The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	卵白Lysozyme及びLysozyme methyl esterの免疫化学的研究
Author(s)	岸口, 繁
Citation	大阪大学, 1959, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/28208
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【21】

氏　名・(本籍)	岸　口　　繁 きし　ぐち　　しげる
学位の種類	医　学　博　士
学位記番号	第　5 3　号
学位授与の日付	昭和34年6月30日
学位授与の要件	医学研究科病理系 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	**卵白 Lysozyme 及び Lysozyme methyl ester の免疫化学的研究**
論文審査委員	(主　査) 教授 天野　恒久　教授 川俣　順一　教授 須田　正巳

論　文　内　容　の　要　旨

I　目　　的

酵素活性及蛋白質抗原と云う二つの生物学的活性を持つ研究材料として酵素蛋白は多くの興味が持たれて来た。中でも卵白 Lysozyme (Lys.) は一本のペプチッド鎖よりなる低分子の蛋白質であり，容易に結晶化され，且つ物理的，化学的に安定な性質を持つため，特に興味の深いものの一つである。卵白 Lys. の免疫化学については既に二，三の研究がなされているが,何れも半定量的であるか,或は抗原が不均一であるため，明確な決論が得られていない。一方 Lys. の amino 酸配列に関する化学的構造の研究は Fromageot 及 Jolles らによって近き将来完成されんとしている。著者はかくのごとき理由から Lys. と，その遊離カルボキシール基をメチルエステル化して得たリゾチームメチルエステル (L.M.E.)，及それぞれの抗体との間に定量的沈降反応を行い，一方これらの抗体による Lys. 活性の中和作用を定量的に追求し，両者の関係から，メチルエステル化による Lys. の抗原性の変化，及抗体による Lys. 活性阻害の機構を明らかにせんとした。

II　方　　法

直接結晶法により三回再結晶せる卵白 Lys. を Moore 及 Stein の方法により IRC-50 により分劃して均一な主成分を得，これについて更に Fraenkel-conrat らの方法に準じて 25°C48 時間の塩酸メタノール処理によって L.M.E. を調製した。得られた L.M.E. については酵素学的，化学的，及電気泳動学的性質をしらべ，またエステル化の程度はメトオキシール基定量法及酸アルカリ滴定によって測定した。Lys., L.M.E. に対する抗血清は流動パラフイン及アラセールを adjuvant として抗原を家兎の腹部皮下に注射し，抗血清に含まれる血清 Lys. は Bentnite処理により除いた。定量的沈降反応は Heidelberger らの術式に準じ，Lys. の酵素活性は Smolelis に従い M. lysodeikticus 菌液の濁度の減少により定量した。in vivo の試験はモルモットによる受身アナフイラキシーを用いて行った。

Ⅲ 結　　果

a) L. M. E. のカルボキシール基メチルエステル化の程度は上述の二種類の定量法で共に一致した値を示し，そのエステル化の程度は Lys. に存在する全側鎖カルボキシール基に対し，76～78% であった。かかる L.M.E. は Lys. 活性を完全に失っており，エタノール分解せる cotton cellurose を支持体とする電気泳動法で（M/20，醋酸緩衝液，pH4.8）Lys. より早い移動度を示し，明かに等電点の上昇していることが知られる。しかし，Lys.,L.M.E. についての total N, amide N, amino N, tyrosine, tryptophan などの分析値には差がみとめられなかった。b)Lys- 抗 Lys 血清の定量的沈降反応は定形的な沈降曲線を示し，重層法による上清試験では抗原，抗体共に存在しない明らかな当量域が認められた。

しかし上清試験を上清中に残存する中和抗体を，上清中の Lys. 活性によって行った場合，重層法では明らかに抗原過剰域とみとめられる領域に，中和に関する当量点が証明された。L.M.E.- 抗 Lys. 血清の沈降反応は同じく重層法で当量域がみとめられるけれ共，抗原過剰域における抗原－抗体結合物の溶解性は低下している。c)Lys.- 抗 L.M.E. 血清及 L.M.E.- 抗 L.M.E. 血清の定量的沈降反応も上清試験で当量域が証明され，最大沈降抗体N量は，両系共同一の値を示した。d) Lys. の酵素活性は，抗 Lys. 血清，抗 L.M.E. 血清の何れによっても完全に中和される。一定量の Lys. を完全中和するために抗 L.M.E. 血清は抗 Lys. 血清より，50%余分の抗体N量を必要とした。e) 抗－Lys. 血清を Lys.，で吸収した場合，抗原過剰域の上清には最早 Lys. に対する中和抗体は証明されなかった。しかるに，抗 Lys. 血清を L.M.E. で吸収すると，抗原過剰域の上清中にはなほ残存する中和抗体が証明され，しかもこの中和抗体は抗原大過剰に至るも一定値を保ち，その量は原血清に含まれる全中和抗体の約20%に相当した。f) モルモットによるアナフイラキシーショックを行うと，Lys, L.M.E. 共に抗 -Lys. 血清に対して，等しいN量で定形的なショックをおこした。

Ⅳ 総　　括

Edward は既に L.M.E. は Lys. 活性を失っているが，基質（細菌）との結合力は逆に強くなっていることを報告したが，この報告と，われわれの得い上述の諸成績とから，a) Lys. 分子には，少くとも二種類の抗原性決定群が存在し，随って，抗 Lys. 血清の中には，少くともこれに対応して二種類の抗体が存在する。b)Lys. をメチルエステル化することによりこのうち一種類の決定群が不活性化される。しかも新たな L.M.E. 特有の決定群は出現しなかった。c) L.M.E.においてエステル化によっても不活性化されない決定群は Lys. の基質との結合基に関係しているものと考えられ，一方エステル化により不活性化される決定群は Lys. の酵素活性中心かまたはその近傍の構造と密接な関係を持ち，しかもまた Lys. の活性中心には側鎖カルボキシール基が重要な役割を果しているものと考えられる。d) Lys. の基質結合基に関係する決定群に対する抗体は，Lys. の結合基に直接に，または比較的その近傍に結合するものと考えられる。

論文の審査結果の要旨

免疫化学の研究分野において中心的な問題の一つである，抗原物質の抗原性と抗原分子の化学的構造と

の関連性については，人工複合抗原について行われた研究が主であり，天然蛋白抗原についてはほとんで解明されていない。

卵白 Lysozyme は結晶化が容易で，1本のペプチッド鎖よりなる低分子の蛋白質であり，物理化学的に安定な性質を持ち，また酵素蛋白として Lysozyme の活性を持つため，この様な研究目的には好適の材料と考えられる。そこで，均一な卵白 Lysozyme (Lys.) と，その側鎖カルボキシール基をメチルエステル化して得た Lysozyme methyl ester (L.M.E.) 及それぞれの抗体との間に定量的沈降反応を行い，一方これらの抗体による Lys. 活性の中和を定量的に追求して，両者の関連性から，メチルエステル化による Lys. の抗原性の変化，及抗体による Lys. 活性中和機構を明らかにせんとした。その結果

1）Lys. 分子には少くとも2種類の抗原性決定群が存在し，したがって抗 Lys. 血清中には之に対応して少くとも2種類の中和抗体が存在する。

2）Lys. をメチルエステル化することによりこのうち1種類の抗原性決定群が不活性化される。しかも之により L.M.E. に特有の新たな決定群は生じなかった。

3）メチルエステル化によって，不活性化される決定群は Lys. の酵素活性中心と関係があり，しかもこれらには側鎖カルボキシール基が密接に関与にいるものと考えられる。

4）メチルエステル化によって不活性化されない決定群は Lys.. の基質結合基と，密接に関係し，且つ，この決定群に対する抗体は基質結基に直接に，或はその近傍に結合するものと考えられる。

要するに，以上の研究は低分子の天然蛋白である卵白 Lys. に於ても猶抗原性決定群の複合性が存在し，しかもそれらが構造学的に酵素活性と密接な関係を持つことを明らかにしたもので免疫化学の研究に寄与した点大なるものがあると考える。