ウイルス感染での合成ペプチドの応用

白 木 洋*・前 田 義 章*

Serological Application of Synthetic Peptide for Virus Infection

Hiroshi SHIRAKI* and Yoshiaki MAEDA*

The serological application of synthetic peptides in viral infection can be grouped into two categories; antigenic and immunogenic. In the first category, synthetic peptide antigens are used to bind site-specific antibodies raised against the region corresponding to peptide amino acids sequence of the native protein. This site-directed specificity of peptide antigens can be basis for sensitive and specific immunoassay for diagnosis purposes. EIA using synthetic peptides as antigens have been used successfully for diagnosis of viral infection and discrimination between similar viruses. By using site-directed specificity it is also possible to obtain site-specific antibodies from human plasma by affinity column coupled with antigenic synthetic peptides as ligands. These antibodies can be used for analysis of functional domains of the native protein which can neutralize viral infection. In the second category, synthetic peptide immunogens are used to elicit antibodies recognizing the native protein from which the peptide was derived. Antipeptide antibodies have been used for detection, characterization, localization and purification of proteins. This chapter describes the characteristics of antigenic regions on HTLV-I structural proteins, and the serological application of the antigenic peptides in viral infection.

Key words : Synthetic peptide ; Virus infection ; Antigen ; Immunogen ; Enzyme immunoassay ; Diagnosis of virus infection ; Site-specific antibody .

1. はじめに

タバコモザイクウイルスのコート蛋白のC末端の小断片で免疫して作成した抗体に中和抗体活性を見いだしたのが、抗ペプチド抗体作成の最初の報告である¹⁾。この研究は、断片化した蛋白で作成した抗体がもとの蛋白と反応する抗体であったことは断片化した領域の構造がもとの蛋白での構造と似ていたことを示唆していた。その後、ペプチド合成の自動化等合成技術の進展もあって、蛋白上の目的とする領域のペプチドを容易に合成することが可能となり、合成ペプチドを免疫原(生体で免疫応答を惹起するもの)または抗原(惹起された免疫応答の生成物が識別するもの)として、種々の研究分野で使用されている。図1に、ウイルス感染での液性免疫応答の血清学的研究に合成ペプチドを抗原、または免疫原として利用した研究を要約している。免疫原として合成ペプチ

ドを使用した場合、生成する抗体はもとの蛋白の特定領域と特異的に反応する抗体であり、この特異抗体はウイルス蛋白の構造または機能解析の有用な手段となっている。また、免疫原としての合成ペプチドはワクチンとしての応用も期待できる。合成ペプチドを抗原とした場合には、これに反応する抗体はアミノ酸配列に準拠した特定の領域に反応する特異性の高い抗体であり、ウイルス感染診断の有用な手段となるし、さらに、これら領域特異抗体の単離精製も可能となる。この領域特異抗体は蛋白の構造および機能解析の有用な手段となっている。

本稿では、筆者らが合成ペプチドを用いて行ってきたウイルス感染における液性免疫応答についての研究を中心に、合成ペプチドの応用例を紹介したい。

2. ウイルス蛋白上の抗原性領域の検索

10 から 20 アミノ酸残基長の合成ペプチドそのものに免疫原性があるため、蛋白上の免疫原性領域を選択することはそれほど困難なことではないが、蛋白上の抗原性領域を蛋白のアミノ酸配列、組成、それらより推定できる蛋白2次構造を指標として選択することはあまり容易

* 福岡県赤十字血液センター ()

* Fukuoka Red Cross Blood Center ()

Fig.1 Serological application of synthetic peptide.

なことではない。Green らは Influenza Virus 凝集素蛋白の N 末端より順次重複させながら 20 種の合成ペプチド(9 から 39 アミノ酸残基長ペプチド)を合成し、それらの抗原性および免疫原性について検討した²⁾。20 種の合成ペプチドで家兎を免疫したとき、18 種の合成ペプチドに対する抗体はもとの凝集素蛋白と反応する抗体であったのに対して、もとの凝集素蛋白で免疫して得た抗血清は 20 種の合成ペプチドとは全く反応しなかった。この結果は、合成ペプチドの抗原性発現には、その合成ペプチドが対応するもとの蛋白での構造的特徴が関与する可能性を示唆していた。一般に、蛋白には多くの抗原性領域が存在すると考えられているが、その蛋白構造の特徴で分けると、アミノ酸配列に準拠した抗原性領域(Continuous region)と蛋白の 3 次元構造に準拠した抗原性領域(Discontinuous region)となる。合成ペプチドを用いて研究が進んでいるのは主に前者であり、後者の領域は蛋白の立体構造が大きく関与しているため、その蛋白化学的特徴はあまりよくわかっていない。蛋白の抗原性領域を予測するうえで考慮すべきいくつかの構造的特徴が挙げられている³⁾。i) 蛋白分子の末端領域：蛋白の C および N 末端領域は免疫原性が高いこと、また末端領域であるため蛋白の 3 次元構造を取り込まれる頻度が少ないため、領域の自由度が高いことによる。ii) 親水性領域：一般に、蛋白分子上で疎水性領域は分子の内部を、親水性領域は表面に露出していると考えられ、抗体の反応部位は蛋白表面にあると考えられることによ

る。iii) 蛋白のターン構造領域：蛋白分子でのターン構造は蛋白上突出領域を形成している頻度が高いことによる。このような領域が蛋白分子上の構造的特異領域を形成し、それらが抗原性領域となっている可能性が高いことは十分考えられる。iv) アミノ酸組成：蛋白分子でのプロリンやグリシン残基はターン構造上に形成する頻度が高いことによる。これらのいずれもは蛋白の免疫原性領域を推測することを目的として、その構造の特徴を解析した結果であるので、1 部は抗原性領域の検索にも使えるが、絶対的なものではない。

ここで、筆者らが合成ペプチドを用いて行った成人 T 細胞白血病の原因ウイルスである HTLV-I 構造蛋白の抗原性領域についての結果を示す⁴⁾。HTLV-I 構造蛋白は 3 種のコア蛋白(*gag* p19 蛋白、p24 蛋白および p15 蛋白)と 2 種の脂質外被膜(*env* gp46 蛋白と gp21 蛋白)で形成されている。これら 5 種類の構造蛋白の全領域を網羅する合成ペプチドを用いて抗原性領域を検索した。まず、Seiki らにより報告された HTLV-I プロウイルス遺伝子の塩基配列より推定される各構造蛋白のアミノ酸配列⁵⁾に従って、親水性-疎水性領域解析を行った。蛋白のアミノ酸配列より推定される親水性-疎水性領域解析にはいくつかの方法があるが⁶⁻⁸⁾、筆者らは Kyte と Doolittle の方法を用いた。いずれの方法も基本的には構成アミノ酸残基の溶解性に基づいて構築された方法であるのでは似た結果を与える。筆者らの場合、各アミノ酸残基周囲の環境を広く考慮に入れるため、9 アミノ酸

Fig. 2 Hydropathy profiles of HTLV-I structural proteins and location of antigenic regions. □ and ■ indicate the antigenic region and highly antigenic region, respectively. Hydrophilic sequences fall below the center line.

領域での解析を行った。この解析で得た蛋白の親水性-疎水性領域：Chou と Fasman の方法⁹⁾で推定した蛋白 2 次構造でのターン構造，さらにアミノ酸配列でのプロリン残基等を考慮にいれ，合成すべきペプチド領域を選択した。このようにして合成した 52 種の 16-32 アミノ酸残基長のペプチドをプラスチックプレートに固相化し，HTLV-I 感染献血者血清中の抗体との反応性を酵素抗体法で検討した。図 2 に HTLV-I 感染者血清中の抗体と反応した HTLV-I 構造蛋白上のペプチド領域を示している。血清中の抗体は広汎な領域に対応した合成ペプチドと反応していることがわかる。p19 蛋白では 2 箇所，p24 蛋白で 2 箇所，p15 蛋白で 4 箇所，gp46 蛋白で 10 箇所，膜貫通蛋白 gp21 で 6 箇所の合計 24 領域が少なくとも HTLV-I 構造蛋白上のアミノ酸配列に準拠した抗原性領域であることがわかった。これら抗原性領域の

構造蛋白分子上での共通した特徴は，疎水性領域は抗原とはなりにくく，ほとんどの抗原性領域は親水性領域を含んでいることである。さらに，感染者血清検体の 30% 以上が反応する高い抗原性を持つ領域（図中で黒く塗った部分）は蛋白の推定 2 次構造解析でのターン構造を持つか，または蛋白の末端領域にあったことである（図 3）。これらの結果は先に述べた蛋白の抗原性領域を推測する蛋白構造上の特徴は絶対的ではないが，その領域を推定するときの有効な因子であることを示している。

3. 合成ペプチドを用いたウイルス感染診断

一般にウイルス感染を診断するとき，そのウイルス蛋白に対する抗体の有無をもって，そのウイルスに感染しているか否かの判定をする場合が多い。最近，蛋白の高感度微量検出法やウイルス DNA/RNA を Polymerase Chain Reaction 法で増幅し，高感度にウイルス DNA を検出する方法が開発されているが，試料検体の調製や操作が複雑であること等，多数の検体を短時間に検査する方法としてはいくつかの問題点を残している。また，抗体検査では，抗原としてウイルス粒子より

調製したウイルス蛋白または遺伝子組み換えによるウイルス蛋白を使用していることが多いが，抗原の調製過程での生物学的汚染の問題，高分子量抗原であることや抗原調製過程で混入した異物等による非特異反応の発生，さらに常に均一な抗原を維持管理することの難しさ等の問題がある。この点，合成ペプチドを抗原とした抗体検査では，抗原は化学的に高純度に合成できること，均一な抗原を長期間維持管理できること，生物学的汚染の問題がないこと，抗体反応特異性の高い抗原領域を選択することで，非特異反応をなくすることができる等の利点がある。しかし，糖鎖部分に対する抗体の検出はできないので，糖鎖抗体の検出が不可欠な抗体検査には不適である。ここで，筆者らが行った合成ペプチドを抗原とした酵素免疫法による HTLV-I 感染診断のための抗 HTLV-I 抗体検査について，その結果を紹介する¹⁰⁾。

Fig. 3 Secondary structure of HTLV-I structural proteins predicted by the method of Chou and Fasman.

前に述べたように、HTLV-I 構造蛋白には p19 蛋白に 2 箇所、24 蛋白に 2 箇所、15 蛋白に 4 箇所、gp46 蛋白に 10 箇所、さらに膜貫通蛋白 gp21 に 6 箇所のアミノ酸配列に準拠した抗原性領域がある。表 1 にこれらの抗原性合成ペプチドと HTLV-I 保有献血者血清、成人 T 細胞白血病/リンパ腫患者血清(ATLL)および HTLV-I 関連神経症患者(HAM)血清中の抗体との反応性および(本稿での抗体力価は E/A での 492 nm の吸光度 1.0 を与える検体の希釈倍率の逆数で示す)を示す。p19 蛋白の 100-120 の領域、gp46 蛋白の 175-199 の領域、およびその C 末端領域である 288-317 の領域に対応した合成ペプチドは 3 種の HTLV-I 感染者血清の 80% 以上

が反応する高い抗原性を持つこと、さらに前 2 種の合成ペプチドと反応する抗体の力価は他の領域のそれらと比べて高いことがわかった。特に p19 蛋白 C 末端 30 アミノ領域に対応した合成ペプチド(p19 100-130)はすべての HTLV-I 感染者血清の抗体と反応するペプチド領域であることと、その抗体力価はきわめて高いことがわかった。これら 3 種の抗原性ペプチドは抗 HTLV-I 抗体検出での有効な抗原であることを示している。合成ペプチドを抗原とした抗体検査で、その感度および精度を維持するには、抗原として蛋白種が異なる高い抗原領域を複数個用いることが必要と思われる。また、使用する複数の抗原性合成ペプチドは、お互いに抗体検出を補完

Table 1 Peptide reactivity to antibodies in the sera from individuals infected with HTLV-I.

Peptide Code	Healthy Carrier ¹⁾		ATLL Patient		HAM Patient	
	Pos. %	Antibody Titer ²⁾	Pos. %	Antibody Titer	Pos. %	Antibody Titer
		(units±SD)		(units±SD)		(units±SD)
p19 100-119	85	280±524	81	—	100	—
p19 119-120	39	122±239	62	32±22	94	742±765
p19 100-130	100	1232±660	100	818±734	100	2062±1156
p24 131-161	4	3±1	2	8±10	0	—
p24 288-317	18	14±15	2	—	0	—
p15 345-367	17	—	—	—	—	—
p15 366-389	8	—	—	—	—	—
p15 387-411	32	—	—	—	—	—
p15 410-429	8	—	—	—	—	—
gp46 20-49	3	5±1	2	6±3	0	26±16
gp46 89-115	13	9±3	4	10±11	21	84±41
gp46 137-161	1	18±4	—	—	—	—
gp46 175-199	91	456±52	72	458±279	100	963±118
gp46 197-216	1	2±1	—	—	—	—
gp46 213-236	31	7±22	64	8±9	94	41±9
gp46 235-254	8	3±1	25	4±4	52	13±3
gp46 253-282	48	5±2	18	8±12	68	21±6
gp46 277-292	22	5±1	43	—	52	—
gp46 288-317	86	7±1	66	10±9	94	36±6
gp21 332-352	4	4±1	8	5±4	47	95±33
gp21 350-386	7	4±1	4	5±4	26	25±17
gp21 382-403	13	20±9	33	33±55	68	187±70
gp21 400-429	2	6±3	16	4±2	15	30±13
gp21 426-448	4	3±1	10	4±4	5	46±17
gp21 458-488	7	23±5	12	25±26	21	228±91

¹⁾ The number of serum samples from healthy carriers and those with ATLL and HAM were 96, 48 and 19, respectively.

²⁾ Titer was expressed as the dilution time of a serum sample giving absorbance 1.0 at 492 nm. — : not determined.

しあうような抗原であることが望ましい。

筆者らはこれらの点を考慮に入れて、抗原として p19 蛋白 100-130 と gp46 蛋白 175-199 を選択した。この 2 種の合成ペプチドは非特異反応が少なく、しかもこの領域に反応する抗体の検出頻度およびその力価も高い領域で、しかも感染者検体の抗体検出でお互いに補完しあうものであった。血液センターでの献血者抗 HTLV-I 抗体スクリーニングは HTLV-I 感染細胞株より精製した gag および env 蛋白を抗原としたゼラチン粒子凝集法 (PA)で行っている。この方法の抗体検査への導入により、輸血後の HTLV-I 感染はほとんど皆無となり、感染の危険性がある血液を除外する目的の検査法としては簡便な良い方法であるが、少しの偽陽性結果を含むため感染の診断には別の方法による確認検査が必要な検査法である。確認検査法の 1 つに、HTLV-I 感染細胞株 (MT-2) を抗原とした蛍光抗体法 (IF) がある。IF 法は臨床的に有用な検査法で、IF 陽性血液は輸血後感染の危険性があるが、IF 陰性血液では感染しないことが確認されている検査法である¹¹⁾。IF 法は感度および精度で非常に優れた抗体検査法であるが、検査に使用する HTLV-I 感染細胞株を長期間均一に維持管理しなければならないこと、さらに検査結果の判定に少しの熟練を要すること等に問題点を残している。そこで、p19 100-130 および gp46 175-199 を抗原とした抗体検査用 EIA を作成し、これを用いて献血者検体での抗体スクリーニングを行い、その検査法としての評価を行った。1990 年 4 月から 5 月にかけて献血されたすべての検体 21,894 を PA 法で検査し、その陽性検体 438 を IF 法および合成ペプチドを抗原とした EIA で抗体検査を行った。PA 陰性検体は任意に 1228 検体抜き取り同様にを行った。結果は表 2 に要約した。合成ペプチド EIA での検査結果は IF 法でのそれときわめて類似していることがわかる。

Table 2 Results of testing for anti-HTLV-I antibodies in blood donors by synthetic peptide EIA.

		IF	+	+	—	—
PA		SP-EIA	+	—	+	—
+	438		379	0	1	58
—	1228		0	0	1	1228

+, positive for assay; -, negative for assay.
All PA-positive donors (438 of 21,894) are shown; negative donors (1228) were randomly selected.

PA 陽性、IF 陽性と判定された 381 検体は合成ペプチド EIA ですべて陽性であり、PA 陽性 IF 陰性と判定された検体は、1 例を除きすべて合成ペプチド陰性であった。PA 陰性 IF 陰性検体は、1228 検体中 1 例を除いて、ペプチド EIA 陰性と判定された。

このように、合成ペプチドを用いた抗体検査法は非特異反応の少ない、感度および精度に優れた、IF 法に替わり得る簡便な検査法であると思われる。

合成ペプチドを抗原とした抗体検査の特徴の 1 つは、これで検出される抗体は蛋白の特定領域と反応する抗体である点にある。これはウイルス蛋白または遺伝子組み換え蛋白を抗原とした抗体検査法との際立った相違点で、ウイルス感染者血清中のウイルス蛋白の特定領域に対する抗体の変化を合成ペプチドを抗原とした抗体検査では解析できる。ここで、筆者らが得た献血者での C 型肝炎ウイルス (HCV) 感染におけるこの種の応用例を示す。HCV のコア蛋白は感染を診断するための抗体検出に重要な抗原で、この蛋白上には少なくとも 5 箇所の抗原性領域がある¹²⁾。図 4 は、それらの抗原性領域のうち、高い抗原性を示す N 末端側領域 3 箇所の抗原性領域に対応した合成ペプチドと反応する抗体の力価をウイ

Fig. 4 Antibody titers of serum samples from anti-HCV antibody positive blood donors in synthetic peptide EIA. HCV antibody positive sera were selected by a hemagglutination assay. For detection of the HCV sequence in the samples, a PCR was performed with the "nested" primer pairs derived from the 5'-noncoding region of the HCV genome. Antibody titer was determined by the reciprocal of dilution time of serum sample showing the absorbance 1.0 at 492 nm.

ルスゲノムが検出された献血者血清とそうでない血清とで比較したものである。血中にウイルスゲノムが検出できる検体では、相対的に3種のコア蛋白上の抗原性領域に対する抗体の力価は高い値を示しているが、特にコア蛋白の21番目から44番目までの領域に対する抗体力価は、1例を除きウイルスゲノムが検出できない検体のそれらと比較して明らかに高値を示している。しかも、この領域に反応する抗体はすべてのHCV感染者血清中に検出されるので、HCV感染の診断ができるとともに、感染者の感染状況を知る有効かつ簡便な検査法であることを示唆している。表1に示したHAM患者での抗HTLV-I抗体でも同様な結果が得られている。一般に、HAM患者血清中の抗体価は高い傾向にあるが、特に膜貫通蛋白gp21の抗原性領域に対する抗体力価が他の感染者血清のそれらと比較して有意に高い値を示しており、HAM患者での病因解析における興味ある知見と考えられる¹³⁾。このように、合成ペプチドを用いた抗体検査では蛋白の特定領域に対する抗体の動態を解析できるので、感染状態や病因解析の有用な手段となる可能性がある。

4. HTLV-IおよびHTLV-II感染の分別診断

HTLV-Iと類縁ウイルスとしてまれな白血病であるHairy Cell Leukemia患者より分離されたHTLV-IIがある¹⁴⁾。このウイルスの病原性についてまだ不明な点が多く残されているが、このウイルスに感染したヒトが米国南部の薬物常用者、ニューメキシコおよびフロリダの北米原住民、中米パナマおよび南米ブラジル等で報告されている¹⁵⁾が、簡便かつ正確な診断法がないため、このウイルス感染の全体像はあまりよくわかっていない。Shimotohnoらが報告したこのウイルス遺伝子の塩基配列のHTLV-Iのそれとの相同性は約60%で、構造蛋白のア

ミノ酸配列はよく似ている。したがって、ウイルス粒子より調製した蛋白や遺伝子組み換え蛋白を抗原とした抗体検査では、どちらのウイルスに感染したかの診断が困難であった。しかし、合成ペプチドを抗原とした抗体検査ではその対象となる抗体は蛋白の特定領域に対するものであるため、このような類縁ウイルス蛋白を抗体で区別して検出することは期待できる。そのためには、両ウイルス蛋白間で抗原決定部位が異なる高抗原性領域を見いだす必要がある。報告されている両ウイルスの構造蛋白のアミノ酸配列から推定された親水性-疎水性領域、および推定2次構造の結果はきわめてよく似ていた。これらの結果は、HTLV-II構造蛋白上の抗原性領域はHTLV-I構造蛋白上のそれらときわめて類似していることを示唆している。そこで、先に述べたHTLV-I構造蛋白上の高い抗原性を持つ合成ペプチドとそれらに対応したHTLV-IIの合成ペプチドを作成した。それぞれの合成ペプチドを固相化し、日本人由来のHTLV-I感染献血者血清と米国より入手したHTLV-II感染者血清を用いて、各合成ペプチドとの反応性を検討した。表3にその結果を要約した。予想されたように、HTLV-I p19蛋白100-130, gp46蛋白175-199および288-315とそれらに対応したHTLV-II蛋白の合成ペプチドは、両ウイルスに感染したヒト血清中の抗体と高頻度に反応した。この内、HTLV-I gp46蛋白175-199とそれと相同のHTLV-IIの合成ペプチドはそれぞれが由来するウイルス蛋白抗体に特異的で、抗体の交叉反応性は認められなかった。この結果は、この領域の合成ペプチドが感染したウイルス種の区別に有効であることを示している。また、両ウイルスのp19蛋白のC末端30アミノ酸領域には若干の交叉反応性が認められるが、ウイルス感染のよい指標となる領域である。他の合成ペプチドは抗体の交叉反応性または抗体検出頻度に問題があった。表4に、

Table 3 Antigenic peptides of HTLV-II proteins predicted from antigenic peptides from HTLV-I proteins.

Peptides in HTLV-I	Pos.% in Sera		Peptides in HTLV-II	Pos.% in Sera		Sequence homology
	HTLV-I	HTLV-II		HTLV-I	HTLV-II	
p19 100-130	100 (96/96)	0 (0/9)	p19 106-136	53 (49/92)	66 (6/9)	41%
gp46 175-199	90 (87/96)	0 (0/9)	gp46 171-196	0 (0/92)	100 (9/9)	52%
gp46 213-234	30 (31/96)	-	gp46 209-232	0 (0/92)	0 (0/6)	70%
gp46 253-282	47 (46/96)	0 (0/9)	gp46 248-269	19 (18/92)	16 (1/6)	56%
gp46 288-317	85 (82/96)	33 (3/9)	gp46 283-313	93 (86/92)	28 (2/7)	60%

Numbers in parentheses indicate the number of positive in sera from Japanese HTLV-I carriers and U.S. HTLV-II carriers, respectively.

Table 4 Reactivity of synthetic peptides derived from HTLV-I and HTLV-II with sera from HTLV-I and HTLV-II carriers.

Sample code	HTLV-I					HTLV-II				
	p19				gp46	p19				gp46
	100	100	110	119		106	106	116	125	171
	-130	-112	-121	-130	-199	-136	-117	-127	-136	-196
HTLV-I carriers (n=15)										
090-8672	5+ ^{*1}	+	+	3+	5+	5+	-	-	2+	-
090-8673	5+	-	+	4+	5+	3+	-	-	2+	-
061-6613	5+	-	2+	3+	5+	+	-	-	+	-
073-7316	5+	-	2+	5+	5+	5+	-	-	+	-
013-8341	5+	-	2+	5+	5+	2+	-	-	2+	-
311-5280	5+	-	2+	3+	5+	-	-	-	+	-
081-0542	5+	-	2+	+	4+	+	-	-	+	-
454-3212	5+	-	2+	4+	5+	2+	-	-	-	-
035-7575	5+	-	3+	+	5+	4+	-	-	-	-
055-2966	5+	-	3+	5+	5+	-	-	-	-	-
094-3787	5+	-	2+	4+	5+	+	-	-	-	-
037-7596	5+	-	2+	3+	3+	+	-	-	-	-
434-3221	5+	2+	3+	4+	4+	5+	-	-	2+	-
016-1771	4+	-	-	+	5+	-	-	-	-	-
016-1774	5+	-	2+	3+	5+	3+	-	-	-	-
HTLV-II carriers (n=9)										
38-45	-	ND	ND	ND	-	3+	-	2+	-	3+
41-59	-	ND	ND	ND	-	2+	-	-	2+	5+
44-14	+	-	-	-	-	3+	-	-	-	5+
44-26	-	-	-	-	-	3+	-	3+	-	5+
10004	-	-	-	-	-	-	-	-	+	3+
10005	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5+
10007	-	-	-	-	-	5+	-	4+	-	5+
10011	-	-	-	-	-	4+	-	4+	-	5+
10014	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2+

*¹ Sera showing more than 30% decrease of absorbance in the competition EIA were judged to be positive (+). Reactivity is expressed as the absorbance of serum in the ELISA: +, < 0.25; 2+, 0.25-0.50; 3+, 0.50-0.75; 4+, 0.75-1.0; 5+, > 1.0. ND, not done, insufficient quantity of serum available.

Table 5 Sequences of synthetic peptides derived from the p19 gag and gp46 env proteins of HTLV-I and HTLV-II.

Protein	Amino acid sequence									
HTLV-I p19	100			110			120			130
	P	P	P	P	S	S	P	T	H	D
HTLV-II p19										
	C	P	T	T	T	P	P	P	P	P
HTLV-I gp46	175				185			195		199
	F	L	N	T	E	P	S	Q	L	P
HTLV-II gp46										
	F	I	T	S	E	P	T	Q	P	P

The numbers are amino acid positions counted from the N-terminal of the proteins. Asterisks (*) indicate identical amino acid residues.

HTLV-I p19 蛋白 100-130, gp46 蛋白 175-199 およびそれらに対応した HTLV-II の合成ペプチドでの抗体の交叉反応性についての結果を示す。p19 蛋白 C 末端領域には少なくとも 3 箇所の抗原性領域があるが、その交叉反応は C 末端 10 アミノ酸残基領域に起因している。HTLV-I gp46 蛋白 175-199 の領域の抗原決定部位は 191-196 にあるが¹⁶⁾, HTLV-II の対応する領域では 6 個のアミノ酸のうち 4 個のアミノ酸に置換が起こっているため、交叉反応がなくなっていることが示唆された(表

5)。これらの結果を踏まえて、この 2 種の抗原領域を用いて、メキシコ ユカタン半島原住民より採取した PA 陽性、IF 陽性かつウイルス蛋白を用いた EIA 陽性の血清検体についてウイルス感染の分別診断を試みた¹⁷⁾。表 6 に、その結果を要約している。予想されたように、HTLV-II 感染者血清は HTLV-II gp46 蛋白 171-196 に反応している血清で、HTLV-I 感染者血清は HTLV-I gag p19 蛋白 100-130 と反応している血清であると判定された。

Table 6 HTLV-I and HTLV-II infection among the individuals in Yukatan Peninsula of Mexico.

Sample*1 No. Code	PA	IF	Western Blot	Whole Virus ELISA	Synthetic peptide ELISA				
					HTLV-I		HTLV-II		
					100 -130	175 -199	106 -136	116 -127	171 -196
1 0953	+	-	p24	++++	-*2	-	-	-	-
2 367	+	-	p24	++	-	-	-	-	-
3 0492	+	+	p19,p24 p28,p53	++++	++++	++++	+++	-	-
4 0159	+	-	p19,p24	++++	-	-	-	-	-
5 1367	+	+	p19,p24 p53	++++	-	-	++++	++++	++++
6 102	+	+	p19,p24 p28,p53	++++	++	-	-	ND	-
7 x26	+	+	p19,p24	++++	-	-	++++	++	++++
8 x16	+	-	-	+	-	-	-	-	-
9 v187	+	+	p19,p24 p28,p53	+++	++	-	-	-	-
10 v138	+	+	p19,p24 p28,p53	++++	-	-	+++	-	++++
11 Hod-2	+	-	p19,p24	++++	-	-	-	-	-
12 68AC	+	+	p19,p24 p28,p53	++++	+++	-	-	-	-
13 4Mi	+	-	p19,p24	++	-	-	-	-	+++

*1 Sample No. 1-6, 7-10 and 11-13 were obtained from healthy volunteers, prostitutes and patients, respectively.

*2 The sera in PA and IF were described as positive (+) or negative (-). Cut off levels in ELISA are 0.195 in whole virus ELISA, 0.231 in p19 100 I, 0.091 in gp46 175 I, 0.236 in p19 106 II, 0.195 in p19 116 II and 0.175 in gp46 171 II. ND, not done, insufficient quantity of sera available.

最近、筆者らは同様の検査結果を得たアフリカ ガーナ原住民より採取した血液より、実際に HTLV-II ウイルスの分離に成功した¹⁸⁾。これらの結果は、2種類の領域に対する合成ペプチドを用いた抗体検査は簡便な HTLV-I および HTLV-II 感染の分別検査法であることを示唆している。

5. 領域特異的ヒト抗体の精製とその応用

合成ペプチドを用いて蛋白の特定領域に特異的に反応する抗体を作成し、蛋白の構造解析や機能解析に用いる試みが増えてきている。ここでは、領域特異抗体を合成ペプチドを用いたアフィニティーカラムでヒト血漿より分離し、その応用例について述べる。

抗原性合成ペプチドを樹脂に結合させる方法としていくつか報告されている。結合する合成ペプチドの配向性が重要な場合には、ペプチド合成の段階でいずれかの末端にシステイン残基を導入し、その SH 基を用いて樹脂には配向特異的結合させる方法もある¹⁹⁾。筆者らの場合、各抗原性ペプチドの抗原決定部位が定かではなかったもので、合成ペプチド末端アミノ酸基を用いてブロムシアン活性化セファロース 4B に結合させた。このアフィニティーカラム(1 ml)に HTLV-I 感染献血者血漿 50 ml を注入し、洗浄後 3 M NaSCN または 8 M 尿素にて溶出させた。このようにして精製した抗体の反応領域特異性を表 7 に示す。精製された抗体で少し他の抗体の混入が認められるものもあるが、大部分の抗体は目的とした特定

の領域とのみ反応するきわめて領域特異性の高いものであることがわかる。これらの領域特異ヒト抗体は、ヒトモノクローナル抗体と同様に蛋白構造および機能解析等での有用な手段と考えられる。ここでは、HTLV-I 構造蛋白上の感染防止に寄与する中和抗体産生領域の解析についての結果を示す²⁰⁾。中和抗体活性は感染モデルと

Fig. 5 Neutralizing activity of HTLV-I antibodies determined by a syncytium induction assay. Neutralizing activity was determined by a syncytium induction assay using 8C cells as indicator cell and KT₂₅₂ cells as HTLV-I antigen-positive T cell. Titer of neutralizing activity was determined by the reciprocal of protein concentration showing 50% inhibition of syncytium formation induced by co-cultivation of 8C cells with KT₂₅₂ cells.

Table 7 Characteristics of site-specific antibodies purified from human plasma by affinity column chromatography.

Site-Specific Antibody	Reactive Peptide Region																	
	gag p19		env gp46										env gp21					
	100 -119	120 -130	20 -49	89 -115	136 -160	175 -189	197 -218	213 -236	235 -254	253 -282	277 -292	288 -317	332 -352	350 -388	382 -403	400 -429	426 -448	458 -488
Anti p19-100	0.227	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
p19-120	-	1.850	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Anti gp46-20	0.679	-	0.220	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
gp46-89	0.498	-	-	0.896	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
gp46-136	-	-	-	-	0.838	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
gp46-175	-	-	-	-	-	1.890	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
gp46-197	-	-	-	-	-	-	1.559	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
gp46-213	-	-	-	-	-	-	-	1.728	-	-	0.944	-	-	-	-	-	-	-
gp46-235	-	-	-	-	-	-	-	-	1.013	-	-	-	-	-	-	-	-	-
gp46-253	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.488	-	-	-	-	-	-	-	-
gp46-277	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.846	-	-	-	-	-	-	-
gp46-288	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.478	-	-	-	-	-	-
Anti gp21-332	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2.357	-	-	-	-	-
gp21-350	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2.005	-	-	-	-
gp21-382	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2.337	-	-	-
gp21-400	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.882	-	-
gp21-426	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.372	-
gp21-458	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.188

Data are expressed as absorbance at 492 nm.

して、HTLV-I 感染による被感染細胞核の巨大化(Syncytium Formation Assay)を指標として、添加した抗体のその形成阻害効果で測定する方法で行い、HTLV-I 感染細胞として KT 252 と被感染細胞としてネコ由来 8 C 細胞を用いてその活性を定量的に測定した。図 5 にヒト血漿より精製した各領域特異ヒト抗体の中和抗体価を示す。中和抗体活性は gp 46 蛋白の中央領域に対する抗体に認められ、特に 89 から 115 の領域および 175 から 199 の領域に対する抗体に高い活性が認められた。これらの結果は gp 46 蛋白の 89 から 199 の領域またはこれらの領域と蛋白の 3 次元構造上近接した領域に、HTLV-I 感染で重要な機能を果たす蛋白領域があることを示唆している。一般に、ヒトでの HTLV-I 感染は細胞-細胞間感染の形式をとるが、その感染の操作はよくわかっていない。ここで得られた結果は、この感染機作の解析での興味ある知見であると考えている。さらに、ここで得られたヒト血漿から精製された領域特異抗体は HTLV-I 感染防止への臨床応用が期待される。

ヒトでの HTLV-I 感染は輸血による感染がなくなっているのに、母から子への感染が主な感染経路となっている。この経路での感染の防止に、HTLV-I 感染者血漿より調製した γ -グロブリン分画が有効であることが家兎を用いた研究で明らかにされている²¹⁾。ここで述べた gp 46 蛋白の中央領域の抗体に高い中和抗体活性があること、さらに HTLV-I 感染者血清中にはそれらの領域特異抗体の抗体価も高いことは家兎での感染防止実験の結果を強く支持するものである。これらの結果は、合成ペプチドを担体としたアフィニティークラムクロマトグラフィーで HTLV-I 感染献血者血漿より高度に精製濃縮した中和抗体活性を持った蛋白分画は、効果的な HTLV-I 感染防止効果を持つ可能性を示唆している。

Fig. 6 Structure of multi-antigenic peptide. Arrow indicates cleavage site of peptide-Pam resin complex.

6. 免疫原性ペプチドの合成と応用

近年、生化学研究での解析手段として、またウイルス感染におけるペプチドワクチン開発を目指して、蛋白の特定の領域と特異的に反応する抗体を作製する試みが増えてきている。前にも述べたように、10-20 アミノ酸残基長の合成ペプチドはそのものに免疫原性はあるが、作成された抗体は一般にその抗体価は低く、しかも合成ペプチドのもととなった蛋白との反応性が低い傾向にあることは経験的に知られていた。そこで、ウシ血清アルブ

Fig. 7 Characteristics of antibodies produced by multiantigenic peptide (MAP) and KLH-peptide complex. ● : Reactivity to synthetic peptide as antigen, ○ : Reactivity to the native band 3 protein as antigen.

ミンやキーホールリンペットヘモシアニン(KLH)といった蛋白に合成ペプチドを結合させ、それを免疫原として抗体作成することが多かった。この場合、蛋白と合成ペプチドとの結合反応過程で合成ペプチドの免疫原性の変化、それによる非特異抗体の産生、さらには担体蛋白に対する抗体の産生という問題が残っていた。これらの問題を避ける方法の1つに、Posnettらにより報告された免疫原として用いる多抗原性ペプチド(Multi-antigenic peptide, MAP)の合成法がある²²⁾。図6にMAPの基本的な構造を示す。固相樹脂に β -アラニンを介してリジン結合させ、その2個のアミノ基を使って目的とするペプチドを合成する方法である。一般には樹脂につけるリジン残基数は3個で、8個のアミノ基に目的とするペプチドが合成されることになる。この場合、10アミノ酸残基のペプチドでも最終分子量は9,000-10,000となるため、担体蛋白なしでも十分な免疫原性を持っていると考えられている。さらに、このMAPで免疫して作成された抗体にはリジン残基領域に対する抗体は少なく、もとの蛋白との反応性は良かったと報告されている²³⁾。図7はヒト赤血球バンド3蛋白膜貫通領域の合成ペプチドをMAPとして合成したものと従来の1本鎖合成ペプチドをKLHに結合させたもので家兔を免疫し、作成されたそれぞれの抗体をもとの蛋白であるヒト赤血球バンド3蛋白と1本鎖合成ペプチドと反応させ、その反応性を比較したものである²⁴⁾。KLHに結合した1本鎖合成ペプチドの場合、ペプチドに対する抗体価は高いが、もとの蛋白に対するそれはすべて低かった。一方、MAPを用いた場合はもとの蛋白と反応する抗体の力価が高いものが多かった。これらの結果はMAPとして合成されたペプチドは有効な免疫原として期待できる。

7. おわりに

一般に蛋白は2次元構造、3次元構造をとる複雑な分子形態をしている。これまで、主に蛋白のアミノ酸配列に準拠した抗原性および免疫原性について述べてきた。蛋白の抗原性および免疫原性領域には蛋白の3次元構造に準拠した領域が多く関与していると考えられているが、その解析手段が乏しいのが現状である。最近、ファージと大腸菌の力を借りて、ファージの体表上に数千万種類にも及ぶペプチドのランダムライブラリーを作成し、それを用いて生物学的活性分子の結合様式の解析がなされつつある²⁵⁾。この方法は蛋白の3次元構造に準拠した領域の構造解析も可能であると考えられている。これらの領域の解析が進めば、さらに合成ペプチドの応用範囲を広げられるだろう。

稿を終えるにあたり、終始有益なご助言をいただいた、九州大学 大河内一雄名誉教授に感謝いたします。

(平成6年1月31日受理)

文 献

- 1) F.A. Anderer, *Biochim. Biophys. Acta*, **71**, 247 (1963)
- 2) N. Green, H. Alexander, A. Olson, S. Alexander, T.M. Shinnick, J.G. Sutcliffe, R.A. Lerner, *Cell*, **28**, 477 (1982)
- 3) J.W. Gnann, L.L. Smith, M.B.A. Oldstone, *Method Enzymol.*, **178**, 693 (1989)
- 4) Y. Washitani, N. Kuroda, H. Shiraki, Y. Itoyama, H. Sato, K. Ohshima, H. Kiyokawa, Y. Maeda, *J. Clin. Microbiol.*, **30**, 287 (1992)
- 5) M. Seiki, S. Hattori, Y. Hirayama, M. Yoshida, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **80**, 3618 (1983)
- 6) J. Kyte, R.F. Doolittle, *J. Mol. Biol.*, **157**, 105 (1982)
- 7) T.P. Hopp, K.R. Woods, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **78**, 3824 (1982)
- 8) E.A. Emini, J.V. Hughes, D.S. Perlow, J. Boger, *J. Virol.*, **55**, 836 (1985)
- 9) P.Y. Chou, G.D. Fasman, *Biochemistry*, **13**, 222 (1974)
- 10) K. Yamada, N. Kuroda, Y. Washitani, H. Shiraki, Y. Maeda, *Clin. Chem.*, **38**, 699 (1992)
- 11) K. Okochi, H. Sato, Y. Hinuma, *Vox. Sang.*, **46**, 245 (1984)
- 12) C. Ishida, K. Matsumoto, K. Fukada, K. Matsushita, H. Shiraki, Y. Maeda, *J. Clin. Microbiol.*, **31**, 936 (1993)
- 13) M. Nakamura, M. Kuroki, Y. Itoyama, H. Shiraki, N. Kuroda, Y. Washitani, S. Nagafuchi, K. Anzai, T. Tatsumoto, T. Esaki, Y. Maeda, Y. Niho, *J. Neuroimmunol.*, **35**, 167 (1991)
- 14) K. Shimotohno, D.W. Golde, M. Miwa, T. Sugimura, I.S.Y. Chen, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **81**, 1079 (1984)
- 15) H. Lee, P. Swanson, V. Shorty, J.A. Zack, J.D. Rosenblatt, I.S.Y. Chen, *Science*, **244**, 471 (1989)
- 16) Y. Tanaka, M. Yasumoto, H. Nyunoya, T. Ogura, M. Kikuchi, K. Shimotohno, H. Shiraki, N. Kuroda, H. Tozawa, *Int. J. Cancer*, **46**, 675 (1990)
- 17) Y. Washitani, N. Kuroda, H. Shiraki, Y. Nishimura, K. Yamaguchi, K. Takatsuki, L.P. Fernando, C.T. Fang, H. Kiyokawa, Y. Maeda, *ibid.*, **49**, 173 (1991)
- 18) T. Igarashi, M. Yamashita, T. Miura, M. Osei-Kwasi, N.K. Aysi, H. Shiraki, T. Kishimura, M. Hayami, *AIDS Res. Human Retroviruses*, **9**, 1039 (1993)

- 19) J. McCray, G. Werner, *Method Enzymol.*, **178**, 676 (1989)
 - 20) Y. Inoue, N. Kuroda, H. Shiraki, H. Sato, Y. Maeda, *Int. J. Cancer*, **52**, 877 (1992)
 - 21) N. Takehara, Y. Iwahara, Y. Uemura, T. Sawada, Y. Ohtsui, H. Iwai, H. Hoshino, I. Miyoshi, *ibid.*, **44**, 332 (1989)
 - 22) D.N. Posnett, J.P. Tam, *Method Enzymol.*, **178**, 739 (1989)
 - 23) J.P. Tam, Y.A. Lu, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **86**, 9084 (1989)
 - 24) 康 東天, 重村 剛, 黒田直敬, 白木 洋, 濱崎直孝, *生化学*, **63**, 1345 (1991)
 - 25) J.K. Scott, G.P. Smith, *Science*, **249**, 386 (1990)
-

本 誌 廣 告 料 金

表紙	2	1 頁	120,000 円	後付	1 頁	50,000 円
表紙	3	1 頁	90,000 円	〃	1/2 頁	30,000 円
表紙	4	1 頁 (2 色)	180,000 円	綴込 (1 枚)	100,000 円現物持込	
英文目次下	1/2 頁		35,000 円	('92. 3. 改訂実施)		

詳細は下記一手取り扱い社へご照会下さい。

(株) 共 栄 通 信 社

本 社 〒 104 東京都中央区銀座 8-2-1 (新田ビル) 電話 03-3572-3381 (代)
 大阪支社 〒 530 大阪市北区西天満 3-6-8 (笹屋ビル) 電話 06-362-6515 (代)