

Title	ウサギIgGのトリプシン限定分解
Author(s)	渡邊, 信一郎
Citation	大阪大学, 1968, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/29825
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、〈a href="https://www.library.osaka- u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名·(本籍) 渡 邊 信 — 郎

学位の種類 医 学 博 士

学位記番号 第 1565 号

学位授与の日付 昭和 43年 12月 21日

学位授与の要件 学位規則第5条第2項該当

学位論文題目 ウサギ IgG のトリプシン限定分解

論文審査委員 (主査)

教 授 北川 正保

(副査)

教 授 山村 雄一 教 授 坂本 幸哉

論文内容の要旨

〔目 的〕

IgG のトリプシンによる限定分解はこれまで Hanson, Schrohenloher らによってヒト IgG について行なって、パパイン分解によって得られるものに似たフラグメントを生ずると報告されている。

ウサギ IgG については旭らによってシステイン存在下トリプシンを作用させ,C.M. セルローズクマトグラフィーを行なうとパパイン分解の際に同様にして得られる F-I と F-I に相当する F-I' F-II' の $3.4\,S$ 1 価抗体フラグメントが得られると報告されている以外に研究されていない。そこで著者はシステインを加えないでトリプシン分解を行ない得られる $5\,S$, 2 価抗体フラグメント $F(ab'')_2$ 及びそのシステイン還元によって得られる $3.5\,S$, 1 価抗体フラグメント Fab'' を分離精製しその諸性質について検討した。特に正常ウサギ血清中に存在する Homoreactant (H.R.) を利用してパパイン Fab, ペプシン Fab', トリプシン分解 Fab'' と $F(ab'')_2$ フラグメントについて抗原構造に検討を加えた。

〔方 法〕

- 1) ウサギ IgG; 細菌性 α -アミラーゼ ($B\alpha A$) で免疫したウサギ抗血清或いは正常ウサギ血清を硫安 1/3 飽和沈澱次いで Sober らの方法による DEAE セルローズカラムクロマトグラフィーで精製を行なった。
- 2) IgG の酵素分解;トリプシン分解は旭らの方法に準じ,1%タンパク濃度のものを0.1Mトリス塩酸緩衝液中にてトリプシンをタンパク量の1/30 重量加えて48 時間 37°C 作用させた。パパイン分解はPorter の方法,ペプシン分解はNisonoff らの方法に従った。
- 3) 免疫吸着剤 ; 尾上らの方法に準じて RSA の不溶性重合体 (ポリ RSA) に bisdiazobenzidine (BDB) を介して抗原タンパク (酵素分解フラグメント) を結合させて作った。

〔成 績〕

- 1)トリプシン 5S フラグメントの精製と性質; ウサギ IgG をトリプシン分解後未分解の IgG を除くため飽和硫安40から60%塩析沈澱分画を得て, 更に Sephadex G-100 カラムで2回ゲル沪過を行なって精製した。この分画の沈降恒数は 4.9 S を示し,抗原 $B\alpha$ A とゲル内沈降反応で1本の沈降線を示し,アミラーゼに対する中和活性を有している。また PCA 反応は示さず Fc 部分を欠如していると考えられる。またパペイン分解物に対する Porter の方法に準じて PCM セルローズカラムクロマトグラフイーを行なうとPCM PCM PCM
- 2)トリプシン分解 3.5S フラグメントの精製と性質;a)トリプシン 5S フラグメントの還元による 3.5S フラグメント:トリプシン 5S フラグメント $F(ab'')_2$ に 0.02 M システィンを加えて還元することによって 3.5S フラグメント Fab'' が得られた。この 3.5S (Fab'') は抗原 $B\alpha$ A とは沈降反応を起さないが $B\alpha$ A と 2 価抗体との沈降反応を阻害することから 1 価抗体でありアミラーゼ中和活性を有しており Fc 部分を欠如していて抗 Fc とは沈降反応を示さず PCA 活性も有していなかった。b)システィン存在下トリプシン分解による 3.5S フラグメント Fab'' に分解された。
 - 3) Fab", F(ab")。に対する Homoreactant の証明と精製
- a) 証明:BDB を介して各 Fab, Fab', Fab', F(ab'')。フラグメントをウサギ赤血球に結合させて作った各感作赤血球と正常ウサギ IgG との凝集反応を行なった。 その結果 用いたウサギ IgG は Fab 及び Fab'', F(ab'')。感作赤血球とは凝集反応を起したが,Fab' 感作赤血球とは殆んど凝集を起さなかった。このことから用いた正常ウサギ IgG 中には Fab 及び Fab'', F(ab'')。に対する H. R. が存在することが証明された。b) 精製:免疫吸着剤を用いて正常 IgG 中に存する H. R. を精製した。その結果免疫疫吸着剤に結合した H. R. を 1 M プロピオン酸で溶出透析後 I^{131} でラベルし対照として正常 IgG を I^{125} でラベルして paired label technique により免疫吸着剤と H. R. との特異的結合能を調べた。その結果Fab に対する H. R. は 28%,Fab'' に対する H. R. は 15%特異的に結合する程度精製された。同じ操作を行なっても Fab' に対する H. R. は 15%特異的に結合する程度精製された。同じ操作を行なっても Fab' に対する H. R. は 15% 中ののlogous なフラグメントによって著明な阻害をうけ,Fab, Fab'', と 15%0 には大々特異的に結合する H. R. が存在する事が分った。

〔総 括〕

1) ウサギ IgG 抗体を還元剤なしでトリプシンを作用させると 2価 5S フラグメントが得られ Fab の抗原性を有し Fc の抗原性と皮膚感作能を欠いていた。 2) トリプシン 5S フラグメントを システイン処理するか,IgG をシステイ存在下トリプシン分解することにより 3.5S 1価フラグメントが得られた。 3) 正常ウサギ IgG 中にはトリプシン 5S と 3.5S フラグメントに特異的に反応する Homoreactant が証明され免疫吸着剤で精製された。

論文の審査結果の要旨

(本文) ウサギ 7S IgG に還元剤なしでトリプシンを作用させると 5S, 2価フラグメントになり、還元すると 3.5S, 1価フラグメントとなる。共にパパイン Fab, ペプシン Fab' と共通の抗原性をもつ抗体フラグメントであるが、正常ウサギ血清中のトリプシン分解フラグメントに対する Homoreactant により Fab 又 Fab' と区別出来た。