



Title	Inducibility of protein-reactive antibodies by peptide immunization : Comparison of three epitope peptides of hen egg-white lysozyme.
Author(s)	関, 二郎
Citation	大阪大学, 1992, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38423
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	関 二郎
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 10318 号
学位授与年月日	平成 4 年 5 月 12 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文名	Inducibility of protein-reactive antibodies by peptide immunization : Comparison of three epitope peptides of hen egg-white lysozyme. (ペプチド免疫による蛋白質反応性抗体の誘導 : ニワトリ卵白リゾチーム・3種のエピトープペプチドの比較)
論文審査委員	(主査) 教授 木下タロウ (副査) 教授 平野 俊夫 教授 上田 重晴

論文内容の要旨

【目的】

蛋白質の部分ペプチドの免疫により蛋白質に高反応性の抗体を産生させる試みは、ワクチンなどへの応用を目指し活発である。しかしこれまで主として試みられた、十数個のアミノ酸からなる蛋白質表面由来のペプチドの免疫によっては、元の蛋白質と液相において十分なアフィニティで結合する抗体を得ることは困難であることが指摘されている。今回我々はニワトリ卵白リゾチーム由来のエピトープ活性があることが知られている3種のジスルフィド含有ペプチドで家兔を免疫し、元の蛋白質と高反応性の抗体が得られるかどうかを、液相での結合実験から正確にアフィニティを測定することにより比較検討し、ペプチド特性との関連性を明らかにしようとした。

【方法】

3種のエピトープペプチド Peptide 17 (1-27, 123-129が Cys6-Cys127で連結 ; 分子量3,928), Ploop I-II (57-107, Cys64-Cys-80と Cys-76-Cys94でループを形成 ; 分子量5,438), Peptide 2S (22-33, 115-125が Cys30-Cys115で連結 ; 分子量2,563) はリゾチームのペプシン消化、あるいはリゾチームの Citraconyl 化後、トリプシン消化によって得、C18を用いた逆相クロマトグラフィーにより高度に精製した。それぞれのペプチドは N- γ -maleimidobutyryloxysuccinimide でマレイミド化後、N-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio) propionate 处理により SH 基を導入した牛ガムマグロブリン (B γ G) 1モル当たり12モル以上結合させたものを免疫原として、家兔を免疫した。それぞれの抗血清からリゾチーム・セファロース immunoabsorbent を用いて、リゾチーム反応性抗体の量を算出すると共に、 $[^3\text{H}]$ -acetyl 化したリゾチーム及び各ペプチドと溶液中で結合実験を行ない、Scatchardplot の結果から、リゾチーム及び各ペプチドに対するアフィニティ (K_o) を算出した。また Ploop I-II に対する抗体については、Ploop I-II の2つのループの内、57-84で形成される 1-CM-PLOOP I (57-84, Cys64-Cys-80, Cys-76をカルボキシメチル化) 及びこれを完全還元アルキル化した RP8-1 (57-84, Cys64, Cys80, Cys76のすべてをカルボキシメチル化) を用いてその特異性を調べた。

【成 績】

3種のペプチド中 Ploop I・II のみがリゾチーム反応性の抗体を最も大量に産生した。しかも産生された全ペプチド反応性抗体の内50-80%がリゾチームと交叉反応性を示した。Peptide 17 免疫で得られたリゾチーム反応性抗体の Peptide 17に対するアフィニティ (K_o) は $2.6 \times 10^4 - 1.4 \times 10^5 M^{-1}$ で、リゾチームに対するアフィニティも $1.3 \times 10^4 - 1.5 \times 10^5 M^{-1}$ と低かった。Peptide 2S 免疫の場合も、ペプチドに対し、最高 $2.8 \times 10^5 M^{-1}$ 、リゾチームに対し最高 $5.5 \times 10^4 M^{-1}$ と低かった。一方 Ploop I・II 免疫ではペプチドに対し $K_o = 1.6 \times 10^7 - 4.7 \times 10^8 M^{-1}$ と高く、リゾチームに対しても、 $K_o = 2.5 \times 10^6 - 2.3 \times 10^7 M^{-1}$ の高値を示すものが3匹の兎中2匹に見られた。また、抗 Ploop I・II 抗体の内リゾチームに対し高いアフィニティで結合する抗体によって、リゾチームの酵素活性の中和も見られた。さらにこれらの抗体の特異性を検討した結果、Ploop I・II の形成する2つのループ構造の内の1つである1-CM-Ploop I が結合活性の大部分を担うこと、これを完全還元アルキル化した RP8-1 に対するアフィニティは元の Ploop I・II のそれの1/10以内にとどまることが明らかとなった。

【総 括】

リゾチーム由来の3種のエピトープペプチドはいずれも分子量が2,500以上で、これらを担体蛋白質である B γ G 1 モル当たり12モル以上結合した免疫原により、確かにいずれの兎に対してもある程度のリゾチーム反応性抗体を産生させることができたが、その程度は著しく異なっていた。量的にも質的にも3種のペプチド中、ループ構造を持つ Ploop I・II による免疫が最も有効であった。本ペプチドは用いたペプチド中、最も分子量が大きかったが、他方 X 線結晶解析の結果から、3種のペプチドの内、このペプチド領域のみが元のリゾチーム分子内で高い可動性を示す領域を含むことが示されている。Ploop I・II で免疫して得られた抗体はリゾチームに対するより Ploop I・II 自身に対して1~2オーダー高いアフィニティを示すこと、ジスルフィド結合を還元アルキル化したペプチドとも高い結合活性を示すことから、本抗体の特異性は本質的にはペプチド構造にむけられたものであり、元のリゾチームとの反応は一種の交叉反応と考えられる。このような抗体がリゾチームとの高反応性を獲得した理由として、結合に際し、リゾチーム分子側の可動性が関与しているものと推定した。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

蛋白質の親水性領域由来のペプチド免疫によって immublotting 等により元の蛋白質を同定する抗体は容易に得られているが、ワクチン等への応用を考慮した十分なアフィニティを持つ抗体を得ることは容易ではない。著者はリゾチーム由来の3種のエピトープ・ペプチド（分子量2,500~5,500）を担体蛋白質・牛ガンマグロブリンに1モル当たり12モル以上結合した免疫原により得られる抗体の性質を検討した結果、いずれのペプチドも、ある程度リゾチーム反応性の抗体を産生したが、その程度は領域ペプチドにより著しく異なっていた。ループ構造を持つ Ploop I・II ペプチドが量的にも質的に最も有効であった。本領域に対する抗体は最高リゾチームに対し $2.3 \times 10^7 M^{-1}$ の結合定数を持ち、その酵素活性を中和した。本抗体のリゾチームに対する交叉反応性は本領域がリゾチーム分子内で高い可動性を示すこと、又ループ形成能力があること等の特殊性に起因すると推定した。本研究はペプチド免疫の今後に示唆をあたえるものとして学位に値すると判定した。