Osaka University Knowledge Archive

Title	ニワトリ卵白リゾチーム・N末・C末抗原性決定基について
Author(s)	夏, 潤文
Citation	大阪大学, 1977, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/31920
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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【26】

氏名・(本籍)	夏(は)　潤(ゆん)　文(むん)
学位の種類	医　学　博　士
学位記番号	第　4034　号
学位授与の日付	昭和52年7月27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	**ニワトリ卵白リゾチーム・N末・C末抗原性決定基について**
論文審査委員	(主査)教授 天野　恒久
	(副査)教授 山村　雄一　教授 北川　正保

論文内容の要旨

〔目　的〕

一般に蛋白抗原に対する抗体は，その native comformtion を認識すると云われている。ニワトリ卵白リゾチーム（HL）は4ケのS－S結合があり，その構造保持に重要な役割を果している。従って，この様な蛋白の抗原決定基にはS－S結合を含む，或はS－S結合でつながったペプチド鎖にまたがる決定期が存在し得る可能性がある。以前本教室でHLの Lys^{1}－Asn^{27} と Trp^{123}-Leu^{129} がS－S結合でつながれたペプチド（P17）に抗体結合活性のあることが見出されたので，本ペプチドの抗原活性が P_{17} 内のどこに局在するか，又S－S結合がその活性発現に必要かどうかについて検討した。

〔方法ならびに成績〕

1．ペプチドの調整及同定

P_{17} は以前報告した様に，HLのペプシン限定分解出から，CM-セルロース・クロマト及びBio-Gel P-10ゲル濾過により精製した。P_{17}m は同様なペプシン分解物をSE-セファデックスC—25（1×35cm）に吸着後，pH 5.5の酢酸緩衝液 0.14 Mから 0.16 M迄1ℓ ずつの濃度勾配で溶出，再クロマト後，Bio-Gel P-10，25%（v/v）酢酸中でゲル濾過して精製した。アミノ酸分析の結果，本ペ　チドはHLの Ala^{11}-Gly^{22} に相当し，分子量は 1,418であった。次に P_{17} のほぼ中央 Met^{12} のC端側をプロムシアンで切断後，その98mgをSE-　セファデックスC-25カラム（1×35cm）に吸着，0.2 M酢酸緩衝液pH 5.5及び 0.3 M同緩液pH 6.0，各1ℓ の濃度勾配により溶出すると，　最初にニンヒドリン発色に比し 280 nmでの吸収の弱い分画（P_{17}i）と 280 nmでの吸収の強い分画（P_{17}t）が得られ，それぞれアミノ酸分析を行った結果，P_{17}i は内部由来で Lys^{13}－Asn^{27}（分子量：1,760）

に相当し，$P_{17}t$ は末端由来で，Lys^{1}－$Homoserine^{12}$ と Trp^{123}-Leu^{129} が Cys^{6}-Cys^{127} で結ばれたものであることが解った。（分子量：2,147）。次に P_{17} を0.01 M Dithiothreitol で還元，モノヨード酢酸でアルキル化石セファデックスG-15（3×140 cm）とBio-Gel P-10（3×150cm）の2連カラム，溶媒25%酢酸で分画した。2つの大きな分画の中，最初に溶出される分画は 280 nm の吸収に比べニンヒドリン発色の高い分画で，次に 280 nmでの吸収 が強く，ニンヒドリン値の低い分画が溶出された。アミノ酸分析の結果，最初の分画は P_{17} のN端側のペプチド（P_{17} N）に相当し，分子量3,086，2番目のはC端側のペプチド（P_{17} C）に相当し，分子量959であった。

2．ペプチドの抗体結合活性

HL に対する抗体は雑系モリモット，一匹当り 500μg の高度に純化した HL を Complete Freund Adjuvant と混ぜ，足蹠皮下に注射5週後500 μg を追加免疫9日後，全採血した。20匹の血清をプールし，定量沈降反応の抗体量は 6.0mg／mℓであった。

次いで本血清中から P_{17} と異特異的に反応する抗体分画（anti P_{17}）をとる為40mgの P_{17} をブロムシアンで活性化した。セファロース4Bに結合，常法に従い，抗血清 120 mℓを流し，洗滌後，2 mℓ×10^{-3} MのHL 溶液で3回溶出，蛋白部分を冷凍乾燥後，0.1N酢酸にとかし，同溶媒で飽和したセファデックスG－150カラムを通すことにより，抗体をHLから分離した。anti P_{17} の収量はHLに対する全沈降抗体の11,1%で99%は分子量15万の7－Sグロブリンであった。

本抗体の結合活性は ^{14}C-無水酢酸でラベルした HL，或は P_{17} を用いて，透析平衡によった。対照としてモルモットの正常ガンマグロブリン（NGG）に対しても透析したが，何れの抗原も5%以下の結合しか示さなかった。^{14}C-HL と anti P_{17} の結合はr／c（縦軸）をγ値（横軸）に対してプロットする。Scatchard プロットを用いた（γ は抗体モル当り結合した抗原モル，c は平衡状態にあるフリー抗原のモル濃度）。HL と anti P_{17} の結合は$\gamma=1$ の近辺で強い屈曲を示す。2つの直線部分から成り，本抗体が HL に対し結合定数（KA）の異る2つの抗体分画（KA＝ 8.9×10^{6} と KA＝4.0×10^{5} から成るか，或は抗体の一つの site が HL でふさがれた為の立体障害により，2番目の site への結合が妨害されるのかを何れかであると考えられる。一方^{14}C－P_{17} と anti P_{17} の結合はほぼ2を示し，KA＝2×10^{4}（L／M）であった。次いで P_{17} の種々の部分を占めるペプチドの結合活性は一定の ^{14}C-P17と anti P17の組合せに対し，^{14}C-P17に対するモル比で 0.7倍から50倍の範囲で共存させ，透析平衡を行い，結合阻止により測定した。用いたペプチド中，P_{17} の末端側のペプチド）のみが結合阻止活性を示し，数点で測定した K_I 値の平均は 8.1×10^{3}（L/M）であった。P17i，P17N，P17C，P17mは何れも P_{17} の50倍（モル比）量でも阻止が見られず，その K_I 値は 2×10^{2} 以下と考えられる。

以上の実験から抗HL抗体の P_{17} と反応する分画は，その一部が末端部を占める P_{17t} と反応するのか，或は大部分がP17tと反応するのかをしらべる為，P17t-セファロース4Bカラムを調整，anti P_{17} を流した所その95%以上が吸着された。又同じカラムに anti P_{17} と同量の NGG を流すと，90%が吸着されずに回収されたので，非特異的吸着を差し引いても，84%以上の抗体が P_{17} の末端部構造に特異性を示したことになる。

〔総　　括〕

ニワトリ卵白リゾチームのN末抗原性決定基の fine specificity を調べた。モルモット抗HL抗体の約11%がP_{17}（Lys^{1}-Ask^{27}, Trp^{123}-Leu^{129}）と特異的に反応し，又その大部分はP_{17}の末端側を占めるペプチドP_{17t}（Lys^{1}-$Homoser^{12}$, Trp^{123}-Leu^{129}）と反応した，P_{17}に対する結合定数は2×10^{4}（L/M）で，結合阻止で測ったP_{17t}のK_{I}は8.1×10^{3}（L/M）であった。HLに対する結合のScatchard plot は$\gamma=1$近辺で強く屈曲した。このことはanti P_{17}がHLとの結合に於て2つの異なる結合力を持つ抗体から成るか（$K_{A}=8.9\times10^{5}$）或は抗体との結合に際し立体障碍が起るかの何れかであると考えられる。

又P_{17}を還元するとN端側（P_{17N}）とC端側（P_{17C}）に分れるが，その何れものがanti P_{17}抗体との結合活性を示さなかったので，P17中に存在する一対のS-S結合は直接抗原性決定基を構成するか，或は決定基がS－S結合を介してつながった2つのペプチド部分にまたがって，存在するかの何れかであると考えられる。

論文の審査結果の要旨

約10年前にニワトリ卵白リゾチーム（HL）からN端，C端をふくむ

P_{17} $\left(\begin{array}{l} Lys^{1}-Cys^{6}-Asn^{27} \\ Leu^{129}-Cys^{127} \end{array}\right)$ が抗HL家兎抗体の中と約47%の抗体と反応することを明らかにした。

著者はこのP_{17}を更に細分化を試み，モルモットの抗HL血清のP_{17}と反応する抗体を分離して，これとの反応性をしらべた。

しらべたペプタイドの中 $\begin{array}{c} Lys^{1}-Cys^{6}-Homoser^{12} \\ | \\ Leu^{129}-Cys^{127}-Trp^{123} \end{array}$ はその抗体と反応するが，P_{17} i（Lys^{13}-Asn^{27}）やP17m（Ala^{11}-Gly^{22}）は反応性はなかった。

又P17の還元CM化した2本のペプタイドも反応性はみとめられなかった。ことから著者はS-S結合周辺部の立体構造の重要性をのべている。

以上の成績はリゾチームを対象として進めている蛋白抗原の研究の一環をなすもので貴重な成績である。