

単クロン抗体を用いたHTLV-Iのenv蛋白gp46の 抗原構造の解析

戸澤秀樹^a、田中勇悦^a、志田壽利^b、丹生谷博^c、下遠野邦忠^c、白木 洋^d

要約：HTLV-Iのリコンビナント env-gp46抗原、及びHTLV-I感染細胞培養から分離した native env-gp46蛋白に対する合計5種のラット及びマウス単クロン抗体を作製した。これら抗体の間接蛍光抗体法並びにWestern blot(WB)法の反応性は、HTLV-Iのgp46に特異的であった。昨年報告したREY-7を加えて6種の抗体のgp46合成ペプチドとの反応性を検討したところ、N末端側から175-199のペプチドと反応するもの2種、253-282のペプチドと反応するもの2種、288-317のペプチドと反応するもの1種で、残りの1種は今回用いたペプチド断片とは反応しなかった。ILTMOR-2細胞とMolt-4細胞との細胞融合に対し、これら単クロン抗体のいずれも阻止できなかった。

見出し語：HTLV-I、env-gp46、単クロン抗体

研究方法：REY-11及び-16抗体は昨年度の本報告集¹⁾に記載したREY-7抗体作製法と同じであった。MET-2抗体はリコンビナントenv蛋白N-147¹⁾によって免疫したBALB/cマウスの脾細胞とSP-2/Oマウスミエローマ細胞とのハイブリドーマ産生抗体であった。REY-30とMET-3抗体は、MET-2抗体アフィニティーカラムで精製したgp46蛋白で免疫した、WKA/HラットとBALB/cの脾細胞を、それぞれ、YB2/O細胞またはSP-2/O細胞と融合させることによって得たハイブリドーマ由来の抗体であった(表1)。

結果：1)IF法による解析(表2)；HTLV-I感染

細胞や、HTLV-I-proenv-VV感染HeLa細胞の細胞膜や細胞質で陽性の反応が認められたが、HTLV-Iに関連のない細胞とは反応しなかった。MET-2以外の抗体はMT-2やHUT102細胞では未固定及びメタノール固定細胞のいずれでも陽性に染まった。MET-2抗体は未固定細胞では反応しなかった。

2)WB法による解析；表1に示した抗体のうちREY-30以外の抗体は昨年度のREY-7に関する報告¹⁾と同様なパターンを示した。REY-30抗体はMT-2を抗原とした場合gp68抗原を検出しなかった。その他の特異性は残り5種の抗体とほぼ同じであった。

a：北里大学衛生学部(Dept. of Immunology, School of Hygienic Sciences, Kitasato Univ.)、b：京大ウイルス研(Inst. for Virus Res., Kyoto Univ.)、c：国立がんセンター(Nat. Cancer Center Res. Inst.)、d：福岡県赤十字血液センター(Fukuoka Red Cross Blood Center)

表1 Monoclonal antibodies prepared in this study

Animal	Strain	Immunization	Booster	mAb	Ig class
Rat	Lewis	WR-proenv1 ^a	N-147 ^b	REY-7	IgG2 _b
		WR-proenv1	N-147	REY-11	IgG2 _b
		WR-proenv1	N-147	REY-16	IgG2 _b
Mouse	BALB/c	N-147	N-147	MET-2	IgG ₁
Rat	WKA/H	gp ^{46c}	gp ⁴⁶	REY-30	IgG
Mouse	BALB/c	gp ⁴⁶	gp ⁴⁶	MET-3	IgG ₁

a Recombinant vaccinia virus with HTLV-I env gene.

b Purified recombinant HTLV-I gp⁴⁶ antigen expressing C-terminal half 147 amino acids of the gp⁴⁶.

c gp⁴⁶ antigen purified from cell and virus-free culture supernatants of HTLV-I producer cells with MET-2 IgG affinity column.

表2 Cell specificity of mAb reactive with HTLV-I gp⁴⁶ as determined by indirect immunofluorescence assay

Cell	Reactivity of mAb					
	Rat IgG mAb				Mouse IgG mAb	
	REY-7	REY-11	REY-16	REY-30	MET-2 [#]	MET-3
HTLV-I-bearing cells						
MT-2	++	++	++	++	+	++
HUT102	++	++	++	++	+	++
ILT-MOR-2	++	++	++	++	+	++
HTLV-I-negative cells						
Molt-4	-	-	-	-	-	-
HPB-ALL	-	-	-	-	-	-
CCRF-CEM	-	-	-	-	-	-
TALL-1	-	-	-	-	-	-
Raji	-	-	-	-	-	-
Duadi	-	-	-	-	-	-
HPB-NULL	-	-	-	-	-	-
K-562	-	-	-	-	-	-
PHA-PBL(n=3)	-	-	-	-	-	-
HeLa cells infected with:						
WR-proenv-1	++	++	++	++	+	++
WR-gag	-	-	-	-	-	-

Live and fixed cells were examined.

[#]MET-2 did not stain cell membrane.

3)gp46部分合成ペプチドとの反応性(表3) ;表3に示した各々の合成ペプチドをコートしたマイクロプレートを用い Lt-4(抗 tax1抗体)、TA-21(抗 gp21抗体)を対照にして、各抗体の反応性を調べた。6種の抗体のうち MET-2だけはここで用いたいずれのペプチドとも反応しなかった。

4)ATL 患者血清との競合試験 ; REY-7、MET-3は患者血清により TCL-kan 細胞培養上清より分離した gp46を抗原とした場合、その結合が ATL 患者血清で阻止された。これら抗体で認識される抗原決定基は患者抗体によっても認識されていることを示している。

5)HTLV-I 融合阻止反応 ; ILT-MOR-2細胞と

表3 Mapping of antigenic determinants recognized by anti-HTLV-I gp⁴⁶ mAbs with synthetic peptides by ELISA

mAb	gp ⁴⁶					gp ²¹		
	20-49	89-115	175-199	253-282	288-317	350-386	400-426	458-487
REY-7	0.000	0.000	0.372	0.000	0.005	0.001	0.000	0.000
MET-3	0.000	0.004	2.548	0.000	0.006	0.000	0.004	0.122 ^a
REY-11	0.000	0.001	0.000	0.025	0.005	0.001	0.000	0.000
REY-16	0.000	0.000	0.000	0.376	0.002	0.000	0.000	0.000
REY-30	0.000	0.001	0.000	0.000	0.845	0.001	0.003	0.000
MET-2	0.000	0.003	0.000	0.000	0.002	0.000	0.004	0.000
Lt-4	0.000	0.004	0.001	0.004	0.004	0.001	0.002	0.001
TA-21	0.000	0.003	0.000	0.002	0.004	0.002	0.003	0.001

mAbs(1: 10 diluted culture supernatants) were reacted with various synthetic peptides (500 ng/well) at 37 C for 2 hr. Bound mAbs were detected with peroxidase-labeled anti-mouse or rat IgG.

^a Non-specific binding, because the unlabeled peptide, 458-487 could not inhibit the binding of MET-3.

Molt-4細胞との間で巨細胞形成が認められるが、これに対する各抗体の阻止活性を観察した。

ATL患者血清は阻止活性が認められたけれども、今回得られた6種の抗体はいずれも阻止活性を持たなかった。

考察：HTLV-I-env 蛋白 gp46に対するラット並びにマウスの単クロン抗体6種について、その特異性を検討した。これら抗体はすべて、HTLV-I感染細胞やHTLV-I-proenv-VV感染細胞由来のenv-gp46蛋白と関連性のある蛋白と反応した。これら抗体が認識する抗原決定基とHTLV-I-env機能との関連について調べるために、数種のgp46蛋白の部分合成ペプチドを作製し、抗体との反応性を見た。5種の抗体はgp46蛋白の中央からC末端寄りの部分のペプチドと反応し、1種は調べたペプチドのいずれとも反応しなかった。ペプチドとの反応性の陽性な抗体もHTLV-I融合阻止反応が認められなかった事は、これら抗体の認識部位がHTLV-Iの感染に関与する部位と異なるという可能性がある。我々の研究以外にマウス²⁾及びヒト型³⁾の単クロン抗体の作製が報告されてい

る。しかし、それらの報告においてもHTLV-I融合阻止活性は認められていない。ATL患者血清にはHTLV-I融合阻止活性があるので、より多種類の単クロン抗体の作製が必要である。今回の研究で得られた抗体を用いてHTLV-I診断法の改良などについての検討が可能と思われる。

文献

- 1) 戸澤 秀樹、田中 勇悦、志田 壽利、丹生 谷 博：HTLV-Iのenv蛋白gp46に対する単クロン抗体：厚生省心身障害研究、成人T細胞白血病(ATL)の母子感染防止に関する研究斑—昭和63年度研究報告書、pp153-155、1989
- 2) Palker, T. J., et al. : Mapping of immunogenic region of human T cell leukemia virus type I (HTLV-I) gp46 and gp21 envelope glycoproteins with env-encoded synthetic peptides and a monoclonal antibody to gp46. J. Immunol., 142, 971-978, 1989.
- 3) Ralston, S. et al., : Identification and Synthesis of the epitope for a human monoclonal antibody which can neutralize human T-cell leukemia/lymphotropic virus type I. J. Biol. Chem., 264, 16343-16346, 1989.

Preparation and characterization of monoclonal antibodies reactive with human T cell leukemia virus type-I envelope glycoprotein gp⁴⁶.

We have prepared five monoclonal antibodies (mAbs) reactive with HTLV-I gp⁴⁶ antigen from rats and mice immunized with recombinant HTLV-I gp⁴⁶ antigens and native gp⁴⁶ purified from HTLV-I-infected cells by an antibody-affinity chromatography. Reactivities of these new mAbs and previously reported anti-gp⁴⁶ mAb, REY-7, were characterized by immunofluorescence, Western blot and ELISA. These mAbs except one specifically stained cell surface of HTLV-I-bearing cell lines. By using various synthetic peptides deduced from the HTLV-I envelope amino acid sequence, epitopes recognized by five of these mAbs were mapped to the amino acids 175-199, 253-282, 253-282 and 288-317. One mAb did not react with any peptides used. These mAb did not inhibit Molt-4 cell fusion mediated by HTLV-I-infected ILT-MOR2 cells.



検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用

論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



要約:HTLV- のリコンビナント env-gp46 抗原、及び HTLV- 感染細胞培養から分離した nativeenv-gp46 蛋白に対する合計 5 種のラット及びマウス単クロン抗体を作製した。これら抗体の間接蛍光抗体法並びに Westernblot(WB)法の反応性は、HTLV- の gp46 に特異的であった。昨年報告した REY-7 を加えて 6 種の抗体の gp46 合成ペプチドとの反応性を検討したところ、N 末端側から 175-199 のペプチドと反応するもの 2 種、253-282 のペプチドと反応するもの 2 種、288-317 のペプチドと反応するもの 1 種で、残りの 1 種は今回用いたペプチド断片とは反応しなかった。ILTMOR-2 細胞と Molt-4 細胞との細胞融合に対し、これら単クロン抗体のいずれも阻止できなかった。