

称号及び氏名	博士（学術） Haggag Salah Zein Mostafa
学位授与の日付	平成 18 年 3 月 3 1 日
論 文 名	「Study on Molecular and Immunochemical Characteristics of Monoclonal and Recombinant Antibodies Selective for <i>Cucumber mosaic virus</i> Coat Protein and Their Applications」 (キュウリモザイクウイルス (CMV) に対するモノクローナル抗体の分子・免疫学的特性とその利用)
論文審査委員	主査 宮武 和孝 副査 高橋 正昭 副査 藤井 郁夫 副査 大木 理

論文要旨

Introduction

Diseases caused by viruses are a constant and major problem for crop and livestock production worldwide. *Cucumber mosaic virus* (CMV) is the type species of the genus Cucumovirus and is one of the most widespread plant viruses in the world. It has a very broad host range of wild and cultivated plants, with more than 1000 known hosts. Predominantly, CMV attacks several economically important plants in Japan. Considerable efforts are needed to control these diseases, including accurate and rapid diagnosis using both classical and emerging technologies. The methods used are mainly serological and molecular biological based methods. Recombinant and monoclonal antibodies have been used to group viruses, and also to differentiate strains of viruses. Among serological tools, ELISA has been the method of choice because of its high sensitivity, simplicity, reproducibility and versatility in screening a large number of specimens. The application of immunocapture reverse transcriptase polymerase chain reaction (IC-RT-PCR) has now made it possible to amplify a low copy number of viral RNA/DNA molecules, and their subsequent detection PCR technology for the detection of DNA from various organisms may eventually replace some immunological assays.

The Scope of the Thesis

The major aim of producing monoclonal antibodies was developed in order to allow fast, large scale testing of infected plants and to obtain a panel binding to different epitopes contained in the CMV coat protein. The in vitro experiments of "mechanical inoculation" of the monoclonal antibodies against CMV were neutralized efficiently against virus infectivity and to block virus infection. Due to development of MAbs, the serological assays, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), western blots, dot-immune binding assay, and immunocapture IC-RT-PCR protocols were developed and optimized for the sensitive detection of CMV. Knowledge of the specific immunoglobulin genes used to target common epitope may lead to insights on pathogen-host co-evolution and long term blocking virus infections in plants which may be useful for antibody based resistance. CMV coat protein could stimulate catalytic antibodies which identically sequence with anti-VIP, gp41-HIV, and HCV light chain antibodies. I hypothesize that MAbs possess DNase and Protease like activity and might be used for medical therapy.

Chapter I

The production of MAbs and PAbs are an efficient means of using long-term maintenance to produce antibodies which are specific for CMV coat protein, The affinity of MAbs were measured with competitive ELISA. Interestingly, the affinity of the MAbs $\{$ varied depending on the CMV subgroup, and MAbs specific subgroup-I showed a very high specific binding affinity nanomolar level which ranged $3.0-38.3 \times 10^{-9}$ against Pepo-CMV strain. On the other hand, MAbs specific subgroup-II showed to be ~ 100 lower than subgroup-I, however, the MAbs revealed reactivity against M2-CMV strain was $2.8-5.2 \times 10^{-7}$.

Chapter II

Due to the development of serological and molecular assay for high detection CMV coat protein, Dot-immune binding assay was more effective for the detection of CMV. Younger leaves are more suitable as samples for TAS-ELISA than older leaves. This may imply a high accumulation of virus particles in younger leaves, which are still actively growing, or alternatively there may be a reduced amount of tannins and phenolics in the younger leaves compared with the older leaves. The nucleic acid-based detection method IC-RT-PCR is at least five times more sensitive than protein-based serological methods for the detection of CMV in infected tissues. Predictably, specific

antibodies neutralized infectivity in homologous tests of mechanical inoculation. Subgroup-I strain Pepo specific MAb-5 which showed the highest binding affinity was employed for neutralizing virus infectivity. The inhibition by MAb-5 was significantly very high and consequently tobacco plants inoculated with virus pretreated with MAb showed clearly to be symptom-less on tobacco plants and could not be detected by immunochemical methods.

Chapter III

The main goal of the experiments was to develop Fab to highly conserved regions of CMV coat protein. For this purpose, I isolated, cloned and sequenced the VH and V regions of 14 anti-CMV mAbs generated from five different fusions of BALB/c mice immunized with native CMV coat protein, and the VH, D, JH, V, and J were determined. The antibodies grouped into four sets, based on highly identity VH and VL genes. The mAbs responses were oligoclonal and paratypically diverse as it was encoded by different heavy chain V region gene segments. All the antibodies were found to derive from distinct B cells because they had utilized diverse VH, DH, and JH gene combinations, and the length of the CDR3 region ranged from seven to seventeen amino acid residue. An abundance of VH genes from J558 family was observed (eight out of fourteen) but each represented a separate member of the family. It is appears likely that CMV-CP is capable of inducing a variety of B cells that have distinct phenotypic and genotypic paratope. Interestingly, high affinity antibody specificity was encoded by germline genes. Sequence analyses of PCR-amplified cDNA derived from fourteen different hybridoma Ig variable region genes, showed that ten hybridoma cell lines amplified that maximal enrichment is obtained for the highly represented variable Ig gene subgroups VII gene bd2 which was a partner of a numerous of different antibodies raised in autoimmune diseases anti-DNA, -RNA, -Sm, and -Histone. Moreover, our present results show that the anti-HIV and -HCV human viruses light chain which plays a vital and dominant function in determining antibody specificity.

Chapter IV

Molecular mimicry is one of the leading theories that attempts to explain why the immune system turns on its own body in autoimmune diseases such as multiple sclerosis, rheumatoid arthritis and type-one diabetes. CMV capsid protein domains are clearly exposed on the virus, and the amino acid sequence of the H-I loop forms a conspicuous, negatively charged electrostatic field on the surfaces of virions, which has fundamentals aspects, and is conserved among Cucumoviruses. The structure plays a

role in aphid vector transmission and determines the most immunodominant domain.

I hypothesize those CMV specific antibodies light chains have an identical sequence to the catalytic antibodies, anti-VIP, -gp41 HIV and -HCV light chain antibodies, and in addition, the MAbs specific CMV coat protein possesses DNase and Protease like activity. Consequently, CMV-CP specific antibodies are important for isolates such as coat proteins of bacteria, viruses, cancer cells, etc. which are vital and might be useful for medical therapy.

審査結果の要旨

植物は植物ウイルスに感染することでその生産性が低下することが知られている。これらのウイルスの中でブロモウイルス科、ククモウイルス属のキュウリモザイクウイルス(CMV)は、その被害の大きさから最もよく知られた植物ウイルスのひとつであり、CMVは植物ウイルスの中で最も広い宿主範囲を持っているとされる。85科 365属 775種の植物に感染するとも言われ、現在宿主植物は1000種を越すと推定されている。実験的には、容易に汁液接種により植物に感染させることができるが、自然界ではアブラムシによって伝播され、現在約80種のアブラムシがCMVを伝播することが知られている。この防御には、直接ウイルスに効く農薬がないことから、伝播するアブラムシを農薬などで駆除しているが、食の安全などの問題から使用量が限定されている。このような状況において、抗体によるウイルス防御や、感染植物の早期発見により最終的には生産性の向上と環境負荷を低減した農業をめざすため、この本研究を行った。

その内容は、以下のように要約される。

まず、2系統に大別されるCMV、サブグループI(ペポ)およびII(M2)のウイルスを感染させた植物からウイルス粒子を精製して、ウイルス外被タンパク質を抗原として、モノクローナル抗体を作製し、微量、迅速、低価格での酵素抗体法について検討した。その結果、14種のモノクローナル抗体を得ることができ、そのいずれもがIgGに分類された。サブグループIを抗原としたモノクローナル抗体からは、サブグループIのウイルスのみを特異的に検出できる抗体10個を得た。一方サブグループII(M2)を免疫して得られたモノクローナル抗体からは、サブグループII(M2)のウイルスと特異的に反応する3つのモノクローナル抗体と、2つのサブグループウイルスを同時に認識できるモノクローナル抗体一株を得たが、その親和性は、それぞれのサブグループウイルスを認識できる抗体の1/100の程度であった。そこで、入手可能な、サブグループIおよびIIウイルス、14種を用いてその特異性を検討したが、明確にこれらの抗体により区別ができた。得られた抗体を用いてドットイムノブロット、あるいはImmunocapture RT-PCRにてその感度や迅速性を確かめたところ、10ピコグラムの

抗原あるいは、植物感染してわずか 12 時間後の植物体中の感染を確認できた。これらのことから、迅速かつ早期診断により感染拡大を防げることが示唆された。

ついで、モノクローナル抗体の抗原に対する結合定数 (K_d) を Klotz プロットから求めた。最も親和性の高い抗体は、サブグループ I のウウイルスに対するもので、 $3 \times 10^{-9} M$ であり、同じ抗体の中でも最大 100 倍程度の差が見られた。一方サブグループ II に対しては、 $2.7 - 5.2 \times 10^{-7} M$ の値となった。この親和性の違いは、抗原としたウイルス外被タンパク質のネガティブチャージを持つ領域 (βH ・ βI ループ) に存在するアミノ酸の違いによるもので、親和性は、この領域のスレオニンがアラニンに変化することと一致していることを明らかにした。

次に、CMV に親和性の高い、モノクローナル抗体を用いて、CMV と試験管内で反応させた後にその感染力を検体植物に接種して調べたが、CMV が感染できないことを病徴観察ならびにウエスタンブロットにて確認し、抗体によりウイルス感染を完全に抑制できること示し、植物体に抗体を発現できれば、感染予防ができることを示唆した。

最後に、大腸菌にて抗体の Fab フラグメントを合成し、CMV に特異的に反応することを確認した。さらに、抗体産生遺伝子のアミノ酸ホモロジー検索を行い、H 鎖および L 鎖を比較した。H 鎖では、エプトープ結合部位である CDR3 に含まれるタイロシンの存在の確認をした。一方、L 鎖では、アミノ酸ホモロジー検索では、いずれの抗体でもほぼ同じであった。その値をデータベースで検索すると、触媒抗体として種々の酵素活性の報告が多数あることから、精製した抗体を用いて酵素活性を測定したところ、DNAase 様活性が検出された。これはまだ仮説の段階ではあるが、単に CMV ウイルス抗体としてだけでなく、他の動物由来のウイルス検出やウイルス治療にも応用できる可能性が示唆された。

以上のように本研究は、植物ウイルスの中でも、最も広い宿主範囲を持っている CMV を早期検出、感染予防できる可能性を明らかにしただけなく、抗体とウイルス外被タンパク質の相互作用を分子のレベルで解明し、さらに、抗体触媒の可能性についても示唆したものである。これらの成果を応用することで、増加する地球人口に対して農産物をはじめとする食糧増産を確保しながら減農薬あるいは環境負荷低減に貢献できるものである。

これらの成果は、農学、生命機能、環境科学の分野など幅広く、大きく貢献するものであり、本論文の審査ならびに最終試験の結果と合わせて博士(学術)の学位を授与することを適当と認める。