

# ヒトリンパ芽球様株化細胞産生レトロウイルスの 主構造蛋白質の解析：モノクローナル抗体の作成 と N 末端領域アミノ酸配列の分析

岡山大学医学部附属癌源研究施設生化学部（指導：小田琢三教授）

初 鹿 雅 男

（昭和62年3月30日受稿）

**Key words：**モノクローナル抗体，レトロウイルス  
主構造蛋白質，アミノ酸配列分析  
イムノアフィニティークロマトグラフィー

## 緒 言

Köhler と Milstein<sup>1)</sup> によって開発されたモノクローナル抗体 (MAb) の作成技術は、今日では生物学、基礎医学のみならず臨床医学の各分野に広く応用されている。MAb は、その認識する抗原決定基が単一のために、従来のポリクローナル抗体と比較して特異性が極めて高く、しかも得られた抗体産生細胞を同系動物の腹腔内に接種すると、腹水として大量に得ることができる。MAb は又、作成上の利点として、その抗原精製が完全でなくてもよいという大きな長所を有している。そこで著者もウイルス性腫瘍に関する研究の一環として、各種抗原に対する MAb の作成を行なってきた<sup>2)</sup>。

レトロウイルスは動物界に広く分布する逆転写酵素を有する RNA 型ウイルスであるが<sup>3)</sup>、今までにヒトのレトロウイルスとしては、HTLV-I<sup>4,5)</sup>、II<sup>6,7)</sup>、及び III<sup>8,9)</sup> などが発見され、それぞれ成人 T 細胞白血病<sup>10-12)</sup>、Hairly 細胞白血病<sup>6,7)</sup>、後天性免疫不全症候群<sup>8,9,13)</sup> などの疾患と深い関連性を有している。これらのウイルスは T リンパ球に特異的に感染し障害をもたらすという共通した特徴を持っている<sup>14)</sup>。最近 Oda ら<sup>15-21)</sup> は、種々なヒトリンパ性白血病由来株化細胞の電子顕微鏡的検索によって、ヒトリンパ

芽球様株化細胞の一種 (HLB 細胞) に、HTLV とは異なるレトロウイルスの産生を見いだした。このレトロウイルス (HLBV と仮称) は、主構造蛋白質と推定される分子量 34,000 ダルトン (Da) の蛋白質 p34 と Mg<sup>2+</sup> により活性化する逆転写酵素活性を有しているが<sup>16,18)</sup>、種々の血清学的検索によっても未だこのウイルスが同定されず<sup>17)</sup>、その遺伝子のクローニングと構造解析が進められている<sup>21)</sup>。本研究では、このレトロウイルス HLBV の性状を解明するために、HLBV 主構造蛋白質 p34 に対する MAb を作成し、その抗体を用いたイムノアフィニティークロマトグラフィーによる p34 の精製を試みた。さらに同蛋白質の N 末端領域アミノ酸配列を決定し、他のレトロウイルスの主構造蛋白質との比較を行なった。

## 材 料 と 方 法

### 1. レトロウイルスの精製

#### 1) 細胞の培養

レトロウイルスの精製に用いた HLB 細胞は 10% 牛血清添加 RPMI-1640 培地 (日水製薬) で培養した。一回の精製につき、約 5 ℓ の培養を行なった。

#### 2) レトロウイルスの精製

HLBV の精製は図 1 に示した方法<sup>18)</sup> で行な

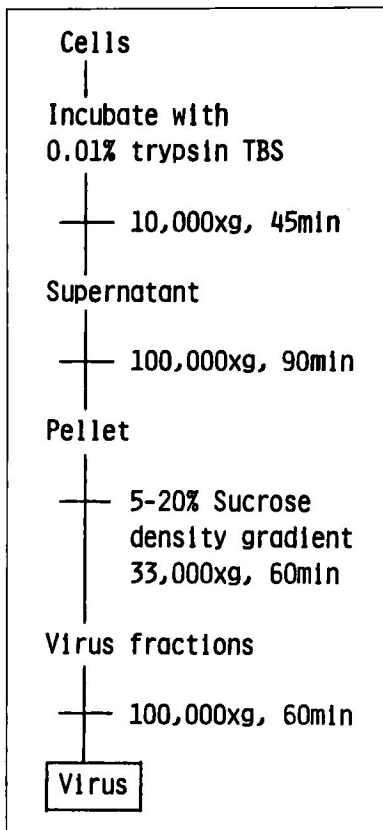


図1 HLBVの精製方法の概略図

った。即ち、培地より回収した HLB 細胞を TBS (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl) で洗浄し、細胞数を数えた後、100  $\mu$ g/ml トリプシン (シグマ社) を含む TBS を細胞沈渣に加え、37°C, 15 分間反応させた。1/5 容量の 1 mg/ml 卵白トリプシンインヒビター (シグマ社) を含む TBS で反応を止め、10,000 $\times$ g で、4°C, 45 分間遠心後、上清をさらに 100,000 $\times$ g で、4°C, 90 分間遠心分離した。沈渣を、TEN (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA, 10 mM NaCl) に懸濁し、33,000 $\times$ g, 4°C, 60 分間、5~20% ショ糖密度勾配で遠心分離後、各分画をドデシル硫酸ナトリウム (SDS)-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE)<sup>22)</sup> し、銀染色<sup>23)</sup> で分析した。HLBV を含むと思われる分画 (図 2, No.2~8) を集め、100,000 $\times$ g で、4°C, 60 分間遠心後、その沈渣を精製 HLBV として以後の実験に用いた。

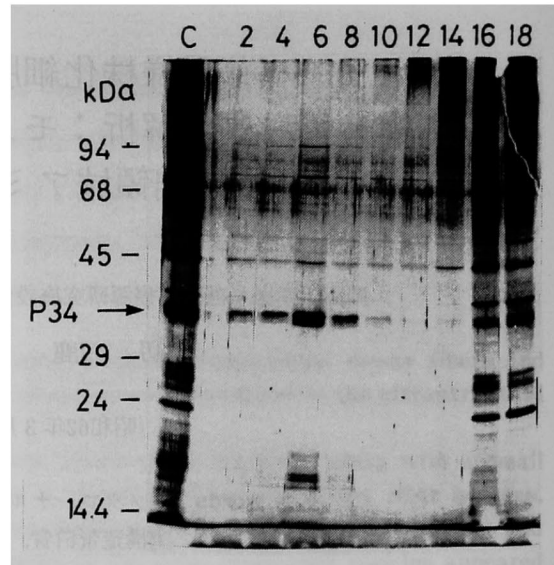


図2 HLBVのショ糖密度勾配遠心法による精製材料と方法で示した様に、HLBVを粗精製し、5~20%ショ糖密度勾配で速度ゾーン沈降遠心した。遠心後の各分画をSDS-PAGEした後、蛋白質を銀染色した。レーンCは遠心分離前の粗精製HLBV懸濁液を、レーン2から8は遠心分離後の分画を示す。レーンの数字は分画番号と同じである。

## 2. レトロウイルスに対するモノクローナル抗体の作成

### 1) 免疫

TENで懸濁した精製 HLBV を等量のプロイント完全アジュバントと混合し、エマルジョンにした後、BALB/cマウスの腋窩及び鼠蹊部に、計 1 ml (HLBV 25~50  $\mu$ g)/匹で、皮下注射した。さらに10日間隔で、3回追加免疫し、抗体の産生を確認した後、最後の追加免疫は、精製 HLBV 1 ml (HLBV 50~100  $\mu$ g) を腹腔内に注射した。3日後に、脾臓を摘出し、細胞融合に用いた。

### 2) 培地

10%牛胎児血清添加ダルバッコ変法イーグル培地 (日水製薬) を DMEM(+), 血清を含まないものを DMEM(-) として使用した。また、0.1 mM hypoxanthine, 0.4  $\mu$ M aminopterin, 16  $\mu$ M thymidine を添加した DMEM(+) を HAT 培地<sup>24)</sup>, HAT 培地より aminopterin を除いた培地を HT 培地として使用した。

### 3) ミエローマ細胞の培養

細胞融合には、ミエローマ細胞 X63-Ag8-653<sup>25)</sup> (香川医科大学第一内科, 田中輝和博士より供与) を用いた。ミエローマ細胞は DMEM(+) で維持培養した。

#### 4) 細胞融合及び雑種細胞の培養

細胞融合は文献 26~29 を参考にして行なった。精製 HLBV で免疫されたマウスの脾細胞  $3 \times 10^8$  個と対数増殖期のミエローマ細胞  $3 \times 10^7$  個を 50 ml 遠心管内で混合、遠心し、上清を除去後、遠心管底を指で軽くはじいて細胞沈渣を分散し、その上に 45% ポリエチレングリコール (PEG 4,000, メルク社) を含む DMEM(-) を約 0.5 ml 滴下し、振盪混和後、室温に 3 分間放置した。DMEM(-) で徐々に PEG を希釈し、遠心後、細胞沈渣を HAT 培地 230 ml に再浮遊させ、前日に BALB/c マウス腹腔より調製した支持細胞を含む 96 ウェルプレート 23 枚に 0.1 ml ずつ分注し、7.5% 炭酸ガス存在下で培養した。10 日目頃より、活発な雑種細胞の生育が見られるウェルでは半量ずつの培地交換を行ないながら、HAT 培地で 2 週間、HT 培地で 1 週間、以後通常の DMEM(+) で培養した。

#### 5) 雑種細胞のクローニング

目的の雑種細胞コロニーをパスツールピペットで懸濁し、細胞数を計算して、96 ウェルプレートに 1 ウェル当たり 1 細胞になるように雑種細胞を分注し (限界希釈法)、7.5% 炭酸ガス存在下で培養した。約 2 週間後、生育の活発な 1 個のコロニーを含み、培養上清が高い抗体活性を示すウェルを選んで、同様のクローニング操作を繰り返した。1 クローンにつき、少なくとも 2 回のクローニングを行なった。

#### 6) 腹水の作成

1 週間前にプリスタン (アルドリッチ社) 0.5 ml を腹腔内に注射しておいた BALB/c マウス腹腔内へ  $3 \sim 4 \times 10^6$  個の雑種細胞を移植した。腹部膨隆が著明となる 2 週目頃より 1 日に 1 ml ずつ腹水を回収した。

#### 7) イムノグロブリン (Ig) サブクラスの決定

Ig サブクラスの決定は、オクタロニー法で行なった。

#### 8) 雑種細胞培養上清のスクリーニング

スクリーニングは、アビジン-ビオチン法<sup>30)</sup>

(ABC キット, ベクター社) を用いたドットプロットアッセイ<sup>31,32)</sup> で行なった。精製 HLBV を 20  $\mu$ l の 0.1% NP-40 を含む TEN に懸濁し、4  $^{\circ}$ C、30 分間放置後、TEN で 100 倍希釈して、アッセイの抗原とした。この抗原をマイクロウェル底のニトロセルロース膜に 2  $\mu$ l ずつスポットし、希釈液 A (1% ゼラチンと 0.05% Tween 80 を含む TBS) 200  $\mu$ l を加え、10 分間放置した。TBS 洗浄後、雑種細胞培養上清を希釈液 A で 10 倍希釈して、50  $\mu$ l ずつ加え、60 分間反応させた。TBS で洗浄後、250 倍希釈のビオチン化抗マウス Ig ウマ抗体を 40  $\mu$ l ずつ加え、30 分間反応させた。TBS で洗浄後、250 倍希釈アビジン-ペルオキシダーゼ標識ビオチン複合体 40  $\mu$ l を加え、15 分間反応させた。TBS で洗浄後、0.5 mg/ml 4-クロロ-1-ナフトール、0.165% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を含む TBS を 100  $\mu$ l ずつ加えて、発色反応させた。反応停止は水洗により行なった。以上の反応はすべて室温で行なった。

#### 9) 精製ウイルスの [<sup>125</sup>I] 標識と免疫沈降反応

0.5% NP-40 と 2 mM Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) を含む TEN で懸濁した精製 HLBV 0.3 ml (HLBV 50~100  $\mu$ g) をヨードゲン法<sup>33)</sup> により、800  $\mu$ Ci の [<sup>125</sup>I] で標識し、その 20  $\mu$ l ずつをスクリーニング陽性培養上清 0.1 ml と 4  $^{\circ}$ C で一晩反応させ、アフィニティー精製抗マウス IgG, IgA, IgM ウサギ抗体を結合させたプロテイン A セファロース 20  $\mu$ l を加えて、室温で 2 時間反応を行なった。遠心でビーズを回収後、抗原抗体複合物を SDS-PAGE で分離し、蛋白質をクーマシーブリリアントブルー (CBB) 染色し、ゲルを乾燥させた後オートラジオグラフィを行なった。

#### 3. 電頭酵素抗体法

HLB 細胞及び MT-2 細胞を 4% パラホルムアルデヒド溶液で 4  $^{\circ}$ C、60 分間固定し、凍結切片として、Oda らの方法<sup>34)</sup> に従い酵素抗体間接法を行ない、電頭試料を作成した。

#### 4. イムノアフィニティークロマトグラフィー

MAb 14H10 (後述) を腹水から 50% 飽和硫酸で粗精製し、その 10 mg を 0.5 ml プロテイン A セファロースと反応させ、2 mg/ml ジメチルスベロイミデートで MAb とプロテイン A を架橋

した<sup>35,36)</sup>。このアフィニティー担体で作成したミニカラムに、HLBVの精製に使用したHLB細胞のトリプシン処理後沈渣0.5gの1% NP-40, 20 µg/ml 卵白トリプシンインヒビターを含むTBSによる抽出液10mlを、4°Cで2時間かけて流し、カラムの50倍容量の1% NP-40を含むTBS及び20倍容量の150 mM NaClで洗浄後、0.1 M 酢酸1.5 mlで30分間かけてカラムに結合した蛋白質を溶出させた。溶出分画はSDS-PAGE後、銀染色で分析した。

#### 5. 蛋白質のN末端領域アミノ酸配列分析

蛋白質のN末端領域アミノ酸配列分析は、Hunkapillerらの方法<sup>37,38)</sup>にほぼ従って行なった。p34はショ糖密度勾配遠心分離前の粗精製HLBVを、p30(後述)はイムノアフィニティークロマトグラフィーで回収した蛋白質を材料とした。これらの蛋白質をSDS-PAGEで分離し、CBB染色後、ゲルより切り出し、0.1% SDSを含む緩衝液(25 mM Tris-HCl, pH 8.0)中で電気泳動的に溶出させた。溶出液をセントリコン(アミコン社)で濃縮後、逆相カラムクロマトグラフィー(ファルマシア社, FPLC システム)で不純物を除き、凍結乾燥させた後、蒸留水又は0.1% SDSに溶解させ、気相シーケンサー(アプライドバイオシステムズ社, モデル470A)及びHPLC(アプライドバイオシステムズ社, モデル120A)でN末端アミノ酸配列を分析した。

### 結 果

#### 1. レトロウイルスの精製

本ウイルス(HLBV)は培養液中への遊離が少なく<sup>18)</sup>、培養液からの精製は困難であったため、HLB細胞表面のウイルスをトリプシンで遊離させ回収する方法(図1)を用いた。この方法で回収した粗精製HLBV懸濁液を5~20%ショ糖密度勾配遠心法で分離し、その各分画の一部試料をSDS-PAGE後、銀染色で解析すると図2に示すごとく、分子量34 kDaの蛋白質(p34)及びこれより少量であるが分子量約33 kDaの2つの蛋白質(p33と総称)と分子量約20 kDaの3つの蛋白質(p20と総称)が第6分画をピークとして、第2~第8分画に見られた。これらの分画には蛋白質の分布パターンと一致して逆転写

酵素活性が検出され、濃縮ウイルスが電顕で観察されることからこれらの蛋白質はHLBV由来と考えられ<sup>16,18)</sup>、それらの分子量及び量的関係からp34がその主構造蛋白質と推定されていた<sup>16,18)</sup>。又図2におけるこれらの分画には微量であるが、細胞由来と思われるきょう雑蛋白質も見られ、ウイルスの精製が完全ではないことがうかがわれた。一回の精製には約5ℓの培養を行ない、その培養液より7~8×10<sup>9</sup>個のHLB細胞が回収され、それらの細胞からSDS-PAGE後の銀染色による推定で50~100 µgの精製ウイルスが得られた。

#### 2. レトロウイルスに対するモノクローナル抗体の作成

上記の精製HLBVを免疫原及びスクリーニングの抗原として抗HLBV-MAbの作成を行なった。融合操作後の細胞懸濁液を分注した96ウェルプレート23枚のうち活発な雑種細胞の生育が見られた約600ウェルの培養上清を、ドットプロットアッセイによりスクリーニングして13

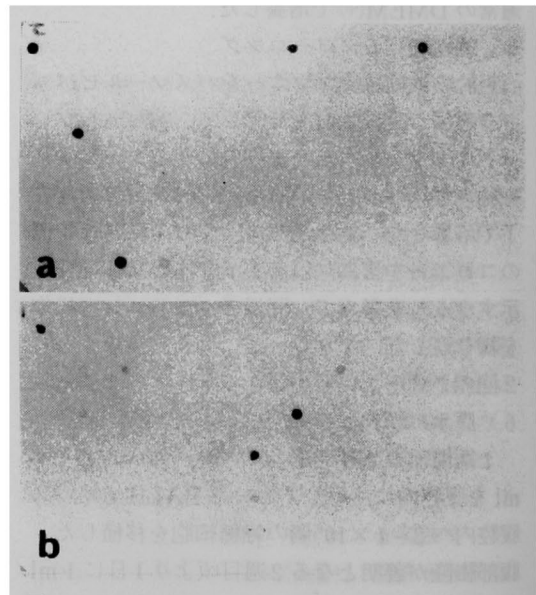


図3 ドットプロットアッセイによるスクリーニングの結果の例

左上端の発色スポットはMAb E-1<sup>2)</sup>(抗MHCクラスI-MAb産生細胞の培養上清)を用いた陽性コントロールを示す。発色スポットの濃さからaでは4スポット、bでは2スポットを陽性と判定した。

の陽性ウェルを得た。図3にその結果の一例を示した。次にこれらのウェル培養上清に含まれるMAbの対応抗原の検索のため培養上清と $^{125}\text{I}$ 標識精製HLBVとの免疫沈降反応を行なった(図4)。図4において、レーン7と14には図2に示したp34に相当すると考えられる分子量34kDaの蛋白質が免疫沈降されている。これらのレーンには少量であるが分子量30kDaの蛋白質(p30)も同時に免疫沈降されている。レーン7と14に対応するウェル15C9と14H10の雑種細胞はクローニング後、同系マウス腹腔内に移植して腹水を作らせた。MAbのIgサブクラスは、MAb 15C9: IgG1, MAb 14H10: IgG2bであった。このうちプロテインAとの結合性が良く、腹水として大量に得ることのできたMAb 14H10を以後の実験に用いた。

### 3. 電顕酵素抗体法による所見

MAb 14H10とHLBVとの反応性を調べるため電顕酵素抗体法を行なった。図5-aにおいてMAb 14H10はHLBVのコアと特異的に強く

反応しているがウイルスエンベロープや他のHLB細胞成分とは反応していない。図5-bにおいてMAb 14H10は対照としたHTLV-1やその産生細胞MT-2細胞成分とは反応していない。これらの所見から、このMAbが確かにHLBVに対する抗体であり、又p34が本ウイルスのコア蛋白質であることが確認された。

### 4. イムノアフィニティークロマトグラフィーによるレトロウイルス蛋白質p34の精製

HLBVのコア蛋白質p34を精製するためMAb 14H10を用いて、イムノアフィニティークロマトグラフィーを試みた。図6に示す如く、HLB細胞粗抽出液からイムノアフィニティークロマトグラフィーによって得られた溶出成分にはp34の他に分子量33kDa, 30kDa及び更に低分子量の蛋白質も同時に回収されていた。同図において、HLB細胞沈渣を蛋白質分解酵素阻害剤非存在下でNP-40処理した場合は、存在下の場合に比べ、p34の収量が減少し、低分子量の蛋白質の収量が増加していることから、分

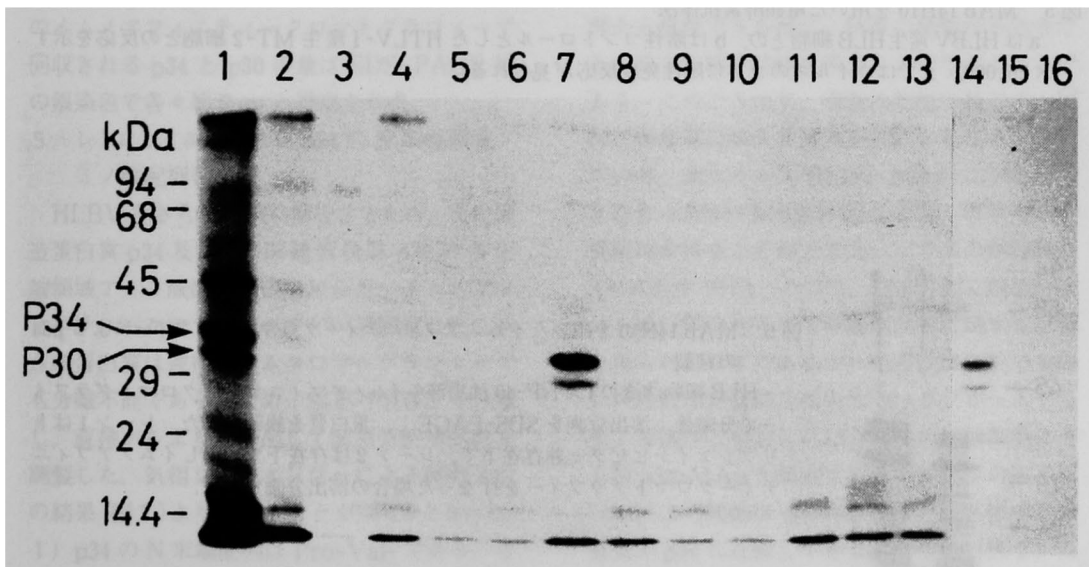


図4  $^{125}\text{I}$ 標識精製HLBVとスクリーニング陽性ウェル培養上清との免疫沈降反応によるMAbの対応抗原の検索

材料と方法で示した様に、 $^{125}\text{I}$ 標識HLBVとスクリーニング陽性ウェル培養上清を免疫沈降反応させ、抗原抗体複合物をSDS-PAGEで分離した後、蛋白質をCBB染色して、ゲルをオートラジオグラフィーした。レーン1は免疫沈降反応前の $^{125}\text{I}$ 標識精製HLBVを示す。レーン2は精製HLBVで免疫したマウス抗血清との、レーン3はドットプロットアッセイ陽性コントロールMAb E-1(培養上清)との、レーン4~16はスクリーニング陽性ウェル培養上清との免疫沈降反応を示す。レーン7と14に免疫沈降されたp34がみられる。

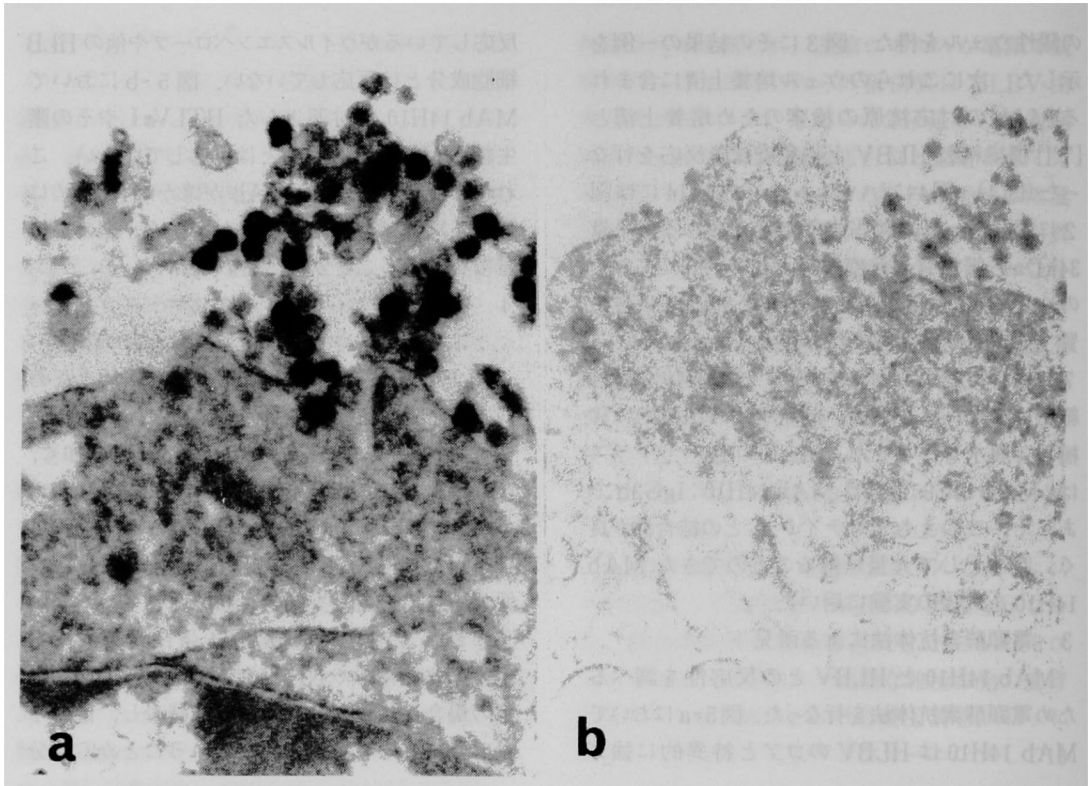


図5 MAb 14H10 を用いた電顕酵素抗体法

a は HLBV 産生 HLB 細胞との, b は陰性コントロールとした HTLV-I 産生 MT-2 細胞との反応を示す ( $\times 26,000$ ). a ではウイルスのコアに陽性免疫反応が見られる.

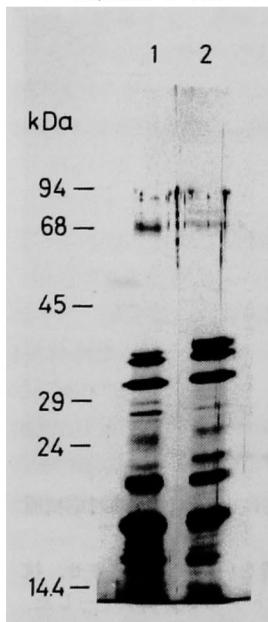


図6 MAb 14H10 を用いたイムノアフィニティークロマトグラフィーによる p34 の精製

HLB 細胞沈渣の 1% NP-40 抽出液をイムノアフィニティークロマトグラフィーで分離後, 溶出分画を SDS-PAGE し, 蛋白質を銀染色した. レーン 1 はトリプシンインヒビター非存在下で, レーン 2 は存在下で抽出しイムノアフィニティークロマトグラフィーを行なった場合の溶出分画を示す.

p34	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
	Pro	Val	Thr	Arg	Ser	Gln	Gly	Gln	Val	Ser	Ser	Asn	Thr	X	Gly	Arg
	17	18	19	20	21	22										
	Ala	X	Pro	His	Pro	Asp										
p30	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12				
	Ala	Ser	Pro	His	Pro	Asp	Thr	His	Thr	Ile	Pro	Glu				

図7 気相シーケンサーによる蛋白質 N 末端領域のアミノ酸配列分析の結果  
数字は N 末端からのアミノ酸残基数を示す。

子量 33kDa 以下の蛋白質は抗原決定基を共有する p34 の分解産物と推測された。そして分子量 33kDa 及び 30kDa の蛋白質は各々図 2 の p33, 図 4 の p30 に相当すると考えられた。分子量 33kDa 以下の蛋白質が同時に回収されるため、イムノアフィニティークロマトグラフィーにより p34 を単一蛋白質として、精製することはできなかった。しかし p34 及びその分解産物と推測される蛋白質をウイルスを精製せずとも HLB 細胞粗抽出液より一段階操作で回収することができた。0.5g の HLB 細胞沈渣より 1 回のイムノアフィニティークロマトグラフィーで回収される p34 と p30 の量は SDS-PAGE 後の銀染色で各々約 5 µg と推定された。

#### 5. レトロウイルス蛋白質 p34 の N 末端領域アミノ酸配列の分析

HLBV をさらに詳細に解析するため、その構造蛋白質 p34 及びその関連蛋白質 p30 の N 末端領域アミノ酸配列決定を試みた。イムノアフィニティークロマトグラフィーで回収したこれらの蛋白質は逆相カラムクロマトグラフィーでも分離不能であったため、SDS-PAGE で分離し、直接ゲルより切り出して配列分析用試料を調製した。気相シーケンサーによる配列分析の結果(図 7)より以下のことが明らかとなった。

- 1) p34 の N 末端配列は Pro-Val- である。このことより p34 は HLBV の主構造蛋白質であることが確認された。
- 2) p34 の第 17 残基から第 22 残基(第 18 残基は不明のため除く)までと p30 の第 1 残基から第 6 残基までが一致しており、又 p34 の第 16 残基が Arg である。これらの事実は、p34 が第 16 残基の直後で、トリプシン様のプロテアーゼで切

断され、p30 はその C 末端側断片に由来することを強く示唆している。従って p34 の N 末端領域アミノ酸配列は、p34 の第 22 残基以後に p30 の第 7 残基以後が続くこととなり、合計 27 残基が判明したと考えられた。

#### 考 察

Oda らにより分離されたレトロウイルス(HLBV)の性状解析を行なうため、このウイルス蛋白質に対するモノクローナル抗体(MAb)を作成した。MAb 作成の大きな利点の一つは、その作成原理から推察できる様に、抗原の精製が不完全でも、完全な特異抗体を得ることができることである。このことは又、複数の抗原に対して、同時に各抗原に対する抗体が得られることも示している。本ウイルス HLBV も完全には精製できなかったが、MAb 作成により、ウイルス特異抗体を得ることができた。マウスの免疫はウイルス全体で行なったので、上述の如く理論的には p34 以外のウイルス構成蛋白質に対する抗体も得られるはずであるが、免疫沈降反応で実際に対応抗原が判明したのはドットプロットアッセイで陽性と判定した 13 ウェルの雑種細胞のうち抗 p34-MAb を産生する 2 クローンのみであった。この理由は p34 以外のウイルス構成蛋白質量が p34 に比較してかなり少ない(図 2)ためと思われる。

MAb はその特異性の高さの点で抗原の検出プローブとして優れている。電顕酵素抗体法、中でも MAb を用いた電顕酵素抗体法は抗原の局在を調べる上で強力な解析手段と考えられる<sup>34)</sup>。本研究で得られた抗 p34-MAb 14H10 も、パラホルムアルデヒド固定した HLB 細胞凍結切片

との電顕酵素抗体法において、HLBV コアとのみ特異的に反応し、p34 が実際にウイルスコアに局在することを示すことができた。MAb 14H10 は又、蛍光抗体法で、アセトン固定した HLB 細胞とも特異的に反応した<sup>20)</sup>。MAb は認識する抗原決定基が単一であるため、抗原決定基の変化が予想される場合には、特に注意を要する。ウェスタンブロット法は特異的抗原蛋白質の簡便な検出法として汎用されているが、一般に電気泳動に SDS を使用するため蛋白質の抗原決定基が変化している可能性がある。従って、得られた MAb がウェスタンブロットされた蛋白質と反応するか否かを調べておくことは重要である。MAb 14H10 はウェスタンブロットされた p34 と反応することが確認されている<sup>20)</sup>。

MAb の抗原検出プローブとして以外の重要な応用にイムノアフィニティークロマトグラフィーがある。イムノアフィニティークロマトグラフィーは、原理的には、免疫沈降法と同じで、粗な抗原抽出液からでも、一段階操作で高度な抗原精製が可能なる方法である。MAb は、その均一性、特異性、及び量的な面からイムノアフィニティークロマトグラフィーには特に適しており、MAb を用いたイムノアフィニティークロマトグラフィーは種々の抗原の精製に応用されている<sup>39-41)</sup>。本研究でも、抗 p34-MAb 14H10 を用いたイムノアフィニティークロマトグラフィーにより p34 の精製を試みたが、その分解産物が同時に回収されるため、p34 を単一蛋白質として精製することはできなかった。しかしイムノアフィニティークロマトグラフィーにより p34 の分解産物 p30 を回収することができ、この p30 は SDS-PAGE で分離後、アミノ酸配列分析の材料とすることができた。

蛋白質の一次構造を知ることは、例え部分的であっても、その蛋白質の同定のみならず、その遺伝子のクローニングにおいても重要な意義を持つ。近年開発された気相法<sup>42)</sup>による配列決定法は、わずかに 5~50 pmol の蛋白質からでも、そのアミノ酸配列分析を可能にした<sup>43)</sup>。そこで著者も、HLBV についてさらに詳しい情報を得るため、その主構造蛋白質と推定されていた p34 の N 末端領域アミノ酸配列決定を行ない、他

のレトロウイルスの主構造蛋白質との比較を行なった。レトロウイルスの主構造蛋白質はゲノム RNA を含む最も主要なコア蛋白質で、その N 末端アミノ酸は今までに調べられた限り、レトロウイルスの種類によらず Pro で、2 番目のアミノ酸は側鎖に分枝炭化水素鎖を持つ Leu, Ile, 又は Val のいずれかである。これらはいずれも、非極性アミノ酸で、その高度の保存性はプロテアーゼの認識部位として以外に主構造蛋白質における何らかの構造的役割をも推測させる。本ウイルス HLBV の p34 N 末端配列も Pro-Val-であり、レトロウイルスの主構造蛋白質としての条件を満たしている。本研究で得られた p34 の N 末端領域アミノ酸 27 残基と現在までに報告のある他のレトロウイルスの相同領域の比較を行なったが、同一又は高度なホモロジーを有するウイルスは見られなかった。p34 はレトロウイルスの主構造蛋白質としては分子量的にかなり大きく、これに近いものとして squirrel monkey retrovirus<sup>44)</sup> の p35 があるが、その N 末端領域アミノ酸配列の報告が未だないため、比較できなかった。Mason-Pfizer monkey virus<sup>45)</sup> は最初の 3 アミノ酸が HLBV と一致しているが、それ以後の部分については、他のレトロウイルスと比べて特に高い相同性は見られなかった。又、HLBV がヒトリンパ芽球様株化細胞より分離されたため、HTLV-I~III との関連性についても関心が持たれたが、それらとも特に高いホモロジーは見られなかった。従って主構造蛋白質 N 末端領域アミノ酸配列を比較した限りでは、HLBV が既知レトロウイルスのいずれと近縁であるのか明確な結論は下し得なかった。最近 Sonigo ら<sup>46)</sup> は、逆転写酵素の保存領域アミノ酸配列をもとにレトロウイルスの系統的分類を行なっている。それによると現在のレトロウイルスはほぼ 4 グループに分類され、そのうち Moloney murine leukemia virus (Mo-MLV) をプロトタイプとする mammalian type C グループの逆転写酵素が最も早く、他の 3 グループから分かれた。このグループの逆転写酵素のみが Mn<sup>2+</sup> 嗜好性であることから<sup>47)</sup>、このグループの逆転写酵素の特異性がうかがえる。mammalian type C グループの特異性は逆転



写酵素のみならず、主構造蛋白質のN末端アミノ酸配列にも見られ、このグループのそれが、Pro-Leu-Arg-であるのに対し<sup>48)</sup>、他の3グループでは、Pro-Val-又は、Pro-Ile-である。本ウイルスHLBVの主構造蛋白質p34のN末端配列がPro-Val-であること及び、逆転写酵素がMg<sup>2+</sup>嗜好性であることから、このウイルスは少なくともmammalian type Cグループには属さないであろうと推測される。

以上本研究では、Odaらにより白血病患者由来ヒトリンパ芽球様株化細胞より分離されたレトロウイルスの性状を解明するため、そのウイルス主構造蛋白質に対するモノクローナル抗体を作成し、同蛋白質N末端領域アミノ酸配列の分析を行ない、このウイルスの帰属について考察した。本ウイルスについては現在、遺伝子レベルでの解析も行なわれているが<sup>21)</sup>、本研究はそれらに対して、又今後のこのウイルスの病原性の解明などに対しても有意義であろうと考えられる。

## 結 語

1. 白血病患者由来ヒトリンパ芽球様株化細胞(HLB)より産生されるレトロウイルス(HLBV)の蛋白質p34に対するモノクローナル抗体(MAb)を作成した。
2. 電顕酵素抗体法でこのMAbはHLBVのコア部分とのみ特異的に反応することが示され、p34がHLBVのコアに局在することが実証された。
3. このMAbを用いたイムノアフィニティー

クロマトグラフィーによりp34及びその分解産物をHLB細胞粗抽出液より一段階の操作で回収することができた。

4. HLBVの精製p34のN末端領域アミノ酸(27残基)の配列を決定した。そのN末端配列がPro-Val-であることよりp34がHLBVの主構造蛋白質であることが実証された。

5. 主構造蛋白質p34N末端領域アミノ酸配列(27残基)と、他のレトロウイルスの主構造蛋白質N末端領域アミノ酸配列を比較したところ、同領域に高度な相同性を有するレトロウイルスは見られなかった。

6. 主構造蛋白質p34のN末端配列、Pro-Val-、及び逆転写酵素のMg<sup>2+</sup>嗜好性より、本ウイルス(HLBV)はMoloney murine leukemia virusをプロトタイプとする、主構造蛋白質N末端配列がPro-Leu-Arg-で、逆転写酵素がMn<sup>2+</sup>嗜好性のmammalian type Cレトロウイルスには属さないことが推察された。

## 謝 辞

本研究の遂行及び論文の作成にあたり、御指導と御校閲を賜りました恩師、小田琢三教授に深く感謝いたします。またモノクローナル抗体の作成に関して御教示を頂きました香川医科大学第1内科、田中輝和博士、並びにその作成に御協力を頂きました岡山大学医学部小児科、茂原嗣也博士に感謝いたします。さらにアミノ酸配列分析に御協力頂きましたアプライドバイオシステムズジャパン、仙石氏に感謝いたします。最後に、実験遂行にあたり、御協力を頂きました教室の皆様方に感謝いたします。

## 文 献

1. Köhler G and Milstein C: Continuous cultures of fused cell secreting antibodies of predefined specificity. *Nature* (1975) 256, 495-497.
2. 初鹿雅男, 茂原嗣也, 池田正五, 住居広士, 渡辺晰子, 小田琢三: レトロウイルス産生ヒトT株細胞に対するモノクローナル抗体の作成と抗原解析. 日本癌学会総会記事第43回(昭和59年)135頁.
3. Weiss R, Teich N, Varmus H and Coffin J: *Molecular Biology of Tumor Viruses*, 2nd Ed, RNA Tumor Viruses, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1982).
4. Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, Bunn PA, Minna JD and Gallo RC: Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* (1980) 77, 7415-7419.

5. Poiesz BJ, Ruscetti FW, Reitz MS, Kalyanaraman VS and Gallo RC: Isolation of a new type C retrovirus (HTLV) in primary uncultured cells of a patient with Sezary T-cell leukemia. *Nature* (1981) **294**, 268-271.
6. Gallo RC and Reitz JrMS: Human retroviruses and adult T-cell leukemia-lymphoma. *J Natl Cancer Inst* (1982) **69**, 1209-1214.
7. Kalyanaraman VS, Sarngadharan MG, Robert-Gureff M, Miyoshi I, Blayney D, Golde D and Gallo RC: A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia. *Science* (1982) **218**, 571-573.
8. Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dauguet C, Axler-Blin C, Vezinet-Brun F, Rouquet C, Rozenbaum W and Montagnier L: Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* (1983) **220**, 868-871.
9. Gallo RC, Salahuddin SZ, Popovic M, Shearer SM, Kaplan M, Haynes BF, Pallor TJ, Redfield R, Oleske J, Safai B, White G, Foster P and Markham PD: Frequent detection and isolation of cytopathic retrovirus (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* (1984) **224**, 500-502.
10. Hinuma Y, Nagata K, Hanaoka M, Nakai M, Matsumoto T, Kinoshita KI, Shirakawa S and Miyoshi I: Adult T-cell leukemia: antigen in an ATL cell line detection of antibodies to the antigen in human sera. *Proc Natl Acad Sci USA* (1981) **78**, 6476-6480.
11. Miyoshi I, Kubonishi I, Yoshimoto S, Akagi T, Ohtsuki Y, Shiraishi Y, Nagata K and Hinuma Y: Type C virus particles in a cord T-cell line derived by co-cultivating normal human cord leukocytes and human leukemic T-cells. *Nature* (1981) **294**, 770-771.
12. Yoshida M, Miyoshi I and Hinuma Y: Isolation and characterization of retrovirus from cell lines of human adult T-cell leukemia and its implication in the disease. *Proc Natl Acad Sci USA* (1982) **79**, 2031-2035.
13. Ratner L, Gallo RC and Wong-Staal F: HTLV-III, LAV, ARV are variants of same AIDS virus. *Nature* (1985) **313**, 636-637.
14. Wong-Staal F and Gallo RC: Human T-lymphotropic retro-viruses. *Nature* (1985) **317**, 395-403.
15. Oda T, Watanabe S, Shigehara T and Nakamura T: Budding type C virus particles in a human T-cell line derived from acute lymphoblastic leukemia. *J Electron Microsc* (1983) **32**, 172-175.
16. 小田琢三, 池田正五, 筒井 研, 渡辺晰子: ヒト急性リンパ性白血病由来 T細胞株産生レトロウイルスの分離と性状. *生化学* (1983) **55**, 769.
17. Oda T, Watanabe S, Ikeda S, Tsutsui K and Maki Y: Comparative studies of a type C retrovirus in a human T cell line from a acute lymphoblastic leukemia and adult T-cell leukemia virus. *日本癌学会総会記事第42回 (昭和58年)* 371頁.
18. 池田正五, 筒井 研, 渡辺晰子, 小田琢三: ヒト急性リンパ性白血病由来 T細胞株 (TALL-1)産生レトロウイルスの分離と構成蛋白質の性状. *日本癌学会総会記事第42回 (昭和58年)* 374頁.
19. 池田正五, 筒井 研, 小田琢三: ヒト T細胞株より分離されたレトロウイルスの主構成蛋白質の精製と性質. *生化学* (1984) **56**, 909.
20. Oda T, Hatsushika M, Watanabe S, Ikeda S, Sumii H, Arakaki Y, Nakamura T, Tsutsui K, Seki S, Akiyama K, Wada T, Nakashima A, Suma F and Murakami M: Immunoelectron microscopic and immunoblotting analyses of a retrovirus produced in a human lymphoblastoid cell line with

- a monoclonal antibody. *Cell Mol Biol* (1986) **33**, 343-350.
21. 池田正五, 秋山公祐, 和田 務, 光延文裕, 初鹿雅男, 渡辺晰子, 小田琢三: 発現ベクターによるレトロウイルス構成タンパク質遺伝子のクローニング. *生化学* (昭和61年) **58**, 432.
  22. Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* (1970) **227**, 680-685.
  23. Morrissey JH: Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: A modified procedure with enhanced uniform sensitivity. *Anal Biochem* (1981) **117**, 307-310.
  24. Littlefield JW: Selection of hybrids from matings of fibroblasts *in vitro* and their presumed recombinants. *Science* (1964) **145**, 709-710.
  25. Kearney JF, Radbruch A, Liesegang B and Rajewsky K: A new mouse myeloma cell line that has lost immunoglobulin expression but permits the construction of antibody-secreting hybrid cell lines. *J Immunol* (1979) **123**, 1548-1550.
  26. 渡辺 武, 海津 務: 効率よくハイブリドーマを確立するポリエチレングリコールによる細胞融合法. 免疫実験操作法 (1980) IX, 2963-2967.
  27. Kennett RH, McKearn TJ and Bechtol KB: *Monoclonal Antibodies*, Plenum Press, New York (1980).
  28. Goding JW: Antibody production by hybridomas. *J Immunol Methods* (1980) **39**, 285-308.
  29. Galfre G and Milstein C: Preparation of monoclonal antibodies: strategies and procedures. *Methods Enzymol* (1981) **73**, 1-46.
  30. Guedson JL, Ternynck T and Avrameas S: The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. *J Histochem Cytochem* (1979) **27**, 1131-1139.
  31. Hawkes R, Niday E and Gordon J: A dot-immunobinding assay for monoclonal and other antibodies. *Anal Biochem* (1982) **119**, 142-147.
  32. 国松己歳, 佐々木實: ニトロセルロース膜を用いたマルチスポットエンザイムイムノアッセイモノクローナル抗体の検出・同定への応用. 免疫実験操作法 (1982) XI, 3521-3528.
  33. Markwell MAK. and Fox CF: Surface-specific iodination of membrane proteins of viruses and eukaryotic cells using 1, 3, 4, 6-tetrachloro-3 $\alpha$ , 6 $\alpha$ -diphenylglycoluril. *Biochemistry* (1978) **17**, 4807-4817.
  34. Oda T, Watanabe S, Arakaki Y, Hatsusika M, Sumii H, Nakamura T, Suma F and Hisatake K: Immunoelectron microscopy of adult T-cell leukemia-associated antigen by the peroxidase-labeled antibody method. *Cell Mol Biol* (1985) **31**, 49-56.
  35. Gersten DM and Marchalonis JJ: A rapid, novel method for the solid-phase derivatization of IgG antibodies for immune-affinity chromatography. *J Immunol Methods* (1976) **24**, 305-309.
  36. Schneider C, Newman RA, Sutherland DR, Asser U and Greaves MF: A one-step purification of membrane proteins using a high efficiency immunomatrix. *J Biol Chem* (1982) **257**, 10766-10769.
  37. Hunkapiller MW, Lujan E, Ostrander F and Hood LE: Isolation of microgram quantities of proteins from polyacrylamide gels for amino acid sequence analysis. *Methods Enzymol* (1983) **91**, 227-235.
  38. Hunkapiller MW, Hewick RM, Dreyer WJ and Hood LE: High-sensitivity sequencing with a gas-phase sequenator. *Methods Enzymol* (1983) **91**, 399-412.
  39. Secher DS and Burke DC: A monoclonal antibody for large-scale purification of human leukocyte interferon. *Nature* (1980) **285**, 446-450.

40. Nikaido T, Shimizu A, Ishida N, Sabe H, Teshigawara K, Maeda M, Uchiyama T, Yodoi J and Honjo T: Molecular cloning of cDNA encoding human interleukin-2 receptor. *Nature* (1984) **311**, 631–635.
41. Veronese FdiM, Copeland TD, DeVico AL, Rahman R, Oroszlan S, Gallo RC and Sarngadharan MG: Characterization of highly immunogenic p66/p51 as the reverse transcriptase of HTLV-III/LAV. *Science* (1986) **231**, 1289–1291.
42. Hewick RM, Hunkapiller MW, Hood LE and Dreyer WJ: A gas-liquid solid Phase peptide and protein sequenator. *J Biol Chem* (1981) **256**, 7990–7997.
43. Hunkapiller MW, Strickler JE and Wilson KJ: Contemporary methodology for protein structure determination. *Science* (1984) **226**, 304–311.
44. Devare SG and Stephenson JR: Primate retroviruses: Intracistronic mapping of type D viral gag gene by use of nonconditional replication mutants. *J Virol* (1979) **29**, 1035–1043.
45. Henderson LE, Sowder R, Smythers G, Benveniste RE and Oroszlan S: Purification and N-terminal amino acid sequence comparisons of structural proteins from retrovirus-D/Washington and Mason-Pfizer monkey virus. *J Virol* (1985) **55**, 778–787.
46. Sonigo P, Barker C, Hunter E and Wain-Hobson S: Nucleotide sequence of Mason-Pfizer monkey virus: An immunosuppressive D-type retrovirus. *Cell* (1986) **45**, 375–385.
47. Chiu IM, Callahan R, Tronick SR, Schlom J and Aaronson SA: Major pol gene progenitors in the evolution of oncoviruses. *Science* (1984) **223**, 364–370.
48. Stephenson JR (ed): : *Molecular Biology of RNA Tumore Viruses*. Academic press, New York (1980).

**Analysis of the major *gag* protein of a retrovirus produced  
in a human lymphoblastoid cell line : Preparation of  
monoclonal antibodies and amino acid sequence analysis  
of the N-terminal region.**

**Masao HATSUSHIKA**

**Department of Biochemistry, Cancer Institute, Okayama University Medical School**

**(Director : Prof. T. Oda)**

Monoclonal antibodies (MAbs) against the major *gag* protein (p34) of a retrovirus produced in a human lymphoblastoid cell line (HLB) were prepared for the characterization of this virus. Immunoelectron microscopy showed that one of these MAbs, MAb 14H10, immunoreacted specifically with the core protein of this virus. p34 and its partially degraded products were recovered in a one-step manipulation from the crude extract of HLB cells by immunoaffinity chromatography using MAb 14H10. p34 was highly purified by polyacrylamide gel electrophoresis, and the amino acid sequence of 27 amino acid residues in the N terminal region of the purified p34 was determined by a gas-phase microsequenator. The fact that the sequence begins with Pro-Val- confirmed that p34 was the major *gag* protein of this virus. Comparing the N-terminal sequence (27 amino acid residues) of p34 with the known counterpart sequences of major *gag* proteins of other retroviruses, no retroviruses highly homologous in the N-terminal region were found. The N-terminal sequence (Pro-Val-) of p34 and Mg<sup>2+</sup> preference of the reverse transcriptase of this virus suggested that this virus belonged to a retrovirus other than mammalian type C retroviruses whose prototype is Moloney murine leukemia virus having the N-terminal sequence (Pro-Leu-Arg-) of the major *gag* protein and Mn<sup>2+</sup> preference of the reverse transcriptase.