



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

氏名・（本籍）	こう 洪	けい 卿	ひで 秀
学位の種類	医	学	博 士
学位記番号	第	6 1 5 1	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、C 3b 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-1.5 M 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 C 3b chain の cleavage を求めた。又 membrane に結合した C 3b 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、EAC 1-3b cells による結合した C 3b 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 C 3 b 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 C 3 b 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 120 K と 33 K の fragments に分解され次いで 120 K が 80 K と 46 K の fragments に分解された。従って、これらは尚分子内 S S 結合によって連結していると考えられる。
3. 液相中での C 3 b 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 分解過程でほぼ 2 倍にまで上昇した。しかし、膜に結合した C 3 b に対する H 因子の cofactor としての活性は C 3 b 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 C 3 b 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 EAC 1-3b 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 C 3 b 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 分解過程でほぼ 2 倍に上昇した。しかし、membrane に結合した C 3 b 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 C 3 b 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 C 3 b 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 C 3 b と膜結合性 C 3 b の conformation 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 S S 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 C 3 b 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 C 3 b 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 C 3 b 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，C 3 b 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。