



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	<a href="https://hdl.handle.net/11094/31920">https://hdl.handle.net/11094/31920</a>
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">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏名・(本籍)	夏	潤	文
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末端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 conformation 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<sup>1</sup> - Asn<sup>27</sup> と Trp<sup>123</sup> - Leu<sup>129</sup> が S - S 結合でつながれたペプチド (P<sub>17</sub>) 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<sub>17</sub> 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<sub>17</sub> 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filtration により精製した。P<sub>17</sub> 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 1 l 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filtration して精製した。アミノ酸分析の結果、本ペプチドは HL の Ala<sup>11</sup> - Gly<sup>22</sup> に相当し、分子量は 1,418 であった。次に P<sub>17</sub> のほぼ中央 Met<sup>12</sup> の C 端側をプロムシアンで切断後、その 98 mg 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 同緩衝液 pH 6.0、各 1 l 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<sub>17i</sub>) と 280 nm での吸収の強い分画 (P<sub>17t</sub>) が得られ、それぞれアミノ酸分析を行った結果、P<sub>17i</sub> は内部由来で Lys<sup>13</sup> - Asn<sup>27</sup> (分子量：1,760)

に相当し、 $P_{17t}$  は末端由来で、 $Lys^1$ -Homoserine<sup>12</sup> と  $Trp^{123}$ -Leu<sup>129</sup> が  $Cys^6$ -Cys<sup>127</sup> 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 ( $3 \times 140\text{ cm}$ ) と Bio-Gel P-10 ( $3 \times 150\text{ cm}$ ) 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 の吸収に比ベ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 ( $P_{17N}$ ) に相当し、分子量 3,086、2 番目のは C 端側のペプチド ( $P_{17C}$ ) 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、一匹当たり 500  $\mu\text{g}$  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  $\mu\text{g}$  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 6.0 mg / 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 40 mg の  $P_{17}$  をブロムシアンで活性化した。セファロース 4 B に結合、常法に従い、抗血清 120 ml を流し、洗滌後、 $2\text{ ml} \times 10^{-3}\text{ M}$  の HL 溶液で 3 回溶出、蛋白部分を冷凍乾燥後、0.1 N 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  $^{14}\text{C}$  - 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。 $^{14}\text{C}$ -HL と anti  $P_{17}$  の結合は  $r/c$  (縦軸) を  $\gamma$  値 (横軸) に対してプロットする。Scatchard プロットを用いた ( $\gamma$  は抗体モル当た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) の異なる 2 つの抗体分画 ( $KA = 8.9 \times 10^6$  と  $KA = 4.0 \times 10^5$  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  $^{14}\text{C}$ - $P_{17}$  と anti  $P_{17}$  の結合はほぼ 2 を示し、 $KA = 2 \times 10^4$  (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  $^{14}\text{C}$ - $P_{17}$  と anti  $P_{17}$  の組合せに対し、 $^{14}\text{C}$ - $P_{17}$  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  $8.1 \times 10^3$  (L / M) であった。 $P_{17i}$ ,  $P_{17N}$ ,  $P_{17C}$ ,  $P_{17m}$  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  $2 \times 10^2$  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  $P_{17t}$  と反応するのかをしらべる為、 $P_{17t}$  - セファロース 4 B 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末端抗原性決定基の fine specificity を調べた。モルモット抗HL抗体の約11%がP<sub>17</sub> ( Lys<sup>1</sup>-Asn<sup>27</sup>, Trp<sup>123</sup>-Leu<sup>129</sup> ) と特異的に反応し、又その大部分は P<sub>17</sub> の末端側を占めるペプチド P<sub>17t</sub> ( Lys<sup>1</sup>-Homoser<sup>12</sup>, Trp<sup>123</sup>-Leu<sup>129</sup> ) と反応した、 P<sub>17</sub> に対する結合定数は  $2 \times 10^4$  (L / M) で、結合阻止で測った P<sub>17t</sub> の K<sub>i</sub> は  $8.1 \times 10^3$  (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<sub>17</sub> が HLとの結合に於て 2つの異なる結合力を有するか ( $K_A = 8.9 \times 10^5$ ) 或は抗体との結合に際し立体障礙が起るかの何れかであると考えられる。

又 P<sub>17</sub> を還元すると N 端側 (P<sub>17N</sub>) と C 端側 (P<sub>17C</sub>) に分れるが、その何れものが anti P<sub>17</sub> 抗体との結合活性を示さなかったので、 P<sub>17</sub> 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<sub>17</sub> [ Lys<sup>1</sup>-Cys<sup>6</sup>-Asn<sup>27</sup> ]  
Leu<sup>129</sup>-Cys<sup>127</sup> が抗HL家兔抗体の中と約47%の抗体と反応することを明らかにした。

著者はこの P<sub>17</sub> を更に細分化を試み、モルモットの抗HL血清の P<sub>17</sub> 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 Lys<sup>1</sup>-Cys<sup>6</sup>-Homoser<sup>12</sup> はその抗体と反応するが、 P<sub>17</sub> i  
Leu<sup>129</sup>-Cys<sup>127</sup>-Trp<sup>123</sup>

( Lys<sup>13</sup>-Asn<sup>27</sup> ) や P<sub>17m</sub> ( Ala<sup>11</sup>-Gly<sup>22</sup> ) は反応性はなかった。

又 P<sub>17</sub> 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述べている。

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。