



Title	ニワトリ卵白リゾチームの38-54残基に相当する disulfide結合を含まない抗原性決定基について
Author(s)	高垣, 裕
Citation	大阪大学, 1981, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/32991
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

氏名・(本籍)	高 墓 裕
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 5233 号
学位授与の日付	昭和 56 年 3 月 25 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の 38-54 残基に相当する disulfide 結合を含まない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 岸本 忠三 教授 濱岡 利之

論文内容の要旨

〔目的〕

3 つの disulfide 結合を含む領域に存在しているニワトリ卵白リゾチーム (リゾチーム) の抗原性決定基は、新家、藤尾、Atassi, Arnon, Habeeb, Maron, Matthyssens, Sela 等により明らかにされてきた。

一方、坂戸等はリゾチームのサーモライシン分解により得られたペプチド 29-54-(Cys 30-Cys 115)-109-123(P Ib) がウサギ抗リゾチーム抗体と反応すること、又、その反応がペプチド 34-54 で阻止されることを見出した。

本研究はリゾチーム触媒部位近傍の disulfide 結合を含まないこの領域にも抗原性決定基が存在していることを確認し、その詳細な抗原構造を、プロテアーゼ分解ペプチド及び合成ペプチドを用いて明らかにした。合成ペプチドを用いることにより、プロテアーゼ分解ペプチド中の極微量の不純物 (intact なリゾチーム、抗原活性を持った他のペプチド等) の影響を除外することができた。

〔方法ならびに成績〕

1) ペプチドの合成

リゾチームの 38-48, 38-54 残基に相当するペプチド及び “surface-simulation” 合成ペプチド (site 2 と site 3) を液相法にて合成した。

2) プロテアーゼ分解によるペプチドの調製

抗原活性を持った disulfide ペプチド 1-27-(Cys 6-Cys 127)-123-129(P 17), 62-68-(Cys 64-Cys 80)-74-96(Cys 76-Cys 94) (Ploop II), 29-37-(Cys 30-Cys 115)-109-123(Pka) は、リゾチームをそ

れぞれ、ペプシン、トリプシン、サーモライシンで分解し、イオン交換クロマトグラフィー等で分離精製した。nondisulfideペプチド38-54及び38-57はPIbを分離精製する時に同時に得られた。合成ペプチド及びプロテアーゼペプチドの純度を高速液体クロマトグラフィー、アミノ酸分析、N及びC端のアミノ酸の同定等を用いて調べた結果いずれもHomogenousであることがわかった。

3) 抗リゾチーム血清の調製

高度に純化したリゾチームを、ヒツジ、ヤギ、ウサギに complete Freund's Adjuvantと共に免疫して得た。抗原の結合力測定には抗血清を PBS, pH 7.2にて 5倍に希釀して使用した。

4) 抗 (38-48) 抗体の調製

合成ペプチド38-48をCH-Sepharose 4Bに結合させた immunoabsorbent を用い、抗血清から特異抗体を吸着させ、結合した抗体を 6 M, Guanidine HCl で流出させて得た。

5) Binding inhibition assay

ペプチド38-54を¹⁴C無水酢酸にて α アミノ基をアセチル化した物を抗原として用いた。希釀した抗血清と inhibitor (種々なペプチド) を混合し、0 °Cで、1時間 preincubate した。次に、抗原を加えてさらに1時間 incubate し、charcoal-dextran液を加えて free の抗原を除去した後、その上清の radio activity を測定した。抗原活性を持った3つの disulfide ペプチド、P₁₇, Ploop II, P_{ka} 及び site 2, site 3 はいずれも全く阻止活性を示さなかった。一方プロテアーゼ分解nondisulfideペプチド38-54, 38-57は98%以上の阻止能力を示し、合成ペプチド38-54も同レベルの値であった。

6) Binding capacity と avidity

希釀抗血清と種々な濃度の抗原とを混合し、0 °Cで1時間 incubate し、種々な抗原濃度における抗血清の抗原結合量を求めて、その抗血清の Binding capacity と Avidity を求めると、ヒツジ抗血清では、それぞれ、0.16- 0.93n mol antigen/ml antiserum, 3.3×10⁷- 1.1×10⁸ L/mol, ヤギでは0.29- 0.60, 4.0×10⁶- 6.5×10⁷, ウサギでは0.093- 0.15, 4.5×10⁶- 2.1×10⁸ であった。

抗 (38-54) 抗体量はリゾチーム抗体量の1%前後の値であった。

7) リゾチームと触媒部位近傍の disulfide 結合を含まない領域 (38-54残基) に対する抗体との反応性。

この領域に対する抗体と native リゾチームとの反応性が、(1)リゾチームの酵素活性の抗体による阻害(抗体/リゾチーム比が1.7:1で約89%阻害), (2)リゾチーム immunoabsorbent に抗体が結合すること。(3)抗血清にリゾチームを加えると抗原結合能が消失すること等の事実から確められた。

[結論]

以上の結果から、ニワトリ卵白リゾチームの抗原性決定基が disulfide を含まない領域すなわち、38-54残基に相当する部分にも存在していることが明らかになった。この領域に対する抗体は nondisulfide ペプチド 38-54 同様、native なリゾチームとも反応した。プロテアーゼ分解ペプチドと合成ペプチドとの抗原結合阻止能に差異は見られなかった。このことから、プロテアーゼ分解ペプチド中の他の抗原活性を持ったペプチドの混入を否定することができた。この領域に対する抗体はヒツジ、ヤギ、ウサギの抗リゾチーム血清中に 7-70 μ g /ml 量含まれ、これは全抗リゾチーム抗体の約 1% に相

当していた。この抗体の *avidity* は他の抗原活性領域のそれに比べて、相対的に高い値を示し、 $4.0 \times 10^6 - 2.1 \times 10^6 \text{ L/mol}$ であった。

論文の審査結果の要旨

先に教室の坂戸等はリゾチームのサーモライシン分解により得たペプチド29-54-(Cys 30-Cys 115)-109-123(P_{1b}) がウサギ抗リゾチーム抗体と反応し、その反応がペプチド34-54で阻止されることを見出したが、Atassi 等はそのような単なる連鎖部分には反応性はなく、混在するリゾチームによる反応であると反論した。

著者は酵素分解法の他に化学合成により該当する部分のペプチドを得、これが反応性に於いて酵素法のものと相同であることを証明した。

本研究は従来の我々の知見に大いなる確信を与えた点が評価される。