

Title	ジフテリア毒素フラグメントAを用いたラット肝臓EF2の精製とその抗体の作製
Author(s)	高松, 清治
Citation	大阪大学, 1983, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/33332
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">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

氏 名・(本籍)	高	松	清	治
学 位 の 種 類	医	学	博	士
学 位 記 番 号	第	5	9	9
学位授与の日付	昭	和	58	年
学位授与の要件	医	学	研	究
	科	病	理	系
	専	攻		
	学	位	規	則
	第	5	条	第
	1	項	該	当
学 位 論 文 題 目	ジフテリア毒素フラグメントAを用いたラット肝臓EF2の精製とその抗体の作製			
論 文 審 査 委 員	(主査)			
	教 授	岡	田	善
	(副査)			
	教 授	内	田	驍
	教 授	三	輪	谷
	俊	夫		

論 文 内 容 の 要 旨

(目 的)

ジフテリア毒素は、そのフラグメントA部分により、ペプチド延長因子2 (EF2) をADPリボシル化し失活させる。このADPリボシル化はEF2に特異的で、重要な役割を持つものと考えられ、かつ、真核細胞から古細菌に至るまでの広い範囲に及んでいる。

これまで、ジフテリア毒素とEF2の研究は多数行われてきたが、重要な問題点として、EF2の抗体が得られていないことが挙げられる。このことはEF2が非常に普遍的な存在であることに起因すると考えられるが、その抗体を得ることは、それを利用したEF2の定量やm-RNAの分離など、EF2研究の大きな展開を可能にする。一方、EF2の精製は多種の方法が試みられているが、ジフテリア毒素との反応性を利用した特異的で能率の良い精製法は開発されていない。

そこで、著者は、ジフテリア毒素フラグメントAによるAffinity chromatographyを用いたEF2精製法を開発することと、精製標品を用いて抗体を作製することを目的として、本研究を行なった。

〔方法および成績〕

- 1) ラット肝臓EF2の精製：EF2定量は、フラグメントAと $[^{14}\text{C}]$ NADによるADPリボシル化と $[^{14}\text{C}]$ Phe・tRNAを用いたPolyphenylalanine合成の2つの方法を用いた。ラット肝臓を還流後、ホモゲナイズし、遠沈後硫酸安分画を行なった。33—65%飽和硫酸安分画を透析し、DE-52 chromatographyを行ない、0.1MNaCl付近で溶出される画分を集めた。次に、ジフテリア毒素フラグメントA結合Sephadex 4BによるAffinity chromatographyを行ない、ほぼ単一の標品を得たが、更にSephadex G-150により、混在する微量のフラグメントAおよび非特異的吸着物を除き、精製

標品とした。この方法により、ADPリボシル化活性でホモゲネートに対して、23%の回収率および比活性の約770倍の上昇を認めた。又、Polyphenylalanine合成活性では、硫酸分画に対して30%の回収率を得た。これらの回収率は従来法に比較して、50—100%の増加を示した。精製標品の性質を比較するため、SDS電気泳動、等電点電気泳動を行ない、分子量で、96,000、等電点で6.6—6.8を得、従来値との一致を認めた。又、アミノ酸組成における近似およびN末端のValの一致も認めた。更に、N末端から5ケのアミノ酸配列およびC末端のLeuを新しく同定した。

2) ラットEF2の抗体作製とその性質の検討：精製ラットEF2を種々の方法で修飾したものを、0.2—0.3mgづつ2—3週おきに家兔に投与した。10回以上投与の後、7—10日毎に採血を数回くり返し、血清を得た。各々の血清は、40%硫酸沈でんより粗IgG画分を得た後、ラットEF2-Sepharose 4B affinity chromatographyにより精製した。粗IgG画分による特異性の検討は、ラットEF2およびヒトFL細胞、マウスL細胞の抽出物に $[^{32}\text{P}]$ NADを加え、フラグメントA存在、非存在下でADPリボシル化し、各々の画分による免疫沈降物を、SDS電気泳動—オートラジオグラフにより行なった。その結果、これらの抗体が特異的にADPR-EF2を沈降することを認めた。この際に、ADPリボース、ラットEF2およびADPR-EF2を共存させると、ラットEF2とADPR-EF2によってのみ、競合が認められた。更に、精製抗体を用いて、FL細胞、L細胞を $[^{35}\text{S}]$ Metでラベルしたものの抽出液について免疫沈降を行なった。それにより、これらの抗体は、EF2のADPリボシル化の有無にかかわらず、特異的に沈降させ、EF2分子自体が抗原として働いていることを示した。

〔総括〕

- 1) ジフテリア毒素フラグメントAによるAffinity chromatographyを行ない、ラットEF2を特異的かつ高能率で精製する方法を開発した。
- 2) 修飾したラットEF2を用いて、ラットEF2およびヒト細胞、マウス細胞由来のEF2に対する抗体を得て、EF2定量などに応用できる可能性を示した。

論文の審査結果の要旨

本論文は、ジフテリア毒素フラグメントAを直接的にEF2精製に利用した新方法を確立し、さらにこれまでまったく報告されていなかったEF2に対する抗体の作製に初めて成功したものである。これらの成果が今後のジフテリア毒素およびEF2の研究に果す役割は、非常に大なるものであり、学位に値すると考えられる。