The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

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、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

【22】

氏名・(本籍)	渡　邊　信一郎（わたなべ　しんいちろう）
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イ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-Ⅱ 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 (BαA) 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イ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 4.9S を示し，抗原 BαA 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。またパパイン分解物に対する Porter の方法に準じて CM セルローズカラムクロマトグラフイーを行なうと2つの subfraction に分離された。ヤギ抗ウサギ血清グロブリンまたは抗 Fab 血清を用いたゲル内沈降反応では，ペプシン分解 5S フラグメント $F(ab'')_2$ と融合する1本の沈降線を形成し抗 Fc 血清とは沈降線を示さなかった。

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 0.02M システイ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 BαA とは沈降反応を起さないが BαA 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) システイン存在下トリプシン分解による 3.5S フラグメント：システイン存在下トリプシン分解を行なうと同じく1価抗体活性を有する 3.5S フラグメント Fab″ に分解された。

3）Fab″, $F(ab'')_2$ に対する Homoreactant の証明と精製

a) 証明：BDB を介して各 Fab, Fab′, Fab″, $F(ab'')_2$ 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″, $F(ab'')_2$ 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″, $F(ab'')_2$ 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 1M 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. は殆んど精製されなかった。c) H.R. の特異性：赤血球凝集反応，免疫吸着剤との結合能に対する阻害実験より homologous なフラグメントによって著明な阻害をうけ，Fab, Fab″, と $F(ab'')_2$ には夫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 Homo-reactant により Fab 又 Fab′ と区別出来た。