

ンプロッティング用の抗体は利用できないことが多い。しかし複数用途に利用できる抗体も多数存在するので、市販の抗体を用いる場合は前もってカタログなどで確認する必要がある。

## □ 準備するもの

- 卓上型マイクロ遠心機
- ローターシェーカー
- マイクロチューブ
- ニードルシリンジ
  
- 細胞
- PBS
- 細胞溶解バッファー (リシスバッファー, 4℃保存)
  - 50 mM HEPES, pH 7.4
  - 150 mM NaCl
  - 1.0% Triton X-100
  - 30 mM sodium pyrophosphate
  - 50 mM NaF
  - 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$
  - 100  $\mu\text{M}$  AEBSF (Pefabloc®, ストック溶液 100 mM)
  - 10  $\mu\text{g/ml}$  leupeptin (ストック溶液 10 mg/ml)

タンパク質分解酵素阻害剤以外はストック溶液として数週間4℃保存可。長期間保存すると $\text{Na}_3\text{VO}_4$ が中合してオレンジ色になる。

界面活性剤は必要に応じて種類・濃度を選択する ( )。

広範なホスファターゼ阻害剤 (sodium pyrophosphate)、セリン/スレオニンホスファターゼ阻害剤 (NaF) およびチロシンホスファターゼ阻害剤 ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ) はリン酸化タンパク質の検出の際やタンパク質のリン酸化が相互作用に寄与している場合に加える。 $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ストック (100 mM) の調製は以下の通り。

適量の粉末を水に溶解させる。この状態ではpH10前後であるが、塩酸を用いてpH7.4に合わせるとバナジウムが中合して溶液はオレンジ色になる。5分間のオートクレーブにより中合はほどかれ溶液も透明になる。

一般に低分子プロテアーゼ阻害剤は不安定なので使用直前に加える。AEBSF (Pefabloc®) は水溶性であり、安定性が高いためPMSFよりも使いやすい。

- 最終洗浄バッファー  
細胞溶解溶液から界面活性剤 (ここでは Triton X-100) とプロテアーゼ阻害剤を除いた溶液
- 免沈用抗体および対照抗体  
対照抗体に用いるものとしてポリクローナル抗体の場合は非免疫血清、モノクローナル抗体の場合はアイソタイプコントロール抗体など
- 担体  
プロテインAアガロースレジン、プロテインGアガロースレジンなどのほかにFLAGやmycエピトープタグなどに対する抗体が共有結合したレジンも市販されている

### 各種界面活性剤

		分子量	CMC (mM)
非イオン性	Brij-35	1,200	0.05~0.1
	NP-40	603	0.05~0.3
	Triton X-100	625	0.2~0.9
	Tween 20	1,228	0.06
ジギトニン		1,229	0.09
陰イオン性	DOC	414.6	2~6
	SDS	288.5	7~10
両性イオン性	CHAPS	614.9	6~10

CMC: critical micellar concentration (臨界ミセル濃度)

## プロトコール

- 浮遊細胞の場合は PBS で 1 回洗浄後、必要な細胞数 ( $0.5 \sim 1.0 \times 10^7$  細胞/サンプル) を遠心 (5,000 rpm, 2 分間) し、ペレットに 1 ml のリシスバッファーを加え、ピペットマンで懸濁後、氷上 30 分間インキュベート。接着細胞の場合は PBS で 2 回洗浄後、リシスバッファー (10 cm ディッシュに対し 1 ml 程度) を加え、数分静置後ピペットマンで懸濁しながらチューブに回収し、氷上 30 分間インキュベート
- 遠心 (15,000 rpm, 15 分間, 4 °C)
- ペレットを取らないように上清 (=ライセート) を新しいチューブに移す

### 2) 免疫沈降

- ライセート 1 ml に対し 5  $\mu$ g 程度の抗体を加える。必ず平行して対照抗体を用いた操作も行う。低温室にてロータリーシェーカーを用い 1~16 時間混和する (通常は 2 時間で十分である)
- 平衡化したプロテイン A または G ビーズの 50% スラリーを 30  $\mu$ l 加え、さらに 1 時間程度混和する
- 遠心 (5,000 rpm, 10 秒程度) 後、上清を除く
- ペレットに 1.3 ml の冷却したリシスバッファーを加え、反転混和後遠心 → 上清除去を 4 回繰り返す (洗浄)
- ペレットに 1.3 ml の最終洗浄バッファーを加え、反転混

免沈は抗原-抗体結合による特異的な反応であるはずだが、非特異的なタンパク質の沈降もよく認められる。このため、目的の抗体による免沈操作と平行して対照抗体を用いた操作も行っておかないと、結果の解釈の際に特異的なタンパク質と非特異的なタンパク質との区別ができないことがしばしばある。よって 1 つの抗体による免沈を行う際は同一細胞ライセートを少なくとも 2 つは用意する必要がある。

溶解後のタンパク質濃度はおよそ 1~数  $\mu$ g/ $\mu$ l 程度とする。

非特異的タンパク質が多く回収される場合は、ライセートに抗体を加える前に対照抗体+レジンとのインキュベートによる非特異的タンパク質の吸着を先に行い、遠心分離後の上清に対し、抗体を加えるとよい。

和後遠心→上清除去

- ペレットに 30  $\mu$ l の 2 × SDS-PAGE サンプルバッファーを加え、10 分間ボイルする
- 遠心 (5,000 rpm, 30 秒間) 後、ニードルシリンジを用いて上清 (~30  $\mu$ l) を回収し、SDS-PAGE を行う

この方法で回収されたタンパク質は変性しているため、ネイティブなタンパク質の回収が必要な場合は別の方法をとる必要がある。酸性バッファー (pH 2.5~3.0) による抗原-抗体結合の破壊が一般的であるが、回収後すぐに中和させる必要がある。エピトープタグに対する抗体を用いた免沈の場合は過剰量のエピトープペプチドを添加することによっても競合的に抗原を溶出させることが可能である。回収抗原の酵素活性評価はレジジンに結合した状態でも行える。



## 実験条件を最適化するコツ

非特異的タンパク質のバックグラウンドが低い場合は (1) バッファー中の塩濃度を上げてみる (2) 界面活性剤をいろいろ試してみる (3) 抗体をいろいろ試してみる (4) 封鎖抗原タンパク質によるサンプルからの非特異的タンパク質の除去のいずれか、あるいは組み合わせて試してみる

- ① 一般に高塩濃度はタンパク質間相互作用を減弱させえる。洗浄バッファー中の NaCl 濃度を最大 1 M まで何ポイントかふってみるとよい。ただし、塩濃度が高いと SDS-PAGE の際に泳動が妨害されるので、最終洗浄ステップは 150 mM NaCl にて行う必要がある。
- ② 各種界面活性剤の性質についても理解しておく必要がある。非イオン性界面活性剤はタンパク質を変性させることはなく、またイオン交換クロマトグラフィーや等電点電気泳動などにも用いることができる。一方、陰イオン性界面活性剤はタンパク質に対し極めて高い親和性をもちタンパク質を変性させる。この変性作用により、膜に存在するほとんどすべてのタンパク質が可溶化される。両イオン性界面活性剤は正味の電荷がないため非イオン性界面活性剤と同様の性質を示す。陰イオン性界面活性剤である DOC, SDS はタンパク質間相互作用を阻害する可能性があるため、共沈実験の際のリシスバッファーには用いない。また、比較的弱いタンパク質間相互作用を共沈実験で証明する場合は非イオン性界面活性剤のなかでも、より CMC (臨界ミセル濃度 = ミセルを形成する最低濃度で、一般に大きいほど可溶化力が高い) の低い Tween 20, Brij 系界面活性剤やサポニンの一種であるジギトニンなどを用いると、弱い相互作用を保ったままパートナータンパク質を共沈させることができる場合がある ( )。

## memo

界面活性剤の選択が重要になる例を 2 つ、サイトカイン受容体と JAK チロシンキナーゼの結合は比較的強いいため、1% Triton X-100 入りの細胞溶解液では結合を示すことはできなかったが、マイルドな界面活性剤である Brij 96 を用いることで示されたり。この理由は相互作用が弱かったことに加え、これらのタンパク質の内因性の免沈率が比較的低いことにも由来していると考えられ

る。実験例で示したように両者を対称介現した場合はこの限りではない。

最近、脂質の lipid raft は 1% Triton X-100 を用いて 4℃、30 分間インキュベーションにでも可溶化しない膜成分と定義される。注目するタンパク質がこの分画に局在する場合は溶解後のペレットを SDS で変性・可溶化させて SDS-PAGE を行うなどの確認も必要であろう。

# 🔧 トラブルシューティング

## トラブル

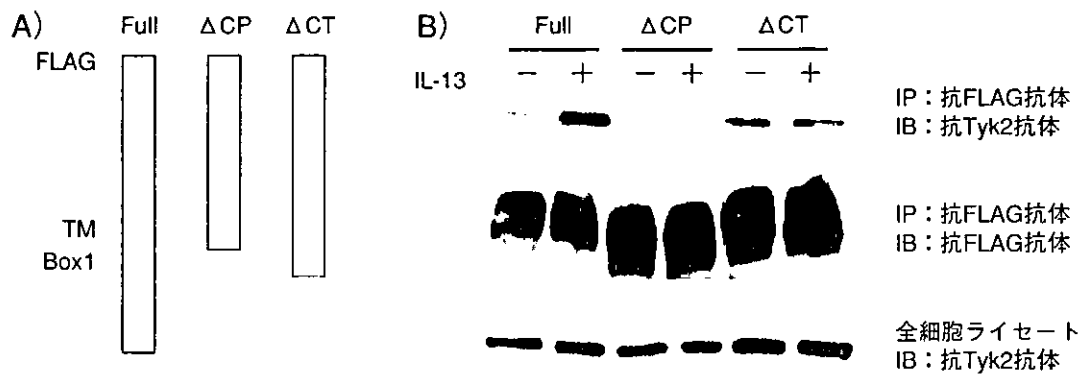
### 起こる原因

結合が認められない	抗体に免疫沈降能がない。	別の抗体を試す。モノクローナル抗体ではなくポリクローナル抗体を用いる。
	ライセートに十分量の目的抗原が含まれていない。	細胞溶解を十分に行う。細胞溶解後のペレットをサンプルバッファーにて可溶化後、SDS-PAGEにより確認する。スタートの細胞数を増やす。
	目的の抗原が分解している。	ライセートの凍結・融解を控える。サンプル中に適切なプロテアーゼ阻害剤を加える。
	洗浄の条件が厳しい。	洗浄回数を減らす。塩や界面活性剤の濃度を下げる。あるいはよりマイルドな界面活性剤を用いる。
	抗体がレジンに結合しない。	抗体の産生宿主とサブクラスを確認する ( )。
	サンプルに妨害物質が存在する。	還元剤は抗体の機能を破壊するので避ける。極端なpHや界面活性剤濃度は抗原抗体反応を阻害する。
非特異的なタンパク質が沈降する	サンプル中にレジンや抗体と非特異的に結合する物質が含まれている。	用いる抗体なしでレジン、あるいは対照抗体+レジンとサンプルをインキュベートした後の上清を免洗に用いる。あらかじめレジんに競合タンパク質としてBSAやゼラチンを飽和量 (0.5~2.0%) 加えることでブロッキングしておく。
	洗浄の条件が適切でない。	洗浄の条件を厳しくする。1 M NaCl, 0.5 M LiCl, 1 M KSCN, 0.2% SDSなどの条件を試みる。洗浄回数を増やす。最後の洗浄を新しいチューブに移してから行う。
	サンプル中のタンパク質が沈殿を生じている。	抗体を添加する前にサンプルを13,000 Gで30分間遠心し、不溶性タンパク質や膜分画を除去する。

遺伝子・タンパク質を解析する

## 実験例

IL-13受容体 $\alpha 1$ 鎖 (IL-13R $\alpha 1$ ) と Jak 分子ファミリーの Tyk2 が細胞内で会合することを共沈実験にて示した (図 5)。COS7 細胞に対し、FLAG エピトープを N 末端に付加した IL-13R $\alpha 1$  野生型 (Full) あるいは細胞内領域欠失 ( $\Delta$ CP), 細胞内 Box1 領域よりも C 末端側の欠失 ( $\Delta$ CT) 変異体の発現プラスミドのいずれかと Tyk2 発現プラスミドとをコトランスフェクションさせた。24 時間後に IL-13 添加あり・なしとし、さらに 6 時間培養後、0.5% Triton X-100 を含むリシスバッファーに



### IL-13R $\alpha$ 1 と Tyk2 の会合

A に発現させたコンストラクトを模式的に示した。TM：膜貫通領域，IP：免疫沈降，IB：イムノ（ウエスタン）プロットティング（Umeshita-Suyama, R. et al. : Inter. Immuno. 12 : 1499-1509, 2000 より転載）

て細胞ライセートを調製した後，抗FLAG抗体にて免沈を行った。回収したタンパク質サンプルに対し抗Tyk2抗体（B上段），抗FLAG抗体（B中段）にてウエスタンプロットティングを行った。B下段は免沈を行わずに調製した細胞ライセートに対する抗Tyk2抗体でのウエスタンプロットティングの結果を示す。実験の結果，野生型IL-13R $\alpha$ 1分子とTyk2分子はIL-13刺激依存的に会合すること，および両者の会合にはIL-13R $\alpha$ 1細胞内のBox1領域が関与していることが示された。なお，中段で抗FLAG抗体により検出されたバンドが幅広くなっているのは膜タンパク質であるIL-13R $\alpha$ 1分子に対する糖鎖付加の結果である。

## おわりに

ポストゲノム時代を迎え，タンパク質の機能解析という観点から相互作用タンパク質の解析はこれまで以上に重要性を増している。いい抗体さえあれば，免疫沈降法はタンパク質間相互作用を証明するための最も簡便でかつ最も決定的な実験であるといえる。

### 参考文献

- 1) Adams, P. D. et al. : "in Protein-Protein Interactions (Erica, G. /ed.)" , pp59-74. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2002
- 2) 山本和博, 東昌市 : 「改訂第3版タンパク質実験ノート下巻」(岡田雅人, 宮崎香/編), pp111-117, 羊土社, 2004
- 3) 船戸洋佑 : 「タンパク質実験ハンドブック」(竹縄忠臣/編), pp234-238. 羊土社, 2003
- 4) PIERCE社ホームページ (<http://www.piercenet.com>)
- 5) Johnston, J. A. et al. : Nature, 370 : 151-153, 1994

# ウエスタンブロッティング法

金地 佐千子, 有馬和彦, 金地泰典, 出原賢治

- ・雑多なタンパク質のなかから目的タンパク質を高感度かつ特異的に検出する方法。
- ・免疫沈降法と組合せることにより特異的修飾を受けたタンパク質や、タンパク質間相互作用の検出が可能。

## 研究への応用のヒント

ウエスタンブロッティングとは電気泳動後のタンパク質をメンブレンに転写し、試料中の目的タンパク質を特異的な抗体によって検出する実験法である。二次抗体として酵素結合IgGなどを用いることにより高感度で特定のタンパク質を検出することができる。サンプル中の目的タンパク質量が少なくCBB染色などで検出できない場合や細胞溶解液のような雑多なタンパク質のなかから目的タンパク質を特異的に検出する場合に有効な手段である。さらに、サンプル中に占める目的タンパク質の割合が非常に低い場合でも免疫沈降法（3章-3参照）との組合せにより検出することが可能となる。免疫沈降後のウエスタンブロッティングはリン酸化などの修飾を受けたタンパク質を特異的に検出したい場合や目的タンパク質との相互作用を証明したい場合にも有用な手段である。

実験を始めるに当たっては抗体がウエスタンブロッティングに使用できること、すなわちゲル内に展開した変性タンパクを認識できる抗体であることを確認する必要がある。市販の抗体を購入する場合は文献や製品データシートなどの情報を参照し、そうでない場合は濃度検定も含めて予備実験を行い、よく検討する必要がある。

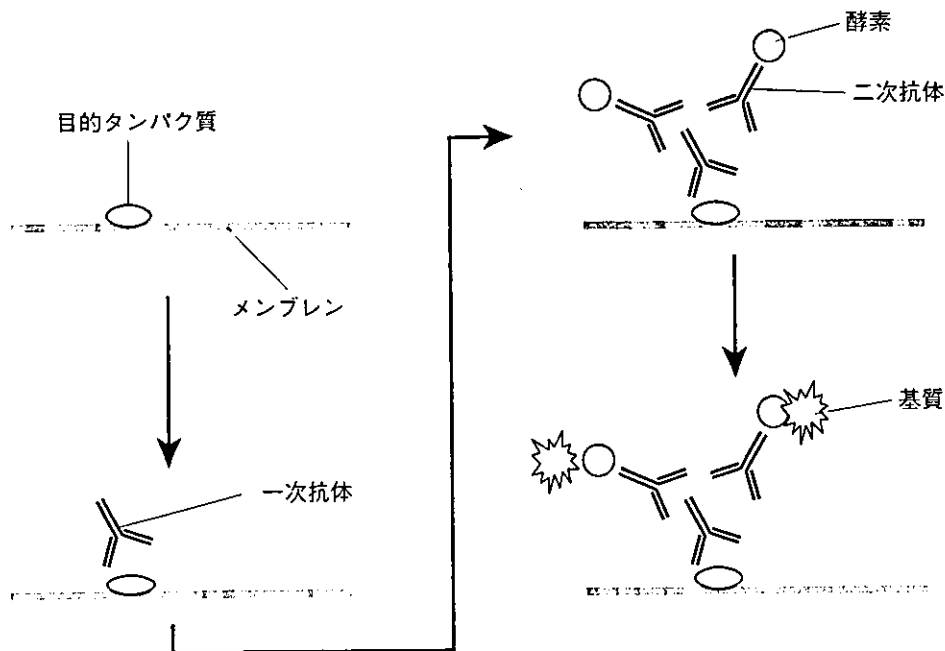
## 原理

ウエスタンブロッティングの原理を以下に示す( )<sup>1)</sup>。  
SDS-PAGEによりタンパク質を分子量に従って分離する

タンパク質をメンブレンへ電氣的に転写する

タンパク質への非特異的吸着を防ぐためのブロッキングを行う

一次抗体反応



### ウエスタンブロットの原理

メンブレン上に転写したタンパク質を特異的に認識する抗体（一次抗体）と反応させる。洗浄操作により未結合の一次抗体を除去した後、さらに一次抗体を特異的に認識する二次抗体と反応させる。酵素標識した二次抗体を用いると、酵素活性を利用して化学発光シグナルとして検出することができる

二次抗体反応（酵素標識）

二次抗体に結合させた酵素活性を利用してシグナル検出

## 準備するもの

1) 器具

- 転写装置（セミドライ型）
- PVDFメンブレン（Amersham Biosciences社、Hybond-P）、  
またはニトロセルロースメンブレン
- シェイカー
- ピンセット（先の尖っていないもの）
- プラスチックケース
- 濾紙

2) 溶液

- 転写バッファー
 

グリシン	144 g
Tris	3.0 g
メタノール	200 ml
純水	
Total	1,000 ml

PBS-0.1 % Tween20 (洗浄バッファー)

10 × PBS	100 ml
Tween20	1 g
純水	
Total	1,000 ml

ブロッキングバッファー (5 % スキムミルク/PBS-0.1 % Tween20)

スキムミルク	5 g
PBS-0.1 % Tween20	100 ml
10 % Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	1 ml
Total	100 ml

一次抗体

二次抗体 (HRP 標識)

化学発光検出試薬 (ECL, Amersham Biosciences 社)

X線フィルム

: 二次抗体の標識法としてはラジオアイソトープを用いないで行える HRP (horseradish peroxidase), AP (alkaline phosphatase) などの酵素が用いられる。AP 標識の場合は発色法でメンブレンを染色してシグナルを検出するが、HRP の場合は X 線フィルムに露光して化学発光シグナルを検出することが多い。化学発光法は発色法に比較して感度が高く、反応が速い。またメンブレンを再利用してリプローブできることから HRP 標識を化学発光で検出する方法が一般的である。

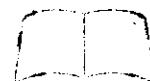
: 二次抗体検出試薬としてわれわれは Amersham Biosciences 社の ECL (HRP 標識抗体検出用) を使用している。Amersham Biosciences 社の ECL-plus, Pierce 社の Supersignal west などさらに高い感度の検出試薬も販売されており、一次抗体、二次抗体をさらに希釈して用いることができるといったメリットがある。しかし弱いシグナルが検出できる一方で短時間の露光でもバックグラウンドが高くなったり、非特異的シグナルが高くなってしまいうという欠点もある。

## プロトコール

SDS-PAGE によりタンパク質を分子量に従って分離する

PVDF メンブレンを 100 % メタノールに 10 秒程度浸した後転写バッファーに浸しておく。PVDF メンブレンと同じ大きさに切った濾紙 6 枚を転写バッファーに浸しておく

電気泳動終了後ゲルの不要部分を切り捨て、転写バッファーに浸す



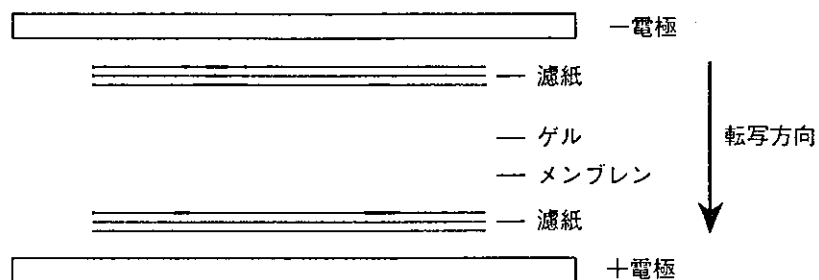
電気泳動の際にプレステインドマーカーを用いると、転写の確認が容易である。Amersham Biosciences 社や Invitrogen 社などから各バンドが異なる色素で着色したマーカーもあり、分子量との比較が容易にできる。また転写後のメンブレンをブロッキング前に Ponceau S 染色液で染色することによってタンパク質がメンブレンに転写されたことを確認することもできる。この方法だとマーカーのレーンだけでなく、メンブレン全体の転写パターンを確認することができる。感度は CBB にやや劣るが脱色が容易で、その後の抗体との反応に影響を残さない。

## MEMO

スキムミルクにはリン酸化タンパク質が多く含まれているので、一次抗体に抗リン酸化抗体を用いるウエスタンブロットティングのブロッキングには BSA を使用する

る。フィッシュゼラチンにはビオチン様物質が含まれるのでビオチン標識二次抗体を使用する場合は使用できない。





### セミドライ型転写

転写バッファーで湿らせた濾紙の上にメンブレンとゲルを載せ、再び転写バッファーで湿らせた濾紙で挟んで通電する。気泡が入ってしまった場合はもう一度バッファーに浸けるか、ガラス管などを転がして押し出す

- 転写装置の+電極の上に転写バッファーを塗布し、気泡が入らないように転写バッファーに浸しておいた濾紙を3枚載せる。その上にPVDFメンブレンを置き、その上にゲルを載せる。さらに濾紙3枚を載せ-電極を載せる( )<sup>2)</sup>
- ゲルの面積1 cmあたり2 mAの定電流で60～90分間転写を行う
- 転写終了後メンブレンをブロッキングバッファーの入ったプラスチックケースに移して1時間、あるいは4℃で一晩放置する
- 一次抗体をブロッキングバッファーまたはPBS-0.1%Tween20で適当な濃度に希釈して室温で1時間メンブレンと反応させる
- PBS-0.1% Tween20で10分間、3回洗浄する
- 二次抗体をPBS-0.1% Tween20で希釈し、室温で1時間メンブレンと反応させる
- PBS-0.1% Tween20で10分間、3回洗浄する
- ECLの1液と2液を等量混合し、1分間メンブレンと反応させる
- 数枚重ねたキムワイブの上で余剰の基質溶液を除去し、ラップで包むかハイブリバッグに入れてシールする
- 暗室にてメンブレンのタンパク質が転写されている面が

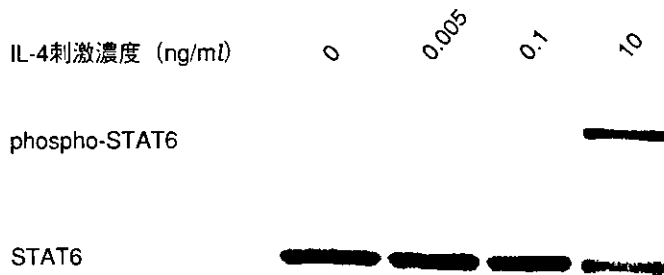
PVDFメンブレンはニトロセルロースメンブレンより少し高価であるが、タンパク質の結合能力が高く、強度に優れる。ニトロセルロースメンブレンを使う場合はメタノール前処理は必要ない。

転写装置にはセミドライ型の他にウェット型がある。ウェット型は必要バッファー量が多く、転写時間も長く必要であるが、高分子タンパク質の転写効率がよい。またメンブレンを扱う際は必ず手袋を着用し、先の尖っていないピンセットを用いる。素手で扱おうとケラチンが混入したり現像時に指紋が写ったりする。

一次抗体希釈液やブロッキングバッファーはアジ化ナトリウム(NaN<sub>3</sub>)を添加し、4℃保存可能である。ただしアジ化ナトリウムはペルオキシダーゼを阻害するので、洗浄バッファーなどに入れると発色反応が起こらなくなってしまう。

最近ではCCDカメラを用いて化学発光のシグナルを検出するシステムがよく用いられるようになっており、われわれはLAS-1000Plusを利用している。このシステムを用いるとX線フィルムを介することなくシグナルを検出するとともに画像処理や定量解析を簡単に行える。ただし感度という点では、非常に弱いシグナルを検出する場合はX線フィルムより優れているとはいえない。





### 実験例

HEK293T 細胞に STAT6 を強制発現させ、IL-4 刺激 30 分後、リン酸化 STAT6 抗体 (Tyr641) でウエスタンブロットした。さらに同じメンブレンを STAT6 抗体でリブロットした

転写バッファー中に 0.04% 程度の SDS を添加すると転写効率が上がる場合もある。

☞ 抗体がウエスタンブロッティングに使用できることをドットブロットなどで確認する。一般にネイティブな状態のタンパク質に対して作製した抗体はウエスタンブロッティングに使用できないことがある。そのような場合は非還元状態で SDS-PAGE を行うと改善する場合もある。

☞ 一次抗体、二次抗体の濃度検定を行う。

☞ 一次抗体の特異性が低い場合はアフィニティー精製を行う。

バンドがたくさん出る、バックグラウンドが高い

タンパク質量が多すぎる、抗体濃度が高すぎる。

ブロッキングが不十分。

洗浄が不十分である。

☞ 電気泳動に用いるタンパク質量を少なくする。

☞ 一次抗体、二次抗体の濃度検定を行う。

☞ 特に化学発光で検出する場合は他の方法で検出する場合よりも低い濃度で最適化されることが多い。

☞ ブロッキング時間を長くする。ブロッキング試薬の濃度を高くする。

☞ 1~10% BSA, 0.5~3%ゼラチンなど他のブロッキング剤を使用する。

☞ ブロッキングバッファー中の界面活性剤の濃度を調整する。

☞ 洗浄バッファーの量を多くし、洗浄時間および回数を増やす。あるいは振盪条件を変える。

### 実験例

IL-4 が受容体に結合すると Jak チロシンキナーゼ分子群が活性化され、STAT6 のリン酸化を誘導する。HEK293T 細胞に STAT6 を一過性に発現させた。リポフェクション 24 時間後、各濃度の IL-4 にて 30 分間刺激を行った。細胞溶解後、SDS-

PAGEを行い、リン酸化STAT6抗体 (Tyr641) でウエスタンブロッティングを行った。同じメンブレンをストリッピングバッファーでインキュベート後、STAT6抗体でリプロットした。すべての試料中にSTAT6タンパク質は同等に検出されたが、リン酸化STAT6シグナルは高濃度のIL-4刺激後に特異的に検出された。

## 」おわりに

免疫学研究においてウエスタンブロッティングは非常によく用いられる手技である。最近ではリン酸化やアセチル化といった修飾タンパクを特異的に認識する抗体や切断されて活性化されたタンパク質に特異的な抗体も市販されている。ウエスタンブロッティングは今後免疫学研究における生化学的解析においてますます重要な手段となってくるものと思われる。

## 参考文献

- 1) Burnette, W. N. : Anal. Biochem., 112 : 195-203, 1981
- 2) 神谷美智子：実験医学別冊「タンパク質実験ハンドブック」(竹縄忠臣/編), pp152-157, 羊土社, 2003
- 3) 奥村宣明：無敵のバイオテクニカルシリーズ「改訂第3版 タンパク質実験ノート下巻」(岡田雅人, 宮崎香/編), pp38-47, 羊土社, 2004

j1とAmb a1の間のそれは46%にすぎない。スギ花粉症患者のほぼ全例はヒノキ花粉の飛散シーズンにも症状が惹起される。これにはCry j1とCha o1の間、あるいはもう一方の主要アレルゲンであるCry j2とCha o2の間の非常に強い交叉反応性が関与していることが明らかにされている。しかし、スギ花粉症患者がブタクサ花粉の飛散シーズンに症状が誘発されるということは通常は起こり得ない。これは、相同性があるにしても配列の一致率が低い、すなわち構造的な類似性が低い場合には臨床的に問題となるレベルでは交叉反応しないということの意味している。臨床的に問題となるレベルで交叉反応するかしないかの境界は、アミノ酸配列の一致率が60%前後のところにあるといわれている。このような近縁のアレルゲン間での交叉反応性は、B細胞エピトープだけでなく、T細胞エピトープにおいても幅広く認められている。

上に述べたような分類学上の近縁度に対応した交叉反応ではなく、もっと広範な交叉反応性を示す一連のアレルゲンがあり、パンアレルゲン panallergen と呼ばれている。このようなパンアレルゲンによる典型的な疾患が、花粉症やラテックスアレルギーに合併した口腔内アレルギー症候群 (oral allergy syndrome, OAS) であり、そこに関与しているのは pathogenesis-related proteins (PR 蛋白質) といわれる植物の生体防御に関わる一連の蛋白質群である。これらの蛋白質は進化の過程で高度に保存されており、分類学的な位置関係がかけ離れていても構造的類似性が高く、互いに強く交叉反応する。シラカンバ花粉症患者はその半数以上がバラ科の果物による OAS を合併しているといわれているが、その原因は PR-10 type proteins ともいわれる Bet v1 関連蛋白質である。シラカンバ花粉の主要アレルゲンである Bet v1 と類似の蛋白質が分類学的には決して近縁ではないバラ科の果物(リンゴ, サクランボなど), あるいはセリ科の野菜(セロリ, パセリなど)に含まれており、それが交叉反応する。Bet v1 とリンゴの主要アレルゲンである Mal d1 のアミノ酸

配列には65%の一致が認められている。PR蛋白質以外にも、すべての真核生物の細胞骨格に普遍的に存在するアクチン結合性蛋白質であるプロフィリン profilin や動物の筋肉を構成する蛋白質であるトロポミオシン tropomyosin などが代表的なパンアレルゲンとして知られている。

アレルゲンはごく普通の蛋白質であり、その分子内にはIgE抗体を誘導するための特別な仕掛けというようなものは見いだされていない。分子そのものの構造や機能よりもむしろ、生体内への侵入経路、曝露量や曝露の持続期間、あるいはアレルゲン粒子の粒径や空気力学的特性などが、ホスト側の遺伝的要因とともに、アレルギー疾患における感作や発症、病態に密接に関わっていると考えられる。アレルゲンについてのこのような視点からの詳細な解析も今後の課題である。

(安枝 浩)

### 3) IgE 抗体産生の調節

#### 要 点

- ① Th2細胞はIL-4/IL-13の産生とCD40リガンドの発現を介してB細胞にアレルゲン特異的なIgE産生を誘導する。
- ② Th2様の表現型を持つTc2細胞, マスト細胞および好塩基球などはB細胞にポリクローナルなIgE産生を誘導する。
- ③ B細胞はIL-4/IL-13の刺激によりgermline C $\epsilon$ 転写物を発現し, さらにCD40リガンドの刺激を介してDNAレベルでIgEクラススイッチが誘導される。
- ④ IL-4/IL-13によるI $\epsilon$ プロモーターの活性化にはSTAT6と協調的に作用する他の転写因子も関与している。
- ⑤ IgE産生は抗IL-4/IL-13中和抗体, IL-4変異体およびIFN- $\gamma$ などのみならず, IgE結合性分子によっても抑制される。

### a) IgE 産生の細胞性機構

アトピー性疾患の発症にはアレルゲン特異的な IgE が免疫抗体として重要な役割を果たしている。免疫系はアレルゲンなどの多種多様な外来抗原を認識する T 細胞レセプター (TCR) や B 細胞レセプター (BCR) を発現しているリンパ球の集合体から構成されている。TCR は免疫グロブリンスーパーファミリーに属する  $\alpha$  鎖と  $\beta$  鎖のヘテロ二量体であり、また CD 3 と非共有結合で会合している。TCR が抗原提示細胞を介して抗原を認識すると、CD 3 の活性化を介して T 細胞は抗原特異的に活性化される。一方、BCR は膜型 IgM であり、BCR が抗原を認識すると、BCR の凝集を介して B 細胞は抗原特異的に活性化される。個々の T 細胞や B 細胞が持つ抗原特異性は、系統的な細胞分化の過程で TCR や BCR の可変部が多様なレパートリーを形成することによって、すでに獲得されている。

特定の外来抗原に対する BCR を発現している 1 個の B 細胞が対応する抗原に出会うと、この BCR と同じ可変部を持つ各クラスの抗体が細胞増殖によるクローンの拡大を介して産生される。抗体産生細胞への増殖分化に CD 4<sup>+</sup> T 細胞の関与を必要とする抗原は T 細胞依存性抗原と呼ばれている。このような抗原には TCR と BCR に対してそれぞれ異なった抗原エпитープを持つアレルゲンなどの異種蛋白質がある。T 細胞依存性抗原は活性化 CD 4<sup>+</sup> T 細胞から産生されるサイトカインの種類に依存して B 細胞に IgE, IgG あるいは IgA クラスの抗体を誘導する。たとえば、アレルゲン特異的な Th 2 タイプ CD 4<sup>+</sup> T 細胞 (Th 2 細胞) が産生する IL-4 や IL-13 は IgE と IgG 4 の両抗体産生の誘導に寄与するサイトカインである。また、B 細胞が IgM から IgE, IgG または IgA へとクラススイッチされるためには、活性化 CD 4<sup>+</sup> T 細胞上に発現される CD 40 リガンド (CD 40 L, CD 154) という TNF スーパーファミリーに属する膜蛋白質を介する刺激がさらに必要であ

る。生体内ではリンパ節の濾胞内に外来抗原が侵入すると、B 細胞と濾胞樹状細胞が増殖して胚中心が形成され、最終的には記憶 B 細胞や抗体産生細胞に分化する。また、記憶 B 細胞は次の抗原侵入に際して速やかに抗原親和性の高い抗体を産生する。アトピー患者では特定のアレルゲンに対する記憶 B 細胞が胚中心で長期間生存している。

### b) IgE 産生の免疫応答機構

IgE 抗体産生の誘導には、アレルゲン特異的な B 細胞と Th 2 細胞との接触が必要である (図 I-38)。この細胞接触は、まずアレルゲン/BCR 複合体の形成とそれに続くエンドサイトーシスを介して提示された MHC クラス II 分子/アレルゲンペプチド複合体が TCR と会合することにより始動される。次いで、各種補助刺激分子の相互結合が関与しており、これによって Th 2 細胞と B 細胞のエフェクター機能が発揮される。たとえば、T 細胞 CD 28 が B 細胞上に発現された CD 86 と結合すると、CD 28 シグナルと TCR/CD 3 複合体シグナルとの協調作用を介して IL-4 や IL-13 などの Th 2 サイトカインが産生される。また、B 細胞 CD 40 が T 細胞上に発現された CD 40 L と結合すると、CD 40 シグナルと IL-4 あるいは IL-13 レセプターシグナルとの協調作用を介して BCR である IgM が IgE へとクラススイッチされる。免疫グロブリンのクラススイッチに CD 40 L による CD 40 の活性化が重要な役割を担っていることについては、CD 40 L の遺伝子変異が原因である X 連鎖型高 IgM 症候群の患者では血中の IgE, IgG および IgA が低下あるいは欠損していることから明らかである。

一方、Th 2 細胞以外の血液細胞は非特異的な IgE 産生の誘導に関与している。たとえば、活性化に伴って IL-4 や IL-13 を産生し、かつ CD 40 L を発現する細胞は、異なった BCR を持つ複数の B 細胞と接触することにより、ポリクローナルな IgE 産生の誘導に寄与している。このような細胞には、Tc 2 タイプ CD 8<sup>+</sup> T 細

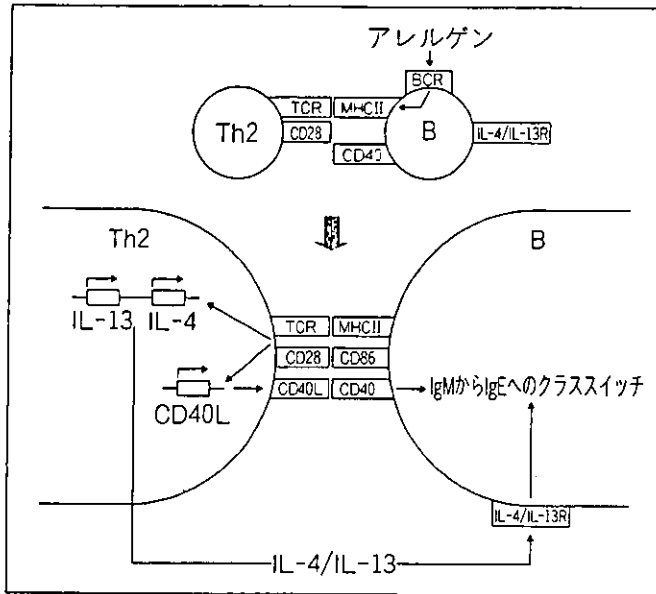


図 I-38. アレルゲン特異的な IgE 産生の誘導機序  
 特定のアレルゲンに対する BCR を発現している B 細胞が Th2 細胞に抗原提示を行うと、まず TCR の活性化を介して IL-4/IL-13 の産生と CD40L の発現が誘導される。次いで、B 細胞の IL-4/IL-13 レセプター (IL-4/IL-13R) と CD40 が活性化されると、BCR の IgM が IgE へクラススイッチされ、最終的には IgE 産生細胞に増殖分化する。

胞 (Tc2 細胞)、マスト細胞、好塩基球および好酸球などがあげられる。アレルゲン特異的な IgE 産生の誘導には Th2 細胞の TCR と B 細胞の BCR との MHC クラス II 分子拘束性の会合が必須であるが、TCR を持たないマスト細胞や好塩基球などの細胞は CD40L 依存性の B 細胞接触を介して IgE 産生の誘導に参与する。また、アトピー患者では Tc2 細胞の出現頻度が高く、さらに Tc2 細胞はリーシュマニアや HIV などの感染のみならず、T 細胞を標的とした遺伝子治療によっても誘導される。CD8<sup>+</sup> T 細胞は TCR を介して MHC クラス I 分子拘束性にウイルス感染細胞を認識して活性化されるが、細胞傷害活性が低下している一部の Tc2 細胞は近傍に存在する複数の B 細胞にポリクローナルな IgE 産生を誘導するとともに、Th2 細胞によって活性化された B 細胞とも接触してアレルゲン特異的な IgE 産生を増強する。

### c) IgE クラススイッチの分子機構

免疫グロブリン重鎖 ( $\mu, \delta, \gamma, \epsilon, \alpha$ ) と軽鎖 ( $\kappa, \lambda$ ) の可変部は抗原特異性を規定しているが、各重鎖の定常部 ( $C_H$ ) はアイソタイプ特異的な生理活性の発現に関わっている。機能的な  $C_H$  遺伝子は重鎖可変部遺伝子断片群 (VDJ) の下流に  $C_\mu - C_\delta - C_{\gamma_3} - C_{\gamma_1} - C_{\alpha_1} - C_{\gamma_2} - C_{\gamma_4} - C_\epsilon - C_{\alpha_2}$  の順に配列されている (図 I-39, 上段)。これらに加えて、 $C_{\gamma_1}$  と  $C_{\alpha_1}$  との間には  $C_\epsilon$  の偽遺伝子 ( $C_{\psi\epsilon}$ ) が、また  $C_{\alpha_1}$  と  $C_{\gamma_2}$  との間には  $C_\gamma$  の偽遺伝子 ( $C_{\psi\gamma}$ ) がそれぞれ挿入されている。各  $C_H$  遺伝子上流には、 $C_\delta$  と  $C_{\psi\gamma}$  を除いて、スイッチ (S) 領域と呼ばれる特徴的な反復配列が存在するが、 $C_{\psi\epsilon}$  の上流に位置する  $S_\epsilon$  はエクソンの一部が欠失している。さらに、各 S 領域の上流には、 $C_{\psi\epsilon}$  の  $S_\epsilon$  を除いて、未熟な germline  $C_H$  転写物の発現に関わる intervening (I) エクソンが位置しており、またこの上流には転写開始活性を持つ  $I_H$  プロ

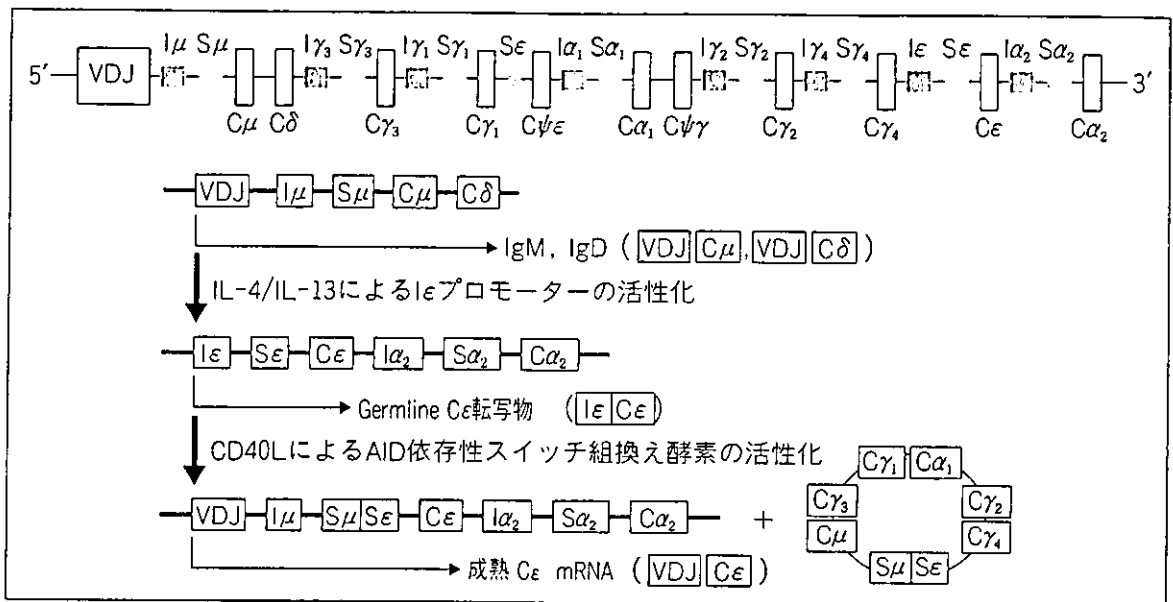


図 I-39.  $C_{II}$  遺伝子の配列と IgE クラススイッチの分子機構

機能的な  $C_{\epsilon}$  遺伝子は  $C_{\gamma_4}$  と  $C_{\alpha_2}$  の両遺伝子の間に挿入されている。また、 $C_{\epsilon}$  遺伝子の上流にはクラススイッチに関わる  $S_{\epsilon}$  領域と germline  $C_{\epsilon}$  転写に関わる  $I_{\epsilon}$  領域がコードされている。IL-4/IL-13 の刺激は  $I_{\epsilon}$  プロモーターの活性化を介して germline  $C_{\epsilon}$  転写物の発現を誘導し、これによって IgM から IgE へのクラススイッチの方向性が決定される。さらに、CD 40 L の刺激が加わると、 $S_{\mu}$ - $S_{\epsilon}$  組換えを介して IgE クラススイッチが誘導される。

モーターが存在する。クラススイッチとは、 $\mu$  鎖の可変部配列、すなわち抗原特異性を変えることなく、 $S_{\mu}$ - $S_{\gamma}$ 、 $S_{\mu}$ - $S_{\alpha}$  あるいは  $S_{\mu}$ - $S_{\epsilon}$  組換えを介して  $C_{\delta}$  以外の  $C_{II}$  遺伝子が再構成される現象である。このような DNA 組換えによって  $C_{\mu}$  が  $C_{\gamma}$ 、 $C_{\alpha}$  あるいは  $C_{\epsilon}$  に置換され、アイソタイプ特異性が獲得される。

IgE クラススイッチでは(図 I-39, 下段)、まず IL-4 や IL-13 刺激による  $I_{\epsilon}$  プロモーターの活性化を介して  $I_{\epsilon}$ 、 $S_{\epsilon}$  および  $C_{\epsilon}$  をコードしている DNA が RNA に転写され、次いで  $S_{\epsilon}$  のスプライシングによって  $I_{\epsilon}$  と  $C_{\epsilon}$  が連結した germline  $C_{\epsilon}$  転写物が発現される。このような未熟な転写物が発現されることによって IgM から IgE へのクラススイッチの方向性が決定される。さらに、CD 40 L の付加刺激によって activation-induced cytidine deaminase (AID) というユニークな RNA 編集酵素の発現が誘導され、また AID の下位にはスイッチ組換え酵素が位置している。実際、AID 遺伝子に変異があると、免疫グロブリンのクラススイッチが障害されて常染色体劣性高 IgM 症候群が

引き起こされる。スイッチ組換え酵素はまだ同定されていないが、IgE クラススイッチに関しては、AID の発現に依存して  $S_{\mu}$ - $S_{\epsilon}$  組換えが誘導され、また両 S 領域間に存在する  $C_{\mu}$ 、 $C_{\delta}$  および  $C_{\gamma}$  などの遺伝子群が環状化 DNA として染色体からループアウトされ、その結果可変部をコードしている遺伝子群が  $C_{\epsilon}$  遺伝子のすぐ上流に転座する。最終的には、RNA 転写とスプライシングにより可変部と  $C_{\epsilon}$  が連結した成熟  $C_{\epsilon}$  mRNA が発現され、 $\epsilon$  鎖蛋白質に翻訳される。

#### d) IL-4/IL-13 シグナルと germline $C_{\epsilon}$ 転写

IgE クラススイッチに先行する germline  $C_{\epsilon}$  転写物の発現には、IL-4 や IL-13 刺激による  $I_{\epsilon}$  プロモーターの活性化が必要である。機能的な IL-4 レセプター (IL-4 R) 複合体は IL-4  $R_{\alpha}$  鎖 (IL-4  $R_{\alpha}$ , CD 124) と他のサブユニットから構成されるヘテロダイマーであり、またその会合サブユニットが IL-2  $R_{\gamma}$  (common  $\gamma$  鎖,  $\gamma_c$ , CD 132) であるものはタイプ I IL-4 R, IL-



IL-13 $\alpha$ 1であるものはタイプII IL-4 Rと呼ばれている(図 I-40)。IL-13 $\alpha$ にはIL-13 $\alpha$ 1 (CD 213 a 1) とIL-13 $\alpha$ 2 (CD 213 a 2) の2種類のサブタイプが存在するが、IL-13 $\alpha$ 2は細胞内領域が極めて短いので、シグナルを伝達しないおとりの受容体であると考えられている。これに対して、IL-13 $\alpha$ 1はIL-4 $\alpha$ とヘテロダイマーを形成するので、タイプII IL-4 RはIL-13 Rとしても機能している。末梢血や扁桃などのB細胞は、タイプIとタイプIIの両IL-4 Rを発現しているが、IL-13 $\alpha$ 2は発現されていない。

サイトカインの細胞内シグナル伝達には複数の経路が関与しており、特にJanus kinase (JAK)-signal transducer and activator of transcription (STAT) 経路が必須な役割を果たしている。IL-4 $\alpha$ にはJAK1、 $\gamma$ cにはJAK3、IL-13 $\alpha$ 1にはTYK2がそれぞれ恒常的に結合している。IL-4はJAK1とJAK3を、またIL-13はJAK1とTYK2を活性化することによって、まずIL-4 $\alpha$ の細胞内領域のチロシン残基をリン酸化する。次いで、

細胞質に存在するSTAT6がそのSrc homology (SH) 2ドメインを介してIL-4 $\alpha$ のチロシンリン酸化部位に結合する。さらに、IL-4 $\alpha$ に結合したSTAT6がチロシンリン酸化を受けると、IL-4 $\alpha$ から解離するとともに、ホモダイマーを形成して核内に移行する。最終的には、IL-4やIL-13応答性のI $\epsilon$ プロモーターのSTAT6結合配列に結合し、その結果I $\epsilon$ 転写が促進される。このように、IL-4 $\alpha$ はSTAT6の活性化に関わるIL-4 RとIL-13 Rの共有サブユニットである。また、STAT6の活性化はIL-4 $\alpha$ の細胞外領域における50 Ile-Val多型の影響を受け、たとえばアトピー患者で頻度が高いIle型は正常者で頻度が高いVal型に比べて数倍強くSTAT6を活性化する。また、I $\epsilon$ プロモーターにはSTAT6のみならず、PU.1やNF- $\kappa$ Bなどに対する結合配列も存在する。

IL-4 $\alpha$ の細胞内領域には、JAK1との結合部位であるBox1という領域のみならず、インスリンレセプターと相同性を示すinsulin/IL-4 receptor (I 4 R) と呼ばれる領域も存在する(図

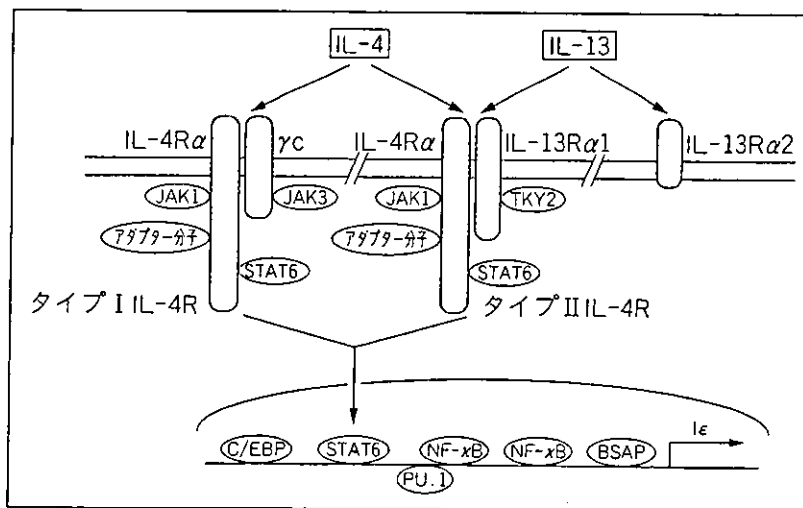


図 I-40. IL-4/IL-13 シグナルによる I $\epsilon$  プロモーターの活性化  
IL-4/IL-13 がタイプ I やタイプ II の IL-4 R に結合すると、JAK 依存的に STAT 6 が活性化される。細胞質から核へ移行した STAT 6 は I $\epsilon$  プロモーター中の特定配列に結合することにより I $\epsilon$  転写を促進する。また、I $\epsilon$  プロモーターには STAT 6 と協調的に作用する他の転写因子に対する結合配列も存在し、一部の転写因子は IL-4 $\alpha$  に会合するアダプター分子を介して活性化される。

I-41). I4R の NPXY (Asn-Pro-X-Tyr) モチーフには phosphotyrosine binding (PTB) ドメインを持つ insulin receptor substrate (IRS) や Src homologous and collagen (Shc) などのいわゆるアダプター分子が結合する。また、IRS には phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) が会合し、この酵素の脂質産物に依存して protein kinase C (PKC) アイソザイムが活性化される。PI3K は p85 調節サブユニットと p110 触媒サブユニットから構成されるヘテロダイマーであり、p85 サブユニットはその SH2 ドメインを介して IRS に存在する YXXM (Tyr-X-X-Met) モチーフと結合する。一方、Shc に関しては、phospholipase C $\gamma_1$  との会合を介して 1, 2-diacylglycerol 依存性の PKC アイソザイムが活性化される。IRS あるいは Shc を介して活性化される PKC の下流には、STAT6 と協調的に作用する PU.1 や NF- $\kappa$ B が位置しているので、IL-4 や IL-13 による I $\epsilon$  転写の促進には JAK 依存性の STAT6 に加えて、PKC 依存性の転写因子も関与している。

### e) B 細胞を標的とした IgE 産生の抑制

IL-4/IL-13 依存性の IgE 産生は、抗 IL-4/IL-13 中和抗体、IL-4 変異体、可溶性 IL-4 R $\alpha$ 、

チロシンキナーゼ阻害剤および PKC 阻害剤のみならず、IFN- $\gamma$ 、TGF- $\beta$ 、IL-12 および IL-18 などのサイトカインによっても抑制される。IgE 産生を抑制する代表的なサイトカインは IFN- $\gamma$  であり、これは IL-12 の刺激を受けた T 細胞や NK 細胞から産生される。また、IL-12 は IL-18 の刺激を受けたマクロファージから産生される。しかし、アトピー患者では IL-12 や IL-18 による IFN- $\gamma$  産生能が不全を示す症例が存在する。このような症例では IL-12 R $\beta_2$  cDNA や IL-18 R $\alpha$  cDNA に塩基欠失を伴った異常が認められるので、これらの遺伝子異常は IFN- $\gamma$  産生を抑制することにより IgE 産生の増強に関与している。IFN- $\gamma$  は、STAT1 の活性化を介して CIS (cytokine-inducible SH2-protein) ファミリーの一員である JAK binding protein (JAB) と呼ばれるシグナル終結分子を誘導することにより、IL-4/IL-13 による STAT6 の活性化を抑制するので、IFN- $\gamma$  による IgE 産生の抑制には JAB が重要な役割を果たしている。

一方、IgE 結合性分子は、IgE クラススイッチを終了した IgE<sup>+</sup> B 細胞上の膜型 IgE と結合することにより、IgE 産生をクラス特異的に抑制する。たとえば、高親和性 IgE レセプター (Fc $\epsilon$ RI) の IgE 結合サブユニットである  $\alpha$  鎖を可溶性化した分子 (sFc $\epsilon$ RI $\alpha$ ) は 1 分子の膜型

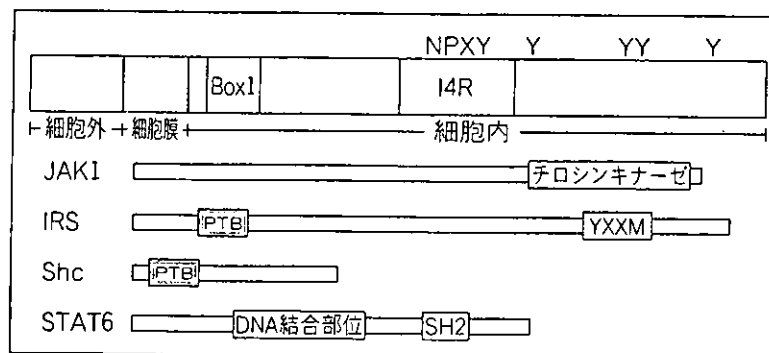


図 I-41. IL-4 R $\alpha$  の細胞内領域に結合する分子群  
I4R 領域の NPXY モチーフのチロシン残基(Y)が JAK によってリン酸化されると、この部位に PTB ドメインを持つ IRS や Shc などのアダプター分子が特異的に会合する。なお、Box1 には JAK1 が恒常的に結合しているが、STAT6 はその SH2 ドメインを介して NPXY モチーフ以外のリン酸化チロシン残基に結合する。

IgEと結合することによりIL-6のオートクリン産生を抑制し、その結果IgE<sup>+</sup>B細胞からIgE産生細胞への分化が抑制される。これに対して、抗IgE抗体は2分子の膜型IgEを架橋することによってIgE<sup>+</sup>B細胞にアポトーシスを誘導する。このように、sFcεRIαと抗IgE抗体によるIgE産生の抑制機序は異なっている。

(柳原 行義)

#### 4) IgE受容体 (FcεR) の構造と機能

##### 要 点

- ① マスト細胞はアレルギー炎症の中心的なコンダクターとして働くが、このマスト細胞活性化の鍵となる分子が高親和性IgEレセプター (FcεRI) である。
- ② FcεRIは、α、β、γの三つのサブユニットから構成され、α鎖はIgE結合サブユニットであり、β、γ鎖はシグナル伝達サブユニットである。
- ③ FcεRI遺伝子の発現制御機構が解明されつつあり、アレルギーの病態解析や新しい治療法の開拓に向けて成果が期待される。
- ④ IgE、FcεRIを標的にしてIgE結合を阻害することによって、アレルギーを制御する戦略が有望である。

アレルギーの科学的な研究は、1921年のPlausnitzとKüstnerによる受け身皮膚アナフィラキシー反応 (passive cutaneous anaphylaxis, PCA) の発見がその嚆矢となった。すなわちアレルギー患者の血清中に存在して、アレルギーを引き起こす受け身移入可能な液性因子 (レアギン: 反応因子) の発見と、この血清成分に反応する末梢組織中の非特異的因子の発見である。前者は1966年に石坂公成によってIgE抗体であることが明らかにされ、さらに1970年代の初めに、後者はマスト細胞 (肥満細胞) であることが示された。このマスト細胞上

でIgEを特異的に結合する分子が高親和性IgEレセプター (FcεRI) で、1989年にMetzger研究室においてKinet, Blankと筆者らによりすべてのサブユニットの遺伝子が単離され、その一次構造が明らかになった (図I-42)。そして現在のIgEによるアレルギー反応の分子的研究の隆盛を迎えることになった。

一方、FcεRにはC型レクチンファミリーに属す低親和性IgEレセプター (CD23/FcεRII) があるが、表I-11にFcεRIと対照して示してあるように、FcεRIIは多くの血液細胞上に発現している (表I-11)。FcεRIIはIgEの外にCD21や接着分子と結合し、また細胞外ドメインのみの分泌型FcεRIIについては、IgE産生調節への関与が示唆されている。本稿ではアレルギー反応を始動する中心的な分子であるFcεRIについて概説する。

##### a) 高親和性IgEレセプター (FcεRI) の分子構造と機能

TCR、BCRや免疫グロブリン受容体 (FcR) などの抗原認識に関わる受容体の原型はFcεRIにある。非共有結合によって会合した複数のサブユニットによって構成される受容体として、FcεRI (α、β、γ鎖) が単離精製された。すなわち、FcεRIはIgEのFcε鎖を特異的に結合するα鎖1個、シグナル伝達に関わるβ鎖1個、γ鎖2個から構成される四量体構造をとる。これらのサブユニットは、細胞膜上で非共有結合によってゆるく会合している。FcεRIそのものに、内因性の酵素活性は同定されていない。FcεRIには総計7個の膜貫通ドメインが存在する (図I-42)。FcεRIは最初マスト細胞、好塩基球に同定され、長い間これらの細胞にのみ特異的に発現しているものと考えられていたが、抗FcεRIα鎖モノクローナル抗体が樹立されて以降、最近になって皮膚のランゲルハンス細胞、一部の好酸球、単球、そして血小板や好中球にも発現していることが明らかになり、それらの細胞におけるFcεRIの生物学的機能に興味を持たれている。

る遺伝子\*の発現誘導やDNA\*合成促進に Box1 は必須である。この領域からやや下流\*の領域は, Ras\*-Raf\*-MAP キナーゼ\*経路および Ras-PI3 キナーゼ経路の活性化に必須で, Bcl-2 の発現誘導にも関与しており, 造血細胞の生存とアポトーシス\*抑制に必要とされている。長期的な細胞増殖には, DNA 合成促進とアポトーシス抑制の両方のシグナルが必要であると考えられる。

IL-3 R と結合し, IL-3 刺激で活性化される JAK として JAK2 がある。IL-3 R  $\beta_c$  鎖と JAK2 の N 末端\*領域が結合し,  $\alpha$  鎖の細胞内領域も JAK2 の活性化にかかわることが示唆されている。JAK2 が活性化されると,  $\beta_c$  鎖の複数のチロシン残基がリン酸化され, 他のシグナル伝達分子とコモン  $\beta$  鎖( $\beta_c$  鎖)結合が可能になる。その中で最も重要な働きを持つと考えられるのが STAT である。STAT5 は  $\beta_c$  鎖に結合すると JAK2 によってリン酸化されて活性化し, レセプターから離れて核へ移行し, 遺伝子の転写\*を促進する転写因子\*として機能する。

Src\*型チロシンキナーゼは  $\beta_c$  鎖に結合すると, アダプタータンパク質\*である Shc, Grb2, \*Sos\*を介して Ras に続いて Raf を活性化する。その下流\*で MEK/ERK 経路, p38 キナーゼ経路, および JNK/SAPK 経路が活性化されて, *c-fos*, *c-jun*\*などの遺伝子の転写を促進する。また, PI3 キナーゼ\*はアダプタータンパク質である Shc, Grb2, Cbl を介して  $\beta_c$  鎖に結合し, Src 型チロシンキナーゼによって活性化されて PKB/Akt を活性化する。これらの経路はいずれも細胞の生存とアポトーシス抑制に重要な役割を果たしており, アポトーシス抑制作用を示す Bcl-2 ファミリー\*の発現を上昇させることで IL-3 依存的な細胞増殖に関与していると考えられている。

#### インターロイキン 4 interleukin 4 (IL-4)

いわゆる Th2 細胞\*型サイトカインの 1 つ

であり, 多くの種類の細胞に作用する多面性を持ったサイトカイン\*である。最初, マウス B 細胞\*において IgG1 産生を誘導する因子として, あるいは抗 IgM 抗体とともに B 細胞の増殖を促す因子として同定され, BSF (B cell stimulatory factor)-1 と名付けられた。その後, cDNA (相補的 DNA\*)がクローニング\*されて IL-4 と改名された。

ヒトとマウスの成熟タンパク質はそれぞれ 129, 120 個のアミノ酸よりなり, アミノ酸レベルで約 50% の相同性を示す。遺伝子\*はともに 4 個のエキソン\*よりなり, ヒト, マウスそれぞれ 5 番 q31-32, 11 番染色体上に位置する。ヒト IL-4 ではエキソン 2 部分が欠損しているスプライス産物である IL-4 $\delta$ 2 の存在が知られている。ヒト IL-4 の結晶構造はすでに決定されており, 左巻きの 4 個の  $\alpha$  ヘリックス\*を持つ構造であり, IL-4 レセプター\* (IL-4 R) と会合する部位が 2 カ所存在する。

CD4\*細胞(その中でも Th2 細胞), マスト細胞\*, 好塩基球, NKT 細胞\*などによって産生される。標的細胞表面上に存在する IL-4R に結合することによって生物活性を引き起こす。免疫系細胞に対する作用としては, T 細胞\*に対しては Th2 型細胞の誘導や増殖作用, B 細胞に対しては IgE\*, IgG1\* (ヒトでは IgG4) へのクラススイッチ\*や CD23, MHC クラス II\* 抗原の発現誘導, 単球\*に対しては抗炎症作用などが挙げられる。

IL-4 ノックアウトマウスでは IgE\*の産生, Th2 型細胞の誘導などが起こらなくなることが示されている。非免疫細胞に対しても, 血管内皮細胞に対して VCAM-1\*などの接着分子\*の発現誘導を, 線維芽細胞\*, 気道上皮細胞に対してエオタキシン\*などのケモカイン\*の産生誘導を引き起こすなど幅広い生物活性を持っている。IL-4 に類似した生物活性を持ったサイトカインとして IL-13\*が知られている。

IL-4 は細胞内において JAK\*/STAT\*経