



|              |  |
|--------------|--|
| Title        | Characteristics of the Epitope of Protein-reactive Anti-Peptide Antibodies.  |
| Author(s)    | 大田, 明生   |
| Citation     | 大阪大学, 1993, 博士論文   |
| Version Type |  |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/38171">https://hdl.handle.net/11094/38171</a>  |
| rights       |  |
| Note         | 著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について〈/a〉をご参照ください。 |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

|            |   |
|------------|---|
| 氏名         | おお 大 田 明 生  |
| 博士の専攻分野の名称 | 博 士 (医 学)   |
| 学位記番号      | 第 10632 号   |
| 学位授与年月日    | 平成5年3月25日   |
| 学位授与の要件    | 学位規則第4条第1項該当<br>医学研究科病理系専攻  |
| 学位論文名      | Characeristics of The Epitope of Protein-reactive Anti-Peptide<br>Antibodies.<br>(蛋白質反応性抗ペプチド抗体の認識するエピトープの特性) |
| 論文審査委員     | (主査)<br>教授 木下タロウ<br>(副査)<br>教授 上田 重晴 教授 平野 俊夫   |

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### (目 的)

一般に蛋白質由来の部分ペプチドの免疫によって元の蛋白質と強く反応する抗体が得られることが知られている。このような抗体は合成ワクチンの作製に有用である。私たちはニワトリ卵白リゾチーム (HEL) をモデル抗原として、分子量2000以上のペプチド4種について検討し、シスチンに富んだペプチド Ploop I. II (57-107, Cys64-Cys80, Cys76-Cys94 を含む) による免疫が最も効果的であることを明らかにした。本研究は、HEL 反応性抗 Ploop I. II 抗体の認識するエピトープの構造を解析すること目的として、Ploop I. IIの部分ペプチドとの反応や、アミノ酸配列のわかっている他の鳥類リゾチームとの交叉反応や、合成ペプチド (59-82, 1ヶ所又は2ヶ所のアミノ酸残基をアラニンに置換したもの) との反応等を調べた。

#### (方 法)

1. Ploop I. IIおよび還元アルキル化 (RA) Ploop I. IIによる免疫: HEL由来の部分ペプチドはすべて C<sub>18</sub> 逆相クロマトグラフィーで精製して、アミノ酸分析で純度を確認した。Ploop I. IIおよびRA Ploop I. II (57-107, Cysはすべて還元カルボキシルメチル化) はマレイミド化して、牛ガンマグロブリンに N-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio) propionate (SPDP) を用いてSH基を導入したものと反応させ、得た複合物を家兎に免疫して抗血清を得た。

2. エピトープの解析: 抗血清から、HEL-セファロースまたはRA Ploop I. IIセファロースを用いて抗 Ploop I. II抗体または抗 RA Ploop I. II抗体を特異的に精製した。抗原として [<sup>3</sup>H]-無水酢酸でアセチル化した Ploop I. IIまたはRA Ploop I. II, あるいは Iodogen 法で <sup>125</sup>Iラベルした HELを用いた。これらの抗体と抗原を4℃で1時間反応させた後、二重抗体法で結合を測定し、Scatchardプロットを行なって、平均結合定数 (K<sub>0</sub>) を求めた。また、Ploop I. IIの部分ペプチドやアミノ酸配列既知の他の鳥類リゾチームや59-82ペプチドのアラニン置換体合成ペプチドなどを種々の濃度で上記の反応系に加えて阻止反応を行ない、これらの阻止体の抗体に対する結合定数 K<sub>1</sub> を求めて、エピトープ領域の限定とエピトープ内のアミノ酸残基の果たす役割を比較検討した。

#### (成 績)

1. シスチンに富んだ Ploop I. IIはHELに対して高反応性の抗体を産生したが、シスチン残基をすべて還元アルキル化して、ループ構造を壊したRA Ploop I. IIの免疫では、HEL反応性の抗体はほとんど産生されなかった。

## 2. HEL 反応性抗 Ploop I . II 抗体の認識するエピトープ

1) 本抗体は RA Ploop I . II とも強く反応し、このペプチドの前半部分である 1 CM-Ploop I (57-84, Cys64-Cys80 とカルボキシメチル化 Cys-76 を含む)、さらにこの 1 CM-Ploop I のシスチンを還元アルキル化したペプチド (R A P8 - 1) とも強く反応することから、57-84 が主としてエピトープ形成に関与していることがわかった。

2) 抗 Ploop I . II 抗体では、二抗体 (R125, R126) が特に HEL に高い親和性を示し、HEL の Arg-68 が Lys-68 に置換したボブホワイトウズラリゾチームでは、アフィニティが 1 / 3 に低下して、Arg-68 の関与が示唆された。またリングネックキジリゾチームでは、HEL の Arg-73, Asn-77 がそれぞれ Lys-73, His-77 に置換しているが、アフィニティはわずかしか下ならず、この実験では、Arg-73, Asn-77 の影響はあまりみられなかった。3 種のアヒルリゾチームの交叉反応では、Cly-71 および Pro-79 のエピトープの寄与が認められた。

3) 合成ペプチド 59-82 およびアミノ酸置換体との阻止反応の結果、Arg-68 をアラニンに置換すると、1 / 150 以下にアフィニティの低下が見られ、Arg-73 をアラニンに変えるとさらにアフィニティが低下した。この他、Cly-71, Ser-72, Trp-62 の寄与も見られたが、Trp-63, Ile-78 の寄与は否定された。

### (総括)

HEL 反応性抗 Ploop I . II 抗体は、2 つのループ内の Ploop I (57-84, Cys64-Cys80 を含む) に高いアフィニティを持ち、Cys64-Cys80 を還元アルキル化したものに対して高いアフィニティは変わらなかった。他の鳥類リゾチームや合成ペプチドおよびその置換体との反応から、Arg-68 がエピトープの中心的役割を果たしていること、さらに Cly-71, Ser-72, Arg-73, Pro-79, Trp-62 などがエピトープの形成に関与しているが、Trp-63, Asn-77, Ile-78 は関与していないことが明らかとなった。

エピトープ形成に関与するアミノ酸残基を HEL 結晶の X 線解析の結果と照合すると、シーケンス上は離れているが、立体的には 1 つのまとまった接触面を形成できることがわかった。また HEL の可動性を調べると 3 つのピークがあり、そのうちの 1 つが Ploop I 内の 68-74 であった。

以上のことから、HEL 反応性抗 Ploop I . II 抗体は、抗ペプチド抗体に特有の sequential エピトープではなく、天然蛋白質に対する抗体のエピトープに類似した立体的なエピトープを認識すると考えられ、これが抗原側の高い可動性と相補って、蛋白質と高い親和性で反応すると推測される。

## 論文審査の結果の要旨

タンパク質の部分ペプチドを免疫原として用い、未変性の元のタンパク質と強く反応する抗体を得る事は容易でない。親水性領域が重要である事は従来から広く認識されており、なかでも可動性の高い部分がより適切であることも認識されてきている。

本研究はペプチドワクチンのデザイン等に有益な知見をさらに得る事を目的とし、卵白リゾチームをモデル抗原として用いた。卵白リゾチームの部分ペプチド Ploop I . II を免疫原として用いると元の卵白リゾチームに強く反応する抗体が得られたので、この抗体が認識するエピトープを解析し、重要なアミノ酸残基を決定した。その結果、通常の抗ペプチド抗体が一次構造に依存する sequential なエピトープを主として認識するのと異なり、本抗体は、立体構造が必須なエピトープを認識することがわかった。このエピトープは、また卵白リゾチームのなかで最も可動性に富む部分を含んでいた。

これらの結果は、部分ペプチド免疫原をデザインするときのポイントとして、親水性と可動性に加え、例えばジスルフィド結合等により立体性をもたせることが重要であることを示唆しており、学位論文に値すると認められる。