

$\beta$ -ラクトグロブリンに対する  
抗原特異的免疫応答に関する研究

辻 典子

①

β-ラクトグロブリンに対する  
抗原特異的免疫応答に関する研究

Studies on β-lactoglobulin Specific Immune Response.

1994

辻 典子

## 目次

	ページ
序論	1
本論	
第1部 $\beta$ -ラクトグロブリンの抗原構造	
第1章 B細胞エピトープ領域の限定化	
Delimitation of B-cell determinant regions on bovine $\beta$ - lactoglobulin	
要旨	11
第1節 緒言	12
第2節 実験材料および方法	16
1) $\beta$ -ラクトグロブリンの調製	
2) 合成ペプチドの調製	
3) 実験動物	
4) 抗血清の調製	
5) ELISA法	
6) 免疫吸収法	
第3節 結果	23
1) B細胞エピトープ領域 I~III (22-56残基目) の限定化	24
(a) 領域 I (22-36残基目)	33
(b) 領域 II (32-46残基目)	42
(c) 領域 III (42-56残基目)	48
(d) 領域 I-II (26-41残基目)	56

2) B細胞エピトープ領域Ⅳ(72-86残基目)	
の限定化	65
3) B細胞エピトープ領域Ⅴ(119-133残基目)	
の限定化	65
4) B細胞エピトープ領域Ⅵ(149-162残基目)	
の限定化	72
第4節 考察	77

## 第2章 β-ラクトグロブリンのT細胞エピトープ解析

### Localization of T-cell determinants on bovine β-lactoglobulin

要旨	87
第1節 緒言	88
第2節 実験材料および方法	89
1) β-ラクトグロブリンの調製	
2) 合成ペプチド	
3) 実験動物	
4) 免疫	
5) T細胞増殖試験	
6) モノクローナル抗体の調製	
第3節 結果	92
第4節 考察	100

第2部  $\beta$ -ラクトグロブリン特異的T細胞クローンの樹立  
と機能解析

第1章  $\beta$ -ラクトグロブリン特異的T細胞クローンの樹  
立と抗原特異性の解析

Establishment of T-cell clones specific to bovine  
 $\beta$ -lactoglobulin and analysis of their specificity

要旨	107
第1節 緒言	108
第2節 実験材料および方法	109
1) $\beta$ -ラクトグロブリンの調製	
2) 還元カルボキシメチル化 $\beta$ -ラクトグロブリン の調製	
3) 還元カルボキシメチル化 $\beta$ -ラクトグロブリン ブロムシアン分解物の調製	
4) 還元カルボキシメチル化 $\beta$ -ラクトグロブリン 酵素分解物の調製	
5) 合成ペプチド	
6) 実験動物	
7) 免疫	
8) 培養用培地	
9) コンカナバリンA培養上清の調製	
10) フィーダー細胞の調製	
11) $\beta$ -ラクトグロブリン特異的T細胞クローン の樹立	
12) フローサイトメトリー解析	
13) T細胞増殖試験	
14) MHCクラスII分子拘束性の解析	

第3節 結果	115
--------	-----

1)  $\beta$ -ラクトグロブリン特異的T細胞クローン  
の樹立と表面抗原

2) MHCクラスII分子拘束性

3) 抗原特異性

第4節 考察	118
--------	-----

## 第2章 T・Bエピートープペプチドがin vitro抗体産生に 及ぼす影響

Effects of nonlinear T and B cell epitope fragments  
on in vitro antibody response

要旨	123
----	-----

第1節 緒言	124
--------	-----

第2節 実験材料および方法	125
---------------	-----

1)  $\beta$ -ラクトグロブリンの調製

2) 合成ペプチド

3) 実験動物

4) 免疫

5) B細胞の調製

6) CD4<sup>+</sup>T細胞クローン

7) In vitro抗体産生系

8) ELISA法

第3節 結果および考察	129
-------------	-----

第3章  $\beta$ -ラクトグロブリン特異的T細胞クローンの複合  
的機能解析

Complex effector functions of CD4<sup>+</sup> T cell clones  
specific to bovine  $\beta$ -lactoglobulin

要旨 137

第1節 緒言 138

第2節 実験材料および方法 139

1)  $\beta$ -ラクトグロブリンおよびTNP化 $\beta$ -ラクト  
グロブリンの調製

2) 実験動物

3) 免疫

4) T細胞クローン

5) *In vitro*抗体産生系 (B細胞の調製)

6) ELISA法

7) サイトカイン産生

8) [<sup>3</sup>H]チミジン遊離試験 (細胞障害活性)

9) 遅延型過敏症反応の誘起

第3節 結果 143

1) 産生サイトカイン

2) ヘルパー活性 (抗体産生補助機能)

3) 細胞障害活性

4) 遅延型過敏症反応誘導活性

第4節 考察 147

第4章 CD4<sup>+</sup>T細胞クローンによる抗原非特異的抗体産  
生の促進と抗原特異的抗体産生の抑制  
Antigen specific suppression with non-specific enhance-  
ment of antibody production by activated CD4<sup>+</sup> T cell  
clone

要旨	153
第1節 緒言	154
第2節 実験材料および方法	155
1) 抗原タンパク質の調製	
2) 実験動物	
3) 免疫	
4) 細胞の調製	
(A) B細胞	
(B) T細胞クローン	
(C) 標的細胞	
5) <i>In vitro</i> 抗体産生系	
6) ELISA法	
7) 細胞障害性試験	
第3節 結果	158
1) 非免疫マウス由来B細胞の抗体産生応答	
2) $\beta$ -ラクトグロブリン感作マウス由来B細胞の抗体 産生応答	
3) 各種抗原提示細胞に対する細胞障害活性	
第4節 考察	166

結語 171

要約 172

参考文献 177

謝辞 196

略号

APC：抗原提示細胞

$\beta$ -LG： $\beta$ -ラクトグロブリン

$\beta$ -CN： $\beta$ -カゼイン

CFA：完全フロイントアジュバント

CNBr：ブロムシアン（臭化シアン）

DTH：遅延型過敏症反応

ELISA：酵素免疫測定法

MHC：主要組織適合抗原

OM：オボムコイド

PBS：りん酸緩衝生理食塩水

PBST：0.05%Tween20を含むPBS

RCM：還元カルボキシメチル化

SI：Stimulation Index

sIg：表面イムノグロブリン；B細胞レセプター

TNP：トリニトロフェノール

TNBS：トリニトロベンゼンスルホン酸ナトリウム

アミノ酸の略号

A (Ala) : アラニン

C (Cys) : システイン

D (Asp) : アスパラギン酸

E (Glu) : グルタミン酸

F (Phe) : フェニルアラニン

G (Gly) : グリシン

H (His) : ヒスチジン

I (Ile) : イソロイシン

K (Lys) : リジン

L (Leu) : ロイシン

M (Met) : メチオニン

N (Asn) : アスパラギン

P (Pro) : プロリン

Q (Gln) : グルタミン

R (Arg) : アルギニン

S (Ser) : セリン

T (Thr) : スレオニン

V (Val) : バリン

W (Trp) : トリプトファン

Y (Tyr) : チロシン

## 序論

日本人が快適な生活を求め、衣食住すべてのスタイルを変化させてきたことに比例するようにアレルギー疾患が増え続けている。よりよい暮らしを目指した結果、高タンパク質型の食事の定着や乳児の早い離乳、気密性の高い住居の普及や大気汚染の増加などアレルギー体質の人を刺激し易い条件がそろってきたためといわれている。

アレルギー症状には、下痢、腹痛などの胃腸障害やアトピー性皮膚炎、鼻炎、喘息などがあるが、なかでも乳幼児で問題となっているアトピー性皮膚炎には食物アレルギーの関与が指摘されている。多くの場合、乳幼児の食物アレルギーは消化管の成熟とともなって学童期頃までには軽快するが、なかには引き続きダニ等の環境抗原に悩まされ、成人型気管支炎喘息にいたる例もみられるという。食物アレルギーが深刻な健康問題とされる所以である。

さて日本における主要な食物アレルギーが牛乳・鶏卵・大豆に起因するといわれてきたことからわかるように、高タンパク質食品が食物アレルギーの原因食品となる。含まれているタンパク質がアレルギー原因物質（アレルゲン）となっているからである。そして実際に食物アレルギーに悩まされている患者の多くは牛乳・鶏卵アレルギーの乳幼児であり、通常は優良なタンパク質源として評価されるこれら畜産食品のアレルゲン性は大きな問題となっている。

生体が特定のタンパク質を抗原として認識し、アレルギー症状の発症に至るまでの過程はなお未解明の部分が多いが、現在までに明らかとなっている免疫応答機序の概略を含めて図1に示した。主に機能するのは免疫担当細胞を中心とする種々の白血球と抗体である。抗体はB細胞により産生されるが、I g E抗体（免疫グロブリンE）がアレルギー症状を引き起こす抗体として知られ、実際R A S T法

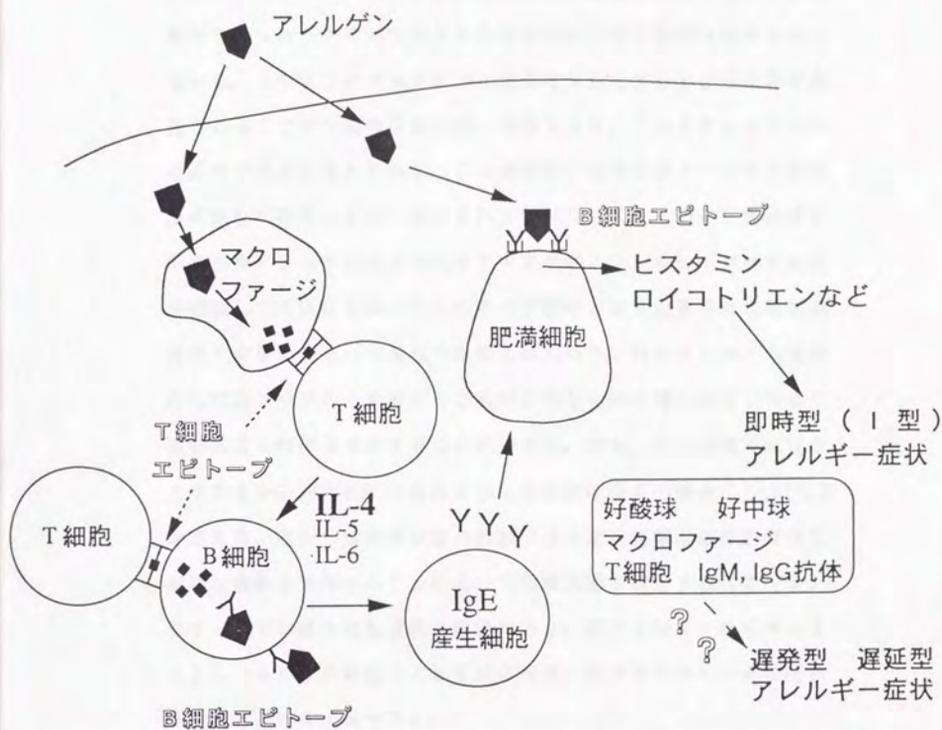


図1. アレルギー発症に関わる免疫応答機序の概略

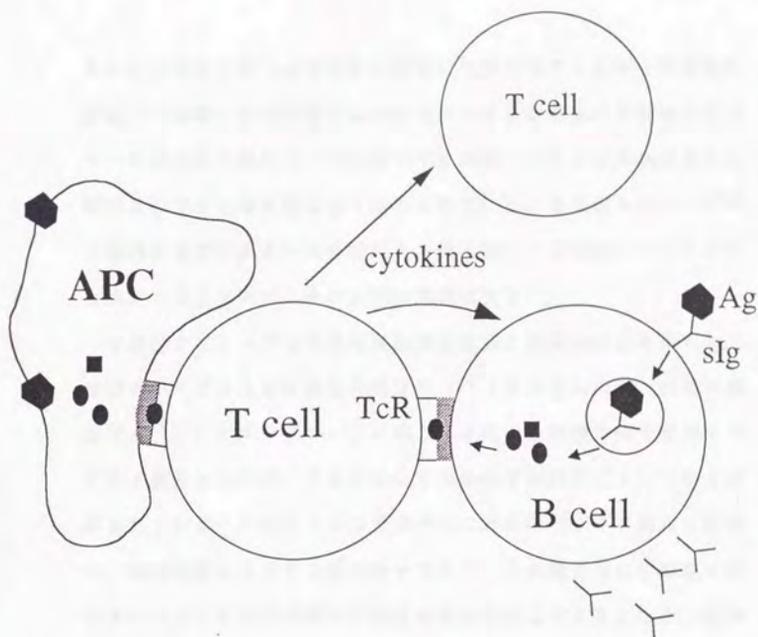
(放射性アレルギー吸着試験)などの臨床検査においても、患者血清中のアレルギーに対するIgE抗体価が診断の重要な指標となっている。このようにアレルギーに特異的に結合するIgE抗体が産生されることが一連の反応の第一段階であり、これでアレルギーへの感作が成立したとされる。この過程は、マクロファージなど抗原提示細胞に取り込まれ、消化されてMHCクラスII分子と複合体を形成したアレルギー由来のペプチドフラグメントをヘルパーT細胞が認識して活性化され、さらにそのT細胞の働きを受けたB細胞が抗体を産生するという流れで理解されている。特にアレルギー特異的な抗原レセプターを有するB細胞は自らも抗原提示細胞となるため効率よく抗体を産生することができる。また、この過程でMHCクラスII分子拘束的に活性化されるT細胞は多くの場合CD4<sup>+</sup>T細胞であり、それらは抗体産生の補助、遅延型過敏症反応の誘導など様々な機能を発揮することによって免疫応答を調節する(1~5)。サイトカイン産生能も重要な機能であり、特にインターロイキン4(IL-4)はB細胞のIgE抗体産生へのクラススイッチに関わるとされている(6~8)。

産生されたIgE抗体のほとんどは消化管、気道など粘膜や皮膚の下部に存在する肥満細胞または血中の好塩基球上のレセプターに存在し、アレルギーの再度の侵入に備えている。そして細胞表面上のIgE抗体がアレルギーにより架橋された時ロイコトリエンやヒスタミンをはじめとする種々のアレルギー作用物質の放出が引き起こされ、平滑筋の収縮や血管拡張作用を持つこれら作用物質の働きによって蕁麻疹や喘息などの即時型アレルギー(I型アレルギー)の症状が現われる。

CoombsとGell(9)により分類されたIからIV型アレルギーのうち食物アレルギーではこのI型アレルギーが最も多いといわれている。

るが、必ずしも I g E 抗体が関与せず機序が明確でない場合も多い。そのような症状には残りの 3 つの型、すなわち I g E 抗体以外の抗体 (I g M、I g G 抗体) と補体の働きにより細胞や組織の破壊が起こる II 型・III 型アレルギー (10) や、T 細胞の産生するサイトカインおよびマクロファージの浸潤により炎症の進行する IV 型アレルギーの関与が指摘されている (11~14)。即時型アレルギーのプロセスなどにより炎症素地のできあがった局所では好中球、好酸球、マクロファージや T 細胞の集積がおこるため、それらの働きが遅発型・遅延型または慢性の症状に関与するのではないかとする考えもある。実際に炎症の起こっている消化管では、代表的な炎症性腸疾患である潰瘍性大腸炎 (Ulcerative colitis) やクローン病 (Crohn's disease) で起こっている炎症誘起機構とも共通項は多いと考えられる。炎症部位における CD 4<sup>+</sup>T 細胞を中心とする免疫担当細胞や産生サイトカインの重要性は、H I V (ヒト免疫不全ウイルス) 感染後クローン病の完全寛解をみた患者の例 (15) や、I L-1 あるいは T N F を投与されたマウス・ラットが下痢などの消化器症状や腸における炎症性変化を呈した成績など (16~18) からも明らかである。アトピー性皮膚炎においても、炎症局所に浸潤・集積する CD 4<sup>+</sup>T 細胞群の重要性が指摘されている (19、20)。

これら一連の免疫応答の端緒となるのは、B 細胞・T 細胞による外来抗原タンパク質エピトープ領域の認識である (図 2)。B 細胞表面の抗原レセプター (sIg, surface immunoglobulin) に結合する部位が B 細胞エピトープである。B 細胞の抗原特異性は抗体産生細胞となった際にも保たれるため、B 細胞エピトープは同時に産生抗体との結合部位でもある。B 細胞エピトープはアレルゲンタンパク



● T細胞エピトープフラグメント

▨ MHCクラスII分子

図2. 免疫担当細胞による外来抗原タンパク質の認識

マクロファージなどプロフェッショナルな抗原提示細胞（APC）に貪食された抗原タンパク質は分解され、MHCクラスII分子と複合体を形成して細胞表面に提示される。B細胞エピトープ-表面イムノグロブリンを介してB細胞に取り込まれた抗原タンパク質も同様に処理される。T細胞はこれらAPC上のT細胞エピトープを認識し、活性化されて様々な機能を獲得する。

質が肥満細胞上のIgE抗体を架橋して即時型アレルギーの症状を誘起する部位、または様々な分化過程にあるB細胞のB細胞レセプターに結合して効率良い抗原提示やB細胞へのシグナル伝達を促す部位としてその重要性は益々注目されている。B細胞エピトープがB細胞の活性化あるいは不応答化の鍵を握り、B細胞レパートリーを決定するとすれば、その解明の意義は大きい。

T細胞エピトープも抗原特異的免疫応答に重要な役割を果たす。食物アレルギーなど外来性の抗原タンパク質は生体内の抗原提示細胞(APC)のエンドソームに取り込まれた後酵素分解を受けてペプチド断片となるが、その中のいくつかはT細胞エピトープ部分に含まれている。MHCクラスII分子はこれらのペプチド断片と会合し、細胞表面に提示する機能分子であり、その複合体はT細胞レセプターを介して抗原特異的T細胞の活性化を促すこととなる。抗体産生をはじめとする外来抗原タンパク質に対する様々な免疫応答にはこのT細胞による抗原認識とその活性化が必須であり、T細胞エピトープの解明はアレルギー特異的免疫応答制御のための基礎的知見として非常に重要である。T細胞エピトープの解析に際しては、厳密にはMHCクラスII分子との結合に与るアミノ酸残基をアグレトープと呼び、T細胞レセプターとの結合に深く関わるアミノ酸残基をT細胞エピトープとするべきところであるが、本研究ではこの両者を合わせたT細胞抗原決定領域(T cell determinant region)をT細胞エピトープ領域と呼称している。

アレルギーの抗原構造を解析することは、特定のタンパク質中のT細胞エピトープ・B細胞エピトープがどのような共同作用・阻害作用を通じて実際の免疫応答を引き起こしているかを分子論的に解析するために必要不可欠である。現在までにT細胞・B細胞の協同作用は、細胞表面接着分子の機能解明やハプテン-キャリアタンバ

ク質を用いた抗原特異的応答の実験系で解析されており、非常に速いテンポで知見の蓄積が行なわれてきた。T細胞・B細胞など主要な免疫担当細胞に備わっている普遍的な機能に関しては、その全容が窺われるまでになったともいえよう。遺伝子組み換えによりB細胞・T細胞が幅広い特異性を獲得する機構も粗筋は解明されなおも活発に研究されている。

タンパク質一次構造に基づいたペプチドを用い、抗原特異的免疫応答を解析する研究も数多く手がけられてきているが、この分野は最近になってより活発に行なわれるようになった。これは合成ペプチドが身近に利用できるようになったことと無関係ではない。本研究を遂行する間にも日を追ってペプチド合成機が一般的になり、マニュアル合成法ではポリプロピレン製ピン先に同時に多種類のペプチドを合成するマルチピン法も広く知られるようになってきた。実際の免疫応答の場では、ペプチドがT細胞レセプター・B細胞レセプターと結合することによって数々の反応が開始され、制御されているのであり、ハプテン-キャリア系で解析されてきた現象も、最終的にはエピトープペプチドを含むタンパク質で解析され、抗原特異的な免疫応答を制御する道を探っていくことになるだろう。

例えばマウス・ラットにおける実験的アレルギー性脳脊髄炎 (Experimental allergic encephalomyelitis; EAE) はヒトの多発性硬化症 (Multiple sclerosis; MS) の主要な動物モデルであるが、Weinerらは経口寛容機構により合成ペプチドがEAEの発症や病態を抑制することを示している (21)。抗原特異的な実験例ではないものの、CD4分子のアナログペプチドもEAEの発症と病態を抑制する (22)。また、マウスにおけるコラーゲン誘導性関節炎がII型コラーゲン部分ペプチドの経口投与により抑制されるという報告もなされている (23)。免疫担当細胞のもつ普遍的な機能を解

明しつつ、タンパク質中のどのようなペプチドが活性を持って免疫応答を調節していくのかを明らかにしていくことが、アレルギー症状、自己免疫疾患、移植片拒絶などで問題とされる抗原特異的な免疫過剰応答を制御する鍵となっていくであろう。

さて外来抗原処理過程でMHCクラスII分子拘束的に活性化されるT細胞は多くの場合CD4<sup>+</sup>T細胞であり、それらは様々なサイトカインを産生したり様々な細胞と細胞間接触を行なうことにより抗体産生の補助、遅延型過敏症反応(DTH反応)の誘導など幅広い機能を発揮し、免疫応答を調節する。すなわちT細胞エピトープを介したT細胞の活性化は、IgE産生を介して即時型アレルギー反応に関わるのみならず、IgE以外の抗体産生・マクロファージや好酸球等の集積など幅広い生体内変化に関わり、遅発型・遅延型または慢性のアレルギー症状にも関与するとされる。

個々のT細胞が免疫応答の際に、抗原濃度・介在サイトカイン・近隣の細胞との相互作用など微小環境条件に応じて機能を発揮し、特定の抗原に対してバランスの良い免疫応答を導こうとするの考えは魅力的である。微小環境を変化させることによりT細胞機能のスペクトルを調節し、炎症局所における抗体産生や細胞の集積も制御する道が拓かれることが期待される。各細胞の多機能性を問うこれらの解析には、抗原特異的CD4<sup>+</sup>T細胞クローンが有用である。

本研究では、牛乳の主要アレルゲンのひとつであるβ-ラクトグロブリン(β-LG)をモデルタンパク質として選び、合成ペプチドを用いてそのB細胞エピトープ、T細胞エピトープの解析を行なった。また、β-LG特異的T細胞クローンを樹立し、エピトープ特異的T細胞・B細胞間相互作用、抗原特異的抗体産生応答の制御

や遅延型過敏症反応の誘導など、抗原特異的免疫応答の機構解析を行なった。

$\beta$ -LGは、分子量約18,400の球状タンパク質であり、牛乳総タンパク量の7~12%を占める(24)。限られた動物種における乳清中の主要タンパク質で、ウシ、スイギュウ、ヤギ、ヒツジ、イヌ、ウマ、ブタ、ロバ、カンガルー、マナティー、イルカ、カニクイザルなどの乳中に認められており(25~39)、ウシ、スイギュウ、ヤギ、ヒツジ、ウマ、ブタ、ロバ、カンガルーなどの $\beta$ -LGについては一次構造も決定されている。しかしヒトの場合乳中には含まれず、かわりに胎盤で相同性の高いタンパク質(Placental protein 14)が認められるとの報告がある(40)。

$\beta$ -LGの分子内には2つのS-S結合と1つのSH基が存在し、ウマ、ブタ、ロバなどの $\beta$ -LGを除き分子は通常ダイマーを形成している。またPapizらによるX線結晶解析により立体構造が明らかとなっており(41、図3)、1つの $\alpha$ -ヘリックスと9本の逆並行 $\beta$ -シートからなるという。さらに予想された通り、レチノール結合タンパク質と酷似した立体構造を取っており、立体構造解析は従来より研究されていたレチノール結合機能に新たな知見を付与した(42~46)。

ところで牛乳アレルギーは卵アレルギーと並ぶ代表的食品アレルギーであるが、中でも $\beta$ -LGは牛乳中最もアレルギー性の高いタンパク質として古くから研究されてきた(47、48)。Lebenthal(49)によると $\beta$ -LGに対する感受性は82%の患者に見られたといい、カゼインに対しては43%、 $\alpha$ -ラクトアルブミンに対しては41%、ウシガンマグロブリンに対しては27%、ウシ血清アルブミンに対しては18%に反応が見られたという。先にも述べ

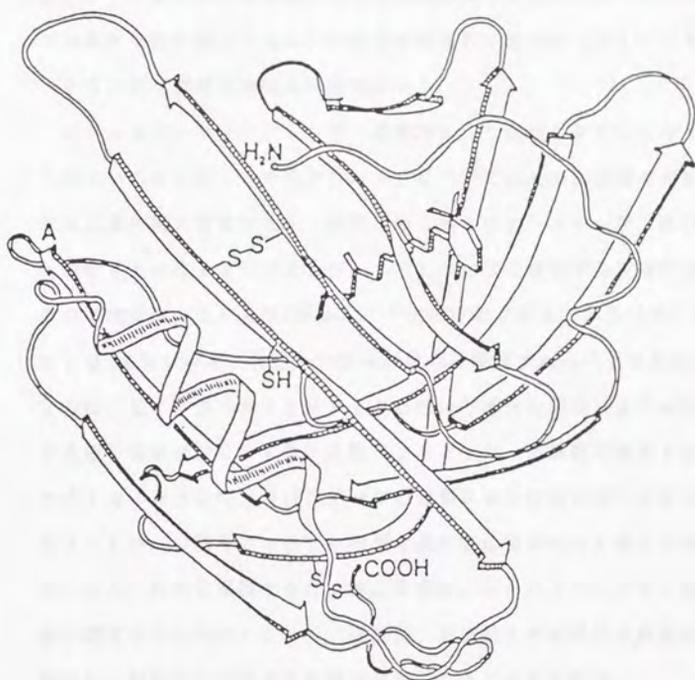


図3. ウシβ-ラクトグロブリンの立体構造

Papizら(41)より転載

たようにヒトにとって $\beta$ -LGの異種性が高いこと、折りたたみ構造を持つ球状タンパク質のため比較的難消化性で胃の中の酸性条件下でも立体構造を保つ(50)など低分子化が行なわれにくいことなどがアレルゲンとなり易い理由であるかもしれない。 $\beta$ -LGのアレルゲン性に関しては多くの研究がなされてきたが(51~57)、その詳細な抗原構造は未解明であった。

卵アレルギーがI型アレルギーの機序により発症しやすいと考えられているのに対し、牛乳アレルギーについてはその発症機序がほとんど未解明の状態である。実際に卵の場合はアレルギー患者血清と結合するのはIgEであるが、 $\beta$ -LGとよく結合する患者の血清中の抗体産生はIgG<sub>4</sub>が多く、IgEは希であるという(57)。IgG<sub>4</sub>のアレルギー発症への関与が早急に検討されるべきであるとともに、先にも述べたIgM・IgG抗体と補体の働きにより細胞や組織の破壊が起こるII型・III型アレルギーや、T細胞の産生するサイトカインおよびマクロファージの浸潤により炎症の進行するIV型アレルギーの関与についても解析を進める必要があると考えられる。また、局所に集積する好中球、好酸球、マクロファージやT細胞の働きを調べていくことも、遅発型・遅延型または慢性の症状を解析し、制御していく上で重要となってくると考えられる。

以上の問題点に関わる免疫応答現象を解明するため、本研究の第1部では合成ペプチドを用いたB細胞エピトープ・T細胞エピトープの詳細な解析を行うことにより $\beta$ -LGに固有の抗原構造を明らかにした。第2部では $\beta$ -LG特異的CD4<sup>+</sup>T細胞クローンを樹立し、抗体産生調節・炎症反応の誘導など抗原特異的な機能の解析を行なうことによりCD4<sup>+</sup>T細胞が抗原特異的免疫応答調節に果たす役割割りについて新たな知見を得た。

## 本論

### 第1部 $\beta$ -ラクトグロブリンの抗原構造

#### 第1章 B細胞エピトープ領域の限定化

Delimitation of B-cell determinant regions on bovine  $\beta$ -lactoglobulin

#### 【要旨】

$\beta$ -LGで免疫したICRマウス、家兎、山羊の血清および3動物種に共通する $\beta$ -LGの主要抗体結合領域22-56、72-86、119-133、149-162残基目のアナログペプチドを用いた。ELISAを用いた免疫吸収法により同血清中抗 $\beta$ -LG抗体の詳細な結合部位(B細胞エピトープ)を調べたところ、ポリクローナル抗体を用いたにも関わらずほとんどのエピトープ領域が5-7アミノ酸残基まで限定化された。このことは $\beta$ -LG分子上動物種を通じて認識され易い領域のなかでも特に抗体の接近が容易な部分があり、その部分に高い特異性を持つB細胞のみが選ばれてきたことを意味している。同じ領域内においても動物種間では微妙に異なる部位がB細胞エピトープとして認識されており、各動物種に固有のB細胞レパートリーの影響あるいは各ハプロタイプのT細胞エピトープとB細胞エピトープとの位置関係の影響等を強く受けた結果と考えられた。

## 第1節 緒言

アレルギータンパク質がIgE抗体に認識されて即時型アレルギーの症状を引き起こす部位、または様々な分化過程にあるB細胞の表面イムノグロブリン(sIg、B細胞レセプター)に結合して効率の良い抗原提示やB細胞へのシグナル伝達を促すと考えられている部位であるB細胞エピトープの働きの重要性は、近年になって益々注目されてきた。B細胞のトレランス(不応答化)あるいは活性化の鍵を握るのはB細胞エピトープであるとすれば、タンパク質の摂取や免疫の各過程でそのいずれの部分も認識するB細胞群が選択され、抗体産生に至るかを解明する意義は大きい。ワクチンの開発やアレルギーの低抗原性を旨とした分子設計の指標となるばかりでなく、タンパク質の異種性の高さや抗原性、立体構造と抗原性といった普遍的な問題にも基礎的な知見を与えることとなる。

さて末梢の免疫担当器官に用意されたB細胞集団は、外来性抗原の刺激を受けて活性化され、分化して抗原特異性を獲得していくが、その過程の詳細はまだまだ十分に解明されていない。

脾臓などで抗原と遭遇した時、抗原特異的なB細胞の一部はそのまま抗体産生細胞へと分化していき、一部は胚中心にとどまってさらにB細胞レセプターを介する抗原の選択を待つことになる。すなわち、胚中心に残ったB細胞群が次回の抗原の侵入に備えてのメモリーB細胞群を形成すると考えられている。また、その間抗原特異的なB細胞は、ただとどまるだけではなく、H鎖とV鎖両方の可変領域(V領域)で活発に起こる体細胞変異に応じて、抗原とよりアフィニティーの強いB細胞受容体を持つB細胞が選択されるという、アフィニティーの成熟が起こっている(58~62)。このB細胞選択の場では濾胞樹状細胞(Follicular dendritic cells; FDC)

が免疫複合体の形で抗原を保持し、抗原の提供細胞として重要な働きをすることも以前から研究されてきた(63~65)。

このように、B細胞レセプターのリガンドすなわちB細胞エピトープはそれに特異的な抗体産生を直接促すのみならず、抗原に特異的なB細胞のレパトリーが形成される際に最も積極的で重要な働きをしていると考えられる。

実用面においても、疾病予防・治療に有用な抗体を積極的に誘導するまたは抗原特異的な免疫寛容を誘導するワクチンの開発、個々のアレルギー患者が認識するエピトープ領域特定のための診断法の確立など、B細胞エピトープの解析は、各種疾病の免疫応答調節法や診断技術の発展に直接つながる重要な研究分野である(66、67)。

多くの抗原タンパク質のB細胞エピトープマップを作成する上で、合成ペプチドは必要不可欠な道具として用いられてきた。B細胞エピトープを解析するためにタンパク質の酵素消化物、臭化シアン分解物、部位指定変換物や異種生物由来のホモログなども有効な材料として用いられているが、目的とするタンパク質分子全体をできるだけ均一にかつ詳細に解析して抗原性領域を明らかにしていくためには合成ペプチドを用いる方法が有利であると考えられる。またエピトープ地図を作製する際にはタンパク質の一次構造に基づいて合成されたペプチドと抗体との結合反応をELISA法により解析する方法が一般的である。さらにエピトープ領域中コアとなる部分を限定化したり構成アミノ酸残基の相対的な結合への寄与度を解析するためには、ペプチド鎖長を短くした部分ペプチドや各アミノ酸残基を他のアミノ酸に置換したアナログペプチドが用いられる。アナログペプチドとしては、目的のアミノ酸を側鎖の構造が簡単なGly、Alaに置換して合成したペプチドや、残りの19アミノ酸す

べてに置換して合成したペプチドシリーズを用いる。

分子量が数万以上のタンパク質を解析する場合や置換ペプチドシリーズを準備するためには数多くのペプチドを合成する必要があるが、最近では各種ペプチド合成機の開発とともにペプチド合成法にも改良・工夫が施されてこれらの作業も遂行しやすくなってきている。また手作業で多種類のペプチドを合成する方法として、96穴プレート中でポリスチレンのピン先にアミノ酸を付加していくマルチピン合成法(68)、ティーバッグ型にデザインしたポリプロピレン製網袋の中にペプチド合成用レジンを封入して同時に複数個のレジンスンプルを結合用アミノ酸溶液に浸せるようにし、多種類ペプチドを同時合成するマルチプルペプチド合成法(69)なども知られている。

抗体Fabフラグメント-抗原複合体のX線結晶解析も、モノクローナル抗体との結合反応に寄与するアミノ酸残基を解析する上で重要な方法である(70~75)。この方法は、エピトープとパラトープの結合状態を直接解析し、分子間の距離などの情報を得られる唯一の方法である。また、X線結晶解析により同定された結合に寄与するアミノ酸が、ELISA法を用いて明らかにされたエピトープ中他のアミノ酸に置換し得ない重要な残基とよく一致することも示されている(73~76)。しかしながら、この方法は実際の結合反応における各々のアミノ酸残基の近接度を解析できるもの、それらが結合反応に与る寄与を直接証明するには不十分である。さらに、この方法はモノクローナル抗体のみに応用可能であるが、抗原タンパク質分子のB細胞エピトープマッピングを目的とする場合にはB細胞のレパートリーを反映するポリクローナル抗体を用いることが望ましい。

栗崎らは抗原タンパク質分子全体をカバーするオーバーラップ

グ部分ペプチドおよびマウス、家兎、山羊由来の抗血清を用い、既にウシ $\beta$ -L Gの抗体結合領域を決定している(77)。また、その結果、主要抗原性領域は3種の動物種ではほぼ共通する事が明らかとなっている。本章では、部分削除やアミノ酸置換を行なった合成ペプチドを用い、 $\beta$ -L Gの主要抗原性領域について抗体結合領域(B細胞エピトープ領域)の限定化を行なった。

3種の動物種より得た血清中抗 $\beta$ -L G抗体の結合領域を詳細に解析するにあたり興味をもたれたのは、 $\beta$ -L G分子自体の有する抗原性と各動物の持つB細胞レパートリーが、産生抗体のレパートリーに及ぼす影響力のかねあいである。今回限定化を試みた抗原性領域は動物種を越えて認識され易い領域であり、この領域に特異性を持つ産生抗体には $\beta$ -L G分子の持つ抗原性が大きく反映されていると考えられる。限定化によりさらに共通の部位が認識されていることが解れば、B細胞エピトープは $\beta$ -L G分子の構造に依存するという知見が得られることとなり、さらに $\beta$ -L G分子の厳密な抗原構造が解明されるはずである。

しかし一方で各動物種は異なった自己抗原のプールを持っており、自己抗原に特異性を持つB細胞はs I gを介した選択機構により免疫応答系から除去されているはずである(78~83)。すなわち免疫応答の基本が自己非自己の区別であるとすれば、T細胞の選択ほど厳密でないにしろ非自己に対する応答のみが許されるよう各動物種により異なったB細胞レパートリーが準備されているはずである。また、T細胞エピトープの位置は動物種または個体により異なるため、それらとの位置関係が産生抗体のレパートリーに与える影響も大きいと考えられる(84、85)。それらの制約の中で $\beta$ -L G抗原性領域のうち同じ部位が動物種を通じてエピトープとなるのか、あるいは異なる部分選ばれてくるのかを確かめるのが本章

の目的のひとつである。

なお結果を要約すれば、全体を通じてポリクローナル抗体を用いたにもかかわらず、主要な抗体結合領域は抗原-抗体結合反応のほぼ最小単位と考えられている5-7アミノ酸残基に限定化された。またその位置は3種類の動物種で微妙に異なっていた。これらの結果より、抗体応答においてはかなり限定されたB細胞集団が選択されており、動物種による微妙な差があることより、B細胞エピトープは各動物種に固有のB細胞レパトリーあるいは各動物あるいは個体におけるT細胞エピトープとの位置関係の影響を大きく受けると考えられた。

## 第2節 実験材料および方法

### 1) $\beta$ -ラクトグロブリンの調製

$\beta$ -LGの遺伝変異体のうち変異体Aのみを含むホルスタイン牛の個乳(畜産試験場で生産)よりAschaffenburgとDrewryの方法(86)により粗 $\beta$ -LGAを調製した。さらに、これをDEAE-650S(Tosoh, Tokyo)を用いたカラムと中低圧タンパク質分画装置(W650プロテインシステム, Waters)を用いたイオン交換クロマトグラフィにより精製した。すなわち、カラムを0.05Mイミダゾール塩酸バッファー(pH6.4)で平衡化して $\beta$ -LGを吸着させたのち、塩化ナトリウム0から0.5Mのリニアグラディエントにより溶出させた。溶出画分を水に対して透析、凍結乾燥し、SDS電気泳動的・ディスク電気泳動的に単一な $\beta$ -LGAを得た。また、アミノ酸組成をアミノ酸分析により確認した。

## 2) 合成ペプチドの調製

$\beta$ -LGの主要特異抗体結合領域である22-56残基目、72-86残基目、119-133残基目、149-162残基目の部分ペプチドおよびアミノ酸置換ペプチドはMerrifieldの固相合成法(87)により調製した。60、106、119、121、160残基目のCysはAlaに置換して合成した。反応試薬は特記したもの以外すべてペプチド研究所(大阪)より購入した。固相には1%ジビニルベンゼンで架橋したクロロメチル化ポリスチレン樹脂(0.8mmolCl/g、100-200メッシュ、和光純薬、東京)を用い、Boc基(t-ブチルオキシカルボニル基)で $\alpha$ -アミノ基を保護したアミノ酸を用いた。アスパラギン酸、グルタミン酸は、それぞれ $\beta$ -、 $\gamma$ -ベンジルエステル、セリン、スレオニン、O-ベンジル化物、チロシンはO-2、6-ジクロロベンジル化物、リジンは $\epsilon$ -2-クロロベンジロキシカルボニル化物、ヒスチジンはN<sup>ω</sup>-トシル化物(国産化学、東京)またはジニトロフェニル化物、アルギニンはN<sup>ω</sup>-ニトロ化物またはトシル化物(国産化学、東京)を用いた。まず、目的とするペプチドのC末端のアミノ酸を、Monahanの方法(88)により固相に結合させたのち、図4に示した方法に従って順次アミノ酸をペプチド結合で付加し、ペプチド鎖を延長した。アミノ酸の縮合は、主として対象酸無水物を用いて行なったが(89)、アスパラギン、グルタミン、ヒスチジン、アルギニンの場合は活性エステル法(90)によった。対象酸無水物は、固相上のアミノ酸のモル数に対して8倍量のアミノ酸を塩化メチレン(国産化学、東京)またはジメチルホルムアミドに溶解し、同量のジシクロヘキシルカルボジイミドとバイアル中で攪拌する事により得た。活性エステルは7倍量のアミノ酸をあらかじめ塩化メチレンに溶解した7倍量のヒドロキシベンゾトリアゾール(Hobt)とO

て、30分攪拌して得た反応物を用いた。アミノ酸縮合物は乾燥したガラスウールに通して沈澱を除去した後カップリング反応に供した。Boc基の脱保護には45% (v/v) トリフルオロ酢酸/塩化メチレンを、その後の中和には、精製したN、N-ジイソプロピルエチルアミン (Aldrich) の10% (v/v) 塩化メチレン溶液を使用した。3-12時間のカップリング反応後、Kaiserテスト (91) により未反応アミノ酸の有無をチェックした。ニンヒドリン反応陽性の場合には、再度同一のカップリングステップを繰り返すか、または、無水酢酸処理によってアセチル化し、反応系より除外した。ペプチド完成後、ジニトロフェニル基を保護基とするヒスチジン・アルギニンを含むペプチドについてはイミダゾール側鎖を還元してジニトロフェニル基を脱離した。ペプチドの樹脂からの切り出しおよびその他の保護基の脱離は、フッ化水素により行なった。脱保護基処理の後塩酸で樹脂および反応容器を洗浄し、グラスフィルターに通して濾液をペプチド溶液として得た。エバポレーターにより脱溶媒を行なって乾固し、さらにその水溶液からエーテル沈澱により得た粗精製ペプチド粉末をゲル濾過 (Sephadex G-25, Pharmacia) により精製した。ゲル濾過用緩衝液は0.05M重炭酸アンモニウムとし、凍結乾燥を行なって精製ペプチド粉末を得た。各画分のアミノ酸分析を行ない、アミノ酸組成が計算値に最も近いペプチドを高純度のペプチドとして以降の実験に用いた。

### 3) 実験動物

6週令のCD-1マウス (雌、SPF (Specific Pathogen-free) マウス) は、日本チャールズリバー (東京) より購入した。家兎および山羊は畜産試験場で繁殖した個体を実験に供した。

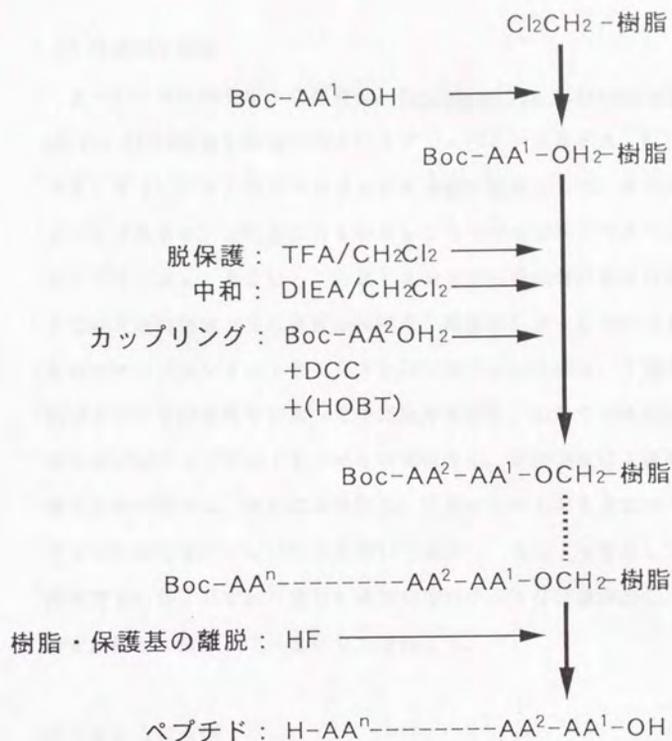


図4. 固相法によるペプチドの化学合成

Boc-AA : t-ブチルオキシカルボニルアミノ酸、TFA : トリフルオロ酢酸、DIEA : N, N-ジイソプロピルエチルアミン、DCC : ジシクロヘキシルボジイミド、HOBT : 1-ヒドロキシベンゾトリアゾール、HF : フッ化水素

#### 4) 抗血清の調製

$\beta$ -LG は生理食塩水に溶解し、*Mycobacterium tuberculosis*, strain H37Ra を含む完全フロイントアジュバント (CFA, Difco) で 1:1 (v/v) のエマルジョンを調製し抗原とした。マウス抗  $\beta$ -LG 血清は、1匹あたり  $100\mu\text{l}$  のエマルジョン ( $\beta$ -LG として  $40\mu\text{g}$ ) を CD-1 の足しよおよび尻尾の付け根に注射し、その後 3 週間間隔で 2 回免疫して得た。家兎は、 $\beta$ -LG  $4\text{mg}$  を含むエマルジョン  $1\text{ml}$  をマウスと同様足しよに免疫し、1 週間間隔でさらに 2 回筋注を行なった後抗血清を得た。山羊では  $4\text{mg}$  を含むエマルジョン  $2\text{ml}$  を上記と同様筋注し、追加免疫は 1 週間間隔で 3 回行なった。さらに 3 週間後、同量の  $\beta$ -LG を含むエマルジョンを不完全アジュバントを用いて調製し、 $2\text{ml}$  を筋注して最終免疫とした。いずれの場合も最終免疫の 7~10 日後採血し、血清を分離して使用まで  $-80^\circ\text{C}$  で保存した。

#### 5) ELISA 法

抗体と合成ペプチドとの結合反応性は ELISA 法を用いて解析した。測定系は、抗原ペプチドを吸着させた 96 穴 ELISA プレートに直接抗体溶液を加えて特異抗体量を測定する直接結合法、または抗体溶液をセファロースビーズ上に固定化した抗原ペプチドとインキュベートした後抗原結合プレートに分注し、吸収された特異抗体量を間接的に測定する免疫吸収法の二方法を用いた (図 5)。

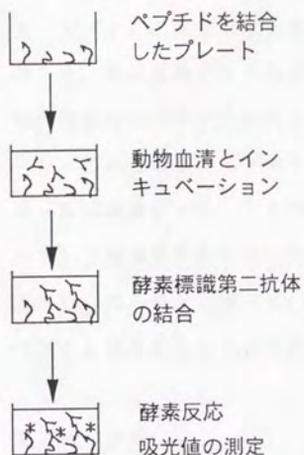
$100\mu\text{l}$  の  $\beta$ -LG ( $10\mu\text{g/ml}$ ) または合成ペプチド ( $50\mu\text{g/ml}$ ) を 96 ウェルポリスチレン製 ELISA プレート (Immuno plate I, Nunc) の各ウェルに加え、 $4^\circ\text{C}$ 、一晩静置してプレートに吸着させた。Immuno Wash 8 (Nunc) を用いて PBS で 6 回洗浄し

た後、PBSに溶解した0.1% (w/v) オボアルブミン (125  $\mu$ l/ウェル) で25℃、2時間ブロッキングを行なった。以後の反応にはいずれも100  $\mu$ l/ウェルの反応溶液を用い、25℃ 2時間静置の後0.05% (v/v) Tween 20を含むPBS (PBST) を用いて6回洗浄を行なった。PBSTで希釈した抗血清を加えて抗原抗体結合反応をさせ、さらにアルカリフォスファターゼで標識した家兎抗マウスIgG、山羊抗家兎IgGおよび家兎抗山羊IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories) を用いてペプチドに特異的な抗体を検出した。基質は0.1% (w/v) p-ニトロフェニルりん酸二ナトリウム塩を用い、溶媒を0.01% (w/v) 塩化マグネシウム6水塩と0.02%アジ化ナトリウムを含む1Mジエタノールアミン-塩酸緩衝液 (pH 9.8) として発色反応を行った。405 nmの吸光値をTitertek Multiskan MCC/340 (Flow Laboratories) で測定した。

#### 6) 免疫吸取法

Marchらの方法(92)に従い、あらかじめ臭化シアンで活性化したSepharose CL-4B (Pharmacia LKB) に $\beta$ -LGまたは合成ペプチドをカップリングして固定化ペプチドを得た。すなわち、同量の臭化シアンで活性化したセファロースビーズと0.2M炭酸緩衝液 (pH 9.5) に溶解した $\beta$ -LG (2 mg/ml) または合成ペプチド (1 mg/ml) を混合し、攪拌しながら4℃、20分間反応させた。カップリング反応後、エタノールアミン-塩酸緩衝液 (1M, pH 9.0) で25℃、6時間処理し、残存した活性基を不活性化した。得られた固定化ペプチドを0.5M塩化ナトリウムを含む0.1M酢酸緩衝液 (pH 4.0)、2M尿素を溶解した0.5M塩化ナトリウム、0.5M塩化ナトリウムを含む0.1M炭酸緩衝液 (pH 10.0)、

### 直接結合法



### 免疫吸収法

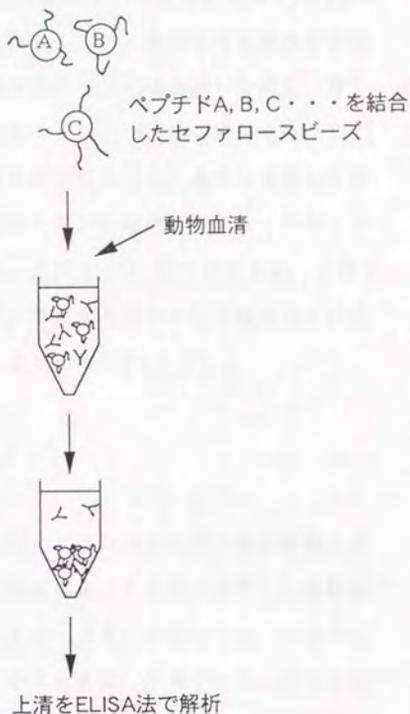


図5. B細胞エピトープの解析に用いた二方法  
(直接結合法・免疫吸収法)の概略

PBS (pH 7.2) 各20倍量で洗浄し、PBSに分散した(1:1, v/v)。尿素による洗浄は $\beta$ -LGを結合させる場合には除外した。6N塩酸による加水分解物をアミノ酸分析した結果、得られた固定化ペプチドは約50~80nmolの吸収抗原を結合していた。これら固定化ペプチドを免疫吸収体とし、適度に希釈した抗 $\beta$ -LG血清と4℃、16時間ゆるやかに攪拌しながらインキュベートして特異抗体を吸収させた。これを12,000rpm、2分で遠沈し、得られた上清について、残存する抗 $\beta$ -LG抗体および抗ペプチド抗体をELISA法により定量した。

### 第3節 結果

マウス、家兎、山羊におけるシークエンシャルな主要B細胞エピトープ領域は、 $\beta$ -LGの一次構造に従って合成された16種類のペプチド：ペプチド1-15、11-26、22-36、32-46、42-56、52-66、62-76、72-86、82-95、91-104、100-113、109-123、119-133、129-143、139-153、149-162(第51図参照)に結合し得る抗 $\beta$ -LG血清中の抗体量をELISAで解析することにより明らかとされている。

すなわち、いずれのペプチドについても特異抗体は検出されたが、マウスでは22-56、72-86、119-133、149-162残基目に抗体結合領域があり、家兎では22-56、72-86、100-143、149-162残基目に、山羊では22-56、72-86、119-143、149-162残基目にそれぞれ相対的に多量の特異抗体が検出された。

3つの動物種においてほぼ同一の部分にB細胞エピトープとして

認識されていることは、免疫ホストに左右されない、 $\beta$ -LGのタンパク質分子固有の抗原構造が存在することを示唆しており大変興味深い。特に22-56残基目、72-86残基目、119-133残基目、149-162残基目は3つの動物種に共通して認識されている領域であることから、その詳細な抗原構造の解析が待たれていた(図6)。

本研究では、上記の抗原性領域に存在するアミノ酸配列に基づいて合成した各種部分ペプチドおよびアナログペプチドを用い、B細胞エピトープの限定化を行なって詳細な抗原構造を明らかとした。図7~13に各領域の限定化に用いたアナログペプチドを示した。解析方法としては、抗原を直接プレートに結合させて血清中の特異抗体と反応させる直接結合法と、抗原をセファロースビーズに結合させて血清中特異抗体の吸収に用いる免疫吸収法の二方法を用いた。特に免疫吸収法では充分量の抗原ペプチドと抗体を反応させるため、より低い結合定数を持つ特異抗体もキャッチできる利点がある。また直接結合法では短鎖長ペプチドのプレートへの吸着が困難である上、固相への吸着部位と抗体との結合部位が競合する可能性があること、ペプチド立体構造のフレキシビリティが減少し、抗原抗体反応時のインデューストフィットの効果が減ることなどの問題点が考えられるが、免疫吸収法はそれらの点においても有利である。なお、本章における結果はすべて、上記主要抗原性領域の解析が行われた際と同一ロットの抗血清を用いて得られた。

#### 1) B細胞エピトープ領域22-56残基目の限定化

$\beta$ -LGの主要B細胞エピトープ領域22-56は22-36残基目、32-46残基目および42-56残基目に相当する3つのオーバーラッピング合成ペプチドに結合する抗体を解析することに

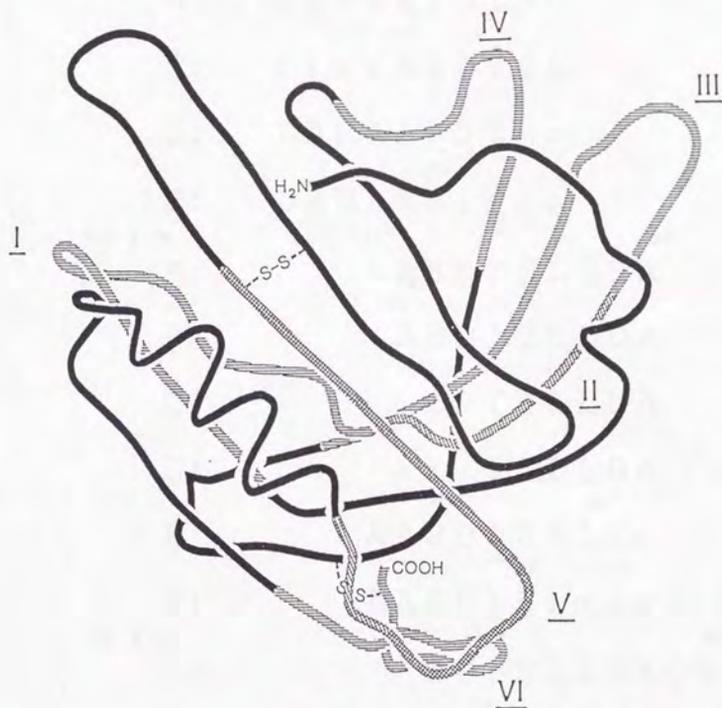


図6. ウシ $\beta$ -ラクトグロブリン上の主要抗体結合領域

領域I：22-36残基目、領域II：32-46残基目、領域III：  
42-56残基目、領域IV：72-86残基目、領域V：119-  
133残基目、領域VI：149-162残基目が明らかにされてい  
る(77)。

	22		36
		LAMAASDISLLDAQS	
LG I-n	22		31
A:		LAMAASDISL	
B:	24	GGMAASDISL	
C:	26	GGGGASDISL	
D:	29	LAMAASDIGG	
E:	27	LAMAASGGGG	
LG I-m	25		34
A:		AASDISLLDA	
B:	26	ASDISLLDA	
C:	28	GGDISLLDA	
D:	29	GGGISLLDA	
E:	32	AASDISLLGG	
F:	30	AASDISGGGG	
LG I-c	27		36
A:		SDISLLDAQS	
B:	29	GGISLLDAQS	
C:	31	GGGGLLDAQS	

図7. 領域I(22-36残基目)の限定化に用いた  
アナログペプチド

32

46

LDAQSAPLRVYVEEL

## LG II-n

A: <sup>32</sup>LDAQSAPLRV<sup>41</sup>B: GG<sup>34</sup>AQSAPLRVC: LDAQSAPLGG<sup>39</sup>D: LDAQSA<sup>37</sup>GGGG

## LG II-m

A: <sup>34</sup>AQSAPLRVYV<sup>43</sup>

## LG II-c

A: <sup>37</sup>APLRVYVEEL<sup>46</sup>B: GG<sup>39</sup>LRVYVEELC: GGGG<sup>41</sup>VYVEELD: APLRVYVEGG<sup>44</sup>E: APLRVY<sup>42</sup>GGGG

図8. 領域II(32-46残基目)の限定化に用いた  
アナログペプチド

26 41  
ASDISLLDAQSAPLRV

I-c

26 36  
A: ASDISLLDAQS  
28  
B: GGDISLLDAQS  
30  
C: GGGGSLLLDAQS  
34  
D: ASDISLLDA<sub>GG</sub>  
32  
E: ASDISLL<sub>GGGG</sub>

I-II-m

29 41  
A: ISLLDAQSAPLRV  
30  
B: SLLDAQSAPLRV

II-n

32  
A: LDAQSAPLRV  
34  
B: GGAQSAPLRV  
39  
C: LDAQSAPL<sub>GG</sub>  
37  
D: LDAQSA<sub>GGGG</sub>

図10. 領域I-II(26-41残基目)の限定化に用いた  
アナログペプチド

72 86  
I A E K T K I P A V F K I D A

IV-A: <sup>73</sup> A E K T K I P A V F K I <sup>84</sup> G  
B: <sup>75</sup> K T K I P A V F K I G  
C: <sup>77</sup> G G K I P A V F K I G  
D: <sup>79</sup> G G G G P A V F K I G  
E: <sup>82</sup> K T K I P A V F G G G  
F: <sup>80</sup> K T K I P A G G G G G

図11. 領域N(72-86残基目)の限定化に用いた  
アナログペプチド

119 133  
A Q A L V R T P E V D D E A L

LG V-n

119 128  
A: A Q A L V R T P E V

LG V-c

123 133  
A: V R T P E V D D E A L  
124  
B: G R T P E V D D E A L  
126  
C: G G G P E V D D E A L  
128  
D: G G G G G V D D E A L

図12. 領域V(119-133残基目)の限定化に用いた  
アナログペプチド

149

162

L S F N P T Q L E E Q A H I

## LG VI

	150		159
A:	S	F	N
		P	T
		Q	L
		E	E
		Q	G
	152		
B:	G	G	N
			P
			T
			Q
			L
			E
			E
			Q
			G
	154		
C:	G	G	G
			G
			T
			Q
			L
			E
			E
			Q
			G
	157		
D:	S	F	N
			P
			T
			Q
			L
			E
			G
			G
			G
			G
	155		
E:	S	F	N
			P
			T
			Q
			G
			G
			G
			G
	154		
F:			T
			Q
			L
			E
			E
			Q
			A
			H
			I
	156		
G:	G	G	L
			E
			E
			Q
			A
			H
			I
	158		
H:	G	G	G
			G
			E
			Q
			A
			H
			I

図13. 領域M(149-162残基目)の限定化に用いた  
アナログペプチド

より決定されたため、それぞれのペプチドが表わす範囲を便宜的に I、II および III と名付けた。本節では、上記 3 ペプチド（ペプチド 22-36、32-46、42-56）の抗体結合能を基準とし、図 7、8、9 に示したアナログペプチドを用いて 22-56 残基目の詳細な抗原構造の解析を行なった。

(a) 領域 I (22-36 残基目)

まず、ペプチド 22-36 を検出抗原とし、22-36 残基目（領域 I）の抗体結合領域の限定化を試みた。N 末端側 10 残基からなるペプチド 22-31 (I-nA)、中央部 10 残基からなるペプチド 25-34 (I-mA) および C 末端側 10 残基からなるペプチド 27-36 (I-cA) のペプチドの抗体結合能を、ペプチド 22-36 を吸着させたプレートを用いて直接結合法 (ELISA) および免疫吸収法で比較した。図 14、15、16 にそれぞれマウス、家兎、山羊抗血清を用いた結果を示した。直接結合法の結果は、各ペプチドを検出抗原としてプレートに吸着させた時に得られる値から、オボアルブミンを吸着抗原とした時の吸光値を差し引いた値で示した。免疫吸収法の結果に示す None は免疫吸収体無しの場合で、領域 I 特異抗体全体の量を表わしている。またグラフ上の吸光値は、それぞれのペプチドを吸収体としたときの残存抗体が与える値から、検出抗原（図 14～19 の場合ペプチド 22-36）を吸収抗原とした群の値を差し引きした絶対値を示した。

マウスにおいては、N 末端側ペプチドによる抗体の結合も吸収も認められないのに対し C 末端側ペプチドでは領域 I 特異抗体の 80% が吸収された。特に、I-cA は 25 および 26 残基目の A1a を欠いているにもかかわらず、I-mA と比較して抗体吸収能が顕

著に高かったことから、35と36残基目のGlnとSerが抗体結合に重要な役割を果たしていることが明らかとなった(図14)。家兎ではマウスと対象的にI-mAが領域Iペプチドに近い抗体結合性を示すとともに、大部分の領域I特異抗体を吸収した(図15)。山羊ではN末端側ペプチドが最も吸収能を有していた(図16)。

上記の結果を参考に、マウスではI-cA、家兎ではI-mA、山羊ではI-nAのアミノ酸を一部Glyに置換したアナログペプチドを合成し、同様の解析を行なった結果を図17~19に示した。マウスではN末端側からGlyに置換することによりI-cA特異抗体に対する結合性は徐々に失われたが、I-cCにおいても約1/3は吸収された(図17)。

家兎ではI-mAは領域Iペプチドとほぼ同様な抗体結合性を有しており、I-mB、I-mCのようにN末端側からAla、Serを失っても抗体吸収能の低下は顕著ではなかった。このことより、25残基目のAla、26、27残基目のAlaとSerの関与は大きくないことがわかった。ところが、さらにN末端側からAspを欠いたI-mDでは抗体吸収能が失われることから、28残基目のAspが極めて重要であることが示された。一方、C末端側については、<sup>33</sup>DA<sup>34</sup>を欠いたI-mEでも全体の1/3ほどの特異抗体は結合能を有していたが、それらも31、32残基目のLeuを欠いたI-mFでは失われていることより、この領域に対する主な特異抗体は<sup>33</sup>DA<sup>34</sup>を必要とするグループと必要としないグループに分けられることが示された。すなわち、領域I特異抗体の約2/3は<sup>28</sup>DISLLDA<sup>34</sup>を結合領域とし、残りは<sup>28</sup>DISLL<sup>32</sup>を認識していると考えられた(図18)。

山羊では<sup>24</sup>MAASDI<sup>29</sup>が領域I特異抗体の大部分を結合し得ることが明らかとなった(図19)。

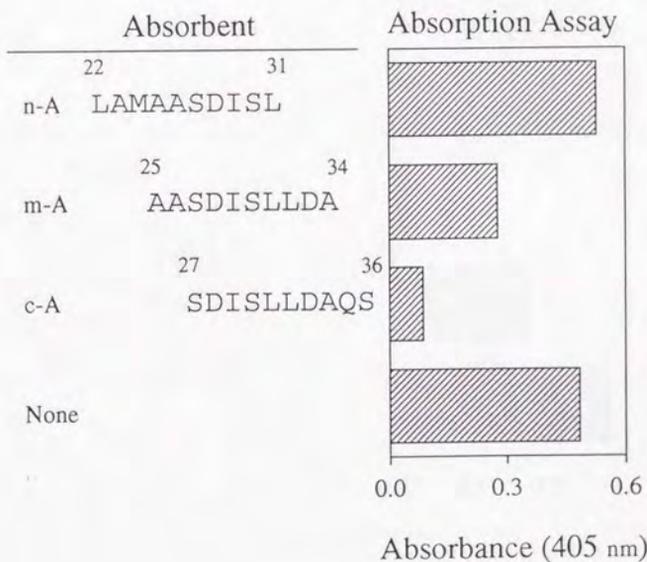
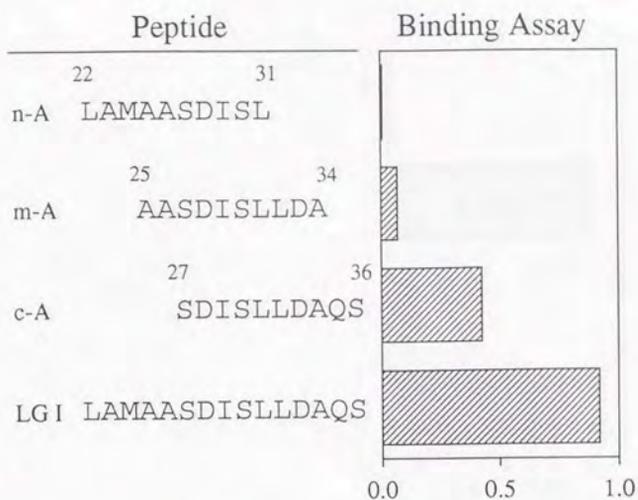
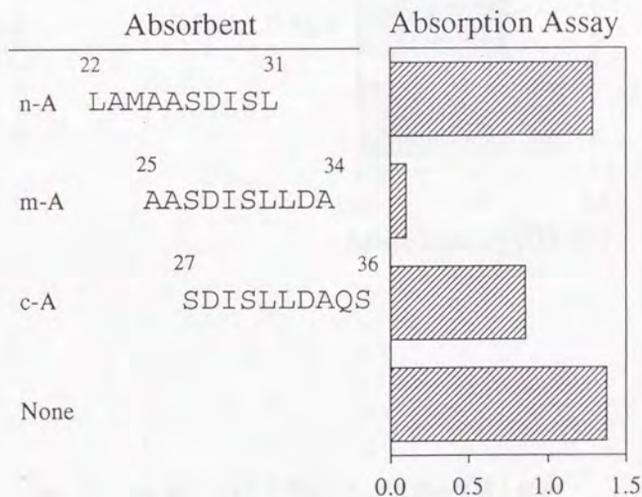
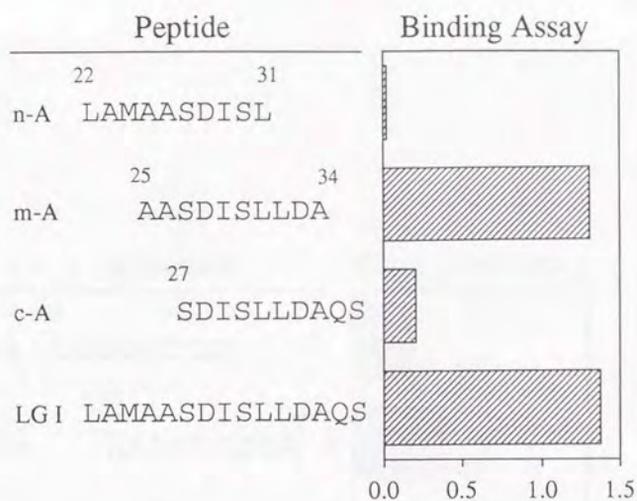


図 14. マウス抗 $\beta$ -ラクトグロブリン血清中領域 I 部分  
ペプチドと結合する特異抗体の解析



Absorbance (405 nm)

図15. 家兔抗 $\beta$ -ラクトグロブリン血清中領域I部分  
ペプチドと結合する特異抗体の解析

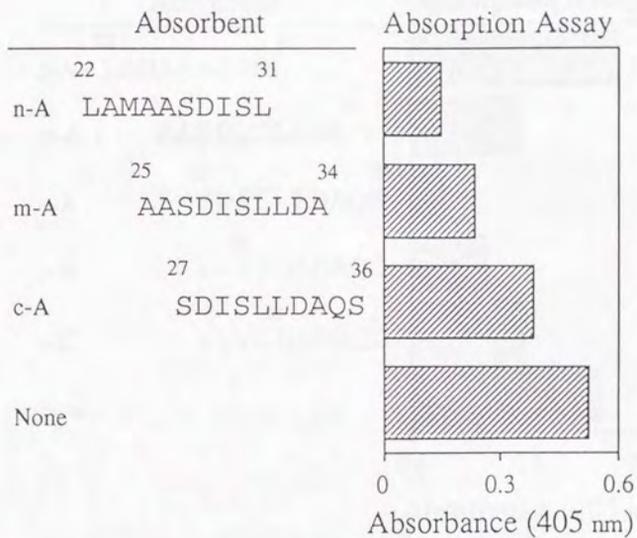


図16. 山羊抗B-ラクトグロブリン血清中領域I部分  
ペプチドと結合する特異抗体の解析

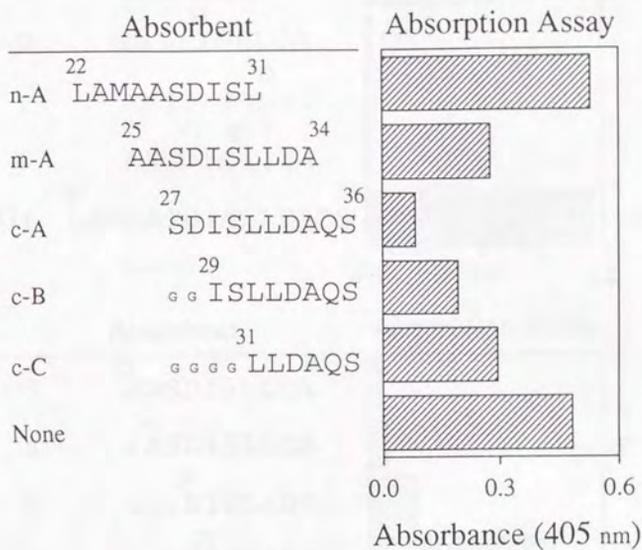


図 17. マウスにおける抗領域 I 特異抗体の解析: C 末部アナログペプチドを用いた抗体結合領域 (B 細胞エピトープ) の限定化

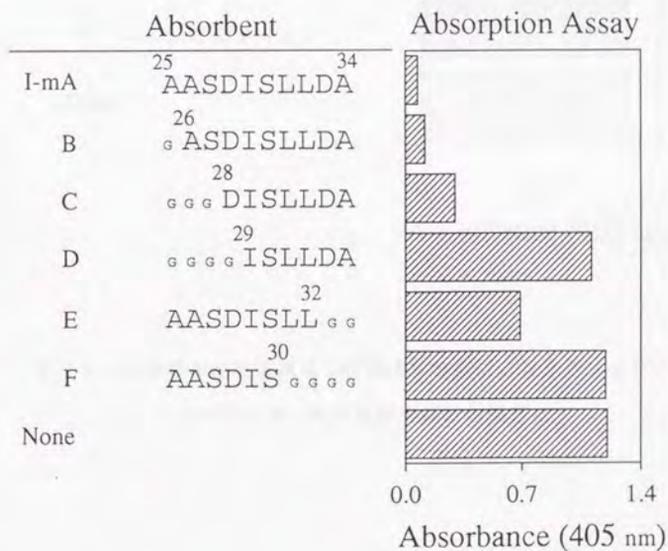
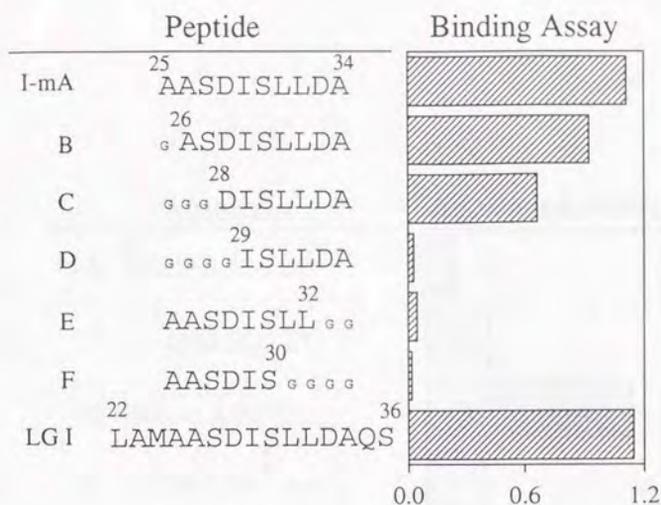


図18. 家兔における抗領域I特異抗体の解析：中央部アナログペプチドを用いた抗体結合領域（B細胞エピトープ）の限定化

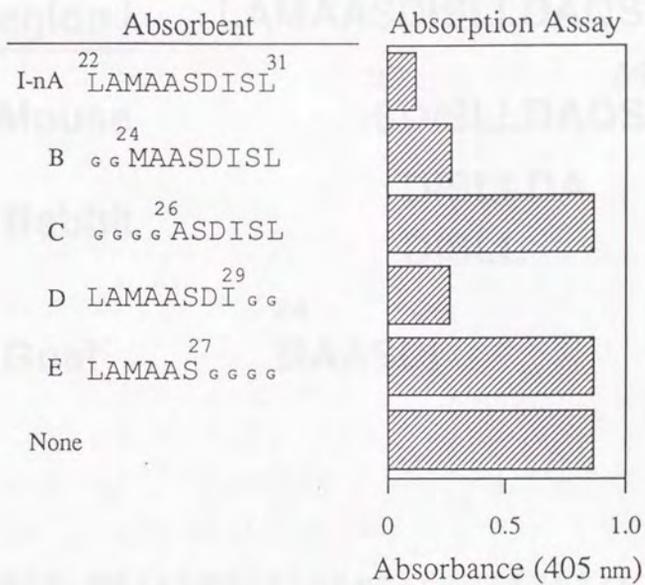


図19. 山羊における抗領域I特異抗体の解析：N末端アナログ  
ペプチドを用いた抗体結合領域の限定化

<u>Region I</u>	22	LAMAASDISLLDAQS	36
Mouse	27	SDISLLDAQS	36
Rabbit		DISLLDA	
		DISLL	
Goat	24	MAASDI	29

図20. 領域Iより限定化されたB細胞エピトープ領域のまとめ

以上の結果をまとめると、マウスでは領域Ⅰ特異抗体の大部分は27から36残基目に特異性が向かっており、中でもC端側が重要であった。一方、家兎では特異性のかなりの部分をそれぞれ28から34残基目で説明することができ、さらに<sup>28</sup>Dから<sup>34</sup>Aを認識する群と<sup>28</sup>Dから<sup>32</sup>Lを認識する群に分けられることがわかった。山羊では24から29残基目が主な抗体結合領域であった(図20)。

#### (b) 領域Ⅱ(32-46残基目)

ペプチド32-46を検出抗原とし、32-46残基目(領域Ⅱ)の抗体結合領域の限定化を試みた。図2-bに示すペプチド32-41(Ⅱ-nA)、34-43(Ⅱ-mA)、37-46(Ⅱ-cA)を用いて吸収実験を行なったところ、マウスではペプチド32-41、家兎、山羊ではペプチド37-46で領域Ⅱ特異抗体のほとんどを吸収した(図21)ので、以下、マウスではN末側の4種、家兎、山羊ではC末側の5種のアナログペプチドを用いて解析を進めた。

マウスではペプチド32-41で領域Ⅱ特異抗体の大部分が吸収されているのに対し、N末側2残基を欠くと吸収量が減ることから、<sup>32</sup>L D<sup>33</sup>は抗体結合への関与が大きいことが示された。また、C末端を欠損していくペプチドでは<sup>40</sup>R V<sup>41</sup>を欠いてもかなりの部分が吸収されているのに対し、<sup>38</sup>P L<sup>39</sup>を欠くと全く吸収しなくなることから<sup>38</sup>P<sup>39</sup>Lの寄与はかなり大きいと思われる。すなわち、マウスでは32-39残基を中心とする部分が主要な抗体結合領域であることが明らかとなった(図22)。

家兎の抗血清において領域ⅡのC末側を調べたところ、Ⅱ-cA、Ⅱ-cBでほとんどの領域Ⅱ特異抗体を吸収するのに対し、Ⅱ-cCでは吸収能が大きく落ちることから、<sup>39</sup>L R<sup>40</sup>が抗体結合に重要

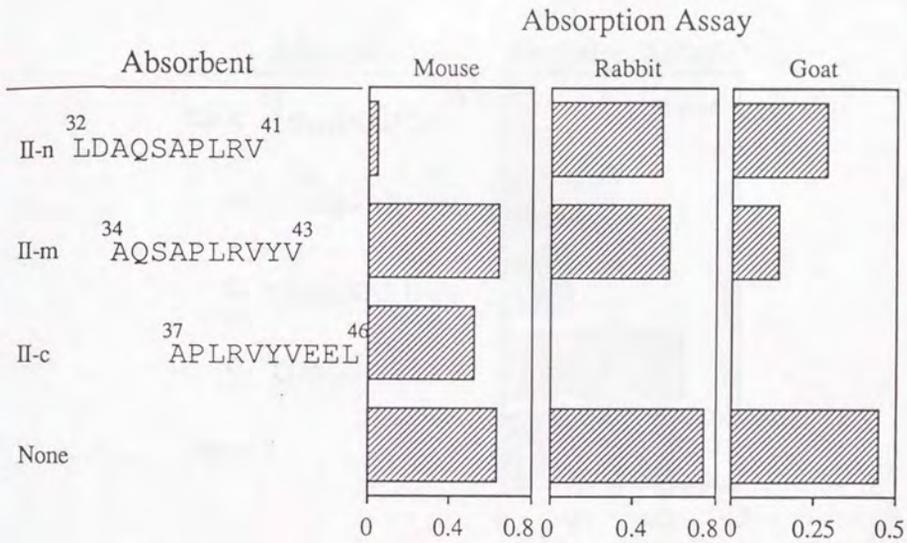


図 21. マウス・家兎・山羊抗β-ラクトグロブリン血清中領域Ⅱ  
部分ペプチドと結合する特異抗体の解析

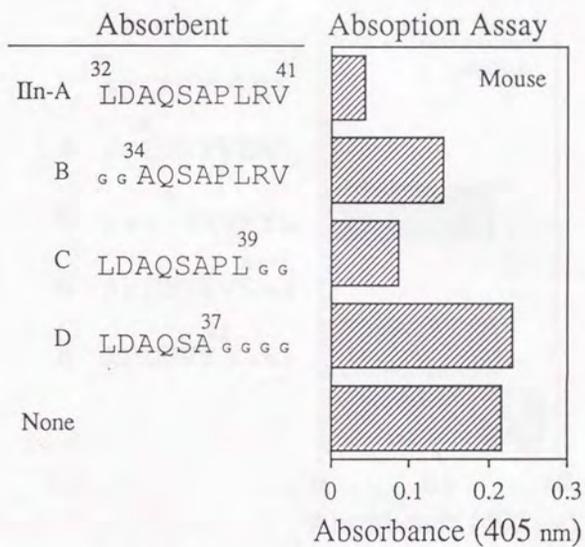


図 22. マウスにおける抗領域 II 特異抗体の解析: N 末部アナログペプチドを用いた抗体結合領域 (B 細胞エピトープ) の限定化

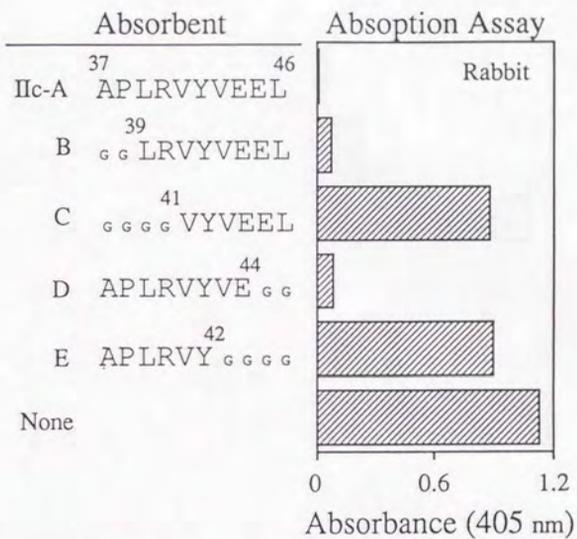


図23. 家兎における抗領域Ⅱ特異抗体の解析：C末端アナログペプチドを用いた抗体結合領域（B細胞エピトープ）の限定化

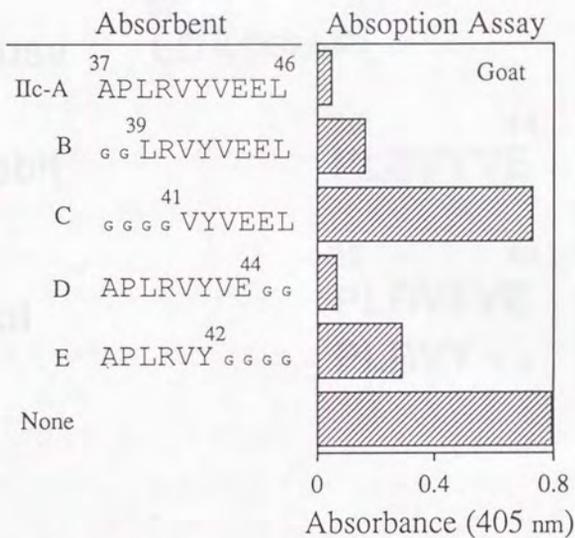


図24. 山羊における抗領域Ⅱ特異抗体の解析：C末部アナログペプチドを用いた抗体結合領域（B細胞エピトープ）の限定化

	32	46
<u>Region II</u>	LDAQSAPLRVYVEEL	
	32	39
Mouse	LDAQSAPL	
	39	44
Rabbit	PLRVYVE	
	39	44
Goat	PLRVYVE	
	PLRVY	VE

図25. 領域IIより限定化されたB細胞エピトープ領域のまとめ

であることが解った。同様に、II-cDで保たれている抗体結合能がII-cEで急激に落ちていることから、<sup>43</sup>VE<sup>44</sup>も非常に重要であることが解り、家兎では39-44が抗体結合において中心部分になることが明らかとなった(図23)。

山羊の抗血清においては家兎とほぼ同様の傾向で、<sup>39</sup>LR<sup>40</sup>の重要性が示されたが、C末側については<sup>43</sup>VE<sup>44</sup>を欠いても領域II特異抗体の過半を吸収することから、<sup>43</sup>VE<sup>44</sup>は家兎における場合ほど大きく関与していないことが解った(図24)。

以上の結果を図25に示した。マウスでは32-39残基、家兎では39-44残基を中心とする部分が抗体結合に重要であることが解った。山羊では家兎と同様に39-44残基が抗体結合に必要なであるが、39-42の4残基で抗原特異性のほとんどを説明することができた。

#### (c) 領域III(42-56残基目)

ペプチド42-56を検出抗原とし、42-56残基目(領域III)の抗体結合領域の限定化を試みた。図9に示すペプチド42-52(III-nA)、46-56(III-cA)を用いて吸収実験を行なったところ、マウス・家兎ではC末側、山羊ではN末側で領域III特異抗体の大部分が吸収された。以下、マウス・家兎ではC末側の5種、山羊ではN末側の4種のアナログペプチドを用いて解析を進めた(図26、27、28)。

マウスではIII-cAから<sup>46</sup>LK<sup>47</sup>を欠いてもほとんどの領域III特異抗体が吸収されるのに対し、<sup>48</sup>PT<sup>49</sup>を欠いたIII-cCではほとんど吸収性は見られず、それらの重要性を示している。同様に、III-cEで見られるように<sup>55</sup>EI<sup>56</sup>を欠いても吸収能は保持されるのみに対し、III-cDのように<sup>53</sup>DL<sup>54</sup>を欠損すると領域IIIペプチド

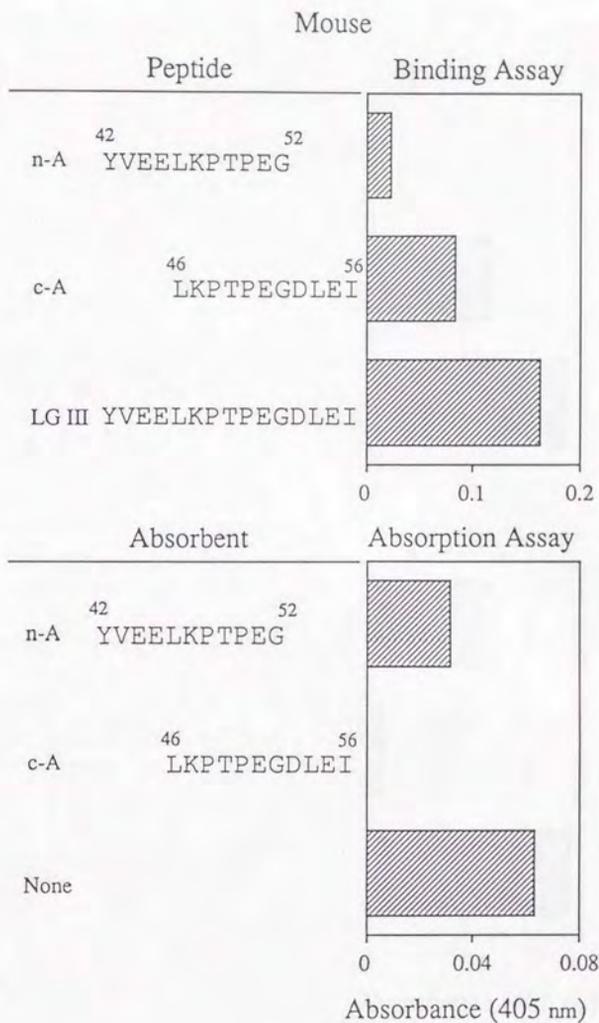


図 26. マウス抗 $\beta$ -ラクトグロブリン血清中領域 III 部分ペプチドと結合する特異抗体の解析

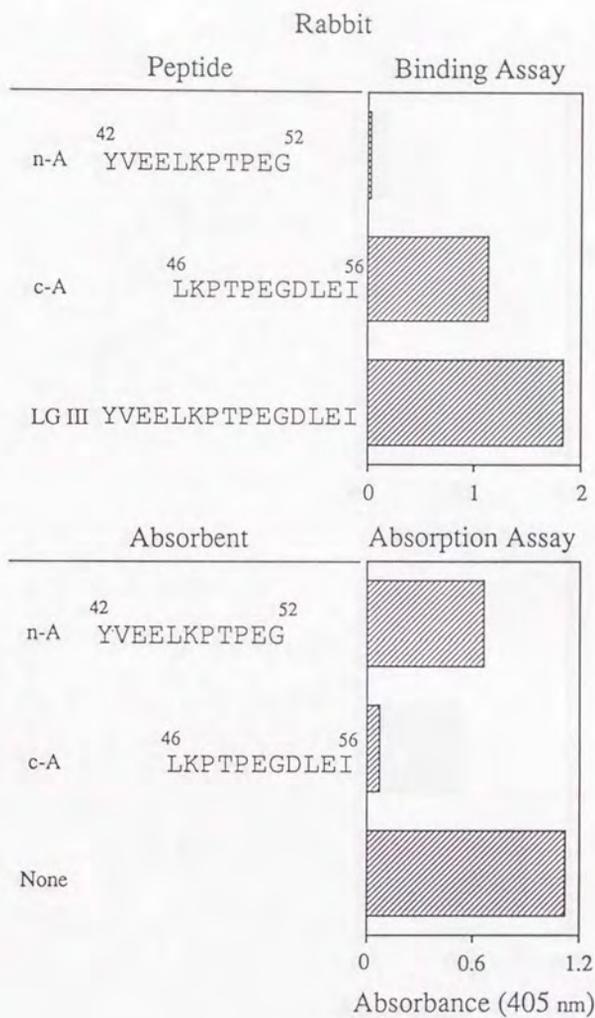


図 27. 家兔抗 $\beta$ -ラクトグロブリン血清中領域Ⅲ部分  
ペプチドと結合する特異抗体の解析

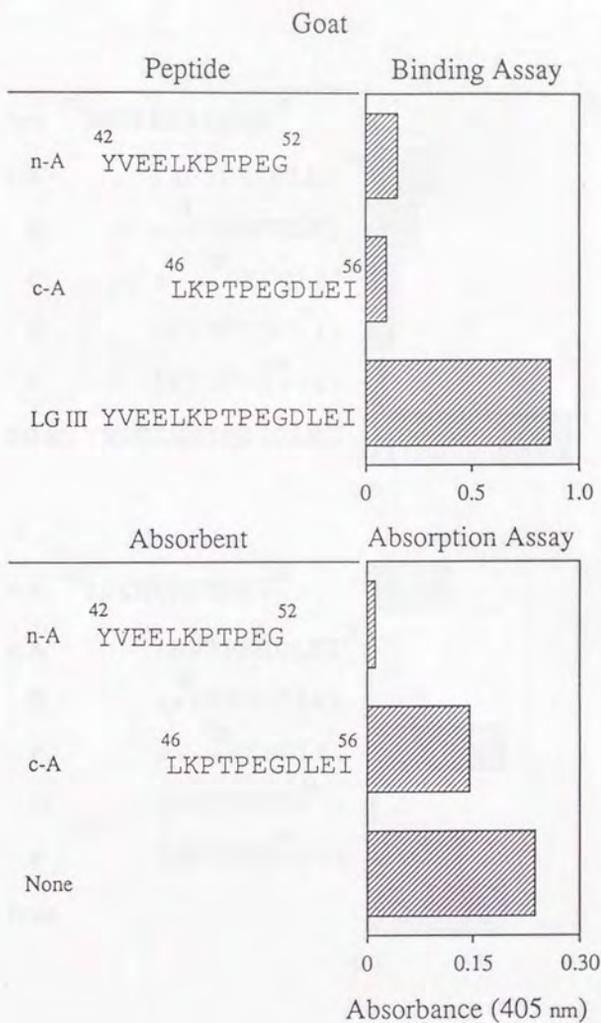


図 28. 山羊抗β-ラクトグロブリン血清中領域Ⅲ部分  
ペプチドと結合する特異抗体の解析

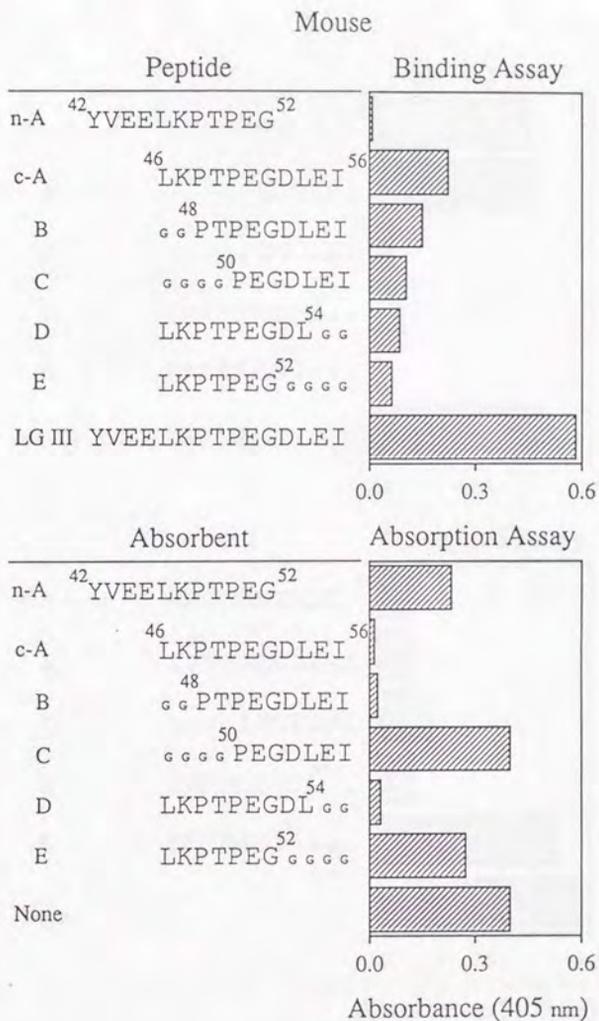


図29. マウスにおける抗領域Ⅲ特異抗体の解析：C末部アナログペプチドを用いた抗体結合領域（B細胞エпитープ）の限定化

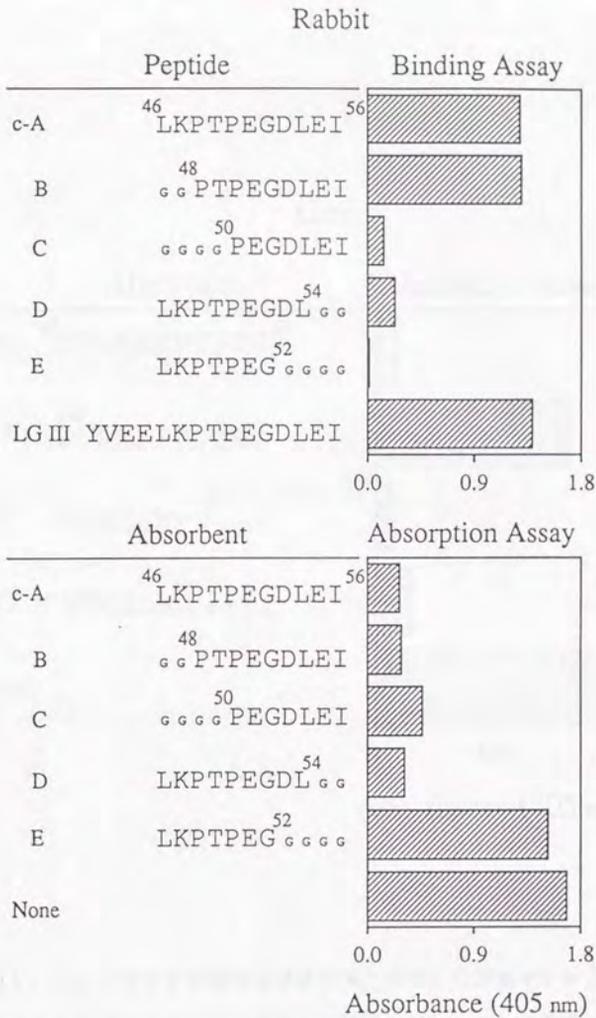


図30. 家兎における抗領域Ⅲ特異抗体の解析：C末端アナログペプチドを用いた抗体結合領域（B細胞エピトープ）の限定化

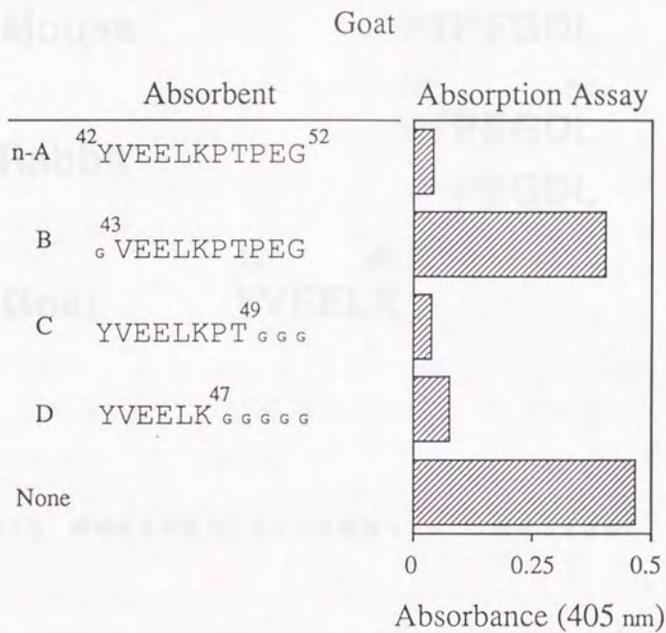


図31. 山羊における抗領域Ⅲ特異抗体の解析：C末端アナログペプチドを用いた抗体結合領域（B細胞エпитープ）の限定化

	42		56
<u>Region III</u>	YVEELKPTPEGDL EI		
Mouse		48	54
		PTPEGDL	
Rabbit		48	54
		PTPEGDL	
		PT PEGDL	
Goat	42	47	
	YVEELK		

図 3 2. 領域 III より限定化された B 細胞エпитープ領域のまとめ

への結合性を失うことより、これらが抗体結合に重要なアミノ酸であることが明らかとなった(図29)。

家兎では<sup>46</sup>L K P T<sup>49</sup>および<sup>55</sup>E I<sup>56</sup>のG l yへの置換はほとんど領域Ⅲ特異抗体の吸収能には影響を及ぼさなかったのに対し、<sup>53</sup>D L<sup>54</sup>を欠くⅢc-Eではほとんど吸収能は消失し、抗体結合における<sup>53</sup>D L<sup>54</sup>の関与が大きいことが解った(図30)。

山羊ではN末側のペプチド42-52の一部をG l yに置換してアミノ酸の抗体結合への寄与をみたが、42残基目のT y rを欠くⅢ-c Bペプチドではほとんど結合性が認められなかった。それに対して、C末側を欠くC、Dは領域Ⅲとほぼ同等の結合能を有していた。従って、山羊においては、42残基目のT y rが抗体結合に強く関与しており、48-52残基目の関与は少なく<sup>42</sup>Y V E E L K<sup>47</sup>残基目を中心とした部分に抗体結合領域が集中していることが明らかとなった。(図31)

マウス、家兎、山羊における結果を図32にまとめて記した。

#### (d) 領域Ⅰ-Ⅱ(26-41残基目)

領域22-56に特異的な抗体を5残基ずつ重複するペプチド22-36、32-46、42-56を用いて解析した後、重複部分を認識する抗体の特異性をさらに解析する目的でペプチド26-41および36-51を合成し(図10)、吸収実験における基準ペプチドとして用いた。ペプチド26-41(領域Ⅰ-Ⅱ)を吸着抗原とした実験では家兎、山羊において新しい抗体結合領域が同定されたが、ペプチド36-51(領域Ⅱ-Ⅲ)を用いた実験ではペプチド32-46、42-56を基準ペプチドとして解析した場合と同じ領域が認識されることが解った。

部分ペプチドⅠ-c A~E、Ⅰ-Ⅱ m A~B、Ⅱ-n A~Dを用

いて領域 I - II を解析した結果を図 33 ~ 35 に示した。領域 I と領域 II は重複する 32 - 36 残基を中心としたそれぞれの C 末側と N 末側で領域 I - II をカバーする。マウスにおいて領域 I - II に特異性を示す抗体はこの 2 領域の混合物ではほぼすべて吸収された。それぞれの部分ペプチドを用いた結果、領域 I、領域 II を解析して得られた知見通り領域 I における 28 - 36 残基目、領域 II における 32 - 39 残基目が主に認識されており、領域 I - II はこの 2 つのエピトープが複合した抗原性領域として説明された (図 33)。

家兎の場合も同様に領域 I - II に特異性を示す抗体のほぼすべてが領域 I と II の混合物で吸収されることが解った。また、領域 I の主なエピトープは C 末側にあることが解っていたが、ペプチド 26 - 41 を検出抗原として用いることにより、32 - 39 残基目を中心として認識する抗体も相当量存在することが明らかとなった (図 34)。

山羊の抗血清を用いた結果では、領域 I、II ペプチドはいずれも領域 I - II 特異抗体に対する寄与が少ないことが解った (図 35)。そこで、これまで使ったペプチド 26 - 36、ペプチド 32 - 41 に対してより中央部分を多く含むペプチド 29 - 41 (I - II m A)、ペプチド 30 - 41 (I - II m B) を合成し、免疫吸収実験を行ったところ、これら 2 ペプチドはいずれも領域 I - II に特異性を示す抗体の大部分を吸収することが解った (図 35 ~ 37)。このことより、山羊では領域 I、II の主要エピトープとは別に 29 - 41 残基目をおもに認識する抗体のグループもあることが明らかとなった。以上の結果を図 38、39 に示した。図 38 ではペプチド 26 - 41 を用いることにより新たに検出された B エピトープに下線を施して示している。図 39 では  $\beta$ -LG の立体構造の一部に各動物種が認識する B エピトープを示した。いずれの動物種においても、

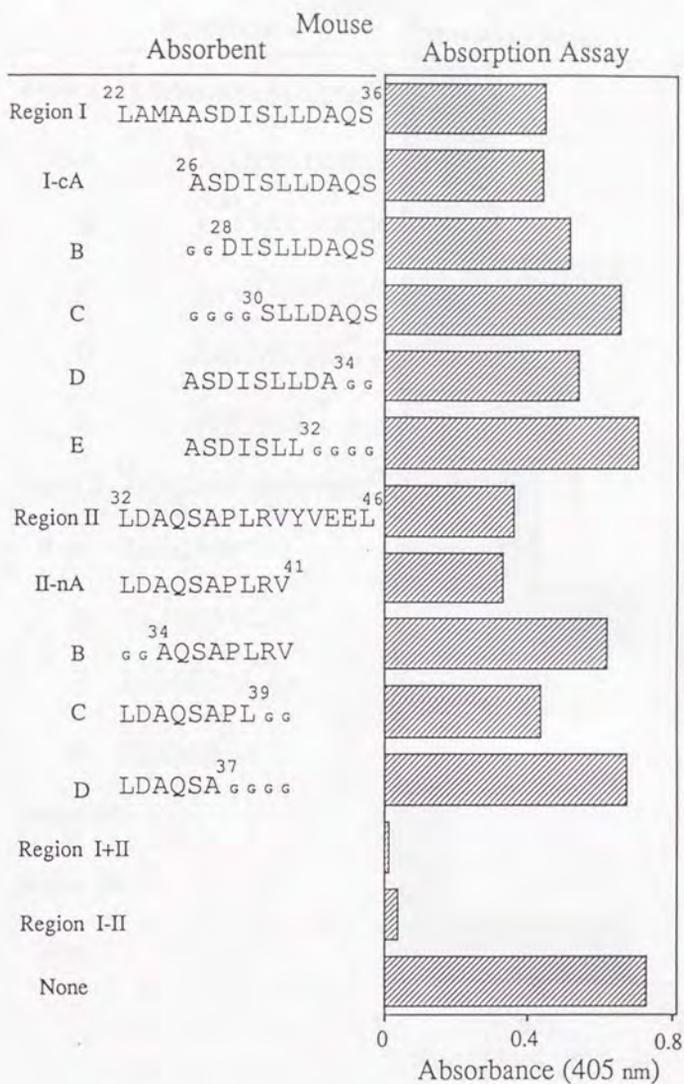


図33. マウス抗β-ラクトグロブリン血清中領域I-II部分ペプチドと結合する特異抗体の解析

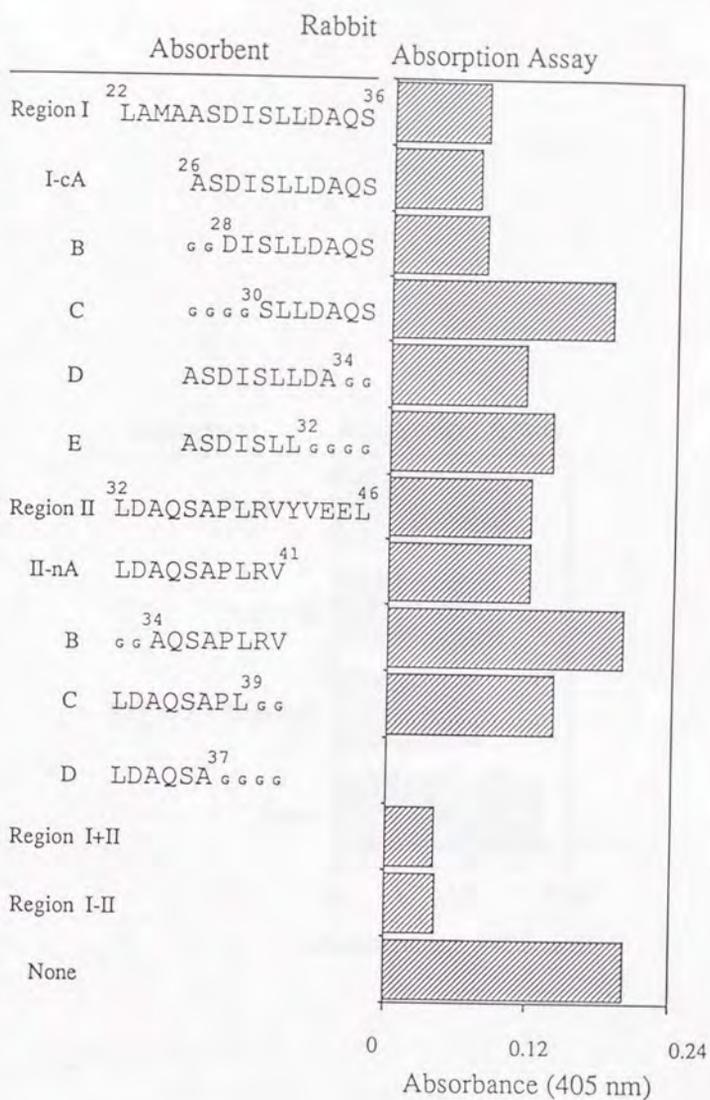


図34. 家兎抗β-ラクトグロブリン血清中領域I-II部分ペプチドと結合する特異抗体の解析

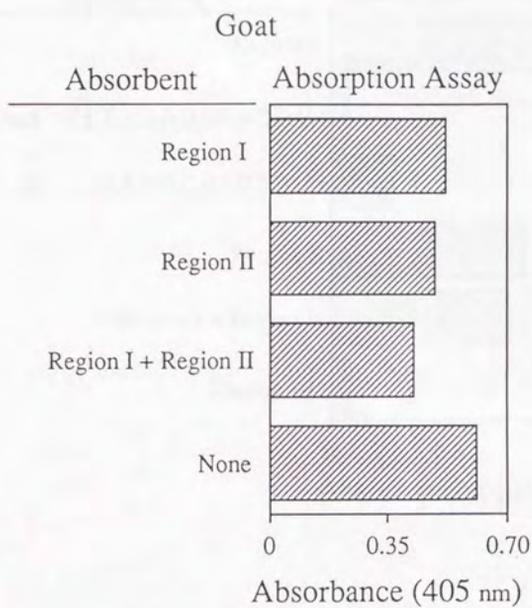


図 35. 山羊抗  $\beta$ -ラクトグロブリン血清中領域 I - II 部分  
ペプチドと結合する特異抗体の解析

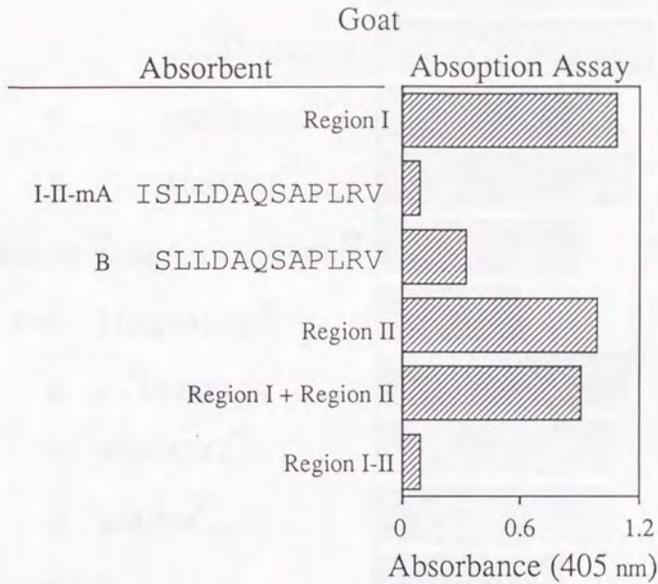


図36. 山羊抗 $\beta$ -ラクトグロブリン血清中領域I-II部分  
ペプチドと結合する特異抗体の解析

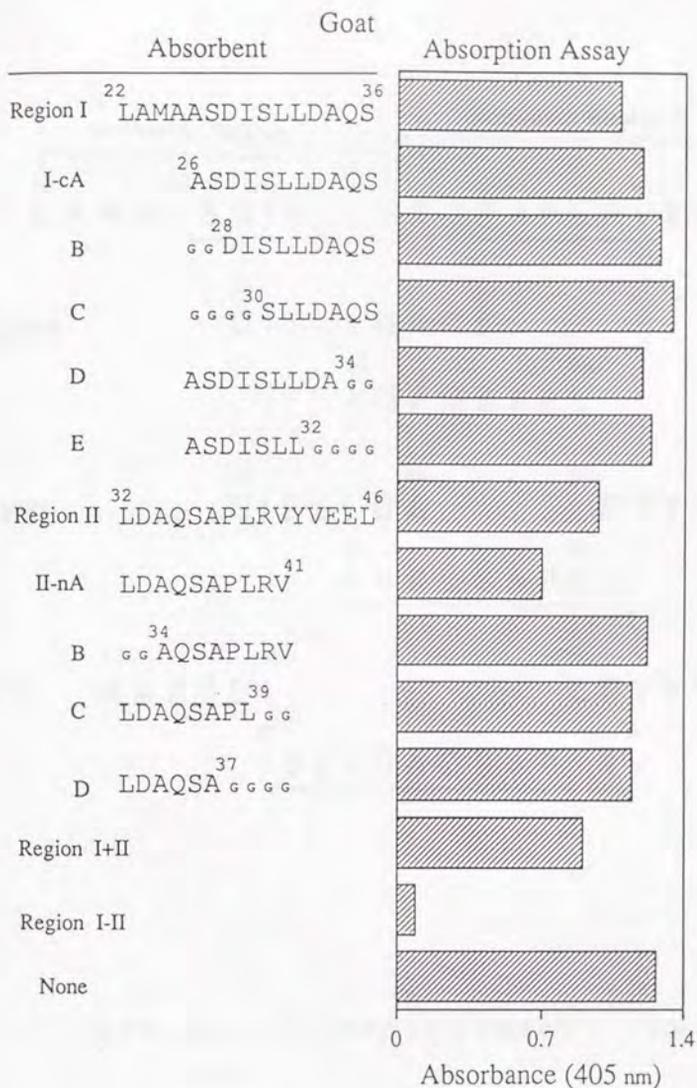


図37. 山羊抗β-ラクトグロブリン血清中領域I-II部分  
ペプチドと結合する特異抗体の解析

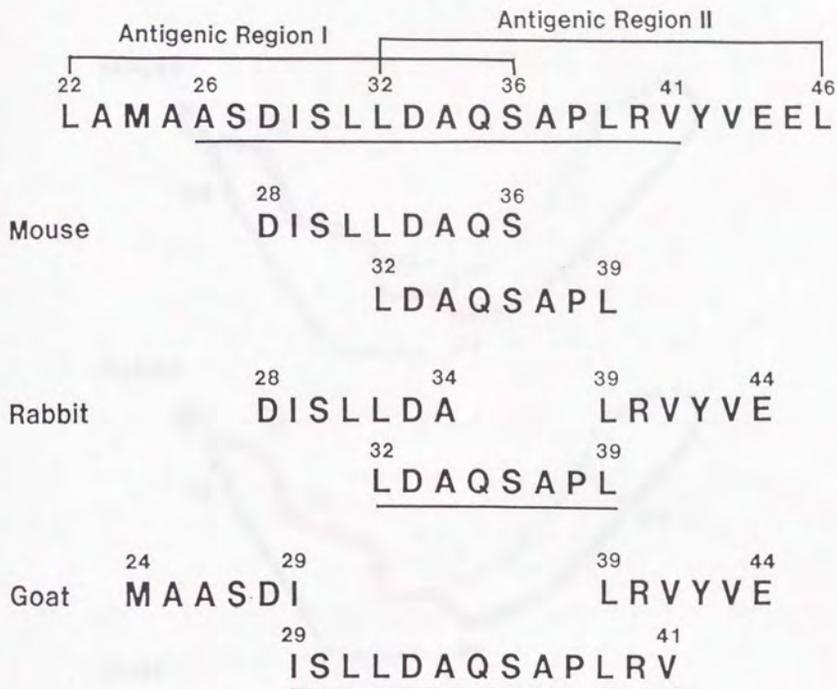
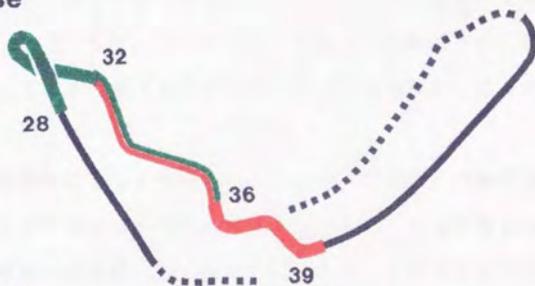
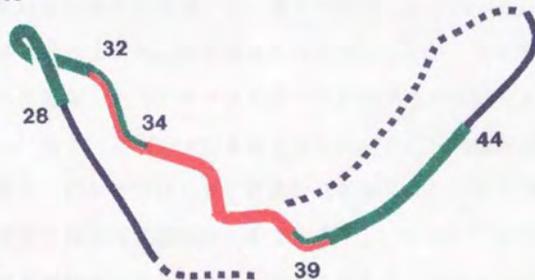


図38. 領域I-IIより限定化されたB細胞エピトープ領域の  
まとめ

Mouse



Rabbit



Goat

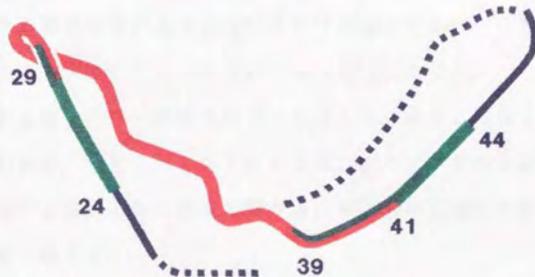


図39. 領域I-IIより限定化されたB細胞エピートプ領域の  
立体構造上の位置関係

30 残基目を中心とする曲がり角の部分を含み、マウスでは28-32 残基目、家兎では28-34、32-39、39-44 残基目、山羊では24-29、29-41、39-44 残基目のエピトープが複合して抗原性領域を形成していることが明らかとなった。

## 2) B細胞エピトープ領域Ⅳ(72-86 残基目)の限定化

ペプチド72-86を検出抗原とし、72-86 残基目の抗体結合領域の限定化を試みた。図11に示すアナログペプチドを用いて家兎における抗体結合領域72-86の限定化を行なった。N末端側から順次アミノ酸残基を欠損または置換した結果、76 残基目までG1yに置換したペプチドは72-86 特異抗体のほとんどを吸収した。 $^{77}\text{K I}^{78}$ をG1yに置換すると部分的に吸収能が低下した。これに対し、C末側をG1yに置換した結果では、 $^{83}\text{K I}^{84}$ を欠いたペプチドで特異抗体吸収能がかなり低下し、 $^{81}\text{V F}^{82}$ を欠くと特異抗体結合能はすべて失われた。このことより、家兎抗血清中の抗72-86 特異抗体の結合には $^{81}\text{V F}^{82}$ が必須であり、 $^{83}\text{K I}^{84}$ の寄与もかなり大きいことが明らかとなった(図40)。

山羊抗血清で同様の解析を行なったところ、家兎と類似した結果が得られたが、 $^{77}\text{K I}^{78}$ をG1yに置換したペプチドの吸収能の低下が顕著であり、この2 残基の関与は山羊において特に大きいと考えられた(図41)。

以上より、領域72-86におけるエピトープは、家兎・山羊ともに77 残基目から82 残基目を中心とした $^{77}\text{K I P A V F}^{82}$ に存在すると結論した(図42)。

## 3) B細胞エピトープ領域Ⅴ(119-133 残基目)の限定化

ペプチド119-133を検出抗原とし、119-133 残基目

Rabbit

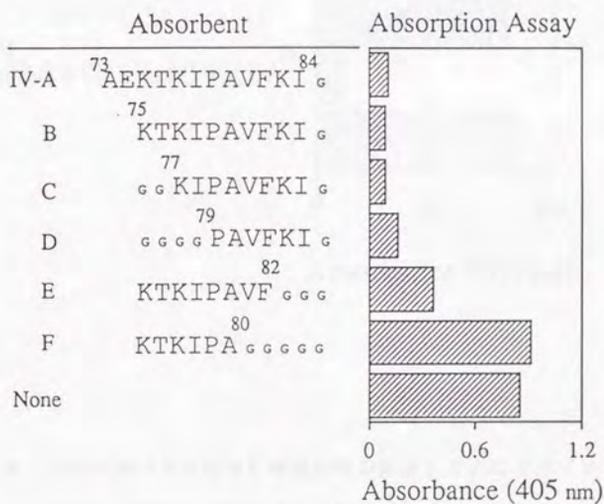
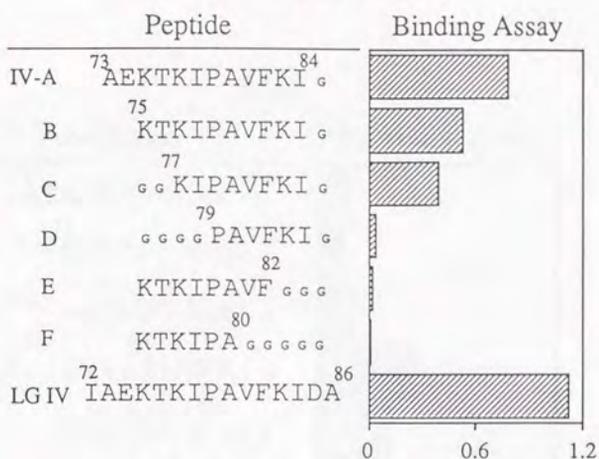


図40. 家兔における抗領域N特異抗体の解析：アナログペプチドを用いた抗体結合領域（B細胞エピトープ）の限定化

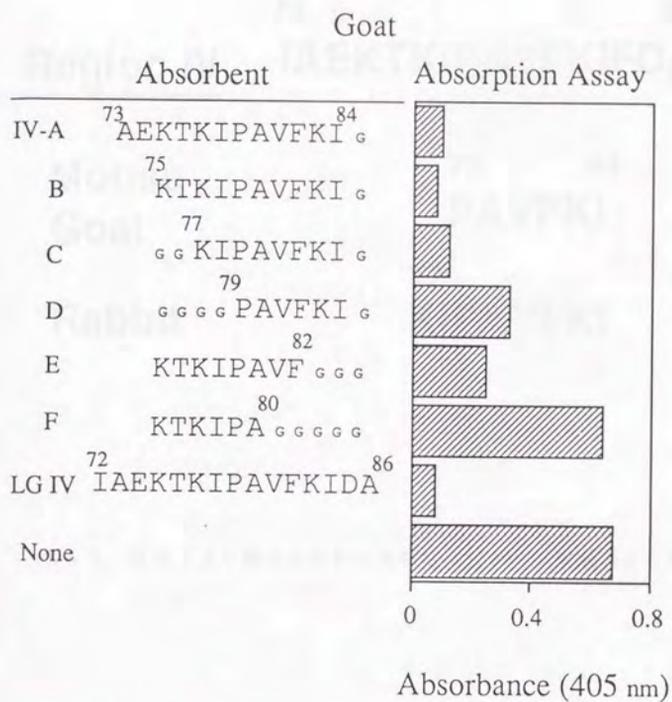


図 4 1. 山羊における抗領域 N 特異抗体の解析: アナログペプチドを用いた抗体結合領域 (B 細胞エピトープ) の限定化



Mouse

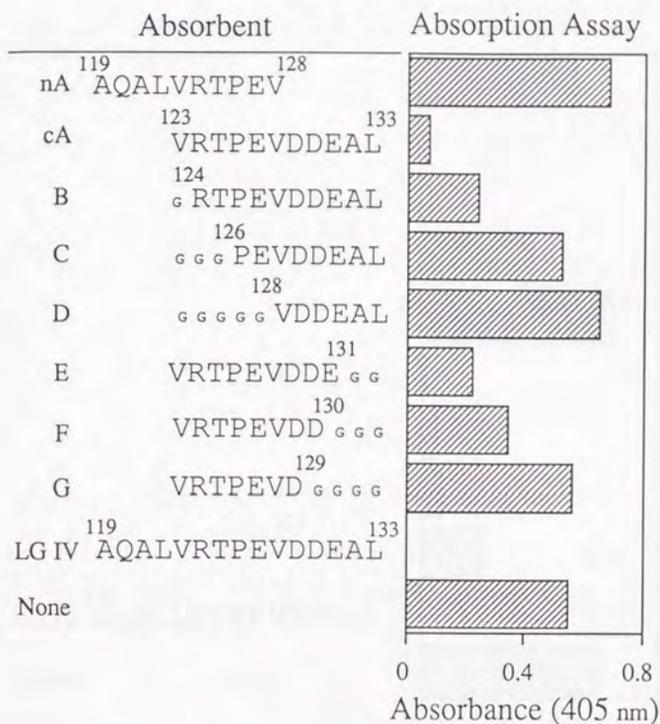


図43. マウスにおける抗領域V特異抗体の解析: C末部アナログペプチドを用いた抗体結合領域(B細胞エピトープ)の限定化

Rabbit

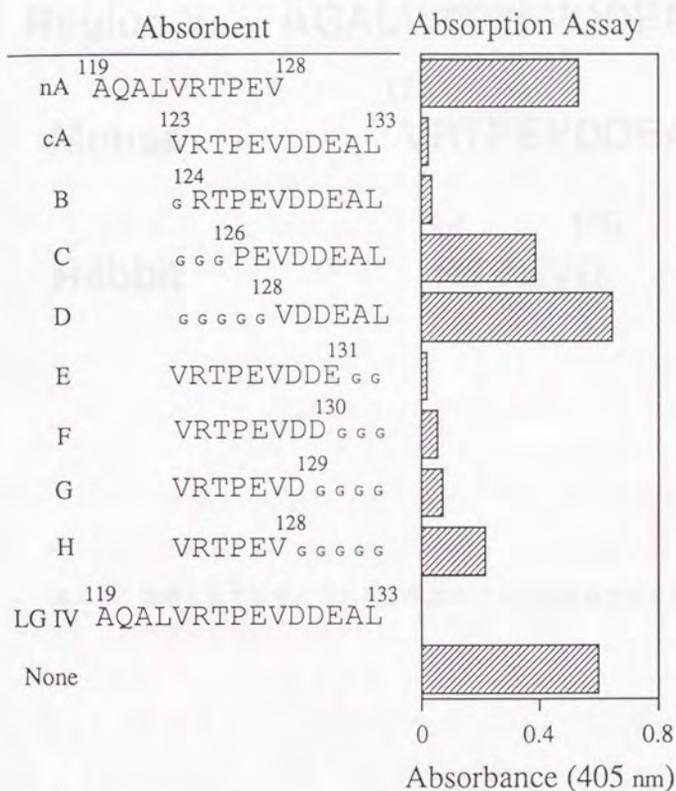


図 4.4. 家兎における抗領域 V 特異抗体の解析: C 末部アナログペプチドを用いた抗体結合領域 (B 細胞エピトープ) の限定化

<u>Region V</u>	119	AGALVRTPEVDDEAL	133
Mouse	123	VRTPEVDDEAL	133
Rabbit	124	RTPEVD	129

図45. 領域Vより限定化されたB細胞エピトープ領域のまとめ

の抗体結合領域の限定化を試みた。図11に示すペプチド119-128およびペプチド123-133を用いて吸収実験を行なったところ、マウス、家兎ともにC末側で領域119-133特異抗体のほとんどが吸収されたため、C末側のアナログペプチド8種を用いて解析を行なった。

マウスの抗血清について得た結果を図43に示した。N末端側をG1yに置換すると階段上に吸収量は落ち、 $^{123}\text{V}$ を必要とする抗体も相当量あることが解った。特に $^{124}\text{RT}^{125}$ の寄与は大きく、領域119-133特異抗体の結合に必須であることが明らかとなった。C末側についてもG1yへの置換に伴って抗体結合性は失われた。特に $^{130}\text{D}$ を失うとほとんど結合せず、このアミノ残基の重要性が示された。以上よりマウスにおけるBエピトープは $^{124}\text{RT}^{125}$ から $^{130}\text{D}$ をコアとする123-133残基目に存在すると結論した。

家兎の抗血清について図44に結果を示した。ペプチド123-133のN末側の $^{123}\text{V}$ を欠いても抗体との結合性に影響は与えなかったが、 $^{124}\text{RT}^{125}$ を必要とする抗体は相当量あり、 $^{126}\text{PE}^{127}$ を欠くと全く吸収しなかった。C末側はマウスと異なり、 $^{130}\text{DEAL}^{133}$ を欠いてもペプチド119-133とほぼ同等の結合性を有していた。また、 $^{129}\text{D}$ を欠くと吸収量が低下することより、領域119-133特異抗体のうち1/3程度は結合に $^{129}\text{D}$ を必要とすることが解った。以上より家兎のBエピトープは $^{124}\text{RTPE}^{127}$ を中心とする $^{124}\text{RTPEVD}^{129}$ に存在することが明らかとなった。図45に領域V限定化のまとめを示した。

#### 4) B細胞エピトープ領域VI(149-162残基目)の限定化

ペプチド149-162を検出抗原とし、149-162残基目の抗体結合領域の限定化を試みた。図13に示す8種のアナログペ

Mouse

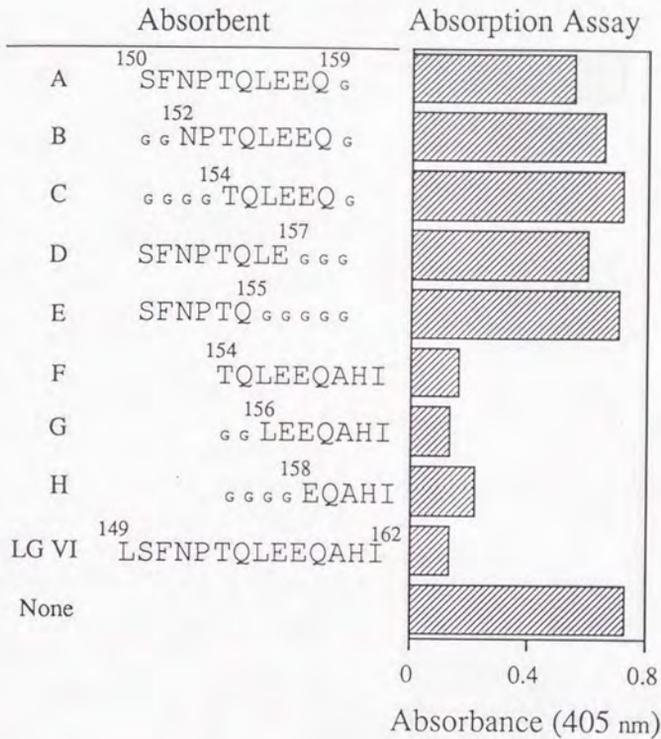


図46. マウスにおける抗領域Ⅴ特異抗体の解析：C末端アナログペプチドを用いた抗体結合領域（B細胞エピトープ）の限定化

Rabbit

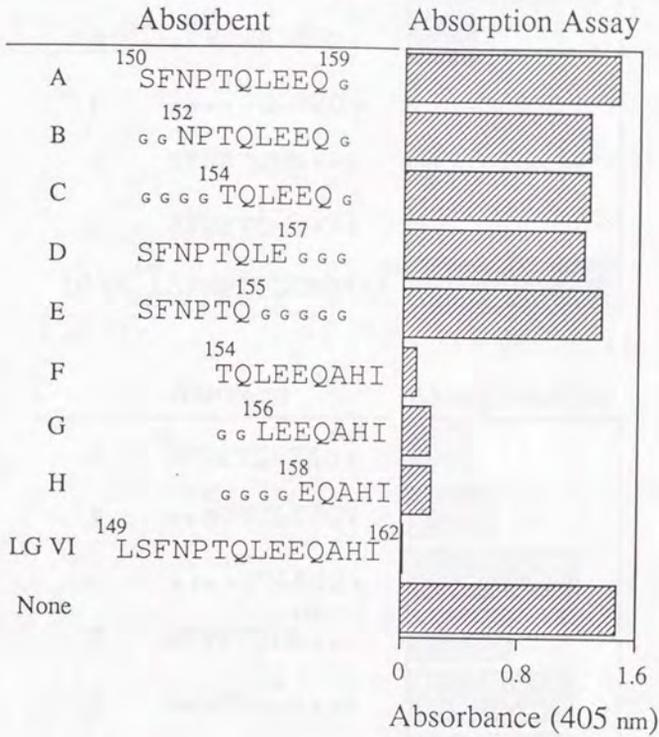


図47. 家兎における抗領域Ⅴ特異抗体の解析：C末部アナログペプチドを用いた抗体結合領域（B細胞エピトープ）の限定化

Goat

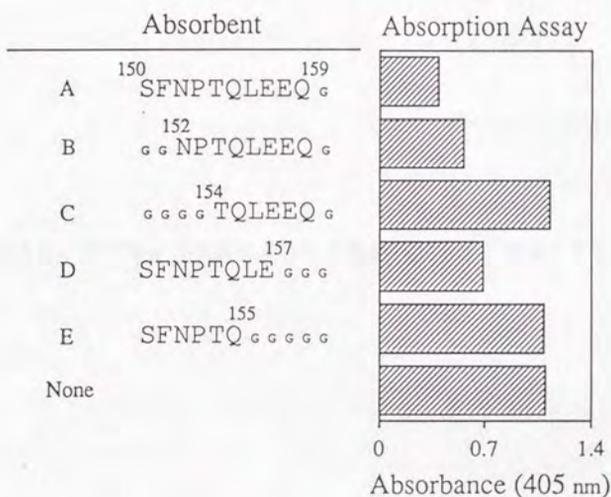
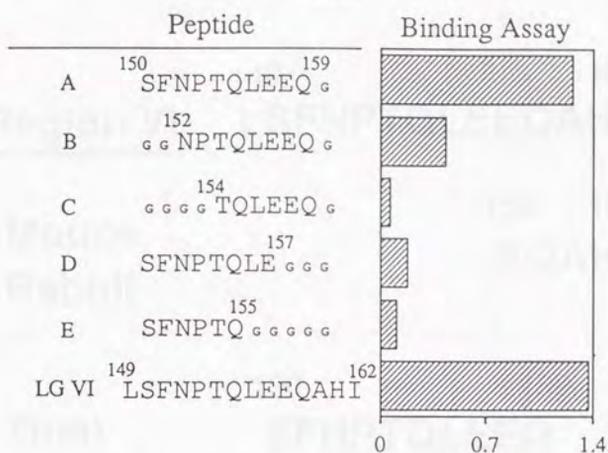


図48. 山羊における抗領域Ⅳ特異抗体の解析：N末端アナログペプチドを用いた抗体結合領域（B細胞エピトープ）の限定化

	149	162
<u>Region VI</u>	LSFNPTQLEEQAH I	
Mouse	158	162
Rabbit	EQAH I	
	150	159
Goat	SFNPTQLEEQ	

図49. 領域Ⅵより限定化されたB細胞エピトープ領域のまとめ

プチドを用いて吸収実験を行なった。

図46にマウスの抗血清について得た結果を示した。150-159残基目を基本とした5ペプチドはほとんど免疫吸収体として働かなかったのに対し、154-162残基を基本とした3ペプチドはいずれも抗ペプチド149-162を吸収した。C末側<sup>158</sup>EQAH I<sup>162</sup>のみを残したアナログペプチドで特異抗体のほとんどが吸収されたことから、マウスにおけるBエピトープはこの5残基に存在することが明らかとなった。

家兎においても同じ結果が得られ、C末端5残基が領域149-162のBエピトープの主要部分であることが示された(図47)。

150-159残基のアナログペプチドについてN末側、C末側を順次欠損していくと抗体吸収能は階段状に落ちていき、特に<sup>152</sup>NP<sup>153</sup>、<sup>156</sup>LE<sup>157</sup>を欠くと吸収能は大きく低下した。C末側の3ペプチドについては、ペプチド154-162で吸収された抗体も<sup>154</sup>TQ<sup>155</sup>を欠くと結合しなくなっており、領域150-162特異抗体との結合において<sup>154</sup>TQ<sup>155</sup>の寄与が大きいことを示している。以上より、山羊の場合には152-157残基を中心とする部分にBエピトープが存在し、<sup>152</sup>NP<sup>153</sup>、<sup>156</sup>LE<sup>157</sup>とともに<sup>154</sup>TQ<sup>155</sup>も抗原認識に重要であることが示された(図48)。領域M限定化のまとめを図49に示した。

#### 第4節 考察

タンパク質中のB細胞エピトープは従来よりその一次構造が認識されるシーケンシャルエピトープ(リニアエピトープ)と三次構造が認識されるコンフォメーションナルエピトープに分けられている。

		27	36
Region I	Mouse	Ser-Asp-Ile-Ser-Leu-Leu-Asp-Ala-Gln-Ser	
	Rabbit	Asp-Ile-Ser-Leu-Leu-Asp-Ala	
		Asp-Ile-Ser-Leu-Leu	
	Goat	24	29
		Met-Ala-Ala-Ser-Asp-Ile	
		32	39
Region I-II	Rabbit	Leu-Asp-Ala-Gln-Ser-Ala-Pro-Leu	
	Goat	29	41
		Ile-Ser-Leu-Leu-Asp-Ala-Gln-Ser-Ala-Pro-Leu-Arg-Val	
	Mouse	32	39
Region II		Leu-Asp-Ala-Gln-Ser-Ala-Pro-Leu	
	Rabbit		39
			44
	Goat		Leu-Arg-Val-Tyr-Val-Glu
			Leu-Arg-Val-Tyr-Val-Glu
		48	54
Region III	Mouse	Pro-Thr-Pro-Glu-Gly-Asp-Leu	
	Rabbit	Pro-Glu-Gly-Asp-Leu	
	Goat	42	47
		Tyr-Val-Glu-Glu-Leu-Lys	
			84
Region IV	Rabbit	Pro-Ala-Val-Phe-Lys-Ile	
	Mouse	77	
	Goat	Lys-Ile-Pro-Ala-Val-Phe-Lys-Ile	
		123	133
Region V	Mouse	Val-Arg-Thr-Pro-Glu-Val-Asp-Asp-Glu-Ala-Leu	
	Rabbit	124	129
		Arg-Thr-Pro-Glu-Val-Asp	
		150	159
Region VI	Goat	Ser-Phe-Asn-Pro-Thr-Gln-Leu-Glu-Glu-Gln	
	Rabbit		162
	Mouse		Glu-Gln-Cys-His-Ile

図50.  $\beta$ -ラクトグロブリン分子上で限定化された

B細胞エピトープ領域のまとめ

それらはアミノ酸配列上連続しているか否かでコンティニューアスエピトープおよびディスコンティニューアスエピトープとも呼ばれ、相補的な種類のエピトープとして解析されてきた。しかし前者が主として合成ペプチドとELISA法の組み合わせで解析されてきたのに対して後者はX線結晶解析法を用いるなどそれぞれ異なった解析法でアプローチが行なわれてきたため、研究者によりB細胞エピトープの大概はシーケンシャルエピトープで説明できるという立場(93)から逆にそのほとんどはコンフォメーションナルエピトープであるという立場(94)まで様々な主張がなされてきた。

$\beta$ -LGは162残基のアミノ酸からなり、2つの分子内S-S架橋を有する球状タンパク質であるため、それに対する抗体の多くは $\beta$ -LGの立体構造を認識するのではないかと考えられてきた。立体構造上近傍にあるアミノ酸群を認識して結合する場合には、抗体の抗原結合部位がアミノ酸配列上離れた位置にあるアミノ酸残基と相補的な構造をとっていると考えられる。そのため、球状タンパク質に対しては、特に一次配列に基づいて合成したペプチドではエピトープが検出しにくいと考えられてきた(95)。また $\beta$ -LGを還元カルボキシメチル(RCM)化して立体構造を破壊した場合、抗 $\beta$ -LG血清中の抗体との結合性が大きく低下するという報告もあった(96)。しかし、近年になって栗崎らは $\beta$ -LGの一次構造に基づいて合成したオーバーラッピング部分ペプチドを用い、 $\beta$ -LGで免疫したマウス・家兎・山羊から得た血清中抗 $\beta$ -LG抗体の60-70%はこれらのペプチドの混合物で吸収し得ることを明らかにした(97、98)。このことは $\beta$ -LGを認識して産生される抗体のかなりの部分は $\beta$ -LG分子内の一次配列を認識して結合しうることを意味しており、 $\beta$ -LGにおけるシーケンシャルエピトープの寄与が大きいことを明らかにしている。

ところでシーケンシャルエピトープとコンフォメーションナルエピトープの実体は、従来論議されていたほどには対立的なものではないと考えられる。抗体あるいはB細胞エピトープがタンパク質に結合する際には、アミノ酸数残基により構成される立体構造が認識されるが、その複数のアミノ酸残基が一次配列上連続・近接したアミノ酸である場合と、立体構造上は近接しているが一次構造上は遠い位置にある場合がある。立体構造のしっかりしたタンパク質の多くは後者と考えられるが、牛乳中タンパク質の中にも $\alpha$ s<sub>1</sub>-カゼインのようにペプチド鎖の折りたたみ構造がルーズなタンパク質が知られており、このようなタンパク質では結合に関与するアミノ酸の大部分が一次構造上も近接する確率が高いと推測される。このようにB細胞エピトープの構造は抗原タンパク質に固有の性質が規定する部分が大きい。

さらに一次構造上離れた位置にあるアミノ酸残基が結合に関与する場合でも、ペプチドと抗体の接点の一部が再現されていれば結合性を示すと考えられ、寄与度の大きいアミノ酸残基およびその周辺のアミノ酸残基を含むシーケンシャルペプチドがエピトープとして認識される可能性はかなり高いはずである。特に鎖長の短いペプチドの場合には立体構造上の自由度が大きいため、その一部が抗体に結合することにより周辺のアミノ酸残基も抗体ポケットに相補的な構造を獲得していく、インデューストフィットが起りやすい。インデューストフィットは、合成ペプチドによるエピトープの検出をより確実にすると考えられる。この場合コンフォメーションナルエピトープの一部がシーケンシャルエピトープとして検出される。

実際にX線結晶解析で解析されたコンフォメーションナルエピトープのうち寄与の大きいと考えられたアミノ酸残基は多くの場合シーケンシャルペプチドおよびそのアナログペプチドを用いたエピト

ープ解析でも重要とされたものであることが確認された(73~76)。同様にGeysenらはモノクローナル抗体の結合部位をピンペプチドを用いて解析しており、複数のシーケンシャルペプチドとそのアナログペプチドで寄与度の高いアミノ酸残基は予測可能であると考えている(99)。

本研究によりシーケンシャルエпитープとして認識されたペプチドの多くもコンフォメーションナルエпитープの構成部分である可能性は高い。またペプチドが抗体結合能を有するところRCM- $\beta$ -LGが抗体結合能を失う理由は、ペプチドに比してRCM- $\beta$ -LG分子ではインデューストフィットの機構が働きにくいと考えるのが妥当であろう。また逆に、構造が柔軟なペプチドを用いる場合には免疫抗原以外のアミノ酸配列にも特異抗体が結合性を持つのではないかという可能性も懸念されるが、クロスリアクティビティーについては3残基以上のアミノ酸配列ならばさほど重大視する必要はないとの知見がある(100)。今後コンフォメーションナルエпитープの解析法に化学合成法(101)あるいはファージにオリゴペプチドを発現させる方法を用いたランダムペプチドライブラリー(102)が用いられる流れもできてきており、従来の解析方法を交え多くのタンパク質においてB細胞エпитープの実像が示されることが期待される。

このような背景の下で決定された $\beta$ -LGの主要抗体結合領域すなわちB細胞エпитープ領域は、領域22-56、72-86、119-133、149-162残基目であった。本研究ではこれらの領域をさらに限定化し、広義でのコンフォメーションナルエпитープを含む、シーケンシャルエпитープのコアとなる部分を明らかにした。ここでポリクローナル抗体を用いたにもかかわらずほとんどのエпитープ領域が5-7アミノ酸残基まで限定化されたことは

興味深い。このことは $\beta$ -L G分子上動物種を通じて認識され易い領域のなかでも特に抗体の接近が容易な部分があり、その部分に高い特異性を持つB細胞のみが選ばれてきたことを意味している。

こうした、抗体分子に認識され易い部分構造は各タンパク質固有の性質として存在するという観点の元に、B細胞エピトープの予測方法が提唱されている。HoppとWoodsは、タンパク質の一次構造上親水性に富む部分がB細胞エピトープになり易いと考えた(103)。Fraga(104)、Thorntonら(105)、Wellingら(106)も一次構造よりB細胞エピトープを予測する方法を提唱した。Westhofら(107)、KarplusとSchulz(108)は同様に温度ファクターよりタンパク質分子内のゆらぎの大きい部分B細胞エピトープとして予測しており、FanningやNovotnyらによって実際のタンパク質結晶解析データからの計算値とよく一致することが示されている(109、110)。

$\beta$ -L Gにおいてもこれらの予測方法が有効であるか否かに興味を持たれるが、栗崎らが既に報告しているように、HoppとWoodsによる親水性度やWellingらによる抗原性価(既知の抗原決定基に含まれるアミノ酸とタンパク質を構成するアミノ酸の出現頻度比のファクター)による予測は、 $\beta$ -L Gの抗原性領域I~Mとほとんど一致していなかった(98)。また、高橋らは温度ファクターを計算して $\beta$ -L Gの抗原構造との関連を考察したが、実際の抗原性領域を予測することはできなかった(55)。

また、これらの多くはタンパク質表面に露出している部分やタンパク質のターン形成部など突起構造がB細胞エピトープとして認識され易いとの考えにもとづいたものであるため、 $\beta$ -L Gの立体構造と本研究で限定化された抗原性領域の関連を考察した。

$\beta$ -L Gの立体構造上折れ曲がり構造は、PapizらのX線結晶解析

の結果より9残基目 (Gly)、23残基目 (Ala)、30残基目 (Ser)、46残基目 (Leu)、59残基目 (Gln)、77残基目 (Lys)、85残基目 (Asp)、98残基目 (Asp)、114残基目 (Glu)、128残基目 (Val)、143残基目 (Leu)、158残基目 (Glu)をそれぞれ中心とする領域にあることが明らかとなっている(41)。このうち $\beta$ -LGの主要B細胞エピトープ領域I~VIに相当するのは、領域I-II(26-41残基目;これは領域IのC末端部分および領域IIのN末端部分にも相当する)に含まれる30残基目(Ser)を中心とする部分、領域III(42-56残基目)に含まれる46残基目(Leu)を中心とする部分、領域IV(72-86残基目)に含まれる77残基目(Lys)・85残基目(Asp)を中心とする部分、領域V(119-133残基目)に含まれる128残基目(Val)を中心とする部分、領域VI(149-162残基目)に含まれる158残基目(Glu)を中心とする部分であった(97、98)。折れ曲がり構造の中心となる12アミノ酸残基のうち7残基は主要B細胞エピトープ領域に含まれており、各エピトープ領域もそれぞれ折れ曲がり構造に相当する部分を包含していることから、折れ曲がり構造とB細胞エピトープ領域の相関は大きいとも考えられた。ところが、本研究による抗体結合領域の限定化の結果は、抗原抗体反応の中心部分が必ずしも折れ曲がり構造を含んでいるとは言えないことを示した。例えば、領域IVの77残基目はマウス抗体ではその結合に与る中心部分(79-84残基目)から外れており、家兎・山羊抗体ではコア部分(家兎・山羊ともに77-82残基目)に含まれてはいるもののそのN末端残基であり、抗原抗体結合反応に折れ曲がり構造自体が重要ではない可能性も示された。同様に領域VIの158残基目は山羊抗体のコア部分(152-157残基目)から

外れ、マウス・家兎抗体ではコア部分のN末端残基（158-162残基目）であった。領域Ⅰ-Ⅱの30残基目はマウス・家兎・山羊抗体のいずれのコア部分にも含まれていたが、（マウスでは28-36残基目、家兎では28-34残基目、山羊では29-41残基目）マウス・家兎ではアミノ酸配列の中央に含まれていたのに対し、山羊抗体ではN末端から2残基目であった。領域Ⅲの46残基目はマウス・家兎抗体についてはコア部分（マウスでは48-54残基目、家兎では50-54残基目）から外れ、山羊抗体ではコア部分（42-47残基目）のN末端から2残基目であった。領域Ⅴの128残基目は、家兎・マウスともにコア部分（124-129残基目）のC末端から2残基目であった。

以上のように、折れ曲がりの中心となるアミノ酸残基の前後を含む領域が抗体に認識されている場合の方がむしろ稀であり、折れ曲がり構造自体の重要性は証明されなかった。ただし、本研究で行なった解析の手法がN末端側・C末端側から結合反応に不要なアミノ酸残基を削除していく方法であるため、折れ曲がりの中心アミノ酸残基がN末端もしくはC末端に必要残基として残っていることは、それらアミノ酸残基の重要性を示しているとも言える。これらが抗体ポケットに結合した後インデューストフィットにより安定な抗原抗体結合を形成すると考えれば、折れ曲がり構造の中心にあるアミノ酸残基は結合反応の鍵となる場合も多いと考察される。

次に動物種でみられた微妙な差異についてであるが、これはひとつにはそれぞれの種が準備しているB細胞のレパートリーの差異を反映した結果と考えられる。すなわち、抗原タンパク質上には確かに抗原性の高い領域（内在性抗原性領域）が存在するものの、各個体におけるB細胞エピトープは、抗原タンパク質の構造とB細胞レパートリーとの組み合わせで決定されることを示している。

このことは抗原がある動物種にとって異種性が高いタンパク質であるか否かとも関わってくる。例えば山羊はウシ $\beta$ -L Gと一次構造がほぼ等しい $\beta$ -L G分子を有しているが家兎・マウスではその存在が確認されていないことから、山羊にとって $\beta$ -L Gの異種性は低くマウス・家兎にとって $\beta$ -L Gの異種性は高いと考えられる。一般に自己タンパク質に対して高い特異性を有するB細胞は免疫応答系から除去される機構が働くため(78~83)、山羊における $\beta$ -L G特異的B細胞レパートリーはマウス・家兎における $\beta$ -L G特異的B細胞レパートリーに比べてより修飾を受けているはずである。山羊 $\beta$ -L Gにおいてウシ $\beta$ -L G(A型)と異なるアミノ酸残基は<sup>1</sup>I l e(ウシA型ではL e u)、<sup>64</sup>G l y(同じくA s p)、<sup>118</sup>A l a(V a l)、<sup>138</sup>L y s(A s p)、<sup>150</sup>A l a(S e r)、<sup>162</sup>V a l(I l e)であるが、山羊抗 $\beta$ -L G血清においては領域II特異抗体がマウス・家兎と比較して多量に存在すること、領域III・領域VIの認識部位が特異であることなどは $\beta$ -L Gの動物種における異種性に関わるとも考えられる。

その他動物種による差異には、B細胞エピトープとT細胞エピトープの位置との関係も大きく影響しているであろう。B細胞エピトープが抗原タンパク質固有のアミノ酸配列や立体構造に依存する面が大きくそのおおまかな領域は動物種に共通な部分も多いと考えられるのに対して、T細胞エピトープは各ハプロタイプに固有のMHCクラスII分子に結合した形で特異的T細胞に認識されるという性質上、その領域は動物種間または個体間で大きく異なる。そこでB細胞エピトープとT細胞エピトープがあまりにも近接している領域では、T細胞エピトープが提示されにくい等の理由からT-B相互作用が効率的に行なわれず、抗体産生も制約される可能性がある(84、85)。

以上、3動物種に共通する $\beta$ -L Gの抗原性領域を選んでB細胞エピソードの限定化を行なったが、3種に共通のB細胞エピソードは見られず、種により数残基シフトしている場合が多かった。このことより、産生抗体のレパトリーは各動物種の有するB細胞レパトリーあるいは各動物種におけるT細胞エピソードとの位置関係などに大きく影響されることが明らかとなった。