



| | |
|------------------|---|
| Title | ペプシン分解によるウサギγG抗体Fd' fragmentの抗体活性について |
| Author(s) | 大原, 達; OHARA, Tohru; 山下, テイ子(リッシンベンに貞) 他 |
| Description | |
| Citation | 結核の研究, 29, 25-29 |
| Issue Date | 1969 |
| Doc URL | https://hdl.handle.net/2115/26794 |
| Type | departmental bulletin paper |
| File Information | 29_P25-29.pdf |



ペプシン分解によるウサギ γ G 抗体 Fd' fragment の抗体活性について

大 原 達・山下 慎子
柿 沼 光 明・木 村 卓 郎

(北海道大学結核研究所細菌部)

免疫グロブリンの基本構造をなす2本のH鎖と2本のL鎖は、それぞれ更に可変部と不変部の2つの部分から成っている。グロブリン分子全体からみると可変部は大體その $\frac{1}{2}$ を占め、L鎖にあってはN末端より約 $\frac{1}{2}$ 、H鎖にあってはFd fragmentのN末端側からおよそ半分がこれにあたる。このような可変部と不変部の存在は、これを抗体の特異性との関連において考えると興味深いものがある。すなわち、異った特異性を持つ抗体の間にはその一次構造に相違を認め得る、というKoshlandら¹⁾の主張に従えば、可変部の少なくとも一部が特異性と関係を持つであろうことは想像に難くない。先にわれわれは、 γ G グロブリンについて抗体活性部位(換言すれば特異性決定部位)の所在を調べ、主としてH鎖がこれに関与していることを知った。この際、抗原はH鎖の広い部分に亘ってこれと結合するのではなく、恐らくは特定のアミノ酸配列によって規定される可変部のごく狭い部分(およびこれと隣接するL鎖の一部)が、1個の抗原結合部位を作っているものと思われる。この意味から、H鎖の担う活性部位の範囲をもう一步狭くしてみるならばその所在は不変部を形成するFc部分にはなくて、可変部を含むFd部分にあると考えて間違いはなからう。しかしながら、Fd fragmentを純粋に単離することは、現在までのところはなほだ難しい。われわれの分離したFd' 標品も完全に純粋なものではなかったが、その抗体活性は混在する微量のL鎖に由来するものではなく、主成分たるFd' 自身の持つものであることを認めたので、以下その成績について述べる。

実験材料並びに方法

1) 抗原抗体系: 免疫原および反応原としてそれぞれHSA (Nutritional Biochemical Corporation 製, Cleveland) および ¹²⁵I-HSA (第一化学株式会社製, 東京) を使用。抗血清は complete Freund adjuvant 添加また

はアラム沈降HSA でウサギを免疫して得た。

2) Anti-HSA 抗体の精製: DEAE-cellulose カラムクロマトグラフィーによって全血清より γ G 分画を分離した後²⁾、以前の報告³⁾と同様にして γ G 抗体の精製を行なった。

3) ウサギ γ G 抗体の pepsin による消化: 精製 HSA 抗体および正常ウサギ γ G は、Utsumi & Karush⁴⁾の方法を少しく変えて次の如く pepsin で分解した。pH 4.5 の 0.02 M sodium acetate buffer 中で抗体と pepsin の比が 100:1 から 100:2 の間になるように混合し、37°C で 16 時間反応させた後 IN NaOH を dropwise に加えて pH を 8.0 に上げ、0.005 M の borate buffer (pH 8.0) に対して透析する。これを DEAE-Sephadex A50 column にかき、最初は 0.005 M borate buffer、次いで NaCl 濃度を 0.1 M から 0.5 M まで漸次増しながら 0.02 M の sodium phosphate buffer (pH 7.2) で溶出する。得られた第 2 の peak の eluate を集めて濃縮し、更に Sephadex G 200 column を通して精製 (0.15 M phosphate buffered saline, pH 7.0 で溶出) すると、沈降恒数 5S の hydrolyzate が得られる。

4) 5S fragment の還元、アルキル化: 上記の如くして得られた 5S fragment は Fleischman ら⁵⁾の方法によって 0.05 M の 2-mercaptoethanol (以下 2 ME) で還元し iodoacetamide でアルキル化した。しかるのちその一部をとって前報と同様な次の 2 つの標品を得た。その 1 つ、Red A と名付けたものは、5S fragment を酸化することなく pH 7.0 の 0.15 M 磷酸緩衝液に対して透析したものであり、他の 1 つ、Red B と名付けたものは 5S fragment を 1 M 醋酸に対して透析した後更に 0.15 M phosphate buffered saline (以下 PBS) で透析を行なったものである。残り半分の 5S fragment は、これを 1 M の冷醋酸に対し 18 時間透析した後、同じ酸で平衡せしめた Sephadex G 200 カラム (1.8 × 145 cm) で濾過し

た。effluent は単一の peak を形成するが、この peak は再濾過を行なっても symmetrical にならず、後半の部分に僅かな shoulder を伴っていた。

5) 超遠心分析: Spinco model E の分析用超遠心機を用い、56,000 rpm の速度で遠心、 $S_{20,w}$ は S_{app} を zero concentration として外挿法により計算した。

6) その他: 澱粉ゲル電気泳動、免疫電気泳動、ABC の測定法等はすべて前報³⁾と同様である。

Fig. 1 Column chromatography (DEAE-Sephadex A 50) of pepsin-treated γ G

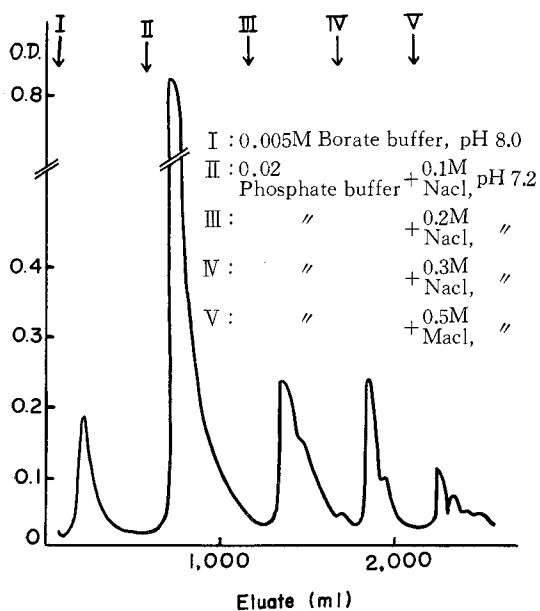
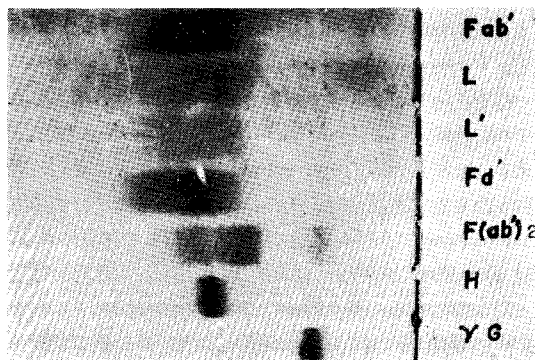


Fig. 2 Starch gel electrophoresis in formate buffer and 8 M urea at pH 3.4

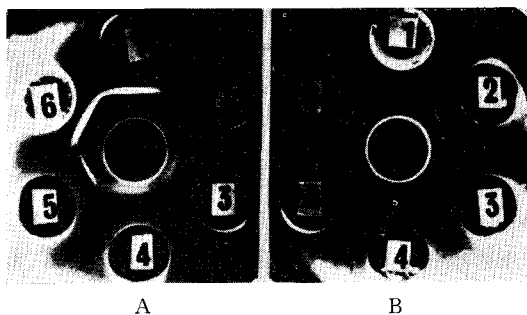


実験成績

1. ペプシン分解ウサギ γ G の性状

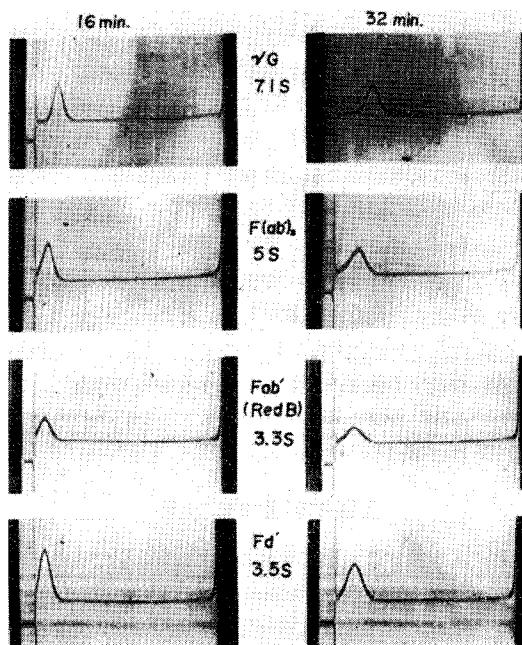
ペプシン分解物を DEAE-Sephadex A 50 カラムにかけて chromatography を行なうと、Fig.1 に示す如き elution pattern が得られる。このうち第2の peak に属する eluate は更にゲル濾過を繰り返して精製したが、得たる fraction の沈降恒数は、超遠心分析の結果によ

Fig. 3 Gel diffusion in agar



1=H chain, 2=L chain, 3=5S fragment, 4=Fab fragment, 5=Fd' fragment, 6= γ G.
Center well : A=anti- γ G, B=anti L+anti H.

Fig. 4 Ultracentrifugal analysis (56, 100 r. p. m)

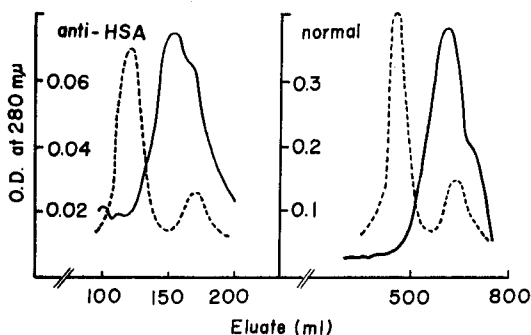


ると 5S であった (Fig. 4)。また 8 M urea を加えて formate buffer, pH 3.4 で澱粉ゲル電気泳動を行なってみると、この fraction は γ G よりも陰極側に移動する (Fig. 2)。更に寒天ゲル内沈降反応においては、Fig. 3 に示すような precipitin band が得られた。Fig. 3A は中央の well に抗ウサギ γ G ヒツジ血清を入れたもので、上述の 5S fragment は H 鎖と共通した抗原部分を持つことがわかる。しかし center well に抗 H 鎖血清と抗 L 鎖血清の混合物 (共にモルモット血清) を加えた Fig. 3B の場合には、中央抗血清と 5S fragment の間に沈降線は形成されていない。H 鎖に対する抗血清は Fc fragment 上の determinant に対するものであるから、このことは 5S fragment が Fc 部分を含んでいないことを示している。一方 5S fragment は L 鎖を含むものと考えられるが、一般に抗 L 血清は単離された L 鎖とのみ反応するものであるから、抗 H + 抗 L と 5S fragment の間に反応をみないのは、あえて異とするに足らない。以上の超遠心分析, starch block electrophoresis, agar gel diffusion test の成績を総合するに、本

Table. 1 Effect of 2-mercaptoethanol on antigen-binding capacity of 5S fragment of anti-HSA

| 2-mercaptoethanol (Mole) | Antigen Binding Capacity ($\mu\text{g } ^{131}\text{I-HSA}/\mu\text{g Antibody}$) |
|--------------------------|---|
| 0.0 | 0.42 |
| 0.02 | 0.23 |
| 0.05 | 0.20 |
| 0.1 | 0.19 |
| 0.2 | 0.13 |
| 0.3 | 0.12 |
| 0.5 | 0.06 |

Fig. 5 Elution patterns of reduced and alkylated 5S fragment on Sephadex G 200 column.



実験で調べた 5S fragment は $F(ab')_2$ であると考え得る。

2. 還元およびアルキル化した 5S fragment の性状予備実験として上記の 5S fragment にいろいろな濃度の 2ME を作用せしめ、還元後の antigen-binding capacity を調べてみた。その結果 Table 1 の如き成績が得られたので、力価の loss が比較的少ない有効濃度として以下の実験にはすべて 0.05 M の 2ME を用いた。

なお実験方法の項記載の如くして得た Red A の 0.15

Fig. 6 Distribution of Antigen-Binding Capacity

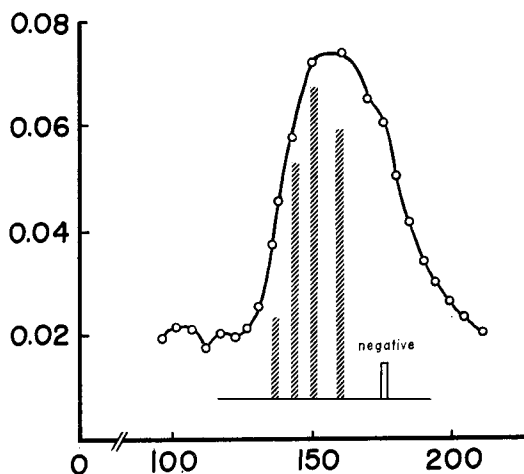
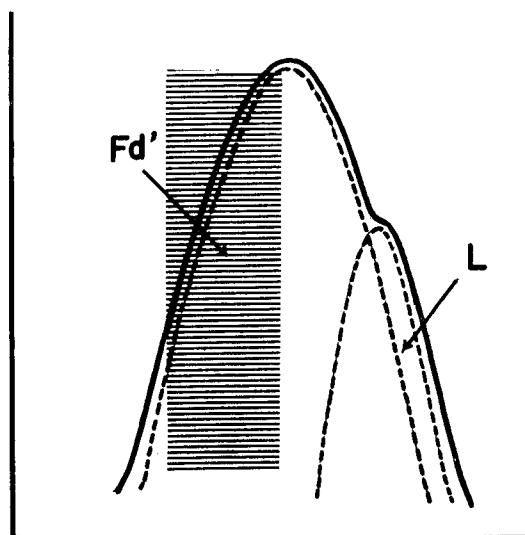


Fig. 7 A schema showing the localization of antigen-binding capacity in Fd' fragment



M NaCl solution 中における沈降恒数は 3.3 S で、この S value は引き続く 2 回の透析 (1 M 醋酸および 0.15 M PBS, pH 7.0 に対する) によっても変らなかつた。

還元、アルキル化した 5 S fragment を 1 M 醋酸に対して透析後 Sephadex G 200 カラムによってゲル濾過を行なうと、Fig. 5 に示すような elution pattern が得られる (溶出液は 1 M 醋酸)。図の左側は anti-HSA、右側は正常ウサギ血清を濾過したものであるが、共に asymmetrical な peak が得られ、後半部に僅かな shoulder を伴うのが見られた。Fig. 5 における点線は、同一条件で別に濾過して得た H 鎖と L 鎖の pattern をこれに重ねて図示したものであるが、後者の位置からみて実線の shoulder は L 鎖がその主な component であると考え得る。よってこの shoulder 部分のみを集めて濃縮後、細長い Sephadex G 200 で再クロマトを行ない、得たる main fraction を便宜上 L' と名付けてこれと L 鎖の異同を調べてみた。その結果によると、両者は 0.15 M NaCl 液中で共に沈降恒数 3.5 S を示し、starch block electrophoresis において易動度が同じであり (Fig. 2)、両者はモルモットから得た抗 L 血清に対して identity reaction を示した。従って、5 S fragment を還元アルキル化後 Sephadex G 200 で濾過して得た peak の前半部は Fd' であり、後半の shoulder は L 鎖と考えられる。なおこの peak 全体は 0.15 M NaCl 溶液において沈降恒数 3.5 S を示し、Fab' fragment のそれに一致した。

3. Fd' fragment の抗体活性

ゲル濾過による Fd' fragment と L 鎖の完全分離は非常に困難であったので、Fig. 5 に示した Sephadex column からの effluent を各 tube ごとに 0.15 M PBS に対して透析し、それぞれの antigen-binding capacity を Farr の方法によって測定した。Fig. 6 はその 1 例 (anti-HSA No. 72) を図示したものである。図から明らかなように、抗原結合能は peak の前半部だけに存し、後半部には全くこれが見られなかつた。換言すれば、Fd' fragment に相当する fraction だけに抗体活性は存在しこれに contaminate している L 鎖はこの活性を欠くことが明らかにされた。なお図表は省略したが抗原感作赤血球凝集反応を行なってみると、5 S fragment すなわち $F(ab')_2$ のみが陽性反応を呈し、Red A, Red B および Fd' fragment, L 鎖等はいずれも反応陰性であった。但しこれら四者はすべて、hemagglutination inhibition test においては inhibiting activity を示した。

考 察

抗体分子の如何なる部分に抗原と結合する active site が存在するかという問題は、最近の免疫学において最も興味あるテーマの 1 つである。抗体 γG はパペイン消化によって 3 つの fragment に分解されるが⁶⁾、その 1 つである Fab fragment は、その interchain disulfide bond を還元して酸で処理することにより、更に Fd fragment と L 鎖とに解離する。しかし Heimer⁷⁾ も指摘している如く、純粋な Fd fragment を得る事ははなはだ難かしく、少なくとも現在までのところ、L 鎖を全く含まない Fd の分離には成功していない。その理由として、L 鎖と Fd 間に存在する hydrophobic な結合が中性溶液中での両者の解離を妨げること、L 鎖と Fd fragment の分子量が余り違わないこと、等をあげ得る。従って抗体としての active site は Fd fragment にあると推測されているものの、現段階においては確実にこれを証明した報告には接していない。そこでわれわれは、pepsin 分解によって Fd よりは幾らか分子量が大きいと思われる Fd' fragment を分離し、その抗原結合能を Farr の方法によって証明しようと試みた。本実験に用いた標品は、出来るだけ pure にすべく Sephadex column によって精製を繰り返したものであるが、しかもなお L 鎖の contamination が全くないものとは言いがたい。この点、問題は今後の精製に残されていると言わざるを得ないが、理論的に見るならば、Fd' fragment はそれ単独で抗体活性を持つものと考えて大過ないように思われる。Fig. 5 における 5 S fragment 分解物の elution pattern は Fig. 7 の模型図に示す如く、点線で描いた Fd' fragment の峰と L 鎖の峰とを合成したものと考える事が出来る。しかして、集めた effluent を試験管ごとに 1 本ずつ調べてみると、抗原結合能は模型図の shadow を施した部分のみにあつて peak 後半の L 鎖部分にはない。なお、L 鎖が血球凝集反応、Farr test, radioimmuno-electrophoresis のいずれにおいても活性を示さなかつたことは、前報においてもわれわれの報告したところである。一方 shadow を施した前半部は L 鎖を構成する峰から外れており、固有の Fd' fragment から成るもので、L 鎖の contamination はないか、あるいはほとんど無視し得べきものと考えて差支えあるまい。かくみれば、われわれの得た成績は間接的ながら上述の結論を支持するものとみなす事が出来よう。

最後に、 γG 抗体の subunit たる Fab', Fd' はいずれも univalent であることを付け加えておきたい。従ってその抗体活性を証明するに当っては、本実験に用いた

Farr test の如く、抗原との結合を直接観察し得る方法を採るべきで、HA でこれを直接証明する事は出来ない。しかしながら後者においても、抗原と結合する能力のあることは inhibition test によって察知することが出来る。

結 論

ペプシン分解によって得た抗 HSA ウサギ γ G 抗体の 5S fragment を還元・アルキル化した後、Sephadex column を通して酸で溶出すると、Fd' fragment を得るが、これに contaminate する L 鎖を完全に除く事は出来なかった。すなわち 280 m μ の波長における吸収曲線をみるに、得られた elution pattern は再濾過によっても symmetrical にならず、常に後半部に僅かな shoulder を伴う。しかしながら抗原結合能は peak の前半部のみに限局され、後半部にはこの能力が認められなかった。この事実は抗体の active site が Fd' fragment に存在することを強く示唆するものである。

引 用 文 献

- 1) Koshland, M. E. & Engelberger, F. M. : Proc. Nat. Acad.Sci., **50**, 61, 1963.
- 2) Sober H. A., Gutter, F. J. Wyckoff, M. W. & Peterson, E. A. : J. Amer. Chem. Soc., **87**, 751, 1965.
- 3) 大原 達, 山下慎子, 柿沼光明, 木村卓郎 : 「アレルギー」に投稿中.
- 4) Utsumi, S. & Karush, F. : Biochemistry, **4**, 1766. 1965.
- 5) Fleischman, J. B., Pain, R. H & Porter, R. R. : Reduction of γ -globulins. Arch. Biochem. Biophys. Suppl. **1**, 174-180, 1962.
- 6) Porter, R. R. : Nature, **182**, 670, 1958.
- 7) Heimer, R., Schnoll, S. S. & Primack, A. : Biochemistry, **6**, 127, 1967.