



Title	ニワトリ卵白リゾチームN末C末決定基と反応するモノクロナール抗体について
Author(s)	小林, 哲郎
Citation	大阪大学, 1981, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/32852
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 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) 小林 哲郎
 学位の種類 医学博士
 学位記番号 第 5163 号
 学位授与の日付 昭和 56 年 2 月 24 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 末決定基と反応する
 モノクロナール抗体について
 論文審査委員 (主査) 教授 神前 五郎
 (副査) 教授 天野 恒久 教授 岸本 忠三

論文内容の要旨

〔目的〕

蛋白としては分子量も比較的小さく、構造上の情報もきわめて豊富なニワトリ卵白リゾチーム (HEL) を蛋白抗原の一つのモデルとしてその分子内に散在する数ヶの抗原決定基を明らかにする目的で、この蛋白の部分分解ペプチドを用いて、本蛋白に対して作られた抗体との反応性を追及することにより、少なくとも本蛋白には 5ヶの決定基が存在することが明らかにされている。

最近 Milstein 等の開発した細胞融合によるモノクロナール抗体の分離技術は、当然この様な系にもきわめて有効である筈で、例えはよりシャープな決定基構造の解析に、或はこれと反応する抗体構造の解明に役立つと思われる所以、上記の活性ペプチドと反応性をもつモノクロナールな抗体の分離を試みた。

〔方法ならびに成績〕

1. 細胞融合及びモノクロナール抗体の作製：

ミエローマ細胞としては Schulman 等の用いた免疫グロブリン非産生細胞 SP2/0-Ag 14 細胞を用い、これと HEL-Freund 完全アジュヴアント (CFA) で免疫後 8~10 週の A/J 脾細胞と 1:10 で混合し、ポリエチレングリコール (分子量 4,000) 42.5%, ジメチルスルフォキサイド 15% 溶液中で 37°C 2 分間処理。洗滌した後、96 穴のマイクロウェル中に一穴当たりミエローマ細胞で 1×10^5 , HAT 選別培地で培養した。融合後 2 週を経て、70% 以上のウェルで細胞増殖が認められ、その 95~100% で、200ng/ml 以上抗 HEL 抗体活性を検出できた。抗 HEL 抗体を産生し続けた細胞は寒天培地上でクローニングを行いモノクロナール化すると共に、Pristan 処理した [A/J × Balb/c] F₁ マウスの

腹腔に平均 5×10^6 注射して腹水化した。腹水中には平均 20mg/ml 前後の抗 H E L 抗体を検出できた。腹水中の抗体は硫安半飽和で部分精製後、HEL-セファロース CL-4B の Immuno adsorbent に吸着、 0.1M サイトレート緩衝液 pH 2.3 で溶出、 0.01M トリス-塩酸緩衝液に透析して精製抗体を得た。こうして得た 6 つのモノクロナール抗体は isoelectrofocusing で何れも限局したバンドを示した。その中の一つ Hyb C1 は後述する様に HEL 由来の活性ペプチドの内の N 末端 C 末端ペプチドと結合することが明らかとなったので、このものについて、電気泳動パターン、免疫学的諸性質、更にはその N 末端部分アミノ酸配列について精査した。

2. HybC1 抗体の isoelectrofocusing 及び Ig クラス

HybC1 精製抗体は isoelectrofocusing で $\text{pH} = 6.0$ 付近にきわめて限局したバンドを示した。又種々の Ig クラス別特異血清との反応性から IgG₁ Kappa 型蛋白と考えられる。

3. HybC1 抗体のリゾチームフラグメントとの反応：

H E L の抗原決定基の大部分の活性を担うと考えられる三種のペプチド、 P_{17} [1-27, (Cys 6-Cys 127), 123-129], P_{16} [29-54, (Cys 30-Cys 115), 108-123], $P_{\text{loop 1-1}}$ [57-107, (Cys 64-Cys 80, Cys 76-Cys 94)] をそれぞれ ^{125}I , ^{14}C 無水酢酸でラベルし、HybC1 精製抗体 10.6mg/ml に透析し (4°C 3 日間)、平衡透析実験からその特異性を確かめた。3 種のペプチドの内、 P_{17} のみが添加ペプチドの 25% 以上を結合し他のペプチドは何れも 5% 以下しか結合しなかった。更に P_{17} に対する特異性は P_{17} -Immuno adsorbent に HybC1 抗体を ^{125}I でラベルしたものを流すことによって確かめられた。即ち HybC1 抗体はその 96% が吸着されたが対照として用いた $^{125}\text{I-NMIg}$ (マウス正常グロブリン) 或は A/J の精製抗バクテリア α -アミラーゼ抗体 (^{125}I ラベル) は 5% 以下しか吸着されなかった。

4. HybC1 抗体の H E L との結合特性及び他の鳥類リゾチームとの交叉反応：

二重抗体法を用いた $^{125}\text{I-HEL}$ と精製 HybC1 抗体或は硫安部分精製 HybC1 蛋白との結合実験の結果、その結合曲線の Scatchard plot は抗原濃度の広い範囲にわたって直線を示し、HybC1 抗体が機能的にも均一であった。又その結合定数 $K_A = 3.3 \times 10^7$ (L/M), 37°C であった。

一方、 $^{125}\text{I-HEL}$ と精製 HybC1 抗体の結合に対する種々の鳥類リゾチームの競合阻止実験を行った結果、日本うづら (JEL), 七面鳥 (TEL) は H E L に比し僅かに弱い阻止を示したが、2 種のあひるリゾチーム (DL-1 及び DL-2) は 50% 阻止を起すのに H E L の約 30 倍量を必要とした。

5. HybC1 抗体・H鎖・L鎖の N 末端アミノ酸配列：

HybC1 抗体を完全還元アルキル化後、H鎖と L鎖に分け、それぞれ固相法シーキエンサーにかけて、でてきた PTH アミノ酸を高速液クロロで同定した。H鎖 L鎖何れでも各段階で一種のアミノ酸が主として検出され、その均一性を構造上からも裏付けると共に、N 末端から 25 番目迄のアミノ酸配列を明らかにした。

[総括]

免疫グロブリン非産生系ミエローマ SP 2/0-Ag 14 細胞とリゾチームで免疫した A/J マウス脾細胞のポリエチレンリコールによる細胞融合により抗リゾチーム抗体活性を持った蛋白を分泌する融合細胞を得た。その中の一つは等電点電気泳動で $\text{pH} 6.0$ 付近に等電点を持つ均一な抗体蛋白を產生

し、 IgG_1 でKappa型L鎖を持ち、平衡透析、Immunoabsorbentの実験から、リゾチームのN末C末決定基に特異性を持ち、ニワトリリゾチーム(HEL)との結合実験から、HELに対し均一な結合定数 3.3×10^7 (L/M) (37°C)を持つこと、又 ^{125}I HELと本ハイブリドーマ抗体の結合に対する阻止実験からHELの阻止定数 $K_I = 4.01 \times 10^7$ に対しJEL及びHELは $K_I = 3.14 \times 10^7$ 、DL-1、DL-2は何れも $K_I = 1.19 \times 10^6$ を示した。 K_I に差を生じる構造上の理由について議論した。固相法シーケンサーにより本ハイブリドーマ抗体のH鎖L鎖N末か 25番目迄のアミノ酸配列を明らかにした。以上蛋白抗原の限られた構造に特異性を持つモノクロナール抗体の分離は蛋白抗原と反応する抗体の構造的解析に役立つと思われる。

論文の審査結果の要旨

細胞融合法により、ニワトリ卵白リゾチームに対するモノクロナール抗体を分離、精製した。リゾチームN末・C末決定基にむけられた抗体であり、他の鳥類リゾチームとの交叉反応により、アヒル卵白リゾチームの4番目のグリシン残基に関係していた。又、そのLight chain, Heavy chainの部分構造を明らかにした。