

図3、精製GagVLP及びGag shellの蔗糖密度勾配分析。  
 (A) GagVLPの平衡遠心。精製VLPを20~70%蔗糖密度勾配に乗せ、平衡遠心した。(B) Gag shellの沈降遠心。脂質二重膜を除去したGag shellを20~70%蔗糖密度勾配に乗せ、沈降遠心した。(上段) Gag蛋白発現の酵母スフェロプラスト細胞培養上清から精製したVLP及びそのGag shell。(下段) Gag蛋白発現の組換えbaculovirus感染Sf9細胞培養上清から精製したVLP及びそのGag shell。

同じ結果が得られた(図2)。従って、酵母スフェロプラスト細胞から出芽したVLPは脂質二重膜で完全内包されていると結論された。

次に、このVLPを蔗糖密度勾配で分析した。精製VLPを20~70%蔗糖密度勾配に乗せ平衡遠心したところ、VLPの比重は1.22 g/mlであり、コントロールとして用いたSf9細胞培養上清から精製したVLPの比重(1.18 g/ml)より重いことが判明した(図3A)。この比重の差が脂質二重膜に由来するものなのかを明らかにする目的で、1% TritonX-100処理により脂質二重膜を除去したGag shellを20~70%蔗糖密度勾配に乗せ、2時間の沈降遠心を行った。分画をWestern blotで調べたところ、酵母スフェロプラスト細胞由来のGag shellは高等真核細胞(Sf9細胞)由来のGag shellより沈降速度が遅い、すなわち、総Gag重量が軽いことが判明した(図3B)。これらの結果は、1つのGag shellを構成するGag蛋白の分子数が酵母のVLPの場合には少ないが、そのGag shellは高等真核細胞の形質膜より比重の重い脂質二重膜で内包されていることを意味する。

高等真核細胞におけるGag蛋白発現では、C末端からp6領域を削除してもVLPは形成されるが、NC領域を含めて削除すると、VLPが形成されないことが知られている。そこで、酵母のVLP産生においてもこの性状が適用されるか、Gag蛋白 truncation体を用いて検討した。MA-CA-p2-NCを発現させた酵母ではVLP産生が認められたのに対し、MA-CA-p2ではVLPが産生されなかった(図4)。この結果は、酵母細胞におけるGag蛋白の assembly domainが高等真核細胞におけるそれと一致することを示唆している。

最後に、酵母スフェロプラスト細胞からのVLP

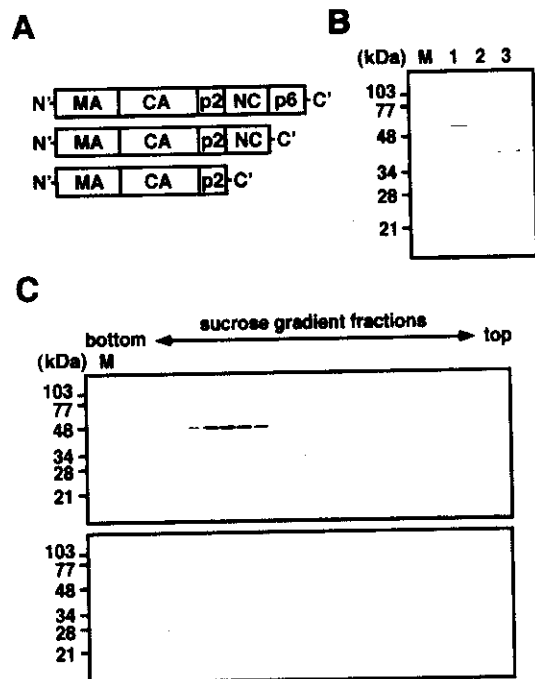


図4、Gag蛋白C末端truncation体のVLP産生能。

(A) 作製したC末端truncation体の構築。(B) 酵母の細胞質内Gag抗原。Lanes: 1, full sizeのGag; 2, MA-CA-p2-NC; 3, MA-CA-p2。(C) 酵母スフェロプラスト細胞からのVLP産生。スフェロプラスト細胞培養上清を20~70%蔗糖密度勾配に乗せ、平衡遠心した。(上段) MA-CA-p2-NC、(下段) MA-CA-p2。

出芽のkineticsを検討した。細胞壁を除去して培養を開始し、その培養液中に放出されてくるVLPをWestern blotで調べたところ、VLPは細胞壁除去直後からわずかに検出されるものの、継時的に増加していた。そこで、濃度既知のGag蛋白を用いたWestern blotおよびBSAを用いたCoomassie blue染色で定量したところ、この酵母出芽系では培養16時間後には300 µg of GagVLP/liter of spheroplast cultureに達することが明らかとなった(図5)。

## 2、成熟型VLP産生の試み

野生型のgag-pol領域およびProteaseの活性中心アミノ酸を変異させたgag-pol(D25N)領域を同様に酵母で発現させ、そのスフェロプラスト細胞培養上清からVLP精製を試みた。変異型gag-pol(D25N)では、未切断のGagおよびGag-Pol蛋白からなる未成熟型VLPが産生された。一方、野生型のgag-pol発現では、VLP出芽は認められなかった。哺乳類の高等真核細胞では野生型gag-pol発現で成熟型VLPが産生されるものの、昆虫細胞ではVLPが産生されない。本酵母のVLP産生系は

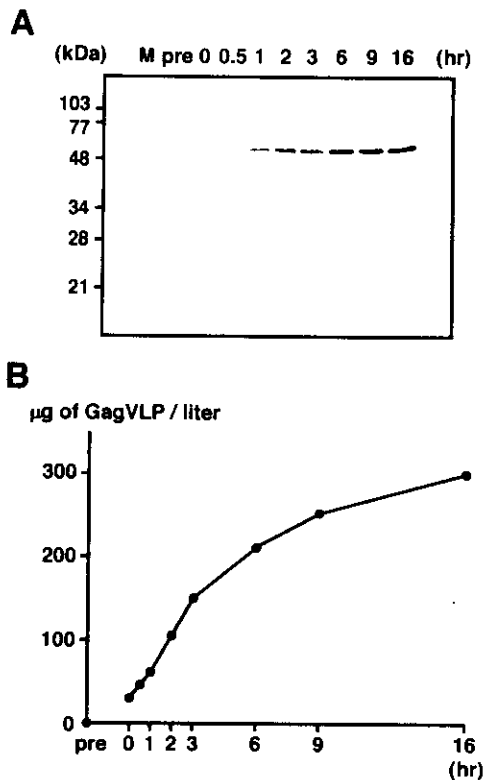


図5、酵母スフェロプラスト細胞からのVLP産生量。Gag蛋白発現酵母から細胞壁除去し、その直後から継続的に培養上清を採取してVLPを精製した。(A) VLP産生の継続的変化。Western blotで検出した。(B) VLP産生量の継続変化。各時間におけるVLP量を濃度既知のGag蛋白を用いたWestern blotとBSAを用いたCoomassie brilliant blue染色により定量した。

この後者の発現系の結果と一致した(表1)。

### 3、Gag-V3 融合蛋白で構成されたVLP の作製

本酵母のGagVLP にgp120 の抗原性を付与する目的で、Gag-V3 融合蛋白を酵母で発現させた。そのスフェロプラスト細胞培養上清からVLPを精製したところ、抗CAと抗V3抗体の両者に反応する約60kDa蛋白からなるVLPが検出された。すなわち、Gag-V3 融合蛋白からなるVLPが産生されたと結論される(図6)。

### D、考察

ウイルスの生活環は、初期過程(吸着・侵入・脱殻)→中期過程(転写・複製・蛋白合成)→後期過程(assembly)と進行する。近年、高等真核細胞を宿主とする動物ウイルスの生活環の大部分が、酵母細胞を宿主として再現できることが明らかとなりつつある。しかしながら、これらの3過程で生活環が完結するのは脂質二重膜をもたないウイルスであり、脂質二重膜を有するウイルスで

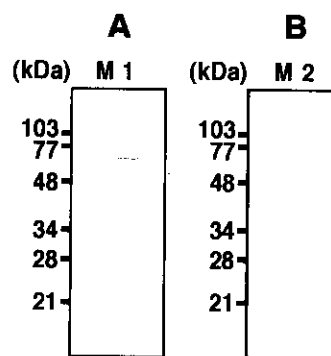


図6、Gag-V3融合蛋白からなるVLPの産生。full sizeのGag蛋白にV3領域をつないだGag-V3融合蛋白を酵母で発現させた。細胞壁を除去して培養した後、培養上清からVLPを精製した。(A) 抗CA抗体を用いたWestern blot。(B) 抗V3抗体を用いたWestern blot。Lanes: M, 分子量マーカー; 1 & 2, VLP

は、宿主細胞膜上でのassembly進行とその膜からの粒子出芽という独特な過程によってのみ、その生活環が完結しウイルス粒子が形成される。現時点では、酵母細胞を宿主として、脂質二重膜をもつウイルスの出芽過程の再現に成功した報告はない。

本研究では、Gag蛋白恒常発現の酵母からその細胞壁を除去すると、脂質二重膜で完全に内包されたGagVLPが自発的に出芽・放出されることが明らかとなった。これは、下等真核細胞である酵母が高等真核細胞と同様に、GagVLP形成に必須な宿主因子をすべて備えていることを意味するとともに、細胞壁の存在が粒子出芽を阻止することを示唆している。

酵母スフェロプラスト細胞から出芽したVLPは高等真核細胞の形質膜より比重の重い膜に内包されていた。一般的に、細胞壁を有する真核細胞では形質膜における蛋白含量が高いのが特徴であり、酵母形質膜の蛋白/脂質重量比は2.2、高等真核細胞の場合は1.0~1.5と報告されている。一方、酵母の細胞質内小胞膜の蛋白/脂質重量比は0.6~0.7と低いことが知られている。これらの質量分析データは、本研究におけるVLPが細胞質内出芽後に分泌経路を経て放出されたものではなく、形質膜直下でassemblyしその形質膜から直接出芽していた電顕観察結果と、理論的に一致する。

この酵母VLPの直径すなわち大きさはコントロールとして用いた高等真核のSf9細胞から出芽したVLPのそれと同等であるにも拘わらず、酵母VLP内に含まれるGag蛋白分子数はSf9細胞VLPのGag蛋白分子数より少なかった。これを裏付けるかのように、酵母VLP内のelectron-denseなGag shellはコントロールであるSf9細胞VLPのGag shellより

表 1、発現系におけるVLP 産生

| 宿主細胞 |                | 酵母細胞    | 昆虫細胞           | 哺乳類細胞             |
|------|----------------|---------|----------------|-------------------|
| 発現系  |                | plasmid | 組換えbaculovirus | 組換えvaccinia virus |
| 発現産物 | gag            | 未成熟型VLP | 未成熟型VLP        | 未成熟型VLP           |
|      | 野生型 gag-pol    | なし      | なし             | 成熟型VLP            |
|      | gag-pol (D25N) | 未成熟型VLP | 未成熟型VLP        | 未成熟型VLP           |
|      | gag-V3         | 未成熟型VLP | 未成熟型VLP        | 未成熟型VLP           |

さらに開環状あるいは半円状であった。これらの結果は、Gag shell の湾曲がそのshell 形成に参与するGag 蛋白の分子数に依存するものではなく、Gag 分子自体の和ろうそく状立体構造による可能性を示唆している。

本酵母発現系において、HIV Protease の活性中心アミノ酸を変異させてその活性をなくしたgag-pol (D25N) を発現させた場合にはgag のみ発現の場合と同様に未成熟型VLP が産生されたのに対し、成熟型VLP 産生を期待した野生型gag-pol 発現の場合にはVLP 出芽が認められなかった。哺乳類の高等真核細胞では野生型 gag-pol 発現で成熟型VLP が産生されるのに対し、昆虫細胞ではVLP が産生されないことから、本酵母のVLP 産生系には昆虫細胞発現系と類似性が認められた。昆虫細胞における野生型gag-pol 発現では、そのframeshift 効率も哺乳類高等真核細胞での効率と差がないにも拘わらず、HIV Protease をover-expression させた場合のように顕著な細胞内processing が観察される。また、Protease の活性中心近傍のアミノ酸を変異させてその活性を低下させたり、Protease inhibitor を処理することにより、昆虫細胞でも成熟型VLP の産生が可能となることを見いだされている。恐らく、酵母の場合も昆虫細胞と同様に、細胞内でのProtease 活性が高いものと思われる。

本研究で確立された酵母VLP 産生系から次のような展開が期待できる。1) このVLP 出芽・放出系はplasmid-based の発現系であるため、感染性がないものの高い免疫原性を有するVLP ワクチン（粒子構造を有する抗原）のベクターウイルスfree の作製系として使用できる。2) 酵母は遺伝子操作が可能で真核細胞であるため、遺伝子改変酵母株を用いて、HIV 粒子出芽に必須な宿主因子を同定・証明しうる。

## E、結論

HIV Gag蛋白発現plasmidを導入した酵母からその細胞壁を除去する方法により、膜に内包されたGagVLPをベクターウイルスfree で産生する系を確立した。

## F、研究発表

### 1、論文発表

- 1) Yuko Morikawa, David J. Hockley, Milan V. Nermut, and Ian M. Jones  
Roles of matrix, p2, and N-terminal myristoylation in human immunodeficiency virus type 1 Gag assembly  
*J. Virol.* 74: 16-23 (2000)
- Yuko Morikawa, Mikiko Shibuya, Toshiyuki Goto, and Kouichi Sano.  
In vitro processing of human immunodeficiency virus type 1 Gag virus-like particle.  
*Virology* 272: 366-374 (2000)
- 3) Eiji Haneda, Teisuke Furuya, Shigeru Asai, Yuko Morikawa, and Kenzo Ohtsuki  
Biochemical characterization of casein kinase II as a protein kinase responsible for stimulation of HIV-1 protease in vitro.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 275: 434-439 (2000)

### 2、学会発表

- 1) 森川裕子、後藤俊幸、佐野浩一  
ヒト免疫不全ウイルス粒子の試験管内成熟  
第48回日本ウイルス学会、三重、2000/10/12-14
- 2) 古屋禎佑、森川裕子、大槻健蔵  
CK-IIによるHIV-1 RTおよびPRの活性化とその選択的阻害化合物の作用に関する解析  
第48回日本ウイルス学会、三重、2000/10/12-14
- 3) 百瀬文隆、森川裕子、永田恭介  
インフルエンザウイルス遺伝子の転写・複製に関与する宿主因子RAF-2の役割  
第48回日本ウイルス学会、三重、2000/10/12-14
- 4) 森川裕子、後藤俊幸、佐野浩一  
ヒト免疫不全ウイルス粒子の試験管内成熟  
第23回日本分子生物学会年会、神戸、2000/12/13-16
- 5) 百瀬文隆、森川裕子、永田恭介  
宿主因子RAF-2によるインフルエンザウイルスRNA合成活性化機構の解析  
第23回日本分子生物学会年会、神戸、2000/12/13-16

## 厚生省科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）

### 分担研究報告書

リコンビナントウイルス様中空粒子(VLP)を用いた HIV 経口ワクチンの開発に関する研究

分担研究者 保富康宏 三重大学医学部 助教授

マウスを用いて経口的に投与でき、粘膜免疫誘導可能なワクチン開発の基礎的研究を行った。E 型肝炎ウイルス(HEV)より樹立されたウイルス様中空粒子(VLP)に Herpes simplex virus-1(HSV-1) B 細胞エピトープを用い VLP の形態を保存し、挿入エピトープに対する免疫反応を誘導する部位を検討したところ、4カ所の疎水部分にて可能であることが見いだされた。このうち培養上清中に最も VLP 産制量の多い部分に HIVenv 中和エピトープ(308-322, RIQRGPGRAFVTIGK)を組み込んだリコンビナント HIV-VLP を作製した。このリコンビナント VLP をマウスに経口投与したところ消化管内容液および血清中にエピトープ特異的抗体が誘導され、更にこの特異抗体は消化管内では IgA が主であり血清中よりも高濃度であった。さらに HIVenv 特異的 CTL が絛間膜リンパ節より誘導された。また、この免疫マウスは HIVenv 組み込みワクシニアウイルスチャレンジに対し明らかに抵抗性を示した。

#### A.研究目的

HIV 感染の予防には液性免疫と細胞性免疫の両者が必要であると考えられている。更に、本ウイルスに対しては感染経路から考えて粘膜免疫は重要である。ウイルス様中空粒子(VLP)は遺伝情報を持たず、そのウイルスとしての立体構造が保存されているため、細胞性免疫反応と液性免疫反応の両者が誘導できる可能性があり、安全なワクチンとして期待されている。本研究では経口感染を示す E 型肝炎ウイルス(HEV)の VLP に HIVenv の中和抗体エピトープを組み込み経口投与可能で粘膜免疫誘導型のワクチン開発の基礎的研究を行った。

#### B.研究方法

1.組み替え VLP の作製：HEV-ORF2 組み込みバキュロウイルスの HEV-ORF2 内の N 末、C 末、および疎水性部分の 4カ所、合計 6カ所に Tag(HSV B cell epitope NOVAGEN)遺伝子を挿入した新たなリコンビナントバキュロウイルスを作製し、Tn5 細胞で培養し、上清中の VLP の形成は電子顕微鏡観察で、抗原の発現はウェスタンブロット法および免疫沈降法にて確

認した。確認された VLP の形成を認め Tag 抗原を発現した位置に HIVenv 中和エピトープ(308-322, RIQRGPGRAFVTIGK)を組み込み同様の方法にて確認した。

2.免疫：BALB/C マウスを用い経口ゾンデにて 2 週間隔で 3～4 回経口投与した。

3.抗体の測定：抗体はエピトープペプチドを用いた ELISA 法にて測定した。

4.ウイルスチャレンジ：免疫マウスに HIVenv 組み込みリコンビナントワクシニアウイルスをチャレンジし、5 日後に卵巣よりウイルス回収を行った。ウイルスカ価は Real Time PCR にて測定し、免疫効果を検討した。

#### C.研究結果

1.VLP の形成：選択した全ての領域で Tag 遺伝子発現組み替えバキュロウイルスは作製されたが、上清中に VLP が産制されるのは 4カ所であった (Fig.1)。このうち最も産制量が多かった C 末に挿入した VLP(S2C)を用い抗 HEV 抗体、抗 Tag 抗体で免疫沈降したところ Tag 遺伝子組み込み VLP は検出できたことから VLP 表面に Tag エピトープが存在していることが示された(Fig.2)。

2. HIVenv エピトープ組み込み VLP: 先の実験より確認したC末に HIVenv 中和抗体エピトープを挿入した(Fig.3)。この遺伝子組み込み VLP は形態的にはオリジナルの VLP と変化はなかった(Fig.4)。この HIVenv-VLP をマウスに経口投与したところ消化管内容液中に HIVenv 特異的抗体の産制が認められ、特にその抗体は IgA であった(Fig.5)。更に挿入エピトープに対する CTL の誘導を見たところ腸間膜リンパ節において CD8+, MHC class I 拘束性の CTL が認められた(Fig.6)。腹腔内に HIVenv 遺伝子組み込みワクシニアウイルスをチャレンジし、チャレンジ後5日目にワクシニアウイルスの分離をマウス卵巣より行ったところ明らかに免疫マウスではウイルス力価は抑制されていた(Fig.7)

#### D. 考察

HIV に対する粘膜免疫誘導型のワクチン開発は急務であると考えられており、本研究で行った VLP を利用する経口ワクチンは安全性が高く、簡便であると考えられる。また、VLP に遺伝子を組み込み経口的に免疫誘導を行うということは過去の報告では殆ど成功しておらず、本研究では疎水性領域に限定し、遺伝子導入可能部位を検索したことにより抗原が VLP 表面に提示されたためであると考えられる。VLP は内部に DNA を挿入することが可能であることを確認しており、今後この手法を用いることにより、より免疫反応を強く誘導する VLP の作製が可能になると考えられる。

#### E. 結論

HEV の VLP に HIVenv エピトープを挿入し、経口ワクチン開発の基礎的検討を行った。遺伝子組み込み VLP は VLP 表面にエピトープを提示し、経口投与で HIV 特異的免疫反応を誘導した。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Seth, A., Yasutomi, Y., Jacoby, H., Callery, J. C., Kaminsky, S. M., Koff, W. C., Nixon, D. F. and Letvin, N. L. Evaluation of a lipopeptide

immunogen as a therapeutic in HIV type 1-seropositive individuals.

*AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 2000;16:337-343.

2) Matsumoto, J., Kawai, S., Terao, K., Kirinoki, M., Yasutomi, Y., Aikawa, M. and Matsuda, H. Malaria infection induces rapid elevation of soluble Fas ligand level in serum and subsequent T lymphocyteopenia: possible factors responsible for the differences in susceptibility of two species of Macaca monkeys to Plasmodium

coatney-infection. *Infect. Immun.* 2000; 68:1183-1186.

3) Mori, K., Yasutomi, Y., Sawada, S., Villinger, F., Sugama, K., Rosenwith, B., Ueberla, K., Yamazaki, S., Ansari, A., and Ruebsamen-Weigmann, H. Short-term treatment with a novel RT inhibitor induces an attenuated vaccine effect able to contain a pathogenic SHIV-RT virus. *J. Virol.* 200;74:5747-5753.

4) Kamei, A., Tamaki, S., Taniyama, H., Takamura, S., Nishimura, Y., Kagawa, Y., Uno-Furuta, S., Kaito, M., Kim, G., Toda, M., Matsuura, Y., Miyamura, T., Adachi, Y. and Yasutomi, Y. Induction of hepatitis C virus specific cytotoxic T lymphocytes in mice by an intrahepatic inoculation with an expression plasmid. *Virology* 2000;273:120-126.

5) Uno-Furuta, S., Tamaki, S., Takebe, Y., Takamura, S., Kamei, A., Kim, G., Kuromatsu, I., Kaito, M., Adachi, Y. and Yasutomi, Y. Induction of virus-specific cytotoxic T lymphocytes by *in vivo* electric administration of peptides. *Vaccine* in press

6) Iwanami, N., Niwa, A., Yasutomi, Y., Tabata, N., and Miyazawa, M. Role of natural killer cells in resistance against Friend retrovirus-induced leukemia. *J. Virol.* in press

7) Mori, K., Yasutomi, Y., Ohgimoto, S., Nakasone, T., Takamura, S., Shioda, T. and Nagai, Y. A deglycosylated mutant of SIV in rhesus macaques. Robust primary replication, severely impaired chronic infection and elicitation of nearly sterile immunity against the parental wild-type strain.

J.Virol. in press

8) Niikura, M., Takamura, S., Kim, G., Kawai, S., Saijo, M., Morikawa, S., Kurane, I., Tian-Cheng Li, Takeda, N. and Yasutomi, Y. Chimeric recombinant hepatitis E virus -like particles as an oral vaccine vehicle presenting foreign epitopes. submitted

2. 学会発表

1) ウイルス様中空粒子を用いた HIV 経口ワクチンの開発: 高村史記、武部豊、松尾和浩、保富康宏・・・第14回日本エイズ学会学術集会(京都)

2) SIVEnv の糖鎖は持続感染、病原性の決定因子である: 森一秦、保富康宏、扇本真治、中曾根正、本多三男、向井領三郎、塩田達雄、永井美之・・・第14回日本エイズ学会学術集会(京都)

3) 新規 RT inhibitor(GW420867)を用いた早期治療動物モデルの開発と免疫機能の解析: 齋藤紀子、保富康宏、澤田周三、洲鎌一成、Ffrançois Villinger、Afrabi Ansari、Rubesamen-Waigman、

山崎修道、森一秦・・・第14回日本エイズ学会学術集会(京都)

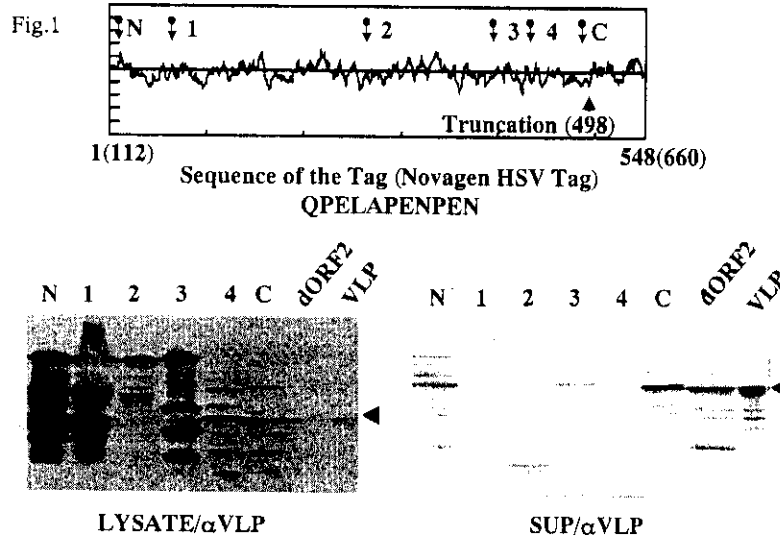
4) 抗原ペプチドの in vivo electroporation 法による細胞性免疫の誘導: 古田さと子、玉置繁憲、高村史記、亀井昭、足立幸彦、保富康宏・・・第4回日本ワクチン学会学術集会(横浜)

5) DNA ワクチン投与におけるウイルス様中空粒子のベクターとしての有効性: 高村史記、新倉昌浩、武田直和、宮村達男、保富康宏・・・第4回日本ワクチン学会学術集会(横浜)

6) ヘルパー T 細胞エピトープを用いた HIV ペプチドワクチンによる CTL の誘導: 黒松功、高村史記、武部豊、保富康宏・・・第48回日本ウイルス学会学術集会(津)

7) BCG α 抗原遺伝子を用いた HIV-DNA ワクチン: 高村史記、黒松功、武部豊、保富康宏・・・第48回日本ウイルス学会学術集会(津)

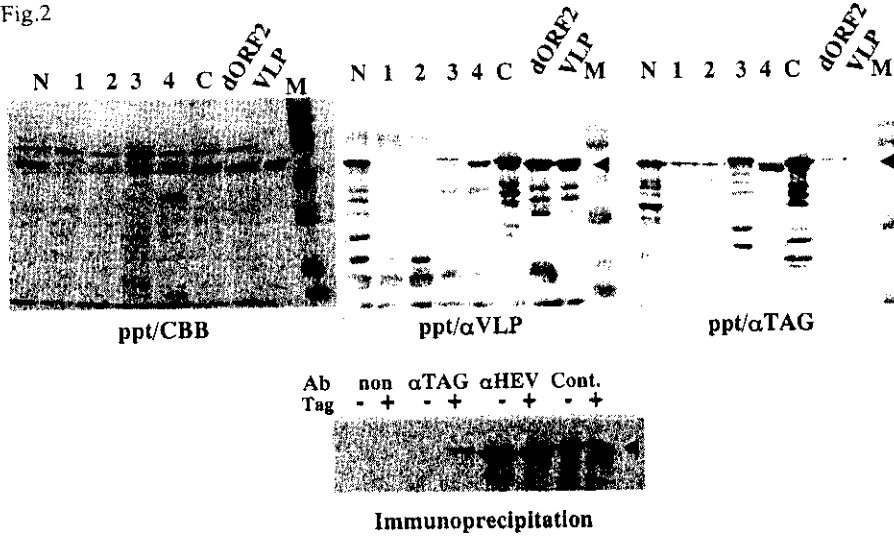
Insertion sites of Tag sequence to dORF2 of HEV



HEV ORF2 領域中の疎水部および N,C 両末端に Tag エピトープを挿入し VLP を作成したところ、C 末にエピトープを挿入したもので一番効率よく VLP が形成された。

## Particle formation of modified dORF2 with TAG

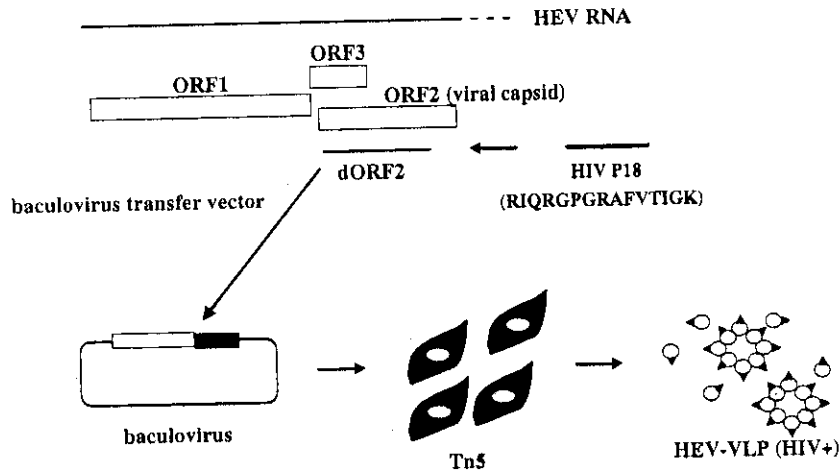
Fig.2



それぞれの VLP 形成後におけるエピトープの発現をウエスタンで確認した。また最も生産量の多かった C 末挿入 VLP において、免疫沈降により粒子表面でのエピトープの存在を確認した。

## Construction of recombinant HEV-VLPs expressing HIV-P18 epitope

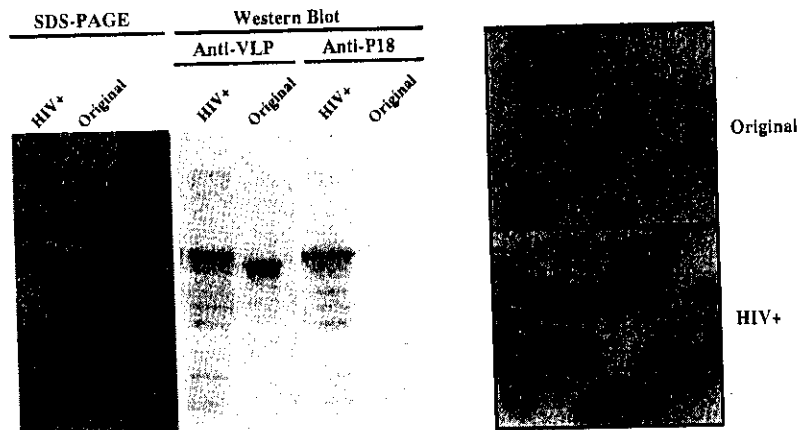
Fig.3



これらの結果より、HEV ORF2 の C 末に HIVenv 中和抗体エピトープを挿入し、HIV+ VLP を作成した。

## Identification of the HIV-P18 epitope recombined on the HEV-VLPs

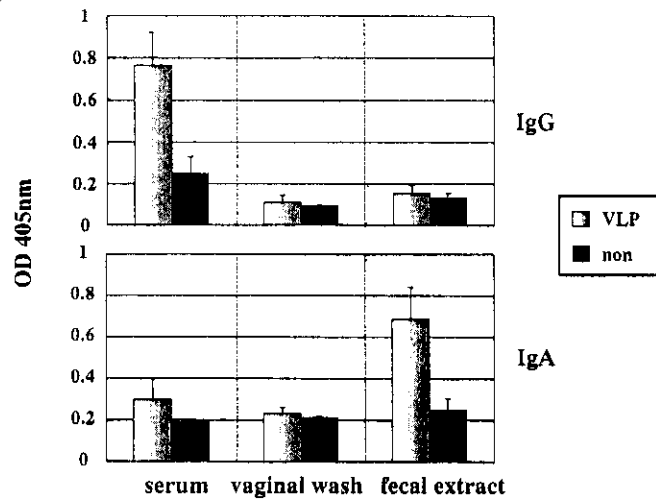
Fig.4



HIV+ VLP 形成後のエピトープの発現をウエスタンで確認した。また作成された VLP は形態的に、オリジナルの VLP と変化は見られなかった。

*Anti-HIV-P18 specific antibody responses  
in immunized mice*

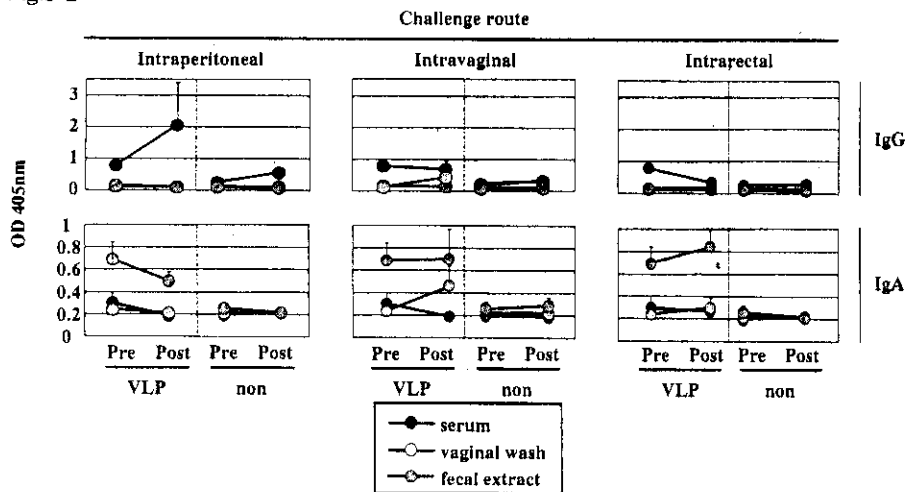
Fig.5-1



HIV+ VLP をマウスの経口より投与し免疫後の挿入エピソードに対する抗体を調べた。この結果血清および糞便抽出液よりエピソード特異的抗体が確認され、糞便抽出液中の抗体は IgA であった。

*Anti-HIV secondary humoral immune responses  
in immunized mice after rVV-HIV IIIB challenge*

Fig.5-2

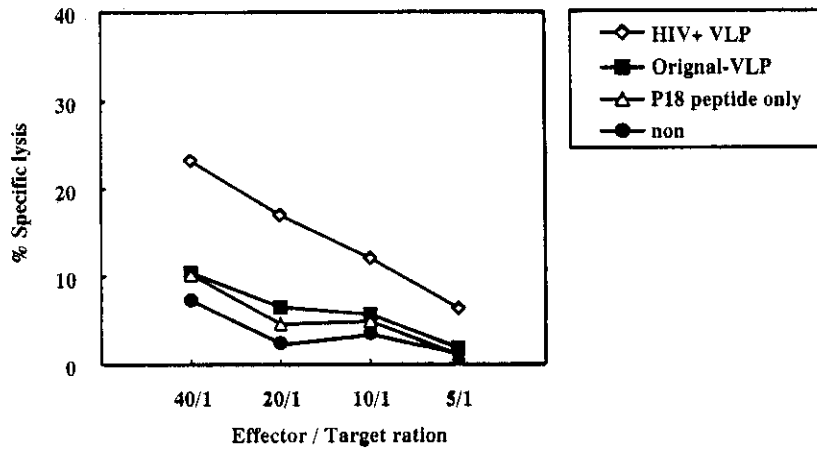


免疫後のマウスにあらゆるルートから rVV HIV IIIB をチャレンジし、5日後の抗体反応の変化を調べた。この結果、未免疫マウスではほとんど抗体反応がみられなかったのに対し、免疫マウスではそれぞれのチャレンジ局所における短期間での抗体価の上昇が確認された。



*Anti-HIV-P18 specific CTL responses  
in methenteric lymph node*

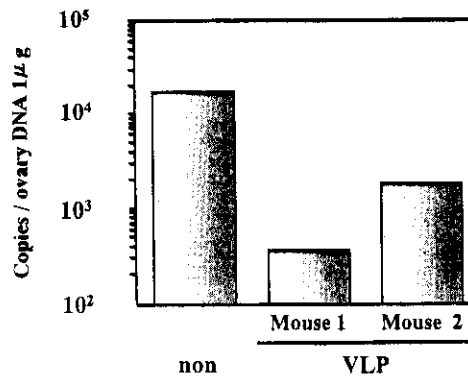
Fig.6



免疫後のマウスにおける HIV 特異的細胞障害活性を調べたところ、脾臓、パイエル板で検出できなかったのに対し、腸管膜リンパ節においてその活性がみられた。

*In vivo elimination of rVV-HIV III B in immunized mice*

Fig.7



免疫後のマウスの腹腔内に rVV HIV III B をチャレンジし、5日後の卵巣におけるウイルス量を real time PCR にて確認した。この結果、未免疫マウスに比べ、免疫マウスでは明らかにウイルス量が減少していることが確認された。

厚生科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）

分担研究報告書

ケモカインレセプターを介した HIV 感染予防に関する研究

分担研究者 杉村 和久 鹿児島大学・教授. 工学部生体工学科

研究協力者

伊東 祐二 鹿児島大学工学部生体工学科

橋口 周平 鹿児島大学工学部生体工学科

中島 秀喜 鹿児島大学歯学部

中島 敏博 (財)化学及血清療法研究所

研究要旨

私どもはレセプター/リガンド結合部分の 3 次構造を認識するモノクロナール抗体を用いてファージライブラリーを探索し、この抗体に結合するファージクローンを単離すれば、抗体が鋳型として働き、レセプターとリガンドの結合部位の 3 次構造を直接コピーできるかという構想について、CTLA4 (1, 2) や MCP-1 分子 (3) について検討しその実効性があることを明らかにしてきた。この 3 D 分子デザイン法によれば、レセプターが 7 回膜貫通型の分子であろうとも、レセプターとリガンドの結合を阻害する抗体が作成されれば、そのアンタゴニストの設計は達成可能と考えられた。

この観点から、HIV-1 の感染を阻害するモノクロナール抗 CCR5 抗体, 2D7(4) を用いて CCR5 の mimetics を試み、2D7/m6 と呼ぶモチーフを提示するファージクローンを単離し、その性状を調べた。その結果、1) 2D7/m6 は M-tropic HIV-1/gp120 に結合活性を有するとともに、T-tropic HIV-1/gp120 にも弱い結合活性を示す。2) 2D7/m6 は FcεR1 や TNFR1 には結合しないが CD 4 に結合活性を示す。3) 2D7/m6 は M-tropic HIV-1 感染も T-tropic HIV-1 感染についてもともに阻害活性を有する。4) 2D7/m6 モチーフは 2D7 抗体のエピトープとして報告されている CCR5 の第 2 細胞外ループの N 末側 (アミノ酸#180-186) に低いホモロジーを示すことを明らかにした。

## A. 研究目的

HIV-1 感染防御の手段として、ウイルスの逆転写酵素の阻害、HIV-1 特異的プロテアーゼの阻害があるが、HIV-1gp120/CD4/ケモカイン受容体の感染複合体の形成阻害も、第3の効果的且つ新しい手段であると考えられる。最近、炎症局所で活性化されたリンパ球の細胞膜がケモカイン受容体(コレセプター)を含んだまま微小粒子として放出され、それを近傍の血管内皮系細胞が取り込むことにより、本来は感染が成立しない組織への感染の成立も明らかになり(5)、このような「bystander infection」を阻止するうえで、強力な HIV-1 のエンターインヒビターの開発が重要であると考えられる。しかし一方、ケモカイン自身を用いた感染阻害についての研究から、これらの分子はレセプターの結合部位を塞ぐと同時に細胞内にシグナルを送り、その結果、トロピズム(指向性)の異なる HIV-1 の株の感染を逆に促進してしまうことも明らかとなってきた(6, 7)。この結果は、ケモカインレセプターには特異的に結合はするが、シグナルを送ることのない「結合モチーフのミミック分子」の重要性を示唆している。

本研究では、R5 ウイルス特異的に感染を阻害するマウス抗 CCR5 抗体、2D7 を用いてファージライブラリーを探

査し、HIV-1 の感染を阻害する CCR5 ミミックペプチドを単離することを目的とした。

## B. 研究方法

### 1. 抗体およびケモカイン

マウス抗ヒト CCR5 モノクローナル抗体(2D7: PharMingen)、マウス抗ヒト CXCR4 抗体(12G7: PharMingen)、アルカリフォスファターゼ(AP)標識ウサギ抗マウス IgG 抗体(Zymed Lab., San Francisco, CA)、AP 標識ストレプトアビジン(Vector Lab., Burlingame, CA)、TNFR1(Genzyme/Techne, Cambridge, MA)はそれぞれ購入した。MIP-1 $\alpha$ は化血研(熊本)、MCP-1は倉津純一(鹿大・医・脳神経外科)より、gp120は永井美之(国立感染症研究所)より恵与された。

### 2. ファージライブラリー

M13 ファージディスプレイライブラリー(Ph. D. -7, 7mer モチーフを有する)を New England BioLabs Inc., Beverly, MA から購入して用いた。

### 3. バイオパンニング

2D7 抗体は CCR5 の細胞外第2ループ領域を認識し CCR5 のリガンドである MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  及び RANTES の結合を阻害し、M-tropic HIV-1 の感染を阻害する(8)。バイオパンニングはこの抗体を用い、Fukumoto, T., et al.

の方法にしたがって行った(1, 2)。

#### 4. DNA シークエンス

ファージの single-strand DNA に相補的なプライマー(5'-CCC TCA TAG TTA GCG TAA CG-3')を用い、ABI DNA Sequencer 373A-36S (アプライドバイオシステムズ)によって塩基配列を決定した(1)。

#### 5. ELISA

96 穴イムノプレート(Nunc, Roskilde, Denmark)に gp120 (250ng/100  $\mu$ l/well)、ケモカイン(80 ng/40  $\mu$ l/well)、CD4 (100 ng/40  $\mu$ l/well)、ヒト IgG の Fc フラグメント(100 ng/40  $\mu$ l/well)をそれぞれ 4 C で一晩コートし、1.0% BSA/TBS でブロックした。TBS/Tween で洗浄した後、ファージクローン ( $1 \times 10^{12}$ v/40  $\mu$ l/well)または段階希釈したマウス血清を 1 時間 4 C で反応させた。血清抗体の測定では AP 標識された抗マウス IgG、IgM 抗体を、または結合ファージの検出にはビオチン標識した抗 M13 抗体(Pharmacia:100 ng/40  $\mu$ l/well)と AP 標識ストレプトアビジン(1:1000)を反応させ、ELISA を行った(1, 8)。HIV-1gp120 の定量キットとして Capture ELISA Kit (INTRACEL Corporation, Cambridge, MA)を用いた。

#### 6. HIV-1 感染実験 (MAGI assay)

HIV-1 感染の際の標的細胞として、

MAGI-CCR5 細胞を用いた(8)。細胞を 48 穴プレートにまき ( $2 \times 10^4$ /well)、37 C で一晩培養した。翌日、ファージ (20-80  $\mu$ g/ml)、2D7 (4  $\mu$ g/ml)、T134 (1  $\mu$ M)と、M-tropic HIV-1 (JR-CSF 株; 0.2 MOI)または T-tropic HIV-1 (NL4-3 株; 0.2 MOI)の混合物を 4 C で 30 分間保温したものをそれぞれ加え、37 C で培養した。2 日後、細胞上清を取り除き細胞を洗浄した後、固定液で細胞を固定し、細胞の染色には X-gal を含む基質溶液を用いた。阻害%=[1 - (阻害物を含む時の感染細胞数) / (阻害物を含まない時の感染細胞数)] x 100。

#### 7. 倫理面への配慮:

HIV-1 の感染実験は、鹿児島大学医学部 P3 実験施設にて、協力実験者である中島 秀喜教授(歯)によって行われた。他には倫理面の問題はない。

### C. 研究結果

#### 1. バイオパンニング

2D7 抗体を用いたバイオパンニングにより、24 クローンのファージを単離した。これらのファージクローンが実際、2D7 への結合活性を持っているかどうかを確かめるために、ELISA によるスクリーニングを行った。図 1 に示すように、24 クローン中、22 クローンのファージが抗 CCR5 抗体 (2D7) との結合活性を示した。一方、コント

ロールとして用いた抗 CXCR4 抗体、12G5 にはいずれも弱い反応を示した。横軸には各ファージクローンを、縦軸には 405 nm での吸光度を示した。

## 2. 2D7 抗体が認識するモチーフ

一次スクリーニングで、抗 CCR5 抗体 (2D7) との結合活性が見られた 22 クローンについて、g3p 分子に含まれる 7 残基のアミノ酸配列を DNA シークエンサーにより解析した結果、下のよう  
に 9 種類のモチーフに分類することができた (図 2)。

得られたモチーフは抗 CCR5 抗体 (2D7) に結合することから、この抗体が認識する CCR5 の部位と同じまたは似通った配列を有していることが考えられた。そこで、これらのモチーフと CCR5 の一次配列とのホモロジー解析を Gene Works (帝人、東京) またはインターネット上の解析ソフト PIMA を用いて行った。その結果、すべてのモチーフが細胞外第 2 ループの N 末側前半の 180-186 のアミノ酸配列と有意なホモロジーを持っていることが明らかとなった (図 3)。

## 3. 2D7/m6 ファージクローンの抗 HIV-1 活性

M-tropic HIV-1 のエンベロープ糖タンパク質 gp120 は CD4 分子に結合することで、CCR5 と特異的に相互作用す

る。2D7 が M-tropic HIV-1 と Dual-tropic HIV-1 の感染を阻害するのならば、パンニングによって得られたファージクローンは HIV-1 感染における CCR5 様結合モチーフとして機能し、HIV-1 の感染を阻害することが示唆された。そこで、これらのファージの抗 HIV-1 活性を調べるために、*in vitro* でファージクローンの存在または非存在下で、M-tropic HIV-1 (SF162 株) の感染阻害実験を行った。9 種類のモチーフを有するクローンについて検討した結果、2D7/m6 が最も強い感染阻害活性を示すことが明らかとなった (データ・略)。この 2D7/m6 について M-tropic HIV-1 (JR-CSF) と T-tropic HIV-1 (NL4-3) を用いて、より詳細な検討を行ったところ (図 4)、2D7/m6 は濃度依存的にいずれの HIV-1 の感染も阻害した。しかし、コントロールとして用いた 2D7 抗体 (4 $\mu$ g/ml) や T134 ペプチド (1 $\mu$ M) が示す阻害活性と比較すると、このファージクローンが阻害活性を示すには極めて高い濃度の条件が必要であることが明らかとなった。ネガティブコントロールとして用いた Y9 は全く阻害活性を示さなかった。

## 4. 2D7/m6 の gp120 分子への結合活性

図 4 の感染実験の結果は、2D7/m6 は

HIV-1gp120 分子への結合活性を示す可能性を示唆した。この点を検討するため、3種類のリコンビナントの gp120 標品を用いて ELISA を行った (図 5)。その結果、2D7/m6 は M-tropic gp120 に強く結合するが、T-tropic gp120 にも結合することが示された。一方コントロールの L6 は全く結合しなかった。

5. 2D7/m6 の CD4 分子への結合活性  
図 4 と 5 の結果は、2D7/m6 は CD4 分子にも結合する可能性を示唆した。この点を明らかにするために、CD4 をプレートにコートし、gp120 分子の存在化または非存在化で 2D7/m6 の結合を ELISA で調べた。その結果、2D7/m6 は CD4 分子に直接結合し、gp120 が存在した場合、さらに強い結合活性を示すことが明らかとなった (図 6 a)。コントロールとして用いたリコンビナント Fc $\epsilon$ R1、TNFR1、BSA には結合しないことより、CD4 分子への結合が特異的であることが示された (図 6 b)。

#### D. 考察および結論

これまで、受容体カリガンドの立体構造を認識する特異抗体で、かつその分子間の結合を阻害する活性をもつ抗体を用いると、phage library から、受容体やリガンドの結合サイトの

conformation をコピーしたモチーフを単離できることを、Tリンパ球の負のシグナル分子、CTLA4、HIV-1 の感染に關与する膜 7 回貫通型受容体、CCR5、および最も強い活性を有するケモカイン、MCP-1 分子を標的分子として検討し、この方法論が可能であることを明らかにした。CTLA4 についての検討では F2 (1, 2)、および CCR5 ミミックについての検討では、random peptide display library を用いた研究から M23(9)、および本研究で示した 2D7/m6 と呼ぶ機能性モチーフを明らかにしたが、いずれもモチーフをペプチド化する過程で、ファージクローンの機能の再現ができていない。しかし、MCP-1 の検討では、sC27 と sG25 と呼ぶ 2 つのペプチドの合成に成功した(3)。ただし、受容体に対するアフィニティーに関する検討で、ナチュラルな MCP-1 に比較し、非常に低いことが明かとなり、さらなる affinity maturation の必要性が示された。

HIV-1gp120 との結合に CCR5 の N 末アミノ酸および細胞外ループ 2 の N 末側半分が重要であることが明らかになっているので (1, 14)、今後はこれらの成果を踏まえ、先端の抗体エンジニアリングの技術を駆使し、HIV-1 エントリーに係わる分子に結合し HIV-1 の感染阻害活性を有するヒト一本鎖抗体 (scFv) の開発を、これまでの研

究手法に加えていく予定である。

この技術はヒトの免疫系を試験管に入れて所有していることと同義であり、1) 特定のタンパク質に結合する抗体は、結合性を有するファージクローンを一匹釣り上げるだけで、特異抗体を作製できること、また、2) 単離された抗体は完全なヒト抗体であること、3) ファージライブラリーの免疫系は、免疫動物内で行われる自己と非自己の選別過程を経ることがないため、通常は作製することが困難な自己分子に対する抗体ファージが単離できることである。

私どもの作製したライブラリーの一つの特長は、20名の健常人の末梢血リンパ球について、それぞれ独立して、IgM および IgG cDNA V gene の遺伝子増幅を行いライブラリーを作製し、それをプールしたものであり、これまで報告されているものは2-3名のプールした末梢血由来である。

Primer の設計は、基本的には、Marks, JD et al., J. Mol. Biol. 222: 581, 1991 に従っているが、V $\gamma$ と V $\lambda$ 、V $\gamma$ と V $\kappa$ 、V $\mu$ と V $\gamma$ 、V $\mu$ と V $\kappa$ の4種の組み合わせのライブラリーを作製していることである。

以上の作製方法は、in vivo selection による affinity maturation のプロセスを経していない、限り無く germline-type に近い V gene とその

usage を反映させることに有利であろうと考えられる。

私どものこれまでの検討で、ヒト MCP-1, IL-6, TNF $\alpha$ R, Fc $\epsilon$ R1 にたいするヒト scFv の単離に成功しており、このライブラリー (non-immunized library) で確実にヒト分子に対する抗体を得ることができることを明らかにしている (Ref. 8-12、日本免疫学会、2000)。

#### F. 引用文献

1. T. Fukumoto, N. Torigoe, S. Kawabata, M. Murakami, T. Ueda, T. Nishi, Y. Ito, K. Sugimura, Peptide mimics of the CTLA4-binding domain stimulate T-cell proliferation, *Nature biotech.*, 16, 267-270, 1998
2. T. Fukumoto, N. Torigoe, Y. Ito, Y. Kajiwara, K. Sugimura, T cell proliferation augmenting activities of the gene 3 protein derived from a phage library clone with CD80-binding activity, *J. Immunol.* 161, 6622-6628, 1998
3. M. Kaji, M. Ikari, S. Hashiguchi, Y. Ito, R. Matsumoto, T. Yoshimura, J. Kuratsu and K. Sugimura, Peptide mimics of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) with an antagonistic activity, *J.*

Biochem. in press

4. L. Wu, G. LaRosa, N. Kassam, C.J. Gordon, H. Heath, N. Ruffling, et al., Interaction of chemokine receptor CCR5 with its ligands: multiple domains for HIV-1 gp120 binding and a single domain for chemokine binding, *J. Exp. Med.* 186, 1373-1381, 1997

5. M. Mack, A. Kleinschmidt, H. Bruhl, et al.: Transfer of the chemokine receptor CCR5 between cells by membrane-derived microparticles: A mechanism for cellular human immunodeficiency virus 1 infection. *Nature. Med.* 6: 769-775, 2000.

6. C.J. Gordon, MA. Muesing, AE. Proudfoot et al., Enhancement of human immunodeficiency virus type 1 infection by the CC-chemokine RANTES is independent of the mechanism of virus-cell fusion. *J. Virol.* 73, 684-694, 1999.

7. V. Marechal, F. Arenzana-Seisdedos, JM. Heard, et al., Opposite effects of SDF-1 on human immunodeficiency virus type 1 replication. *J. Virol.* 73, 3608-3615, 1999

8. A. Meta, N. Torigoe, Y. Ito, R. Arakaki, H. Nakashima, and K.

Sugimura. Inhibition of M-tropic HIV-1 infection by the fd phage-gene 3 protein with MIP-1a-binding activity, *Mol. Immunol.* 36, 1249-1254, 1999

#### 4. 図の説明

Fig 1. Primary screening of anti-CCR5 mAb(2D7)-binding phage clones.

ELISA was performed as described. Immunoplates were coated with phage clones ( $4 \times 10^9$  TU/40ml/well) at 4C overnight. After blocking with 1.0% BSA/TBS, anti-CCR5 mAb(2D7) or anti-CXCR4 mAb (12G5) (100ng/40 $\mu$ l/well) was added, followed by the detection with AP-conjugated anti-mouse IgG at a dilution of 1:1000.

Fig. 2. Seven amino acid sequence motifs of 2D7-binding phage clones.

Fig. 3. Sequence homology of the selected motifs to the N-terminal half of extracellular loop2 of CCR5.

Fig. 4. Inhibitory activity of the 2D7/m6 to HIV-1 infection  
The MAGI-CCR5 cells were infected



with the M-tropic HIV-1 strain (JR-CSF, panel A) or the T-tropic HIV-1 strain (NL4-3, panel B) in the presence of varying concentrations of 2D7/m6 phage clone (20, 40, 80  $\mu$ g/ml: M-tropic, 20, 80  $\mu$ g/ml: T-tropic), Y9 (40  $\mu$ g/ml), 2D7 (4  $\mu$ g/ml) or T134 (1  $\mu$ M). The Y9, randomly selected from the phage library, was used as negative control. The 2D7 and T134 were used as positive control for M-tropic and T-tropic HIV-1 infection respectively.

Fig. 5. 2D7/m6 binds to the gp120  
Immuno plates were coated with the recombinant gp120 (250ng/well: Capture ELISA Kit, INTRACEL Corporation, Cambridge, MA), NL4-3 gp120 or SF162 gp120, followed by the addition of phages ( $1 \times 10^{12}$  TU/well). An hour later, the binding was detected by the biotinylated anti-M13 mAb, followed by the detection with AP-conjugated streptavidin at a dilution of 1:1000. L6: control phage clone

Fig. 6. The 2D7/m6 binds to CD4  
a) Immuno plates were coated with CD4 (Capture ELISA Kit, INTRACEL Corporation), followed by the addition of gp120 (250ng/100 $\mu$ l/well : Capture ELISA Kit). An hour later, the phages ( $1 \times 10^{12}$  TU/100 $\mu$ l/well) were added. The binding was detected by the biotinylated anti-M13 mAb (1:1000), followed by the detection with AP-conjugated streptavidin at a dilution 1:1000.

b) Immuno plates were coated with recombinant CD4 (100ng/well: Protein Science Corporation, Meriden, CT), Fc $\epsilon$ R1 (100ng/well) or TNFR1 (100ng/well: Genzyme/Techne, Cambridge, MA), followed by the addition of phage  $1 \times 10^{12}$  TU/well). The binding was detected by the identical protocol to Expt. a).

## G. 研究発表

### 論文発表

1. 杉村 和久、吉満 正明、御手洗 睦和、新村 靖彦、感染症における最近のトピックス : HIV-1 エントリーインヒビター、臨床免疫、印刷中
2. M. Kaji, M. Ikari, S. Hashiguchi,

- Y. Ito, R. Matsumoto, T. Yoshimura, J. Kuratsu and K. Sugimura, Peptide mimics of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) with an antagonistic activity, *J. Biochem.* in press
3. Y. Nagata, K. Fujino, S. Hashiguchi, N. Abe, Y. Zaima, Y. Ito, Y. Takahashi, K. Maeda, and K. Sugimura, Molecular characterization of buckwheat major IgE-reactive proteins on allergic patients, *Allergology International A* 49: 117-124, 2000
4. T. Hirai, S. Hashiguchi, N. Torigoe, Y. Toda, Y. Ito, and K. Sugimura, Intranasal sensitization of Japanese cedar pollen by the co-administration of low doses of cholera toxin but not its recombinant B subunit to mice, *Microbiol. Immunol.* 44 (4), 259-266, 2000
5. 杉村和久、御手洗睦和、新村靖彦、橋口周平、吉永圭介、吉満正明、伊東祐二、中島秀喜、吉崎和幸、HIV-1: エントリーインヒビターとスキン免疫、*日本臨床免疫学会会誌*、23 巻、592-596、2000
6. 峰山純、出口頭哉、加治正知、倉津純一、伊東祐二、杉村和久、MCP1 ミミックペプチドモチーフの融合蛋白質のリガンド結合活性、第 73 回日本生化学大会要旨集、p1032、1999
7. 伊東祐二、濱崎隆之、松崎真一、木村葵、中島敏博、杉村和久、Jurkat 細胞構築分子に反応するヒト抗体ファージライブラリークローンの単離、第 73 回日本生化学大会要旨集、p1096、1999.
8. 二谷綾、橋口周平、伊東祐二、杉村和久、可溶性 FcεR1α 鎖に結合するヒト scFV 抗体ファージクローンの単離、*日本免疫学会*、30 巻、p36、2000
9. 御手洗睦和、吉満正明、新村靖彦、橋口周平、伊東祐二、杉村和久、抗 CCR5 抗体(2D7)に結合するペプチドモチーフの解析、*日本免疫学会総会・学術集会記録*、30 巻、p59、2000
10. 山本真紀、加治正知、橋口周平、伊東祐二、杉村和久、ケモカイン、MCP-1 のペプチドミミック、*日本免疫学会総会・学術集会記録*、30 巻、p140、2000
11. 碓正臣、橋口周平、伊東祐二、杉村和久、MCP-1 に結合するヒト一本鎖抗体発現ファージクローンの単離、*日本免疫学会総会・学術集会記録*、30 巻、p147、2000
12. 奥菌剛、橋口周平、伊東祐二、杉村和久、ヒト一本鎖抗体ファージライブラリーを用いた抗 TNFR1 抗体の検索、*日本免疫学会総会・学術集会記録*、

- 30 卷、p180、2000
13. 橋口周平、二谷綾、吉永圭介、山本真紀、伊東祐二、杉村和久、CD28-Fc/CTLA4-Fc 発現ベクターによるスキン免疫、日本免疫学会総会・学術集会記録、30 卷、p211、2000
14. 鳥越直彦、米田明広、杉村和久、HIV-1 gp120 とケモカインレセプターの結合にかかわるモチーフ、Annual Review 免疫 2000, pp250-259、1999
15. A. Meta, N. Torigoe, Y. Ito, R. Arakaki, H. Nakashima, and K. Sugimura. Inhibition of M-tropic HIV-1 infection by the fd phage-gene 3 protein with MIP-1a-binding activity, Mol. Immunol. 36, 1249-1254, 1999
16. 杉村 和久、伊東 祐二、中島 秀喜、西本 憲弘、吉崎 和幸、CCR5 結合ドメインのペプチドミミックとその機能、HIV 感染症に関する臨床研究、厚生科学研究費補助金エイズ対策研究事業 平成10年度研究報告書 215-223 頁、1999.
17. 伊東 祐二、杉村 和久、CTLA-4 の生物活性とその構造、免疫 Immunology Frontier, 9: 42-46, 1999
18. M. Kaji, M. Ikari, S. Hashiguti, Y. Ito, T. Yoshimura, J. Kuratsu, K. Sugimura, Analysis of peptide motifs recognized with anti-MCP-1 monoclonal antibody, PEPTIDE Science 1999, 33-36, 2000
19. Y. Ito, S. Takeda, J. Mineyama, S. Hashiguti, K. Sugimura, Ligand binding activity of the recombinant antigen fused with CTLA-4 mimicking motif, PEPTIDE Science 1999, 379-382, 2000
20. M. Ikari, M. Yamamoto, N. Togo, S. Hashiguti, Y. Ito, A. Tominaga, K. Takatsu, K. Sugimura, Isolation of phage library clones selected by anti-IL-5 monoclonal antibody (TB-13), PEPTIDE Science 1999, 383-384, 2000
21. S. Hashiguti, T. Okuzono, Y. Ito, K. Sugimura, Peptide motif analysis of anti-TNF- $\alpha$  monoclonal antibodies using a phage display library, PEPTIDE Science 1999, 385-386, 2000
22. M. Yoshimitsu, M. Mitarai, Y. Ito, K. Kanbara, H. Nakashima, K. Sugimura, Isolation of phage library clone with the binding activity to anti-CCR5 monoclonal antibody (45531.111), PEPTIDE Science 1999, 387-390, 2000
23. T. Fukumoto, N. Torigoe, S. Kawabata, M. Murakami, T. Uede, T. Nishi, Y. Ito, K. Sugimura, Peptide mimics of the CTLA4-binding domain

stimulate T-cell proliferation, Nature biotech., 16, 267-270, 1998

24. T. Fukumoto, N. Torigoe, Y. Ito, Y. Kajiwara, K. Sugimura, T cell proliferation augmenting activities of the gene 3 protein derived from a phage library clone with CD80-binding activity, J. Immunol. 161, 6622-6628, 1998

25. N. Torigoe, Y. Kajiwara, Y. Ito, K. Sugimura, Immunopotentiating activity of a peptide motif that mimicks CTLA4-binding domain, Peptide science 1998 (M. Kondo, Ed), pp69-72, 1999, Protein Research Foundation.

26. K. Ezaki, Y. Ito, S. Hashiguchi, K. Sugimura, Effect of a CTLA4 mimicking motif fused to hen egg white lysozymes on the immune response, Peptide science 1998 (M. Kondo, Ed), pp325-328, 1999, Protein Research Foundation.

27. A. Meta, N. Torigoe, Y. Ito, R. Arakaki, H. Nakashima, K. Sugimura, Peptide-motif analysis of phage clones selected by anti-CCR5 monoclonal antibody (2D7), Peptide science 1998 (M. Kondo, Ed), pp489-492, 1999, Protein Research Foundation.

28. Y. Oomura, Y. Ito, S. Takeda, S.

Hashiguchi, K. Sugimura, Affinity maturation in peptide motif mimicking CTLA4-binding domain, Peptide science 1998 (M. Kondo, Ed), pp321-324, 1999, Protein Research Foundation.

29. S. Akasaki, S. Hashiguchi, Y. Ito, K. Sugimura, A FACS analysis of the gene 3 protein derived from a phage library clone with T-cell proliferation-augmenting activity, A Peptide science 1998 (M. Kondo, Ed), pp317-320, 1999, Protein Research Foundation.

#### 学会発表

1. 杉村和久、御手洗睦和、新村靖彦、橋口周平、吉永圭介、吉満正明、伊東祐二、中島秀喜、吉崎和幸、HIV-1：エントリーインヒビターとスキン免疫、日本臨床免疫学会、9月、東京、2000
2. 峰山純、出口頭哉、加治正知、倉津純一、伊東祐二、杉村和久、MCP1 ミミックペプチドモチーフの融合蛋白質のリガンド結合活性、第73回日本生化学大会、10月、横浜市、
3. 伊東祐二、濱崎隆之、松崎真一、木村葵、中島敏博、杉村和久、Jurkat細胞構築分子に反応するヒト抗体ファミリークローンの単離、第73回日本生化学大会、10月、横浜市、