

Title	ニワトリ卵白リゾチームと対応抗体結合物から競合的阻止物質による抗体の解離
Author(s)	宮川, 宣之
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/29682
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名・(本籍)	宮 川 宣 之 みやがわのぶゆき
学位の種類	医 学 博 士
学位記番号	第 1 6 5 4 号
学位授与の日付	昭 和 4 4 年 3 月 2 8 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	ニワトリ卵白リゾチームと対応抗体結合物から競合的阻止物質による抗体の解離
論文審査委員	(主査) 教 授 天 野 恒 久 (副査) 教 授 川 俣 順 一 教 授 米 田 正 彦

論 文 内 容 の 要 旨

〔目 的〕

酵素活性の抗体による中和機構としては、1) 抗体の特異性が、酵素活性中心構造に向けられている。2) 抗体が酵素分子の活性中心以外の部位で、しかもその活性構造保持に重要な部位に結合することにより、その活性構造を破壊するか、或は酵素反応の効率を下げる。3) 抗体が酵素分子に結合することにより、基質分子の活性への接近を妨害する。等が考えられるが、リゾチームの場合、その分子量が14,300に対し、抗体の分子量は約10倍の15万で、しかもリゾチーム1分子に対し3個以上の抗体分子が結合しうることが知られているので、当然 2) 及び 3) の可能性が強調されてきた。著者は、もしリゾチームに対し作られた抗体のうち、その特異性が活性中心或はその近傍に向けられた抗体があるとすれば、酵素活性を極めて高い効率で阻止し得るものと考え、抗原のもつ酵素活性の競合的阻害剤で抗原抗体結合物から特定の抗体分画を抽出することが出来たので報告する。

〔方法及び結果〕

ニワトリ卵白リゾチーム (HL) 及びアヒル卵白リゾチーム (DL) に今西・藤尾等の方法に従い SE-Sephadex を用いて精製し、抗 HL 血清は HL を Freund の Complete adjuvant と混ぜて免疫した兎の血清をプールして用いた。あらかじめ定量沈降反応を行なった血清 90 ml に等量域相当量の ^{125}I でラベルした HL を加え特異沈降物を作り、十分に食塩リン酸緩衝液 pH 6.0 (P. B. S.) で洗った後、更に 2~3 回 37°C にて P. B. S. で洗い、次いで Rupley の方法で、Chitin の酸加水分解物から精製した Chitotriose の $1.7 \times 10^{-2}\text{M}$ 溶液を加え 37°C で 1 時間ずつ 3 回抽出した。限外濾過により蛋白部分を濃縮すると共に Chitotriose の大部分を除去し、最後に 0.1N 酢酸で飽和した Sephadex G-150 のカラムを通すことにより、同時に抽出されてきた少量の HL を解離し除去した。蛋白の大部分は 7 S-フラクションとして得られ、その収量は通常全沈降抗体の 7~8% であった。Chitotriose

で抽出され得なかつた残余の沈降物は更に 0.1N 酢酸で解離し、Sephadex G-150 で HL を除去して抗体部分を精製した。リゾチームの基質としては分子量の極めて大きい *M. Lysodeikticus* と Chitin の酸加水分解で得られる Chitopentaose を用いた。但し Chitopentaose に対する活性はその還元末端の増加を Perk-Johnson の方法で測定するのであるが、基質濃度を酵素量に対して十分過剰にするため、予め Chitopentaose を sodium borohydride で処理しその還元末端を糖アルコールに変えることにより定量の精度を高めた。

上記 2 つの抗体分画のリゾチームに対する中和能を *M. Lysodeikticus* と低分子基質である還元 Chitopentaose で調べた所、*M. Lysodeikticus* を基質とした時は両者共殆んど同じ効率で酵素活性を阻止し又完全阻止を示したが、低分子基質を用いた時には Chitotriose 抽出抗体は残りの抗体分画に比べて極めて高い効率で酵素活性を阻止し、しかも完全阻止に達したが残りの抗体分画では、その効率は極めて低く、実験範囲内では完全阻止に到達しなかつた。Chitotriose 抽出抗体の特異性を調べるため、リゾチーム分子内決定基を構成する 2 つのペプチド即ちペプチド 7a とペプチド 17 (それぞれ独立した特異性を持つ) と透析平衡実験を行なった所、ペプチド 17 と反応する抗体が含まれている事がわかつたので、リゾチームに対する家兎抗体をまずそれぞれのペプチドをブロムアセチルセルロースに結合させた immunoabsorbent で吸収した後、上記同様沈降物を作り Chitotriose で抽出した抗体分画を調製した。本抗体の中和活性を上記同様 *M. Lysodeikticus* と低分子基質 (還元 Chitohexaose) を用いて調べた所、やはり高い中和能を示した。又沈降反応等の結果から交叉反応を示すことが知られているアヒルの卵白リゾチーム (DL) に対しても中和能を示したが、homologous 系である HL に対してよりはやや低い効率で中和した。但し、低分子基質に対しては HL に対する場合同様完全阻止に容易に到達した。この抗体分画は HL となお沈降反応を示すことから Unispecific (ただ一種類の決定基に対応) とは考え難いが、DL とは沈降反応を示さず、上記の方法による抗体の分画が、その特異性においてかなり特定の抗体を抽出していることを裏書きしている。

〔結論及び考察〕

リゾチームに対する抗体の中和機構として主として立体障害が強調されてきたが、著者は抗原抗体結合物を、その競合的阻害物質で抽出することにより全沈降抗体の 7~8% に相当する低分子基質に対して極めて高い中和能を有する抗体分画を分離することに成功した。このものは HL となお沈降反応を示すが DL とは沈降せず、その特異性においてもかなり限局された抗体分画であると考えられる。又、ペプチド 7a (glu⁵⁷~Ala¹⁰⁷) 及びペプチド 17 $\begin{matrix} \text{Lys}^1 \sim \text{Asn}^{27} \\ | \\ \text{Ala}^{122} \sim \text{Leu}^{129} \end{matrix}$ とは反応せず、従ってこれらの決定基に対応する抗体は除外される。

論文の審査結果の要旨

著者は、リゾチームの低分子基質として Chitopentaose を調整し、これを Sodium borohydride 処理で、還元末端を糖アルコールに変え、定量精度を高めた。

一方リゾチーム抗原抗体結合物を競合的阻害剤で解離することにより、きわめて高い中和能を持つ抗体分画を得、又その特異性が限局されたものであることを示した。

以上は、抗原、抗体反応の分子レベルでの解明に一つの寄与をなしたものと思う。