The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	補体制御因子H因子の精製法とH因子の活性に対するtrypsin処理の影響
Author(s)	洪, 卿秀
Citation	大阪大学, 1983, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/33653
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

【45】

氏名・（本籍）	洪（こう）　卿（けい）　秀（ひで）
学位の種類	医　学　博　士
学位記番号	第　6151　号
学位授与の日付	昭和58年7月28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	**補体制御因子H因子の精製法とH因子の活性に対するtrypsin処理の影響**
論文審査委員	（主査） 教授　井上　公蔵 （副査） 教授　和田　博　教授　岸本　進

論文内容の要旨

（目　的）

H因子は，補体活性化過程の制御因子として，分子量が15万の糖蛋白で1本鎖の peptide から成ると報告されていた。しかし，本研究者は，従来報告された方法でH因子を精製していく過程で，非還元SDS－PAGEでは1本鎖になるが，還元SDS－PAGEでは3本鎖になることを見い出した。この事は，H因子が血清中の protease(s) の作用での分解によると考えられたので，protease inhibitor 存在下での精製法を考案，確立し，その標品を用いて trypsin による限定分解過程での構造の変化を追求すると共に，C3b に対する活性の変化を調べ興味ある結果を得た。

（方　法）

正常ヒト血漿400 mlを出発材料とし phenylmethyl - sulfonylfluoride（PMSF）の存在下で5％－12％ polyethyleneglycol 4000沈澱画分をとり，それを溶解後，lysine－Sepharoseで plasminogenを除去し，さらにDEAE－Sephacel, CM－ Sephadex C－50, Bio－gel HTP, Bio－gel A－1.5Mの順に chromatograph してH因子を精製した。

精製したH因子をTPCK－trypsin を用い，37℃，pH 7.5で分解し，4倍量の soybean－trypsin inhibitor で反応を停止し，還元，非還元 SDS－PAGE で解析した。又，液相中のC 3b をI因子の存在下で trypsin 処理H因子と共に作用させ，分解した C3b chain の cleavage を求めた。又 membrane に結合したC3b に対するIの cofactor としてのH因子の活性を調べるためには immune adherence（IA）阻害試験，EAC1－3b cells による結合したC3b の溶血活性阻害試験，Raji cells 及び Daudi cells に対するロゼット形成阻害試験を用いて行なった。さらに membrane に結合し

たC3bに対するtrypsin処理H因子の結合力は，精製したH因子をクロラミンT法で^{125}Iを標識し，^{125}Iで標識したH因子をtrypsin処理して，膜に結合したC3bに対するtrypsin処理^{125}I-H因子の結合状態を調べた。

（結　　果）

1. 本論文で考案した方法で精製したH因子は還元，非還元SDS－PAGEで分子量15万の1本鎖を示した。
2. H因子のtrypsin分解過程を調べると，非還元状態ではかなり長時間分子量は変化しないが，還元して解析すると，3分以内に120Kと33Kのfragmentsに分解され次いで120Kが80Kと46Kのfragmentsに分解された。従って，これらは尚分子内SS結合によって連結していると考えられる。
3. 液相中でのC3bを分解するH因子のcofactorとしての活性は，trypsin処理H因子においても維持され，むしろ，H因子自体の活性は，trypsin分解過程中でほぼ2倍にまで上昇した。しかし，膜に結合したC3bに対するH因子のcofactorとしての活性はC3bの溶血活性，IA活性及びロゼット形成活性共にtrypsin処理によりintactなH因子の消失に比例して減少していった。又，膜結合性C3bに結合したB因子のH因子による競合置換反応も同様に減退した。
4. trypsin処理^{125}I－H因子のEAC1－3b cellsに対する結合力は，H因子のtrypsin分解過程に比例して減少した。

（総　　括）

(1) H因子をprotease inhibitorの存在下で正常ヒト血漿から単一でintactな蛋白として精製した。

(2) 液相中でのC3bの分解に対するI因子のcofactorとしてのH因子の活性は，trypsin処理H因子においても維持され，むしろ，H因子自体の活性はtrypsin分解過程中でほぼ2倍に上昇した。しかし，membraneに結合したC3bの分解に対するcofactorとしてのH因子の活性は，trypsin処理と共に低下していった。これらの活性低下は膜結合性C3bに対するH因子の結合力の低下によるものであった。以上の結果から，H因子のC3bの結合能の相違は，H因子のtrypsin処理による状態変化に加えて，液相中でのC3bと膜結合性C3bのcomformationの違いが示唆された。

論文の審査結果の要旨

従来から行なわれて来た精製法で分離したH因子は，分子内断裂を起したものを含むことを明らかにし，protease inhibitors存在下に行う精製法を確立し，H因子を単一ペプチド鎖のみからなる蛋白として得た。これをトリプシンで限定分解すると，分子内に2～3ケ所断裂したペプチドがSS結合で連結したものが得られる。

その活性を元のH因子と比較すると，液相中の遊離C3bに対するI因子のcofactor活性は保持さ

れて居り，かえって増大したが，膜結合性Ｃ３ｂに対する活性はトリプシン処理に伴って速かに低下消失し，膜結合性Ｃ３ｂへの結合能も消失した。

本研究は，Ｈ因子の構造と機能の理解に大きな貢献をしたのみでなく，Ｃ３ｂの液相中遊離の状態と膜に結合した時の分子状態が異なることも示したもので，価値あるものと認める。