



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ブタ骨格筋アデニレートキナーゼのフラグメント2-56に依存する抗原決定基の化学構造
Author(s)	小山, 芳一
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(理学)
Dissertation Number	甲第1911号
Issue Date	1983-12-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/32536
Type	doctoral thesis
File Information	1911.pdf



グタ骨格筋アデニレートキナーゼの

5 フラグメント 2-56 に存在する抗原決定基の
化学構造

10

15

小山芳一

目 次

略語

頁

1

5 要 旨

3

序 論

8

第 一 章

30

CB-フラグメントのイオン交換体による
分画および固相法ラジオイムノアッセイ

10 材料と方法

31

結 果

39

考 察

52

第 二 章

63

15 3 種の CB-フラグメント, CBb(2-56),

CBfN(81-125) および CBfC(126-194) の交差

反応性とフラグメント 1-24 の抗原活性

材料と方法

64

結 果

70

考 察

81

第三章

96

フラグメント 1-24 の化学修飾とキモトリ
プシンによる細分化ペプタイドの抗原活性

材料と方法

97

結果

103

考察

115

まとめ

124

謝辞

126

文献

127

略 語

AK : グタ骨格筋アデニレート

キナーゼ

CB-フラグメント : AK の CNBr 分解ペプチド

RIA : ラジオイムノアッセイ

CBb : 配列 2-56 の CB フラグメント

CBd : " 61-75 "

CBfN : " 81-125 "

CBfC : " 126-194 "

anti-AK : AK に特異的に精製したヤギ抗体

anti-CBb : CBb " "

non-anti-CBb : CBb に非特異的に精製したヤギ抗体

TNBS : トリニトロベンゼンスルホン酸

TNP : トリニトロフェニル

BSA : 牛血清アルブミン

MOPS : モルホリノプロパン硫酸ナトリウム

PBS : 0.15 M NaCl, 0.02 M リン酸ナト

リウム緩衝液

Ig G : 免疫グロブリン G

NTCB : 2-ニトロ-5-チオシアノ安息香酸

要 旨

5

10

15

7" タ骨格筋アテニレートキナーゼ [E. C. 2. 7. 4. 3.] (AK) の抗原構造の研究において、この酵素の CNBr 分解物 (CB-フラグメント) を分画するために SP-Sephadex C-25 によるイオン交換クロマトグラフィーを用い、従来用いていたゲル濾過法と併用して精製時間の短縮や精製純度の上昇に効果を挙げた。

フラグメントの抗原活性は従来定量沈降反応の阻害試験により測定されていたが、可溶性抗原抗体複合体の形成阻害が測定されず、また測定には大量のサンプルが必要であった。これらの欠点を補うため、¹²⁵I-標識 AK を用いた固相ラジオイムノアッセイ (RIA) を確立した。この方法により、抗原やフラグメントの抗体に対する結合性 (抗原活性) を

定量的に測定する上で有効であった。

ひとつの CB-フラグメント、CBb(2-56) に対する抗体 (anti-CBb) を CBb-Sepharose 4-B ヲ用いてヤギ抗 AK 血清より精製した。こ

5 の anti-CBb は RIA において他の 2 つの CB-フラグメント、CBfN(81-125) と CBfC(126-194) と交差反応した。この交差反応性は、こゝら 3 つのフラグメントの AK-抗 AK 血清間の定量沈降反応に対する阻害率の和が大きすぎる事
10 実 (各フラグメントの最大阻害率の和が 180 % 以上にもなる (1)) をよく説明する。

この酵素のシステイン残基 (25 と 187 残基の) を 2-ニトロ-5-チオシアノ安息香酸により S-シアノ化するこゝで酵素をこの残基の N
15 末端側で切断し、得られたフラグメント 1-24 を精製した。CBb(2-56) の N 末端側のほぼ半分を形成するフラグメント 1-24 は、RIA で CBb の anti-CBb に対する全活性を示した。従つて CBb の抗原活性部位はその N 末端側半分、2-24 に存在しており、かつこの決定基は CB-7

フラグメント間の交差反応性に密接に関与していると思われる。一方、CBfN は CBb-Sephavose に吸着されなかった抗体画分 (non-anti-CBb) にも結合したので、CBfN には他のフラグメントと共通な抗原決定基の他にこのフラグメントに特有の抗原決定基があると考えられた。

佐藤が予想した CB-フラグメントの交差反応性に関する AK の抗原活性部位の配列(1)
 : -Glu-Glu-Lys-Leu-Lys-Lys(2-7), -Glu-Glu-Phe-Glu-Ang-Lys-
 (103-108) および -Glu-Glu-Thr-Ile-Lys-Lys-(143-148)
 の各側鎖の空間配座を、AK の X 線結晶解析よりコンピュータを用いて観察した。その結果、これらの配列が作る電荷の空間配置は 3 者とも殆んど同じであった。また Hopp と Woods
 の方法(2)を用いて AK の hydrophilicity analysis を行なったところ、これらの 3 つの配列が決定基になつていゝる可能性が高いことが示唆された。

以上の実験結果と解析により、CB-フラグメントの交差反応性に関する決定基は、共通に存在する Glu-Glu-X-X'-Lys(or Ang)-Lys である

ことが強く示唆された。

フラグメント 1-24 のアミノ基とカルボキシル基が抗原活性に関与しているかどうかを調べるために、それぞれをサワシニル化、また⁵はアミド化した。その結果、1-24 の 5 モルのアミノ基が 100 %、3 モルのカルボキシル基が 82.7 % 修飾されたことがわかった。アミド化した 1-24 標品にはインタクトな 1-24 が含まれていないことが薄層電気泳動でわかった。

¹⁰ 修飾した 1-24 の抗原活性を¹²⁵I-CBb と anti-CBb の結合阻害試験で測定した。サワシニル 1-24 は全く阻害せず、抗体と相互作用しなかった。こので抗原活性にアミノ基が関与していることが示された。アミド化 1-24 は活性が減弱¹⁵したにとどまった。この標品に阻害活性が多く残っていたのは、修飾が完全でなかった(修飾率 82.7 %) ことに起因しているかもしれないので、抗原活性にカルボキシル基が関与しているかどうかは現在のところわからな^い。

フラグメント 1-24 をキモトリプロシンで消化

5

10

15

し、フーグメント 1-5, 6-12, 13-24, 1-12, および 6-24 を薄層電気泳動で精製した。これらのいずれもが非常に抗原活性が低く、または全く示さなかった。しかし、1-12 と 13-24 を混じったときに阻害活性が有意に回復した。一方、 $(1-5) + (6-12) + (13-24)$ および $(1-5) + (6-24)$ の阻害活性は、単にそれぞれの和であったに過ぎなかった。従ってペプチドボンド 5-6 の保持は抗原性の発現に重要であること、また、1-12 と 13-24 が 1-24 の抗原決定基の構造を形成したことがわかった。

序 論

5 < た ん ぱ く 質 抗 原 の 免 疫 化 学 >

生体に異物（抗原）が投与されたときに、
体液中に異物と特異的に相互作用するたんぱ
10 く質（抗体）が分泌される。ある抗原によ
り產生された抗体はこの抗原そのもの、ある
いはこの抗原に極めて類似の化学構造をもつ
物質とのみ反応する。このような特異性が發
揮されるのはその抗原上の一部の特有な構造
15 （抗原決定基）に結合する抗体が產生された
からであり、この抗原と抗体の厳密性はしば
しば鍵と鍵穴の関係に例えられる。

外来物質によつて免疫された生体が產生す
る抗体がその抗原上のいかなる構造（抗原決
定基）と相互作用するかを知ることは、免疫

応答の化学的基礎としての抗原抗体反応を深く理解し、様々な免疫現象を分子レベルで理解する助けになる。疾病を含めた免疫現象に深く関与している抗原に多くのたんぱく質が知られていいるが、多形性 (polymorphic) であり、微量であり、たりあるためにこれらの抗原構造の解明は非常に困難が伴う。構造がよく調べられているたんぱく質の抗原決定基をより多く解明することは、たんぱく質の持つこの普遍的な免疫学的性質を知るといいう点で意義深い。

リボヌクレアーゼの抗原構造に関する研究(3, 4)では、分子の立体構造が抗原構造に重要であることが実証された。また、ミオグロビン(5)では6-7残基の一連のアミノ酸配列がひとつの抗原決定基を構成していること、リゾチーム(6)では一次構造上遠く離れたアミノ酸残基が立体構造上近接してひとつの決定基を構成していることが実験的に確かめられた。このように多くの研究の結果、たんぱ

く質の抗原構造の実態が化学的に理解される
 ようになつてきたが、たんぱく質の構造上の
 特徴と免疫学的性質が普遍的に結びつけられ
 るようになるためには多くのたんぱく質につ
 いて調べなくてはならない。

< たんぱく質の抗原決定基の研究手法 >

たんぱく質の抗原決定基の構造を調べる方法として以下がよく用いられている(7) :

(1) 特定のアミノ酸残基の化学修飾

たんぱく質の持つ生物活性とある特定アミノ酸残基との関係を追究する手段として、何種類かのアミノ酸側鎖を化学修飾する方法が用いられてきた。これを抗原たんぱく質に応用して特定のアミノ酸残基を化学修飾し、抗体との反応性の変化を調べることで抗原決定基に関与するアミノ酸残基を固定しようとするものがある。しかし注目したひとつのアミノ酸残基のみを定量的に修飾することは非常に難しく、そのアミノ酸が分子に広く存在していたり、修飾が不完全であつたり、副反応で他の種類のアミノ酸まで変化したり、さらには修飾後立体構造が変化することがあれば、結果の解析が難しい。特異的修飾法のあつた

ミノ酸の種類も限られていゝる。

(2) 異種動物のたんぱく質の交差反応を利用した解析法

アミノ酸置換のある異種動物のたんぱく質の何種類かについて交差反応性を調べ、それらの一次構造の比較から抗原決定基を形成していると思われるアミノ酸残基を同定する。一般に種を超えても高次構造に大きな違いはないので、抗体との結合性に変化があればこれはアミノ酸置換に起因すると考えることができる。しかし、この置換は全く偶然に期待するほかなく、また一次構造が多くの種で知られていゝるたんぱく質には限りがあることがこの方法の限界である。

(3) たんぱく質抗原の細分化

抗原であるたんぱく質をプロテアーゼや化学試薬で切断し、抗原決定基をペプチドとして単離する方法である。この方法は抗原活性部位を小さなペプチドフラグメントに限定でき、直接的に有効である。またある程度大

なオーバーラップフラグメントが得られれば、決定基内部の切断による抗原活性の損失を防ぐことができる。しかし、切断によつてインタクトなコンホメーションが不可逆的に変化してしまったような場合、それに依存する抗原決定基は抗体と結合することができなくなる場合がある。さらに、特異的に切断を受けるとペプチド結合を持つアミノ酸残基の種類も限定されておるし、(2)と同様にその位置も偶然に依存する他ない。

(4) 抗原活性ペプチドの化学合成

前述の3つの方法がかなり偶然性に依らなければならなかったのに対し、この抗原活性ペプチドの合成ははるかに系統的である。抗原決定基と思われる部分の数種のオーバーラップペプチドや、また適当にアミノ酸を置換させたペプチドを合成し、これらの抗体結合能を調べることで最終的に抗体と結合する最小単位ペプチドを同定する。最近は初めからN末端側からC末端まで15残基ずつのオーバー

ーラッポペフ４ドを合成し、抗原活性ペフ４ドを同定した研究もある(8)。

(5) 一次構造からの予測

親水性アミノ酸が抗原決定基を作り易いことから、一次構造をもとに親水性アミノ酸の集まり具合を計算して抗原決定基の可能性の高い領域を推定する方法である。この方法を用いて抗原活性領域を推定する研究グループが最近目につくようになった(9,10)。

たんぱく質の抗原決定基の研究では、以上の方法が組み合わされて用いられる。よく用いられる研究方法を以下に示す。

① (1), (2), (5)により抗原決定基を推測する。

② (3)により、抗原決定基をペフ４ドとして取り出すことを試みる。

③ 決定基をより限定するために(1)と(3)を併用、繰返し、決定基と思われる最小ペフ４ドの単離を試みる。

④ このペフ４ドのいくつかの derivatives を含

成し、最終的に必要十分な大きさのアミノ酸
残基から成るペプチドが抗原決定基として同
定される。

5

10

15

< たんぱく質抗原の性状 >

たんぱく質の抗原決定基は、その性状について大きく2つに分類できる。これらには多くのたんぱく質の抗原構造の研究において、Sela がまづ最初に定義した sequential と conformational という表現で説明されてゐる(11)。しかし、以下に説明するように sequential な抗原決定基についても、その conformation の変化に起因する抗体との親和性の減弱等が議論される。このとき、しばしば混乱や誤解が引き起こされたので、Atassi らの提案(12)に従つて分類する。

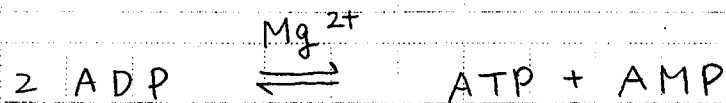
1. Continuous site : たんぱく質またはポリペプチドのペプチド結合による一連のアミノ酸残基で構成され、固有の三次元構造も抗原性発現に必要とされる決定基である。従つて他の場所のポリペプチド鎖の切断により抗体結合能を持ったフラグメントとして分離できるが、多くの場合、単離されたフラグメント

の抗体結合能はインタクトの分子よりもかなり弱い。これは単離されたペプチドフラグメントの極一部の割合のみが、抗体との結合に必要な特有の立体構造をとることができからである(12)。

2. Discontinuous site : 一連のポリペプチド鎖のみで構成される continuous site と違って、空間的に隣接したアミノ酸残基により構成される。この決定基の一部、あるいは全部はペプチド結合で直接は結合しておらず、ポリペプチド鎖の folding や接近によって隣接している部分がひとつの決定基を構成している。従って、この決定基の外側で切断がおきたり、化学修飾、不可逆的変性があった場合でももし決定基の conformation が変化すれば、抗体との結合能を失ってしまう。それ故、この型の抗原決定基の研究は、非常に困難が伴う。

く、アデニレートキナーゼの性質
と構造>

5 アデニレートキナーゼ [E.C. 2.7.4.3.] は次の可逆反応を触媒する:



10 この酵素は骨格筋の他、肝臓、腎臓、心臓、および脳などの臓器、さらに赤血球、と広く分布しており (13-15)、また植物、細菌、酵母 (16-18) にも存在している。代謝回転の速い筋肉やミトコンドリアに多く存在している。

15 ことから、アデニンヌクレオチド高エネルギー化合物間の生体内での調和をほかり、代謝調節に関与していると考えられる (19)。あてにアデニレートキナーゼの一次構造 (Fig. 1, (20, 21)) とアデニレートキナーゼの3次元構造 (Fig. 2~4, (22)) が明らかにされている。

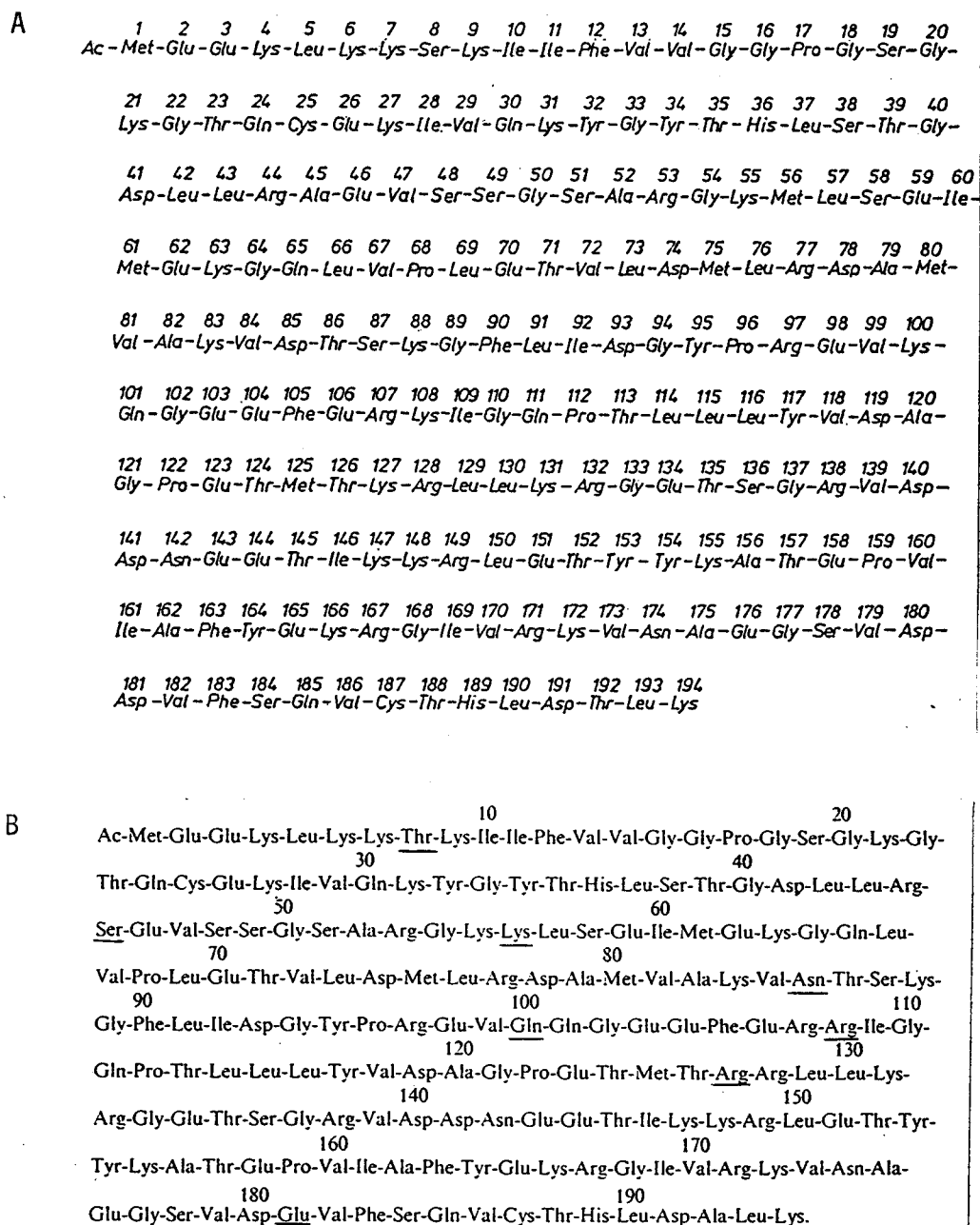


Fig. 1. Amino acid sequences of adenylate kinase from A, porcine (Heil *et al.*, 20) and B, human (von Zabern *et al.*, 21) muscle. Amino acid substitutions in human enzyme are indicated by bars.

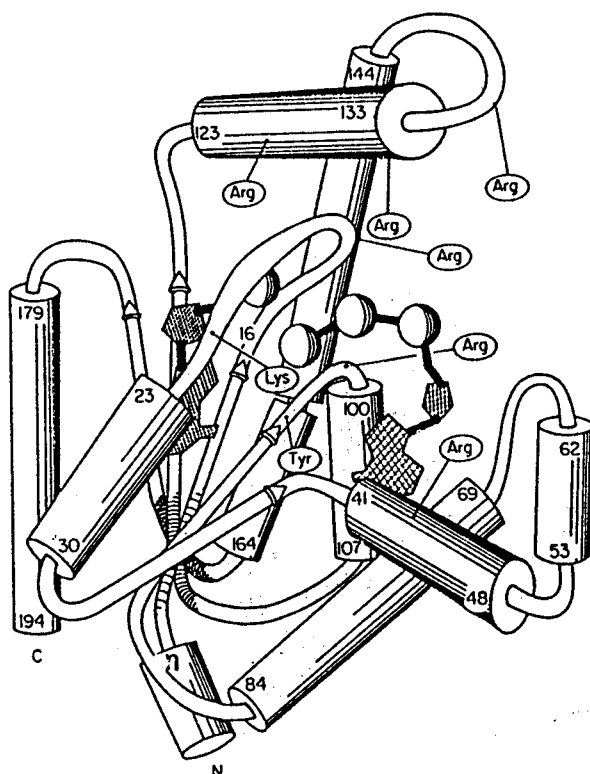


Fig. 2 Structural cartoon of AK. Helices are given as cylinders and β -pleated sheet strands as arrows. Active site, ATP and AMP are shown.

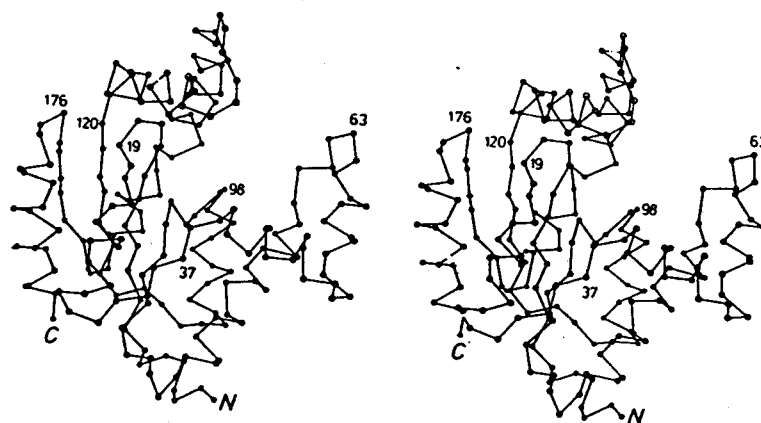


Fig. 3 Stereo drawing of polypeptide chain of adenyl kinase. C α -atom positions are marked with circles. N and C termini as well as some residue numbers are inserted. In the electron density map the chain fades out between residues 137 and 141 in an exposed region on the surface of the molecule. This stretch of chain, however, is strongly connected in the 6 Å map and in an intermediate 4 Å map.

(Schulz et al., 22)

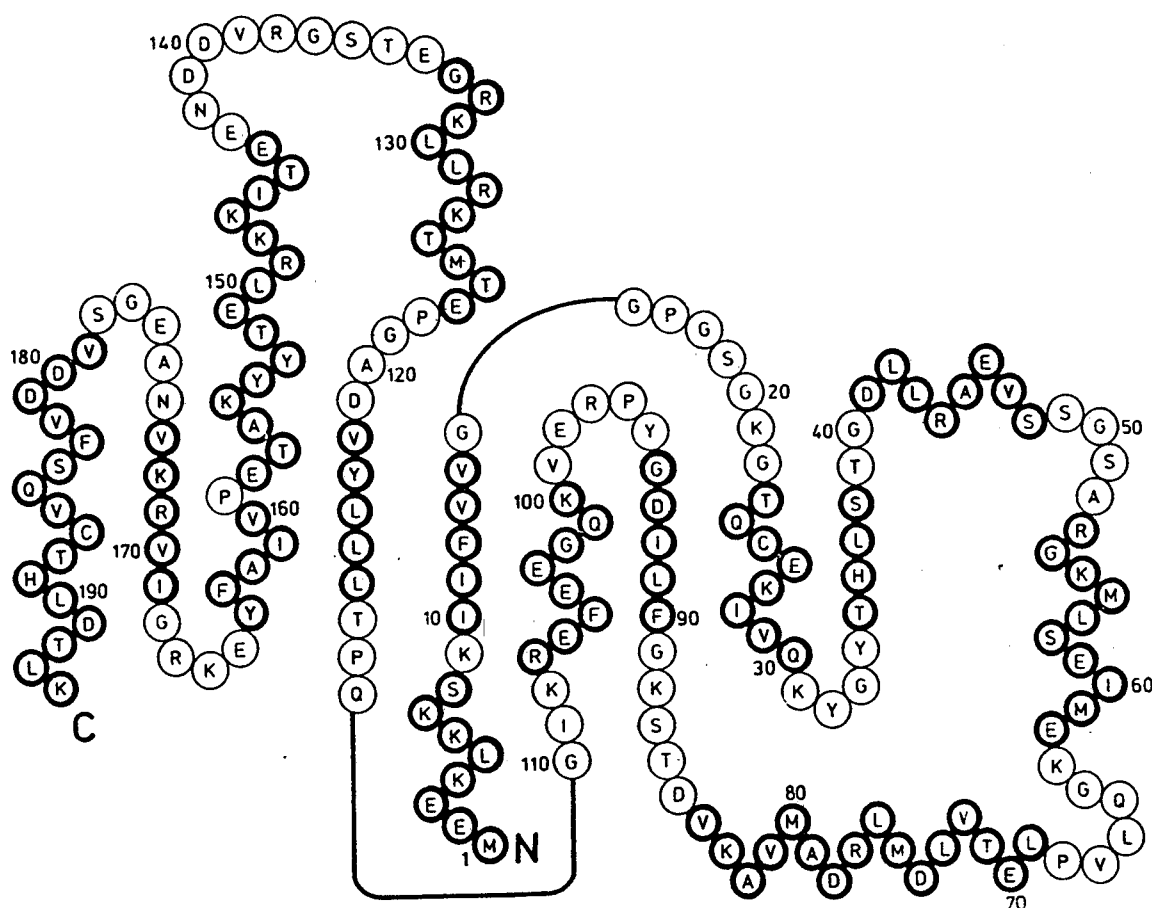


Fig. 4 Sequence of adenylyl kinase in one letter notation. Residues involved in helical structures and in the pleated sheet are drawn with heavier circles. The diagram indicates roughly the chain fold. The orientation of the molecule corresponds to that shown in Fig. 2. Helix 23-30 is above the plane of the paper and helices 100-107 and 144-164 are below.

(Schulz *et al.*, 22)

本研究で用いたブタ骨格筋 AK は、194 個のアミノ酸残基から成る一本鎖の球状たんぱく質 (M. w. 21,700) で分子内 S-S 結合を持たない (Fig. 1)。トリプトファン残基を含まず、⁵塩基性アミノ酸残基から成る電荷のかたまりが数カ所ある。例えば配列 4-9 の Lys-Leu-Lys-Lys-Ser-Lys の 4 つのリジン残基、147-149 の Lys-Lys-Ang の 3 つの塩基性アミノ酸、さらに 107-108, 127-128, 131-132, 166-167, および 171-172 の各配列に¹⁰は Lys, Ang の対が存在している。また、140-144 の Asp-Asp-Asn-Glu-Glu に 4 残基、103-106 の Glu-Glu-Phe-Glu に 3 残基の酸性アミノ酸が局在しており、他にも 2-3 にグルタミン酸の、180-181 にアスパラギン酸の対がそれぞれ位置している。

¹⁵疎水性アミノ酸の集合もみられ、10-14 に Ile-Ile-Phe-Val-Val, 114-118 に Leu-Leu-Leu-Tyr-Val, 160-164 に Val-Ile-Ala-Phe, 66-69 に Leu-Val-Pro-Leu, として 90-92 に Phe-Leu-Ile の各疎水性アミノ酸の配列がみられる。このようなアミノ酸残基の集団はこの酵素のコンホメーションの保持や、他の細

胞成分との相互作用に重要な役割を演じていると考えられている(20)。

AKの酵素活性にHis-36が重要な役割を演じており、立体的にこの残基の近傍に位置するCys-25, Asp-93, Ser-38, およびTyr-153などの各アミノ酸残基の活性部位への直接または間接的な関与が示唆されている(20, 22-24)。

またAKの高次構造の模式図をFig. 4に示す(22)。 α -ヘリックスおよび β -シートの全構造に占める割合はそれぞれおよそ56%と15%にもおよぶ。ひとつの大きな割れ目が分子を2分し、ここに基質が結合すると考えられている(Fig. 2, (22))。

< アデニレートキナーゼの抗原構造 >

酵母とウサギ骨格筋 AK の抗原決定基につ

5 いて、Minatogawa と Russell (25) と Minatogawa (26)

の研究がある。西酵素のトリプトシン消化物か

らペプチドを精製し、それぞれのモルモット

抗血清に反応するペプチド (酵母からはひとつ、

ウサギからはふたつ) を得た。ウサギの

10 抗原活性ペプチドのアミノ酸分析値は、ひとつ

はグルタミン酸が全アミノ酸の $\frac{2}{3}$ を占めて

おり、もうひとつにも酸性アミノ酸が多く含

まれているので、ウサギ AK と抗体の間には

静電的な力が作用している可能性が示唆され

15 た。一方、抗体と相互作用しなかったウサギ

の残りの3種のペプチドには、極性アミノ酸

の含量は低く疎水性アミノ酸が多かった。こ

のらペプチドの配列決定や、ウサギ AK、酵

母 AK の抗原決定基の数の検討はされていな

い。

一方、ブタ骨格筋 AK の抗原決定基について、当研究室の佐藤によつて以下が明らかにされた(1)：

1 得られたヤギ抗ブタ AK 血清と AK の定量的沈降反応の解析から、AK には少なくとも 4 個の抗原決定基が存在する。またこの抗血清は AK の酵素活性を完全に阻害した。

2 AK を CNBr で処理して得られた CB-フラグメント混合物とヤギ抗 AK 血清との免疫沈降反応は全く認められなかった。しかし、このフラグメント混合物が AK と抗血清間の免疫沈降反応を完全に阻害したので、CB-フラグメントは抗体と結合する能力が十分保持されてゐることかわかった。

3 精製した 3 つの CB-フラグメント、CBb(2-56)、CBfN(81-125) および CBfC(126-194) の個々の定量的沈降反応の阻害活性が非常に強かつた (CBb: 40%, CBfN: 70%, CBfC: 70% 計 180%) ので、これら 3 つのフラグメントが互に交差反応している可能性が示唆された。

4. ギタあよびウサギ骨格筋AKの交差反応性を調べたところ、ウサギAKはヤギ抗ギタAK血清に対しギタAKの60%の反応性を示した。従ってギタAKの抗原決定基のアミノ酸残基のいくつかは、ウサギAKで置換してこのことが示唆された。ウサギAKと比較してギタAKで置換している11のアミノ酸残基のいくつかは、直接または間接的にギタAKの抗原決定基に関与していると考えられる。

5. CB-フラグメントのひとつ、CBfN(81-125)のアミノ基をトリニトロベンゼンスルホン酸(TNBS)でトリニトロフェニル(TNP)化し抗原活性の変化を測定したところ、TNP化CBfNに抗体との結合能を認めなかったのて

CBfNのアミノ基が抗原活性に必須であることが示された。

結論として、CB-フラグメントの強い抗原活性やウサギAKでの置換と交差反応性、フラグメントのTNP化での活性消失、さらに -

次構造の検討から、CB-フラグメントの強い抗原活性は、3つのフラグメントに共通に存在する Glu-Glu-X-X'-Lys(or Arg)-Lys の配列に起因する交差反応性にあるものと考えられた。

5

10

15

＜本研究の目的＞

本論文では、AKのCB-フラグメント上に存在する抗原決定基、特にCBb(2-56)の決定基の化学構造を解明するために行なった研究について、3章に分けて述べる。

第一章では、CB-フラグメントの効果的な精製法と固相法RIAについて記述する。本研究では多くの時間と労力がフラグメントの精製に費やされたが、フラグメントを大量に効率よく精製することは重要である。また、定量沈降反応阻害実験で各CB-フラグメントが示した非常に強い活性が、何に起因するのか、長い間疑問であった。後述するように、この測定法は可溶性抗原抗体複合体の阻害が測定できないので、各フラグメントが抗血清の何%と実際に結合するのか、を知る必要があった。この目的のために、ヨード標識AKを用いる固相法RIAを開発した。

す 21 に、CBb(2-56)、CBfN(81-125)およびCBfC(126-194)が交差反応している可能性があり、またこれらの抗原活性に各フラグメントに共通な配列-Glu-Glu-X-X'-Lys(or Arg)-Lys-が関連している⁵と推察された事(1)について述べた。これを確かめるため第2章ではCBbに特異的な抗体を抗血清より精製し、RIAを行なったところ、3つのフラグメントに交差反応性を認め¹⁰た。またCBbのN末端側半分であるフラグメント1-24の活性測定やAKの立体構造、親水性アミノ酸の分析を行なった、抗原決定基に関与していると考えられる構造について考察する。

第3章では、フラグメント1-24の化学修飾¹⁵と断片化の実験から、1-24に存在する抗原構造についてさらに検討を重ねる。

第一章

CB-フラグメントのイオン交換体による

分画および固相法ラジオイムノアッセイ

材料と方法

材料

AKはブタ骨格筋(屠殺直後のものを -20°C で保存)から精製し、再結晶した(23)。AKのCNBr分解物(CB-フラグメント混合物)から、後に述べる方法にしたがって3つのフラグメント、CBb(2-56)、CB+N(81-125)およびCB+C(126-194)を精製した。Sephadex類はPharmacia Fine Chemicals社、celluloseイオン交換体はWhatman社、ラクトペルオキシダーゼと牛血清アルブミン(BSA)はSigma Chemical社、スホプトウホP/ホP6(分画分子量1,000)はSpectrum社、また Na^{125}I はRCC Amersham社よりそれぞれ購入した。ポリビニルピロリジン、DynatechおよびCoasterの3社の製品を使用した。他のすべての試薬は、特級品を用いた。

方法

CB-フラグメントの調製

5 結晶 AK を水に溶かし水に十分透析して凍結乾燥した。これを 70% 酢酸に濃度が 10 mg/ml になるように溶解し、全メチオニン残基の 100 倍モルの CNBr を固体のまま加え、ちっ素置換して栓をし、遮光、撪拌しながら室温に 48 時間放置した。蒸留水で 10 倍希釈後凍結乾燥し、さらに同量の水に溶かし、再度凍結乾燥を行ない、CB-フラグメント混合物を得た。

10 CB-フラグメント混合物 (50 mg) を 10 ml の 0.1 M 酢酸に溶かし、同溶媒に平衡化した Sephadex G-50 カラム (2.4 × 230 cm) にかけ、同じ溶媒で展開した。流速は 17 ml/h, 5 ml ずつを分画した。主に CBb(2-56) から成る画分 (90 mg) を 4 ml の 0.02 M モルホリンプロパン硫酸ナトリウム (MOPS) 緩衝液 (pH 6.0) に溶かし、pH 6.0 に合わせそこから同緩衝液に平衡化した SP-

Sephadex C-25 カラム ($1.5 \times 30 \text{ cm}$) にかけて。同
溶媒でカラムをよく洗ってから、吸着画分を
0.0 M (350 ml) - 0.35 M (350 ml) NaCl の直線濃度勾
配で溶出した。流速は 25 ml/h, 7 ml ずつを分
5 画した。各ピークに帰属する画分を集め、ロ
ータリーエバポレーターで濃縮後、Sephadex G-
25 カラムで脱塩 ($1.5 \times 25 \text{ cm}$, 溶媒 0.1 M 酢酸, 流
速 25 ml/h, 分画 5 ml/tube) 後、凍結乾燥した。
さらに Sephadex G-50 カラムで再度、ゲルクロマ
10 トグラフィーを行ない (クロマトグラフィーの条
件は上記と同じ)、凍結乾燥した。CBfC (126-
194) の精製は、上述の CBb の精製法に準じて
行なった。一方、CB-フラグメント混合物の
Sephadex G-50 によるゲルクロマトグラフィー (15
上記) により得られた、主に CBfN (81-125) から
成る画分 (約 20 mg) を 0.02 M MOPS 緩衝液 (pH
6.0, 10 ml) に溶かし、同緩衝液に平衡化した
CM-cellulose カラム ($1.5 \times 8 \text{ cm}$) にかけて素通り画
分を集めた。この画分をロータリーエバポレ
ーターで濃縮後、0.01 M トリス塩酸緩衝液 (

pH 8.0) に対し十分透析し、同緩衝液に平衡化した DEAE-cellulose カラム ($1.5 \times 30 \text{ cm}$) にかいた。同緩衝液でカラムをよく洗浄し、NaCl の直線濃度勾配 ($0.0 - 0.12 \text{ M}$, 全量 600 ml) で吸着物質を溶出した。流速は 20 ml/h , 3 ml/tube で分画した。メインピークを形成する画分をスペクトラポア 6 (分画分子量 $1,000$) で水に十分透析後、凍結乾燥して -20°C で保存した。

ポリアクリルアミド電気泳動 (PAGE)

pH 4.0 の PAGE は Reistfeld の方法 (27) に従った。

ペプチドの定量とアミノ酸分析

ペプチドの定量は、その構造が既知なのでアミノ酸分析により構成アミノ酸のモル数を

定量することでおめた。ペプチドを減圧下、
6M塩酸中、 110°C で22時間加水分解した。こ
れを日立アミノ酸分析機 (KLA-3B: Hitachi
custom ion-exchange resin 2618) を用いて、そ
の組成を分析した(28)。

抗体のプラスチック表面への吸着

ヤギの免疫グロブリンG (IgG) をクロラミン
T法でヨード標識した(29)。コールドのIgG
と標識したIgGを、抗体濃度が 1mg/ml , 100ng/ml
 10ng/ml , および 1ng/ml になるよう、また $30\mu\text{l}$
中の放射活性が約 $10,000\text{ cpm}$ になるように混ぜ
あわせた。これらの抗体溶液を $30\mu\text{l}$ ずつフレ
キシアルミクロタイタープレートに加え、 4°C
または室温で $0.5 \sim 24$ 時間インキュベート
した。各ウエルを洗浄後、ウエルに結合した
放射活性を測定した。

AK の ヨード化

AK の 放射活性ヨードの標識はラクトペル
オキシダーゼ法(30)で行なった。プラスチック
5 クチューブに以下の溶液を入れた: 10 μ l の 0.5
M 酢酸緩衝液 (pH 5.6), 10 μ l の 0.1 M 酢酸緩衝液
(pH 5.6) に溶けた 0.2 μ g の ラクトペルオキシダ
ーゼ, 10 μ l の PBS に溶けた 10 μ g の AK, およ
び 5 μ l (0.5 mCi) の 無担体 Na^{125}I 。反応を 5
10 μ l の 0.88 mM H_2O_2 を加えることによって開始
させ、5 分間隔でさらに 2 回同量の H_2O_2 溶液
を加えた。50 μ l の 20 mM 2-メルカプトエタ
ノールで反応を止めたのち、1 ml の 5% BSA
(PBS 溶液) をあらかじめ通して PBS で平衡
15 化している Sephadex G-25, または Bio Gel
P-6 DG カラム (1.0 $\times$ 20 cm) を用いて、フリー
の ^{125}I と ^{125}I -標識 AK を分離した。50 μ l の
キャリア BSA (2.6% w/v in PBS) を入れてあ
る試験管に 0.6 ml ずつ分画し、そのうちの各
3 μ l ずつの放射活性を測定した。 ^{125}I -AK

の比活性は $10 \mu\text{Ci} / \mu\text{g}$ であり、従って $1/10$ 分子の AK が ^{125}I で置換された。この標品の 98% の放射活性が 10% トリクロロ酢酸溶液で沈殿した。

タイトレーションと阻害試験

精製抗体（第二章参照）の ^{125}I -AK に対するタイトレーションを固相で行なった。70 ilet のウエルに PBS で 4 倍ずつ順次希釈した抗体溶液を入れ、 4°C で一夜（または室温で 3 時間）放置することによりウエルに抗体を被覆した（第 1 番目のウエルの抗体濃度は 0.3 mg/ml で、12 番目のウエルは抗体を含まない PBS を入れた）。ウエルを PBS で 3 度洗い、0.2% BSA-PBS 溶液^{*注}で室温で数時間処理した。（
^{*}注：微量たんぱく質の非特異的吸着を防ぐ目的で、キャリアたんぱく質の BSA 溶液を反応溶液に使ったが、後に 0.02% Tween-PBS を

BSA 溶液の代わりに用いた。) ウェルを PBS
で洗い、 $25\mu\text{l}$ の ^{125}I -標識 AK ($10,000\text{ cpm}$, 0.05
p mole, 0.2% BSA-PBS 中) を入れた。プレート
をミクロミキサー (三光純薬製) を用いて室
5 温で 30 分攪拌し、 4°C で一夜インキュベート
した。ウェルを PBS で 4 度洗い、それぞれを
切り離してウェルの放射活性を測定した。

阻害試験 (RIA) は、タイトレーション試
験と基本的に同じ方法で行なった。タイト
10 レーションにより求められた一定量の抗体 (加
えた ^{125}I -AK の最大結合法量の $60-70\%$ を結合
する) をウェルに被覆した。標識抗原を加え
る前に 0.2% BSA-PBS で希釈した阻害剤、 $25\mu\text{l}$
をウェル上の抗体と 4°C で一夜反応させた。
15 つぎにラベルした抗原 ($10,000\text{ cpm}$, $5\mu\text{l}$, 0.2%
BSA-PBS 溶液) を加え、さらに一夜反応させた。
ウェルをよく洗い、切りとって放射活性を測
定した。放射活性の、抗体の結合していない
ウェルへの非特異的吸着は、加えた放射活性
の 2% 以下であった。

結 果

フラグメントの精製

CB-フラグメント (50 mg) の, Sephadex G-50 カラム (2.4 × 230 cm) によるゲルクロマトグラフィーを Fig. 5 に示す。主に5つのピークが得られ、溶出する順に CBf (81-194), CBfc (126-194), CBb (2-56), CBfN (81-125) および CBd (61-75) である (20)。また、CB-フラグメントの SP-Sephadex C-25 カラム (1.2 × 10 cm) によるイオン交換クロマトグラフィー (pH 6.5) を行ない、Fig. 6 のようなパターンで分画した。

CBf および CBfN はカラムに吸着せず溶出した。吸着した成分は NaCl の濃度勾配で、CBfc, CBb の順に未同定のいくつかのピークとともに溶出した。CBb が2つの画分に分かれるのは、CBb のC末端の電荷の違いによるためである。すなわち、CNBr によるメチオニン残基の開裂

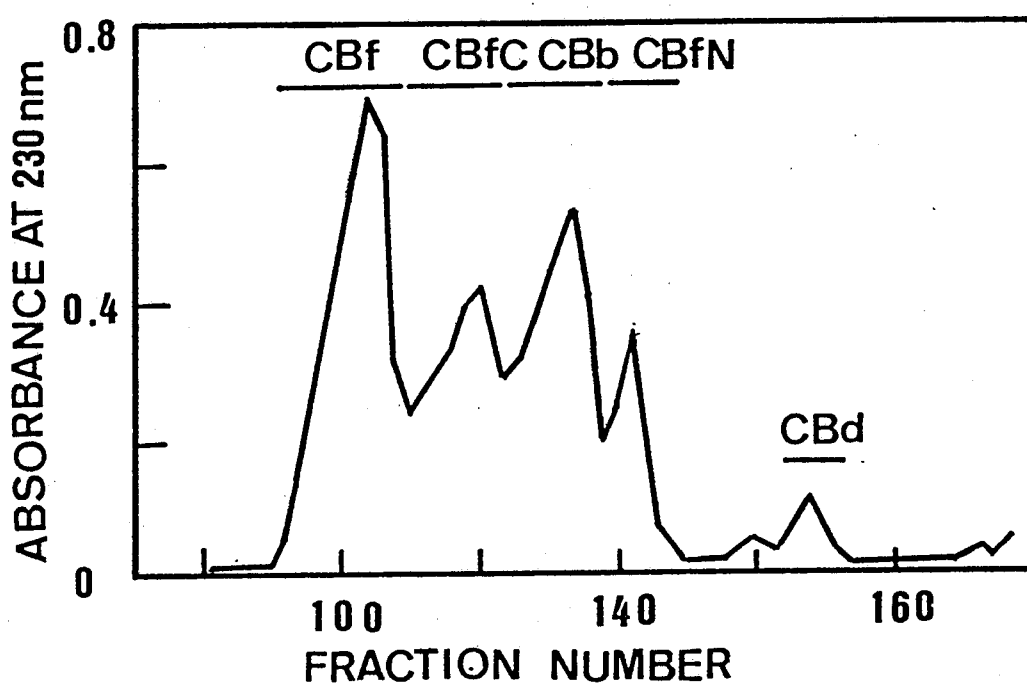


Fig. 5. Sephadex G-50 chromatography of CB-fragments of adenylate kinase from porcine skeletal muscle. Whole CB-fragments mixture (50 mg) was applied to a column (2.4 x 228 cm) of Sephadex G-50 equilibrated with 0.1 N acetic acid. The column was eluted with 0.1 N acetic acid at a flow rate of 17 ml/h and fractions of 5 ml were collected.

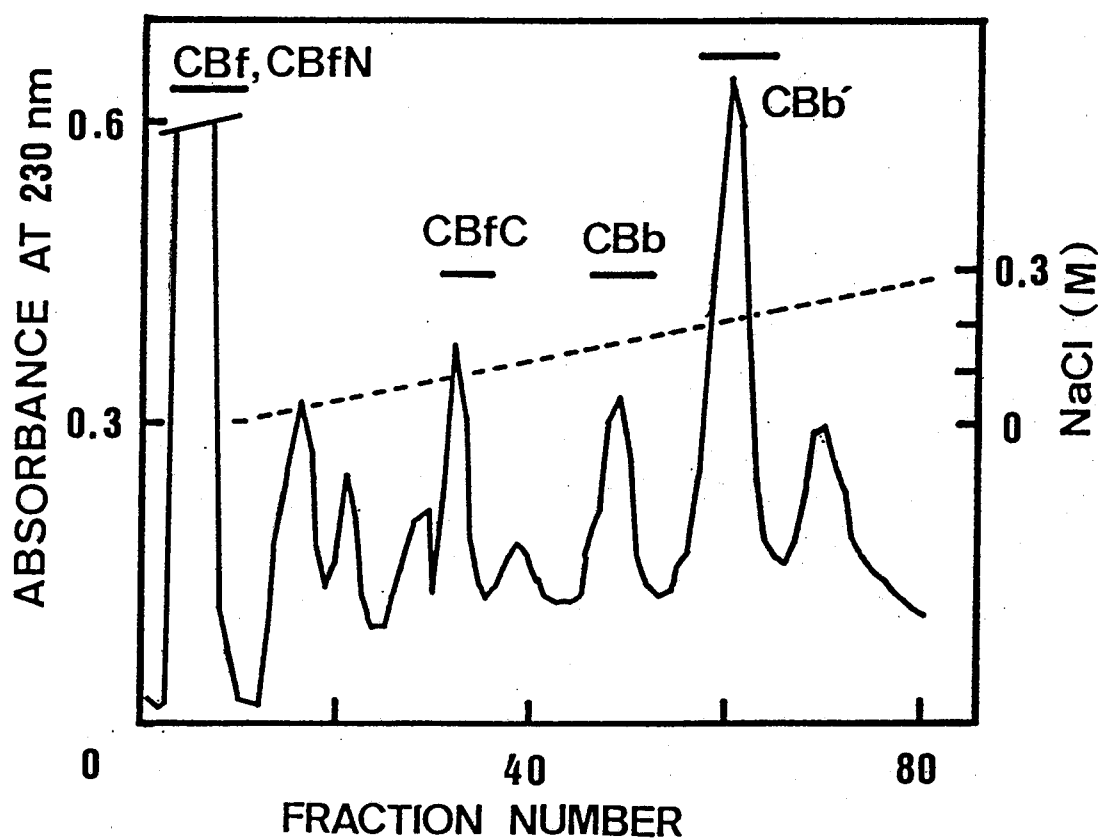


Fig. 6. SP-Sephadex C-25 chromatography of CB-fragments of adenylate kinase from porcine skeletal muscle. Whole CB-fragments mixture (50 mg) was applied to a column (1.2 x 10 cm) of SP-Sephadex C-25 equilibrated with 20 mM morpholinopropanesulfonic acid buffer, pH 6.5. The material was eluted with a linear gradient of NaCl (0 - 0.3 M) at a flow rate of 25 ml/h. The fractions of 5 ml were collected. —, absorbance at 230 nm; -----, concentration of NaCl.

に伴って生成するホモセリンラクトン（無電荷）が、水溶液中でラクトン環がひらいてホモセリン（負電荷）が生成するため、両者は平衡状態にある。CBb と CBb' をクロマトグラフィー直後に 4.0 PAGE にかけると、それぞれはメインバンドに近接したマイナーバンドを持っていた (Fig. 7)。また CBb と CBb' の混合物の 4.0 PAGE では、2 本のバンドのみが観察された。さらに数週間後にあらためて 4.0 PAGE を行なうと、2 本のバンドの比は両 CBb 画分とも小さくなった。同様の結果が CBfcN の PAGE にもまた観察された。CBfc は最終的に一本の均一なバンドを与えたので、AK 分子の C 末端由来のフラグメントであることを示唆した。

CBb と CBfc は Sephadex G-50 カラムによるゲル濾過と SP-Sephadex C-25 カラムにあるイオン交換クロマトグラフィーの 2 ステップで精製した。PAGE で不純物の検出されたときは、Sephadex G-50 または、SP-Sephadex C-25 カラムでリワロ

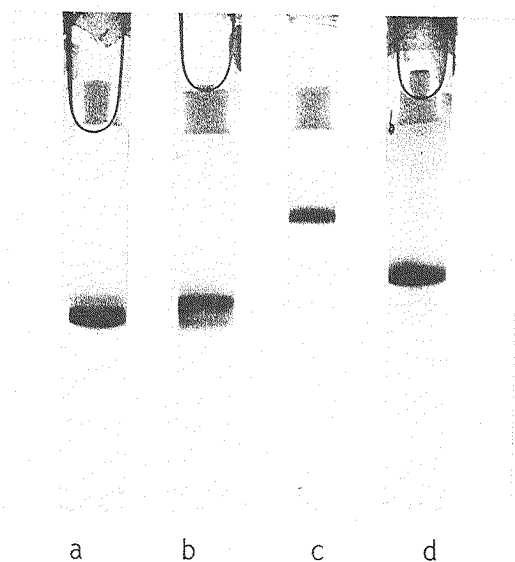


Fig. 7. Polyacrylamide gel electrophoreses (PAGE) of CB-fragments purified. PAGE was performed in 15 % gel at pH 4.0. (a) CBb (2-56); (b) CBb (2-56)^r; (c) CBfN (81-125); (d) CBfC (126-194).

マトグラフィーを行なった。CBfNは、Sephadex G-50
 カラムのゲル濾過後の DEAE-cellulose カラムに
 よるイオン交換クロマトグラフィーでほぼ一本
 のすきいピークを与えたが (Fig. 8), 4.0
 5 PAGEで複数の不純物が検出された。この不純
 物は pH 6.5 で CM-cellulose に吸着されることかわ
 かったので、ゲル濾過の CBfN 画分を CM-cellulose
 カラムにかけ、素通り画分を DEAE-cellulose カラ
 ムにかけた。得られた CBfN は、4.0 PAGE で均一
 10 であった (Fig. 7)。

以上のようにして得られた各フラグメント
 の N 末端アミノ酸をダンシル法で調べたところ
 3, CBb は Glu, CBfN は Val, そして CBfC は
 Thr とそれぞれ同定され、報告されている N
 15 末端アミノ酸と一致した。さらにそれぞれの
 アミノ酸分析値を Table 1 に示す。各フラグメ
 ントのアミノ酸残基の数は、フェニルアラニ
 ン残基の数をそれぞれ CBb は 1, CBfN と CBfC
 は 2 としたときのモル比を表わしている。
 CBb, CBfN および CBfC はそれぞれ配列 2-56,

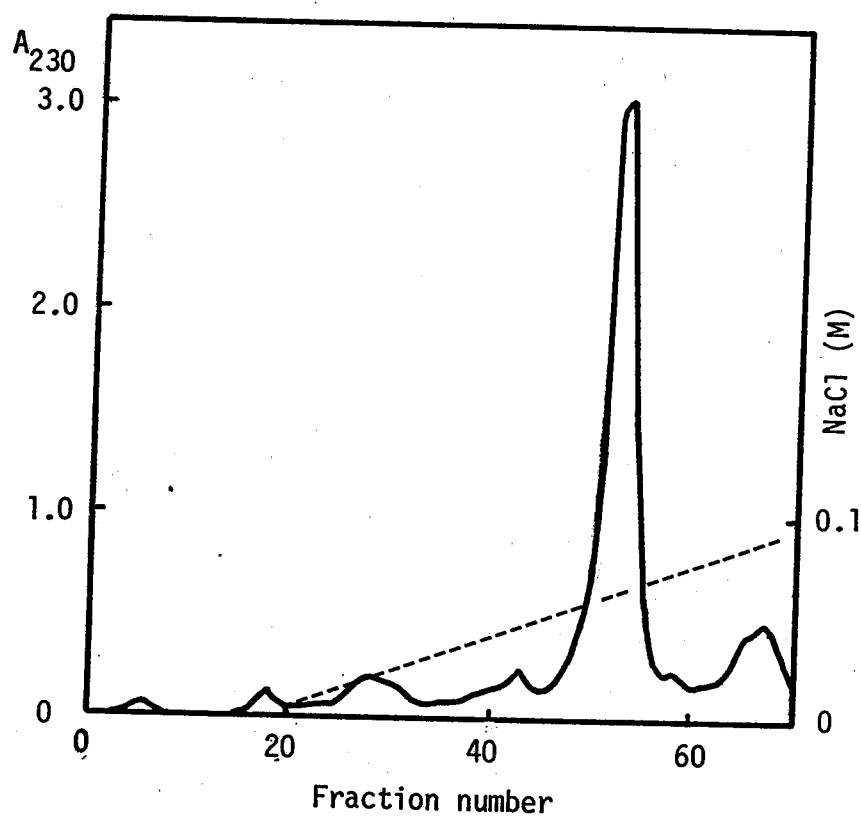


Fig. 8. DEAE-cellulose column chromatography of CBfN fraction from Sephadex G-50. CBfN (15 mg) was applied to a column (1.5 x 30 cm) of DEAE-cellulose equilibrated with 0.01 M Tris-HCl buffer, pH 8.0. The material was eluted with a linear gradient of NaCl (0 - 0.12 M) at a flow rate of 25 ml/h. Fractions of 7 ml were collected. —, absorbance at 230 nm; ----, concentration of NaCl.

Table 1. Amino acid compositions of CB-fragments of adenylate kinase from porcine skeletal muscle^{a,b}

Amino acid residue	CBb(2-56)		CBfN(81-125)		CBfC(126-194)	
	Found	Theory ^c	Found	Theory ^c	Found	Theory ^c
Asx	1.0	1	2.9	3	6.5	7
Thr	2.4	3	2.4	3	6.4	7
Ser	5.1	6	1.3	1	3.0	3
Glx	6.1	6	7.1	7	8.6	8
Pro	0.6	1	2.9 ^d	3	0.9 ^d	1
1/2-Cys	n.d. ^d	1	n.d. ^d	0	n.d. ^d	1
Gly	8.9	9	4.9	5	4.3	4
Ala	2.4	2	1.9	2	3.1	3
Val	2.9	4	3.4	4	6.1	7
Met	0	0	0	0	0	0
Ile	1.4	3	1.4	2	2.4	3
Leu	3.7	4	2.8	4	4.7	5
Tyr	2.2	2	1.5	2	2.8	3
Phe	1.0	1	2.0	2	2.0	2
Lys	7.3	7	3.2	4	7.8	8
His	0.9 ^d	1	0 ^d	0	1.0 ^d	1
Hse	n.d. ^d	1	n.d. ^d	1	n.d. ^d	0
Arg	2.1	3	1.7	2	6.2	6

a. Hydrolysis was in 6 N HCl at 110°C for 22 h under vacuum.

b. The numbers of amino acid residues in each fragments are expressed as the relative values when the values of phenylalanine residues of the fragments are integer *i.e.*, 1 for CBb, 2 for CBfN and CBfC.

c. Calculated from the sequence of adenylate kinase from porcine skeletal muscle by Heil *et al.* (20).

d. Not determined.

81-125 および 126-194 に期待されるアミノ酸組成を反映していた。

5 抗体のプレートへの吸着

抗体のプレートウェルへの吸着の様子を Table 2 と Fig. 9 にまとめた。希薄溶液（0.3 および 4.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）を被覆に用いれば、その70-80%が吸着された。また濃厚溶液では2-10%しか吸着されなかったが、絶対量としては1.6 $\mu\text{g}/30\mu\text{l}$ のときに0.3 μg 、また30 $\mu\text{g}/30\mu\text{l}$ のときに0.6 μg が被覆された。40°Cと室温で大きな差はなく、両者とも約2-3時間で飽和に達した。

抗体の ^{125}I -AKに対する固相上でのタイトレーションおよび阻害試験(RIA)

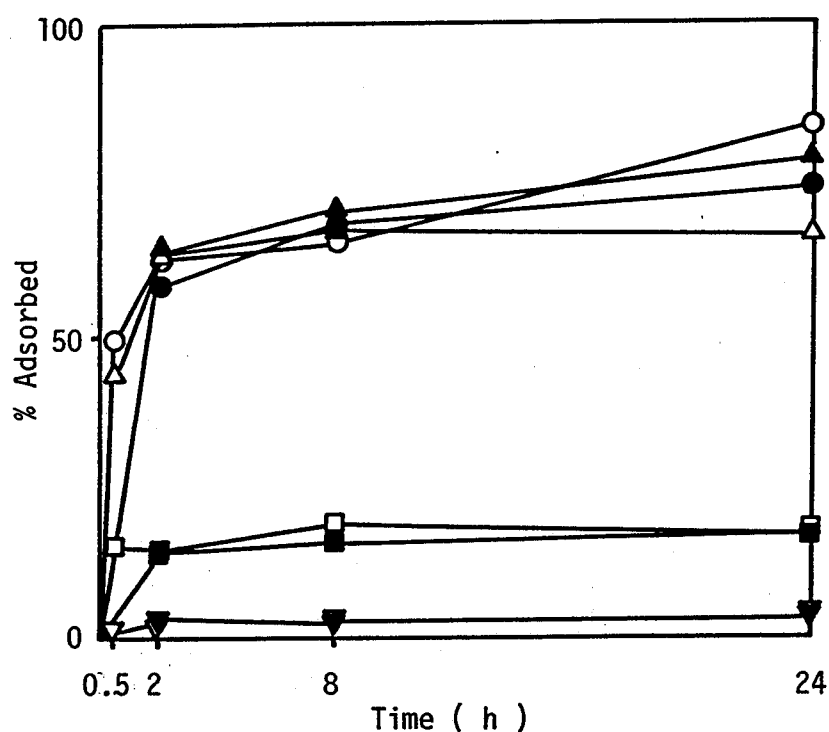


Fig. 9. Adsorption of antibody to polyvinyl microtiterplate well. Various concentrations of ^{125}I -labelled goat antibody solution (10,000 cpm, 30 μl) were added to wells and incubated at r.t. or 4°C for 0.5 - 24 h. Percentages of adsorbed radioactivity to added were shown. Symbols: (○,●) 0.3 $\mu\text{g/ml}$; (△,▲) 4.2 $\mu\text{g/ml}$; (□,■) 53 $\mu\text{g/ml}$; (▽,▼) 1.0 mg/ml. Open indicates r.t. and close 4°C.

Table 2. Adsorption of protein to polyvinyl microtiterplate well

conc.	time(h) temp.	0.5	2	8	24	added
0.3 $\mu\text{g/ml}$	4°C	n.d.	5.4 (60)	6.1 (68)	6.7 (78)	9 ng
	r.t.	4.3 (48)	5.7 (63)	5.9 (66)	7.6 (86)	
4.2 $\mu\text{g/ml}$	4°C	n.d.	81 (64)	88 (68)	100 (79)	126 ng
	r.t.	55 (43)	81 (64)	85 (67)	84 (67)	
53 $\mu\text{g/ml}$	4°C	n.d.	220 (14)	250 (15)	280 (16)	1.6 μg
	r.t.	240 (15)	220 (14)	300 (19)	270 (17)	
1.0 mg/ml	4°C	n.d.	560(1.7)	450(1.5)	630(2.0)	30 μg
	r.t.	420(1.4)	650(2.2)	570(1.9)	480(1.6)	

Values are expressed in nanograms.
Proportions (adsorbed/added) are in parentheses.

Fig. 10 は精製した3つの抗体画分 (anti-AK: 抗原カラムを用いて抗血清より特異的に精製した抗体 (第二章参照), IgG-anti-AK: 抗血清のIgG画分, および normal IgG: 正常血清のIgG画分) のそれぞれ々のタイトレーションカーブを示す。anti-AKは加えた量の最大80%の¹²⁵I-AKを結合した。またIgG-anti-AKおよびnormal IgGの最大結合割合はそれぞれ22および3%であった。非特異的吸着は約2-3%であった。次に阻害実験をするために、標識抗原の最大結合量の60-70%が結合するような抗体量を選んだ (Fig. 10より4³倍希釈のanti-AKを用いる)。この一定量をウェルに被覆し、1 n mole から希釈した非標識AKを順次加えインキュベート後、0.1 p mole の標識AKを加えてさらにインキュベートした。ウェルに結合した放射活性より、Fig. 11の阻害曲線が得られた。等モルのときに50%阻害したので標識AKの抗原構造は非標識AKのそれと大きく変わっていないことがわかった。

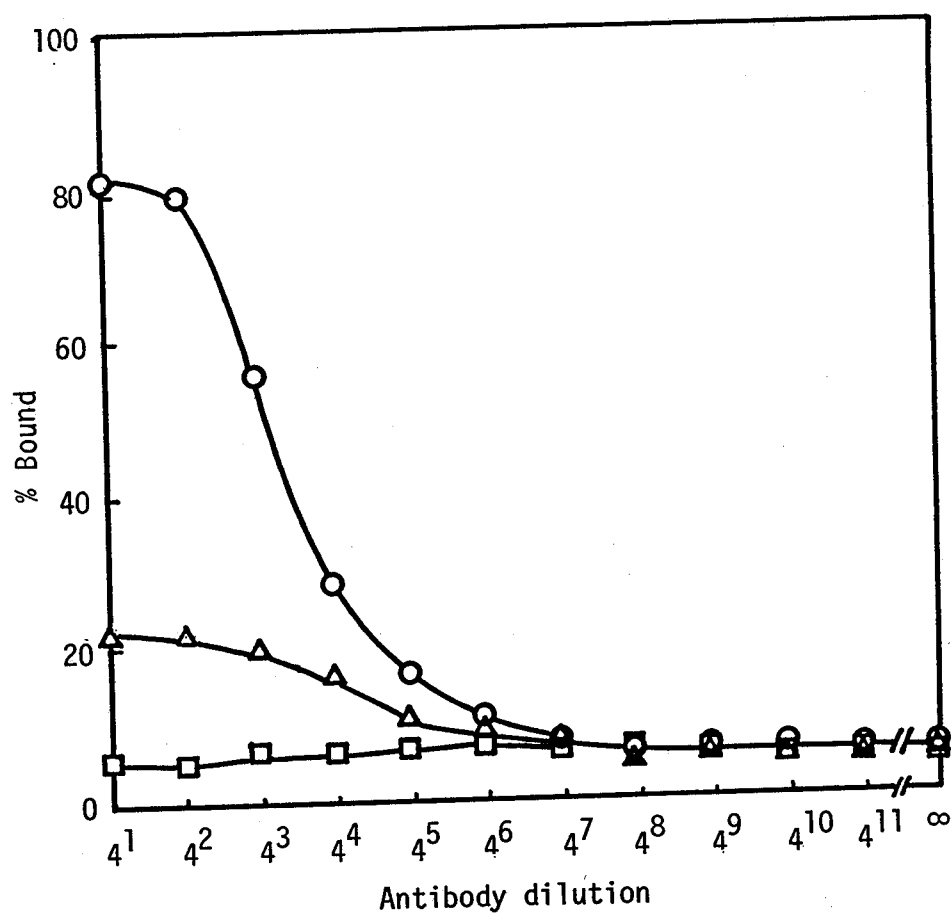


Fig. 10. Titration studies of three antibodies on polyvinyl surface. Aliquots of antibody solution were added to micro-titerplate wells in serial dilutions (four fold). After each well was washed and treated with 0.2 % BSA, a fixed amount of ¹²⁵I-AK (10,000 cpm, 0.05 p mole) was added and incubated overnight. Percentages of bound radioactivity to added were shown. Symbols: (○) anti-AK antibody, purified with AK-Sepharose column from anti-AK serum; (Δ) IgG fraction of anti-AK serum; (□) IgG fraction of normal serum.

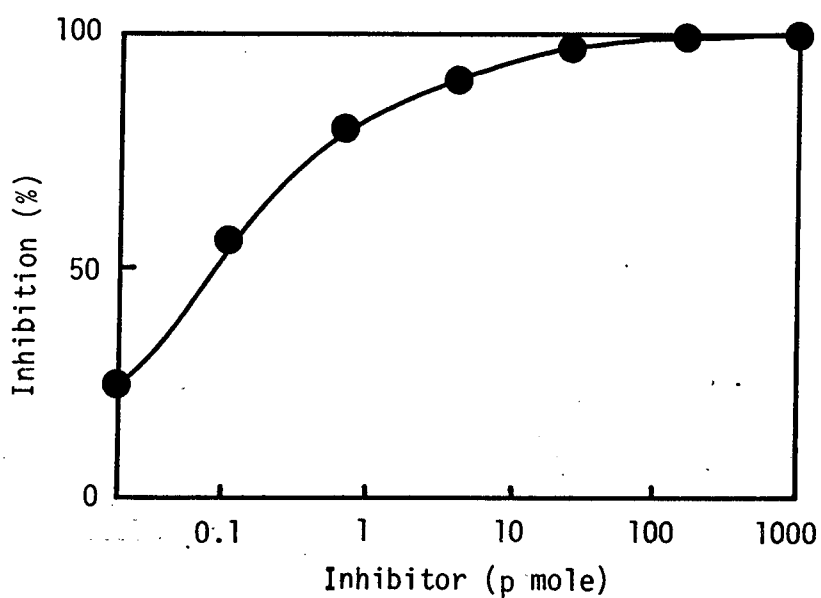


Fig. 11. Inhibition of the reaction between ^{125}I -AK and anti-AK by AK. A fixed amount of antibody solution was coated to polyvinyl microtiterplate well and incubated with cold AK at various concentrations. ^{125}I -AK (10,000 cpm, 0.05 p mole) was then added and incubated overnight. The radioactivity bound was counted.

考 察

1. SP-Sephadex C-25 を用いた CB-フラグメント
5 トの分画

各 CB-フラグメントは、以前 Sephadex G-50
カラム (2.4 x 230 cm) のゲル濾過をくり返すこと
でのみ精製していたが、一度に処理できる量
10 が限られており (数十 mg/run)、時間がかかった
(4 days/run)。さらに、リクロマトグラフィーの
みでは除けたい不純物を含むフラグメント標
品もあった。これらの欠点を補うため、イ
オン交換体によるフラグメントの分画を試み
15 た。

P-cellulose 等のセルロースイオン交換体を用いたときに回収がよくなかったのので、Seph-
adex イオン交換体を使用した。AK は塩基性
なので陽イオン交換 Sephadex である SP-Sephadex
C-25 を用いたところ、
5 10 15
5 10 15

pHを変えて予備的にクロマトグラフィーを行なった。pH 6.5 のとき CBf と CBfN は素通りし、CBfc は単一ピークで、また CBb は C 末端のホモセリン、ホモセリンラクトンの電荷の違いで 2 本のピークとなって回収された。また、負に荷電している CBf と CBfN を吸着させるために pH 4.3 で同じようにクロマトグラフィーを行なったところ、未同定のピークが増えて分離があまり良くなかったのので、pH 6.5 で CBfN を素通り画分として回収する方が良好と思われた。

各フラグメントの精製法は最終的に以下のようになった：CBb と CBfc は Sephadex G-50 カラム (2.4 × 230 cm) でそれぞれ得られた粗画分を凍結乾燥し、次に pH 6.5 で SP-Sephadex によるイオン交換クロマトグラフィーを行なうことでほとんど均一な標品を得ることができた。これらは NaCl で溶出されているので、濃縮後、脱塩も兼ねてもういちど Sephadex G-50 カラムでクロマトグラフィーを行ない、凍結乾燥して

-20°C で保存した。しかし、収量はそれほど改良されず、500 mg の CB-フラグメントから出
発して CBb は 20-25 mg, CBfc は 5-6 mg 程度であ
った。CBfn は Sephadex G-50 のカラムクロマト
⁵ グラフィーで得られた粗画分を、pH 6.5 で SP-
Sephadex または CM-cellulose を用いて不純物の
一部を吸着させたのち、pH 8.0 で DEAE-cellulose
によるイオン交換クロマトグラフィーで均一な
標品と行った。

¹⁰ 抗原たんぱく質の抗原活性を持つフラグメ
ントは、可能な限り高純度な標品でなくては
ならない。というのは、不純物の中に強い抗
原活性を持つものが含まれていたなら、この
フラグメントに対して誤った判断をする可能
¹⁵ 性があるからである。上記のイオン交換クロ
マトグラフィーは、精製日数、短縮や純度の向
上という点で、ゲル濾過のリクロマトグラフ
イーに比べ大巾に改良された。

2. 固相ラジオイムノアッセイ

以前はフラグメントの抗原活性を測定する系として定量沈降反応の阻害試験を用いてきた。この測定法の手順は：抗原（この場合ブタ AK, 20 μ g）とほぼ当量の抗血清（20倍希釈, 0.5 ml）を混ぜれば AK と抗体の免疫沈降物が形成される。この沈降物形成の阻害を測定するのに、さまざまな量の阻害剤をあらかじめ抗血清と一夜反応させてから、当量の AK を加え4日間沈降物を形成させ、これを測定するものである。しかしながら、とり扱う対象が、抗原と抗体の結合に基づいて起こる二次的反応の沈降物形成という点で、多くの欠点があった。

第一の欠点は、測定している対象が二次的反応の沈降物であるという点である。仮に、一見阻害しなかった（=100%沈降した）ような結果を得ても、実際には血清中で阻害剤と沈降反応に関与しなかった抗体とが特異的に結合している可能

性があるが、これを測定することはできない。

また逆に、100%阻害した(沈降反応がまったく起らなかった)とき、上清中に抗原(この場合 AK)-抗体複合体が可溶状態で存在し

5 ているかもしれない。第二に、時間を要する
という点である。抗原と抗体の結合反応は非常に早く平衡に達するまで通常遅くとも1-2時間程度である。しかし、沈降物形成は早く
て数時間、遅いものでは7-10日間かかる系が

10 あるといわれている。ブタ AK とヤギ抗血清
間の沈降物形成は4日間もの反応時間を要した。
第三は、測定には多量の阻害剤、抗原、および抗血清を消費した。100個測定すると
して抗原 AK を 2mg、抗血清 2.5ml、および阻
15 害剤 0.2-1mg 程度が必要であった。

これらの欠点を補うために、放射活性同位
元素で標識した抗原を用い RIA でフラグメン
トの抗原活性を測定することを試みた。この
方法では、標識抗原と抗体間の単なる結合の
阻害が測定されるので、前述の第一番目の限

界はない（すなわち、阻害% = 阻害剤の抗体に結合した割合となる）。また反応終了までに数時間で済むことと、抗原、抗体および阻害剤（試料）の必要量が $10^{-12} \sim 10^{-9}$ モルの単位⁵に極めて感度が良いことも大きな特長である。

逆に欠点として、抗原の標識化に伴って抗原の免疫化学的性質が変化しないか、という問題が挙げられる。ヨード標識によってたんぱく質の持つさまざまな機能が不可逆的に変¹⁰化することが多い。これはチロシン残基がヨード化したから、というよりはむしろ、ヨード化反応の際の酸化状態がたんぱく質に悪い影響¹⁰を与えているようである。

ヨード化の一般的な方法としてクロラミン¹⁵T法(29)があるが、この強力な酸化剤による標識後酵素活性や免疫活性を失うたんぱく質も多い。事実、クロラミン-Tによって標識したAKはもはやその抗体とまったく結合しなくなり、免疫化学的性質を失ってしまった。

A K は、より過和なヨード化法と言われるラクトペルオキシダーゼ法(30)を用いて標識した。通常 $10 \mu\text{g}$ の A K と約 0.5 mCi の ^{125}I を反応に用いたが、いつも $0.1-0.2 \text{ mCi}$ がヨード化反応後のゲル濾過においてボイドボリュームで回収された。RIA の感度をもっと上げるためには、比放射活性の高い標識化合物を調製する必要があるが、反応条件をいろいろ変えても上記を上回ることはほとんどできなかった。

10 標識抗原の比活性は約 $10-20 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ 前後で、ほぼ 10 モルの A K 分子に ^{125}I が 1 原子導入された。この標品は Fig. 10 にみられるように、非常に高い抗体結合能を保持していたが、 4°C で保存すると急速に活性を失ったので、0.2

15 % BSA 中、 -20°C で保存した。しかしこの場合でも 2 カ月後の標品の最大結合割合は約 50-60 % に減少したため、標識した抗原はなるべく早い時期に用いるようにした。

RIA を成功させるためのひとつの大きなポイント は、抗体に結合した放射活性抗原 (B:

bound) と遊離のとき (F: free) とを分離する方法の選択にある。本研究では、B/F 分離に最近主流になりつつある固相法を用いることとした。これはあらかじめ抗体をプラスチック壁やゲルマトリックスに固定化し、阻害剤や標識抗原と反応終了後、固定相を洗浄してそのままカウンターにかける、という極めて簡便な方法である。欠点としては、他に比べ感度が良くない、誤差が大きい、吸着したかった抗体を捨てるので無駄になる (しかし回収することもできる) などが挙げられるが、これはあくまでも他の液相法に比べこのことである。B/F 分離の簡便さには比べたら大きな問題ではない。

抗体のポレートウエルへの吸着を Table 2 と Fig. 9 にまとめた。約 0.3 cm^2 のプラスチック表面に最大 $0.6 \mu\text{g}$ の抗体が吸着した。このとき加えた全抗体量は $30 \mu\text{g}$ ($1 \text{ mg/ml} \times 30 \mu\text{l}$) であるから吸着した割合は 2% であった。一方 $0.13 \mu\text{g}$ ($4.2 \mu\text{g/ml} \times 30 \mu\text{l}$) 加えたとき、 $0.10 \mu\text{g}$ (80%)

の抗体が吸着した。従って、吸着容量（この場合約 $0.6 \mu\text{g}$ ）の $\frac{1}{5}$ 以下の抗体溶液であれば、ほぼ定量的に吸着された。RIA に用いた被覆用抗体濃度は $0.05 - 0.01 \text{ mg/ml}$ （第二章参照）なので、ウエルに入れた抗体はほとんどが吸着したと考えられる。

プラスチックへ一度吸着したたんぱく質は普通の緩衝液はもちろん界面活性剤でも遊離しなかった（データ不掲載）。また、たんぱく質の吸着する程度が同じ種類のプラスチックでも違うことがあるので、製造元やロットが変わったときはタイトレーション実験を行った。

次に ^{125}I -標識 AK を用い抗体のタイトレーションを固相で測定した（Fig. 10）。横軸の抗体希釈度は反応に用いている抗体濃度ではなく、被覆に用いた濃度である。用いた ^{125}I -AK は、ヤギ抗血清から免疫吸着体を用いて精製した特異抗体（anti-AK）と最大 80% 結合した。結合しなかった 20% は変性した AK か

または遊離の ^{125}I と考えられる。一方、 ^{125}I -AK はヤギ抗血清 IgG 画分と最大でも 20% が反応したにとどまった。これはおそらく、この IgG 画分に AK に特異的でない抗体等が多く混在しており、ウエルに十分量の特異抗体が吸着しなかったためと考えられる。このとき、非特異的吸着は 2-3% であつたが、後の ^{125}I -AK 標品では 0.5-1.0% であつた。

^{125}I -標識 AK と非標識 AK の抗体に対する親和性を比較した (Fig. 11)。標識 AK は非標識 AK とほぼ同量でその 50% が阻害されたので、ヨード標識による抗原活性の変化は認められなかった。

RIA に用いた標識 AK は約 0.01~0.05 p mole であつたが、無関係のたんぱく質による非特異的阻害が 1 n mole あたりでもたらされる場合がときどきあつた。これはおそらく、阻害剤を 1 n mole 加えたときに反応液中の全たんぱく質濃度が急激に変化する二に起因すると考えられる。すなわち、反応液には抗体 BSA

が 2mg/ml の濃度で加えられているが、 0.1n mole 以下の阻害剤を加えたとしても全たんぱく質濃度はほぼ BSA の濃度、 2mg/ml に等しいと言える。しかし、阻害剤を 1n mole 入れると、もしこれが分子量 2 万のたんぱく質であれば、全たんぱく質濃度は約 2.6mg/ml になり、濃度が大幅に変化してしまう。従って、RIA の阻害剤濃度はたんぱく質濃度の変化しない、 1n mole 以下、とした。

このような固相法 RIA で約 100 個の試料を測定しようとするならば、用いるものはプレート 1 枚、抗体約 $2-10\text{ }\mu\text{g}$ (抗血清 $1-5\text{ }\mu\text{l}$ に相当)、標識抗原 (AK) $0.05\text{ }\mu\text{g}$ 、阻害剤 (M.W. 5,000 のペプチド) $20-30\text{ }\mu\text{g}$ である。定量沈降反応のそれと比べると非常に少ない試料で測定することが出来る。しかし誤差はやや大きく、初期の頃は $5-10\%$ もあったが、操作に慣れるに従い、 $2-3\%$ 程度に収まるようになった。

第二章

3つのCB-フラグメント, CBb(2-56),
CBfN(81-125) および CBfC(126-194) の交差
5 反応性と フラグメント 1-24 の抗原活性

10

15

5

10

15

材料と方法

材料

ブタ骨格筋 AK およびその CNBr 分解で得られた 3 つの大きなフラグメント, CBb(2-56), CBfN(81-125), と CBfC(126-194) の調製については第一章に述べた。ヤギ抗ブタ AK 血清は佐藤によつて調製されたものを用いた(1)。2-ニトロ-5-チオシアノ-安息香酸(NTCB)は Degani と Patchornik の方法(31)に従つて調製し、融点の測定および 2-メルカプトエタノールとの反応で生成するニトロチオ安息香酸の分光滴定とによつて検定した(31)。使用した他の材料は以下のとおり: ジチイニトロ安息香酸は半井化学薬品、ラクトペルオキシダーゼと牛血清アルブミンは Sigma Chemical 社、ポリビニルミクロタイタープレートは Dynatech 社、 Na^{125}I は RCC Amersham 社、Sephadex および

Sephacrose は Pharmacia Fine Chemicals 社, Σ L Z,
Bio Gel は Bio-Rad Laboratories 社 から Σ L Z" L 購
入した。他の薬品は Σ L Z 特級品を用いた。

方法

特異抗体 (anti-AK, anti-CBb および non-anti-
CBb) の調製

Sephacrose 4-B を March の方法 (32) に従っ
て、2M Na_2CO_3 中、CNBr で活性化 (CNBr-
activated Sepharose 4B) し、続いて PBS 中、AK
および CBb を Σ L Z" L CNBr-activated Sepharose
4-B に結合させた。AK は 23.2 mg が 10 ml (
packed volume) の Sepharose に結合 (AK-Sepharose)
し、CBb は 5 mg が 7 ml (同上, CBb-Sepharose)
に結合した。3 ml のヤギ抗マウス AK 血清を
56°C, 30 分インキュベートして補体を非働化
し、PBS に平衡化している AK-Sepharose 4B

カラム (1.3 x 5 cm) にかけた。カラムを PBS で十分洗浄後、カラムに吸着した物質を 0.1 M グリシン-塩酸緩衝液で溶出した。溶出した画分は 1 M リン酸緩衝液、pH 7.6 で速やかに中和し、PBS に透析した。免疫吸着体によつて精製された AK に対する抗体 (anti-AK) は、免疫電気泳動で IgG と同定され、収量は 18 mg であった。さらにこの anti-AK 抗体を CBb-Sephadex 5B にかき、CBb に対する抗体と CBb に特異的でない抗体とに分画した。精製 anti-AK 抗体、5 mg を PBS に平衡化した CBb-Sephadex 5B カラム (1.2 x 5 cm) にかき、素通り画分 (non-anti-CBb, 2.1 mg) を集め、カラムを PBS で十分洗った。吸着抗体は 0.1 M グリシン-塩酸緩衝液 (pH 2.5) で溶出した (anti-CBb, 2.9 mg)。この緩衝液で溶出した画分は、1 M のリン酸緩衝液 (pH 7.6) で速やかに中和し、PBS に透析した。精製した抗体は 0.02 % NaN₃ を含む PBS 中に 4°C で保存した。

NTCBによる AK の切断と、フラグメント 1-24 の精製

AK のシステイン残基での切断は、基本的には Degani と Patchornik (33) と Jacobson ら (34) の方法に従った。結晶 AK (9 mg) を 2 ml の 6 M グアニジン-塩酸-0.2 M トリス酢酸緩衝液 (pH 8.0) に溶かし、全チオール基のやや過剰量のジチオスレート存在下、室温で 1 時間放置した。全チオール基の 5 倍モル過剰の固体 NTCB を反応混液に加え、NaOH で pH 8.0 に合わせた。20 分後、反応混液を氷酢酸で酸性 (pH 4) にし、50% 酢酸に対し 2 時間透析後、Sephadex G-25 カラムを用いて同じ溶媒で脱塩した。水浴中、ちっ素ガスで乾燥後、S-シアノ化 AK を 2 ml の 6 M グアニジン-塩酸-0.1 M ホウ酸ナトリウム緩衝液 (pH 9.0) に溶かし、溶液を NaOH で pH 9.0 に合わせた。反応混液を 37°C で 24 時間インキュベートし、氷酢酸で溶液を酸性 (pH 4) にした。次にこれを 0.1 M 酢

酸に平衡化している Bio-Gel P-10 カラム (1.8 × 180 cm) にかき、5.4 ml/h の流速で同じ溶媒を用い溶出した。溶出液の 206 nm の吸収を UV-モニター, LKB 2138 で検出し、3 ml ずつ集めた。

たんぱく質の定量

たんぱく質溶液の濃度は 280 nm の吸収により決定した (AK とヤギ IgG の $\epsilon_{1\%}^{1\text{cm}}$ はそれぞれ 5.38 (35), 14.0 (36))。

アミノ酸分析

ペプチドのアミノ酸分析については、第一章に述べた。

親水性配列 (Hydrophilicity) の分析

AK の アミノ酸配列のうち、一連の6残基
すの部分配列について、その親水性、疎水
5 性の程度を Hopp と Woods の方法(2)に従って
計算した。

立体構造の解析

AK の X線結晶解析より得られた立体モデル
10 の空間座標データは、大阪大学蛋白質研究
所附属結晶解析研究センターのデータバンク
より提供された。このデータに基づき、全アミ
15 ノ酸残基の α 炭素原子を結ぶワイヤモデル、
また炭素、酸素、窒素、酸素およびイオン原子か
ら成る特定部分の立体モデルをコンピュータ
ーにより作画した。

結 果

NTCBによるシステイン残基における特異的
5切断と、フラグメント1-24の精製

AKを6M Guanidine-Hydrochloride中、pH 8.0で
NTCBを用いてS-シアノ化し、同じ変性剤中、
pH 9.0で特異的に切断した。反応混液を0.1M
10酢酸に平衡化したBio-Gel P-10カラムにかけ、
同溶媒を用いて溶出した。Fig. 12はその溶出
パターンである。それぞれのピークを集め凍
結乾燥後、 -20°C で保存した。Fig. 12中、横
線で示した小ピークのアミノ酸組成は、
15AKのアミノ酸配列、1-24に期待される組成
を持つていた (Table 2)。加水分解物中のイ
ソロイシンとバリンの低い値は、Ile-Ile (10-11)
と Val-Val (13-14) のペプチド結合による。これ
らの結合は、酸加水分解に抵抗性である (37)。
免疫活性の測定のために、フラグメント1-24

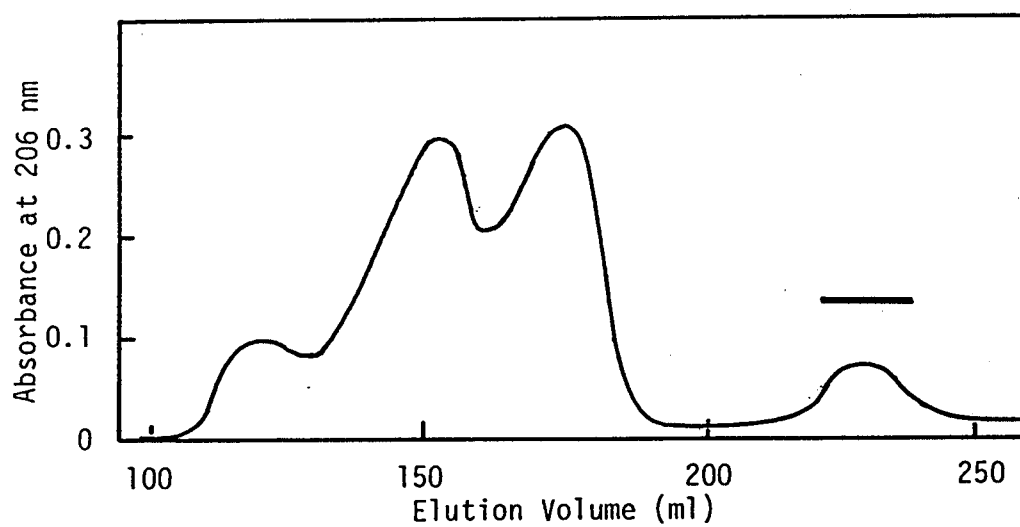


Fig. 12. Gel chromatography of fragment mixture obtained by NTCB-cleavage of AK. Fragment mixture (9 mg) was applied to a Bio-Gel P-10 column (1.8 x 10 cm) equilibrated with 0.1 M acetic acid. Conditions of chromatography were as follows: solvent, 0.1 M acetic acid; flow rate, 5.4 ml/h; fraction size, 3 ml/tube.

Table 2. Amino acid composition of the fragment 1-24 of porcine adenylate kinase from skeletal muscle^{a,b}

Amino acid residue	1-24	
	Found	Theory ^c
Asx	0.08	0
Thr	0.92	1
Ser	1.72	2
Glx	3.14	3
Pro	1.11	1
Gly	5.00	5
Ala	0	0
Val	1.57	2
Met	0.97	1
Ile	1.36	2
Leu	1.14	1
Tyr	0	0
Phe	1.02	1
Lys	4.63	5
His	0	0
Arg	0	0
Total	22.66	24

^aHydrolysis was done in 6 M HCl at 110°C for 22 hr under vacuum.

^bValues are molar ratios with respect to glycine as 5.

^cHeil *et al.* (20)

は、上記の方法でさらに2度クロマトグラフィーをくり返した。この標品は pH 6.0 のセルロース薄層電気泳動で2つのスポットを与えた(第三章参照)が、両者のアミノ酸組成に違いはみられなかった。また、ダンシル法によっても両者からN末端アミノ酸は検出されなかった。アミノ酸組成に違いがなかったのて、基本的には均一な標品と考え、これを免疫化学的活性の測定に用いた。

抗体の精製

AK に対する特異抗体は、AK-Sepharose 4B カラムを用いてヤギ抗血清より精製した (Fig. 13)。3 ml の抗血清から 20 mg の抗体 (anti-AK, これは免疫電気泳動で IgG と同定された) が得られた。カラムに吸着した抗体を 0.1 M グリシン-塩酸緩衝液 (pH 2.5) で溶出したのち、10% ジオキサンを含む同緩衝液をさらにカラ

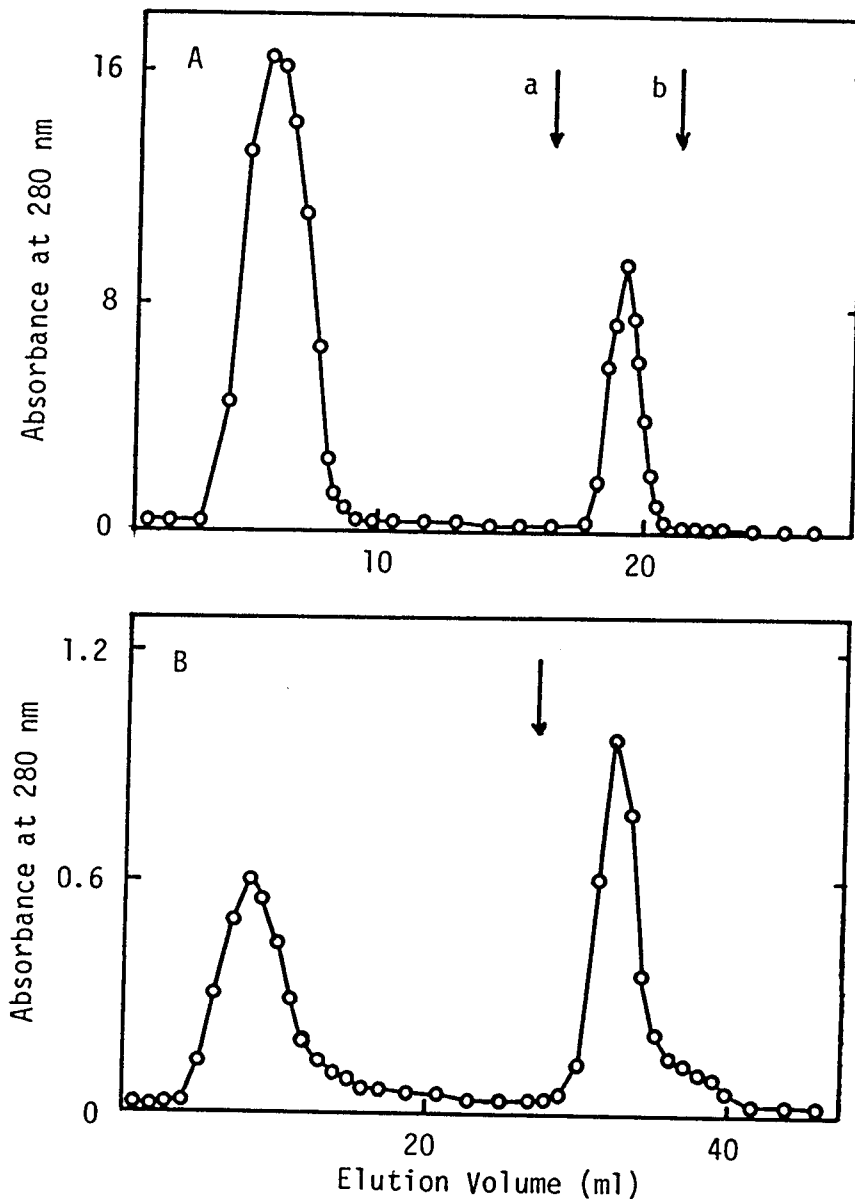


Fig. 13. Purification of antibody specific to adenylate kinase and to CBb(2-56). A) The antibody specific to AK(anti-AK) was purified with an AK-attached Sepharose 4B column. A 3ml aliquot of goat antiserum containing 10 mM EDTA was applied to an AK-Sepharose column equilibrated with PBS. Material adsorbed was eluted with 0.1 M glycine-HCl buffer, pH 2.5 (the arrow a), and with 10 % dioxane containing the same buffer (b). B) Anti-AK (5 mg) was applied to a CBb(2-56)-Sepharose column. Non-anti-CBb was eluted at a void volume (the first peak), and anti-CBb was with 0.1 M glycine-HCl buffer, pH 2.5 (the second peak).

4 にかけても、それ以上の物質はカラムから溶出されなかった。Fig. 13.B は anti-AK から、CBb (2-56) に特異的な抗体画分を精製したときのクロマトグラムである。5 mg の anti-AK を⁵ CBb-Sephavose カラムにかけたとき、2.1 mg (42%) の抗体がカラムを素通りし (non-anti-CBb)、残りの 2.9 mg (58%) が 0.1 M グリシン - 塩酸緩衝液、pH 2.5 で回収された (anti-CBb)。

10 精製抗体の ¹²⁵I-AK に対する固相上でのタイトレーション

Fig. 14 は、精製した 3 つの抗体画分 (anti-AK, anti-CBb および non-anti-CBb) の、¹²⁵I-AK (0.05 pmole) に対するタイトレーション曲線を示している。anti-AK, anti-CBb, および non-anti-CBb に対する ¹²⁵I-AK の最大結合はそれぞれ 82, 88, および 60% であった。阻害試験 (RIA) において抗体の吸着に用いられる抗体

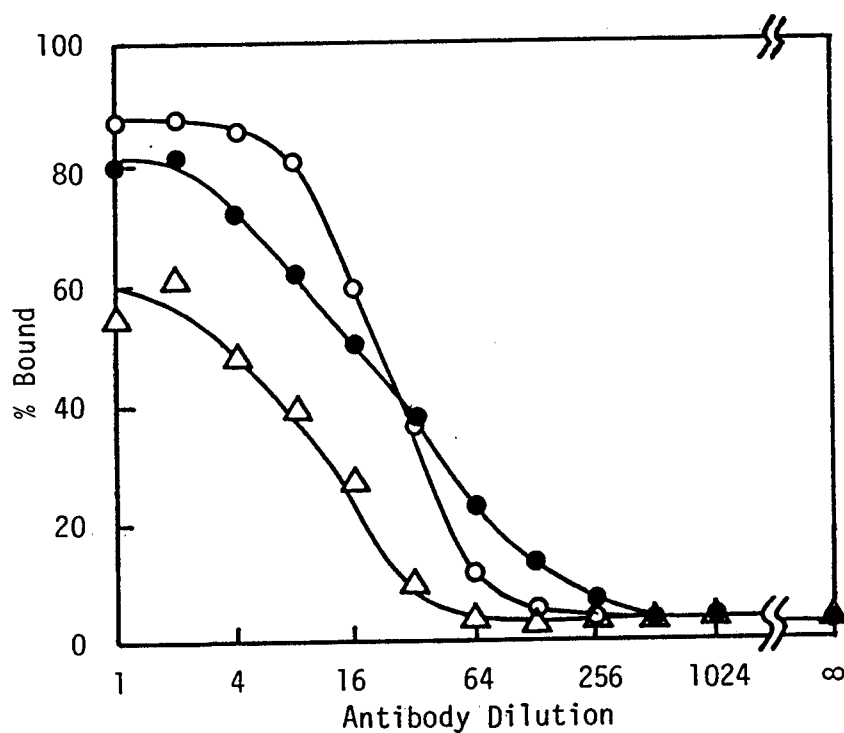


Fig. 14. Titration studies of purified antibodies on polyvinyl surface. Aliquots of antibody solution ((●) anti-AK; (○) anti-CBb; (△) non-anti-CBb) were added to microtiterplate wells in serial dilutions (two fold). After each well was washed and treated with 0.2 % BSA, a fixed amount of ^{125}I -AK was added and incubated overnight. Percentages of bound radioactivity to added were shown.

濃度は、それぞれの曲線から、加えた抗原の最大結合量の60-70%を結合するような濃度が選ばれた。たとえば、anti-CBbでは、16倍希釈液 ($19 \mu\text{g}/\text{ml}$) が阻害試験に用いられた。

精製抗体と標識AK間の反応の、ペプチドフラグメントによる阻害実験

フラグメントの、anti-AK, anti-CBb, および non-anti-CBb との反応を Fig. 15 に示した。

anti-AK との反応では (Fig. 15 a)、AK と CB-フラグメント混合物は両者共に標識した抗原の結合を完全に阻害しており、阻害活性という

点でこれらを互いに区別することはできなかった。精製したフラグメント、CBfN (81-125) と

CBfC (126-194) は、CBb (2-56) と同様にラベルした

AK と anti-CBb との結合を部分的に阻害した

(Fig. 15 b)。この実験結果は、3つのCB-

フラグメント、CBb, CBfN および CBfC は anti-

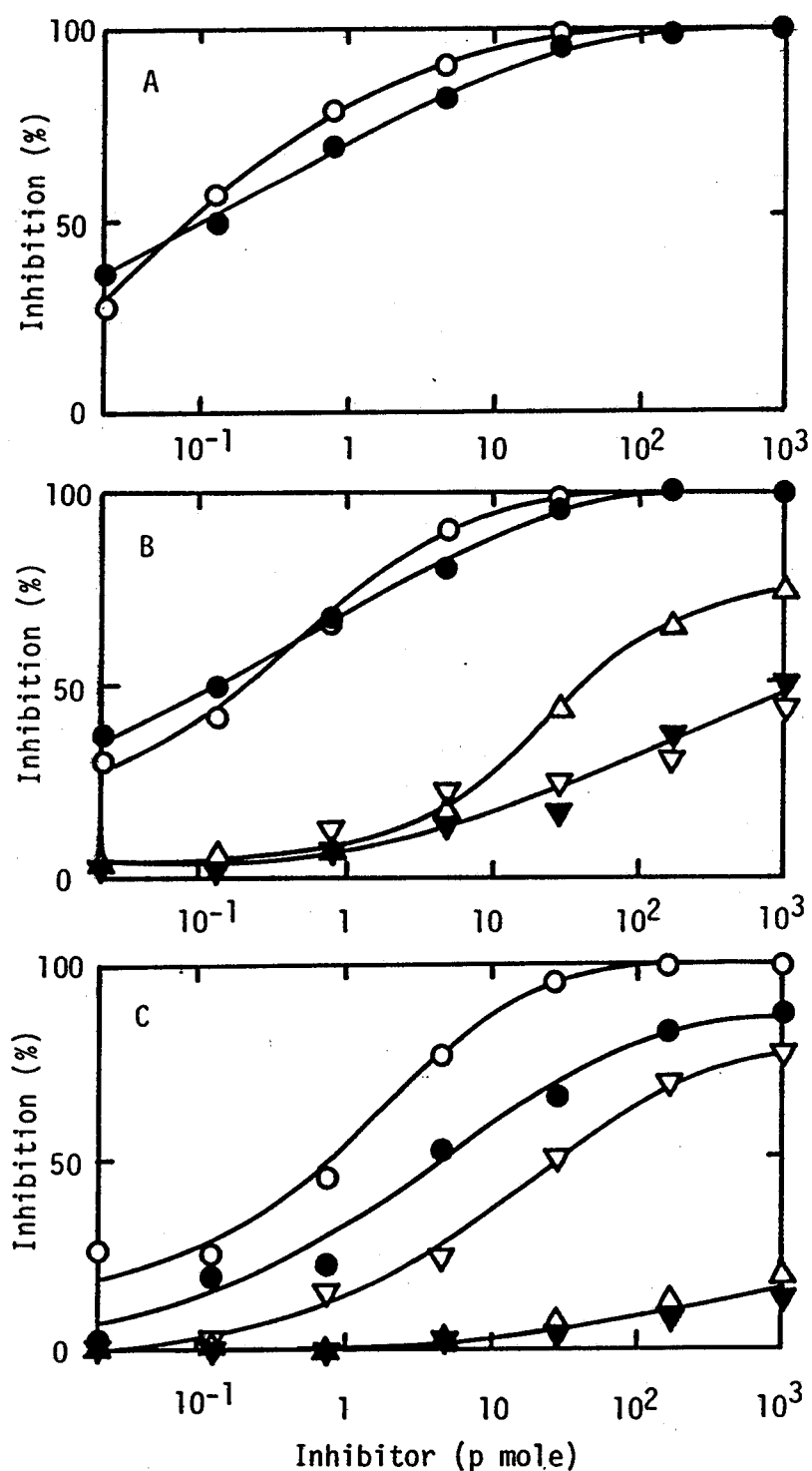


Fig. 15. Inhibition of the reaction between ^{125}I -AK and purified antibodies on solid phase. A fixed amount of antibody [(A) anti-AK; (B) anti-CBb; (C) non-anti-CBb] was coated to polyvinyl microtiter plate well and incubated with each inhibitor: (○) AK; (●) CB-fragments mixture; (△) CBb(2-56); (▽) CBfN(81-125); (▼) CBfC(126-194) at various concentrations. ^{125}I -AK was then added and incubated overnight. The radioactivity bound was counted.

CBb に対し互いに交差反応することを示している。non-anti-CBb と反応するのは、3つの CB-フラグメントの中で CBfN のみであった (Fig. 15c)。CB-フラグメント混合物は、anti-CBb に対しては AK と同じくらいの活性があるが、一方、non-anti-CBb に対する親和性は AK よりも減弱していた。

10 フラグメント 1-24 による阻害

Fig. 16 は、anti-CBb に対する CBb(2-56) とフラグメント 1-24 の結合活性の比較を示している。フラグメント 1-24 は CBb と同じか、むしろやや強い結合力を持っていた。従って、CBb(2-56) の抗原決定基はその N 末端側の 1-24 にあることがわかった。

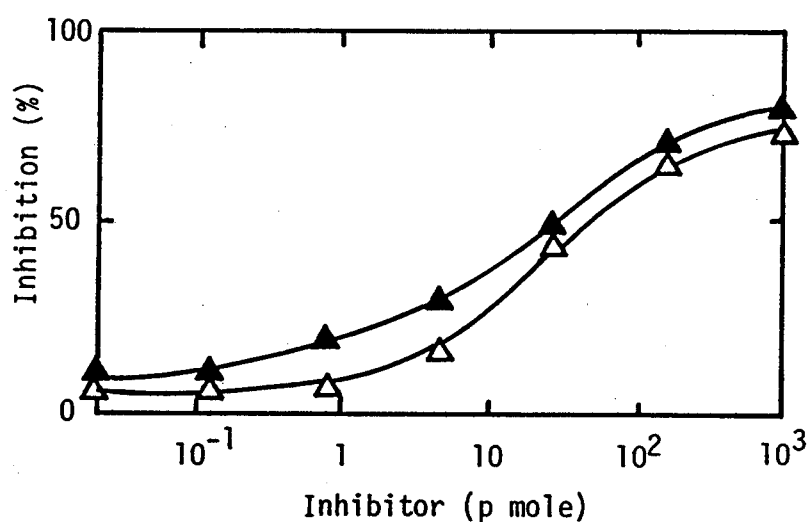


Fig. 16. Inhibition of the reaction between ^{125}I -AK and anti-CBb by fragment 1-24 and CBb(2-56). A fixed amount of antibody was coated to polyvinyl microtiterplate well and incubated with each fragment at various concentrations. ^{125}I -AK was then added and incubated overnight. The radioactivity bound was counted. Inhibitors: (Δ) CBb(2-56); (▲) 1-24.

考 察

佐藤の研究(1)において、AKの各CB-フラグメント、CBb(2-56)、CBfN(81-125)、およびCBfC(126-194)は足量沈降反応阻害実験で非常に強い阻害活性を有することが示された。佐藤は、この高い阻害活性が各フラグメント間の交差反応性によるものと推察した。本章に述べた実験では、フラグメントの交差反応性を検討するためにCBbに特異的な抗体を精製し、この抗体画分に対する他のフラグメントの反応性を調べた。CBbを選んだのは、このフラグメントの収率がいちばん良かったからである。

一連の阻害実験(Fig. 15)で以下のことが示された。(1): CBfN(81-125)とCBfC(126-194)が、¹²⁵I-AKとanti-CBb(2-56)とが結合するのを阻害した(Fig. 15, b)ので、CB-フラグメント間に交差反応性が存在することが証明された。CBfNと

CBfC が 50% 阻害に到るに必要な量は、CBb に比べて Fc が 10-30 倍モル過剰に過ぎなかった。この事実は、これらの 3 つのフラグメントが構造上よく似た抗原決定基を持っていることを示唆している。(2): CB-フラグメント混合物は、anti-AK と anti-CBb に対し、インタクトな AK とほぼ同等の反応性を保っていた。CB-フラグメント混合物は抗原活性領域についてインタクトな酵素の 3 つ構造に非常によく似た構造を再構築していると考えられる(45)。

(3): CBfN には、交差反応性を担う抗原活性部位の他に、CBfN に特異的な(交差反応性に関与しない)抗原決定基が存在していた。CBfN は non-anti-CBb と反応したが、CBb と CBfC は反応しなかった(Fig. 15C)。従って CBfN は、交差反応性に関与する決定基と、CBfN にのみ特異的な決定基の 2 種類の抗原決定基を持っていた。

Fig. 15b で CBb は部分的にしか反応を阻害しているが、大過剰の CBb を添加すれば反応は完全に阻害されると思われる。溶液中の単

離されたペプチドフラグメントは、無数のほどけた (unfolded) コンホメーションをとって存在すると考えられている。従って、溶液中のペプチドの極一部分だけがもとのコンホメーション (インタクトなタンパク質中でそのペプチドが持っていた一定の決まった folding の仕方) に近づいている、と推察される。反応液中の CBB の一部の集団が抗原活性部位において native folding を持ち、この集団のみが抗体との結合において AK と競争することができると考えられる。RIA ではとれ故、フラグメントの阻害は効果的ではない。

一個のタンパク質分子内の決定基間におこる交差反応性について、以前報告されている例に血清アルブミンがある (38, 39)。血清アルブミンは3つのドメインから成り、これらはひとつの前駆遺伝子の重複によって今の分子を構築したと考えられている。これらのアルブミンのドメインは、アミノ酸配列や立体構造に関して非常に高い相同性を持っている。

いま仮にアルブミンのひたつのドメインに存在する決定基に対して抗体が生じたとする。

もし、他のドメインのその決定基に相当する領域でアミノ酸置換が免疫特異性を変えない範囲内で生じているならば(アミノ酸置換が限定されているならば)、この抗体は他のドメインとも相互作用すると想像できる。ウシ血清アルブミンの交差反応性は、実に、ドメイン構造のくり返しによつて生じると報告されている(40)。

ブタAKに対するヤギ抗血清は抗原分子の複数箇所に反応する抗体亜集団を含んでいたが、しかし、AKは血清アルブミンのようなドメイン構造のくり返しからは構成されていない。一次構造と高次構造をよく考慮して、著者らは交差反応性に関する可能性のあるアミノ酸配列を提示した。それは：

Glu-Glu-Lys-Leu-Lys-Lys (2-7) in CBb
 -Glu-Glu-Phe-Lys-Arg-Lys (103-108) in CBfN と
 -Glu-Glu-Thr-Ile₅-Lys-Lys₁₅ (143-148) in CBfC

である。これらの配列はすべて共通に Glu-Glu-X-X'-Lys(or Arg)-Lysで、各配列のすべて、あるいはほとんどの残基がインタクトの酵素分子中でらせん構造をとっている(20)。

5 Fig. 17 に α 炭素原子を結んだ AK の立体的模式図を示す。上記の 3 つの類似配列 2-7, 103-108, および 143-148 はすべて分子表面上、互いに離れて位置している。これらの 3 つの配列のすべて、あるいはほとんどの残基が α -ヘリックスを構成しているが、N 末端側の 2 つの酸性アミノ酸残基と C 末端側の 2 つの塩基性アミノ酸残基のそれぞれが表面に突出していると考えられる。配列 2-7 はその全体が AK 分子より突出しているように見える。さらに

10 これら 3 つの部分配列の微細についで、側鎖の空間配座を Fig. 18 に示した。これらは比較のために、紙面の上下方向を α -ヘリックスの軸とし、ペプチド結合の $N \rightarrow C$ が紙面の左下から右上へ回転して昇って行くように置いた。

15 Fig. 18 A~C のいずれも左下と中下に酸性側鎖

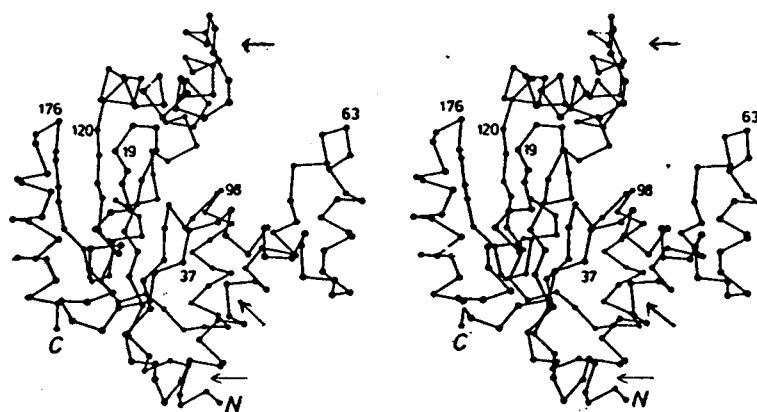
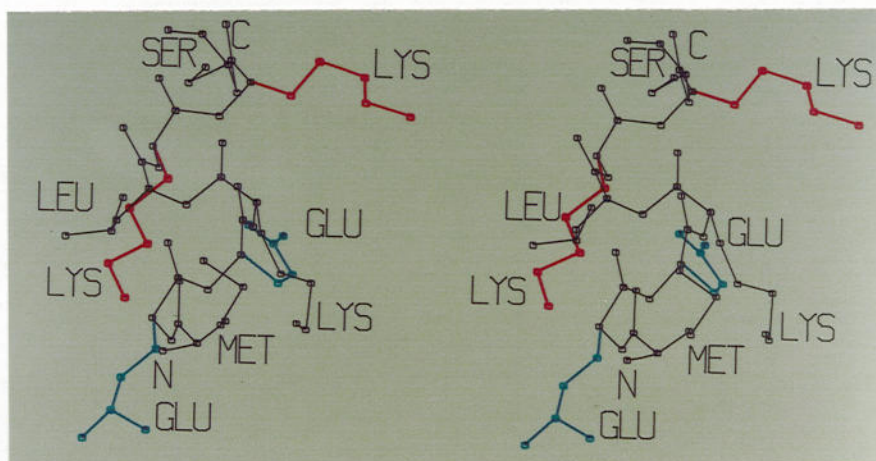
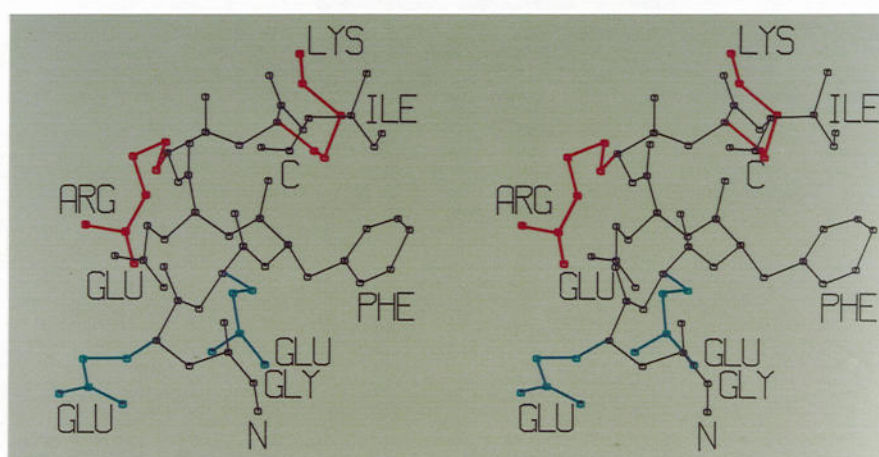


Fig. 17. Three-dimensional structure (α -carbon) of AK(22). Three sequences, 2-7; 103-108 and 143-148 were indicated by arrows.

1 - 8



102-109



142-149

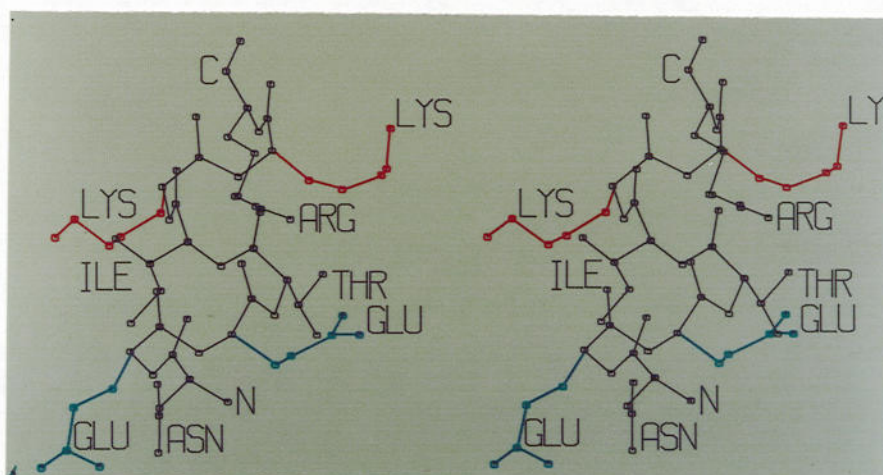


Fig. 18. Stereo drawing of the sequences, 1-8, 102-109 and 142-149 in the crystalline AK molecule. The acidic and basic amino acid side chains, which push out from molecular surface to outside, are colored in blue and red, respectively.

が、中上と右上に塩基性側鎖がそれぞれ位置
してゐるので、これらの分子表面における電
荷の空間配置はすべて同じと考えることがで
きる。もし抗体がこの表面構造とのみ相互作
用するとすれば、分子内に埋没してゐる各配
列の中央の2残基の違いは特異性に大きな影
響を与へないだろう。

しかしながら、Fig. 18 に示したこれらの側
鎖の立体配置はAK分子の結晶状態で求めら
れたものである。これらは溶液中で、ある程
度不特定な、大きな自由度を有して存在して
いる可能性もあるが、分子表面上の電荷の空
間的な分布という点では3者の間に際立った
違いはないであろう。また、抗体が近づいた
り結合するときには、これらの鎖側がその抗
原結合部位に沿って一定の配座をとると思わ
れる。これは、酵素と基質の相互作用におけ
る、induced-fit の関係に似てゐる(41)。

「序論」において言及したように、たんぱ
く質の抗原決定基の場所を一次構造から推定

しようとする Hopp と Woods の研究 (2) がある。

これは、抗原抗体反応の多くは静電的な相互作用によるから、抗原分子の親水性ア

ミノ酸残基の多く集まる、という場所を同定す

ること、抗原決定基を推定しようとするも

のである。方法の概略は、各アミノ酸に親水

性を表わす特定の値を割り振り (Table 3)、一

次構造上前後の残基 n の平均の hydrophilicity を

求める。アミノ酸配列 n 番目から $n+5$ 番目ま

での 6 残基の hydrophilicity は、それぞれのアミ

ノ酸残基特有の親水性の値を H_n とすれば、

$$\text{Hydrophilicity}_{(n \sim n+5)} = \frac{1}{6} \sum_{i=n}^{n+5} H_i$$

で与えられる。マッユウジラミオグロビン

の場合、ピークは約 10 あり、報告されている

抗原決定基は 5 つある (5)。5 つの決定基の

すべてが hydrophilicity のピークに存在する。こ

の例だけに限って議論するならば、hydrophilicity

のピークすべてが決定基とはならないが、決

Table 3. Hydrophilicity values

Amino acid	s,* kcal/mol	Hydrophilicity value
Arginine	3.0	3.0
Aspartic acid	2.5	3.0
Glutamic acid	2.5	3.0
Lysine	3.0	3.0
Serine	0.3	0.3
Asparagine	0.2	0.2
Glutamine	0.2	0.2
Glycine	0.0	0.0
Proline	-1.4	0.0
Threonine	-0.4	-0.4
Alanine	-0.5	-0.5
Histidine	-0.5	-0.5
Cysteine	-1.0	-1.0
Methionine	-1.3	-1.3
Valine	-1.5	-1.5
Isoleucine	-1.8	-1.8
Leucine	-1.8	-1.8
Tyrosine	-2.3	-2.3
Phenylalanine	-2.5	-2.5
Tryptophan	-3.4	-3.4

* Solvent parameter values assigned by Levitt (6).

From Hopp & Woods, (2).

定基はすべてピークに存在することになる。
従って抗原決定基である可能性の高い領域を
選びだすことができる。

AK の hydrophilicity analysis の結果を Table 4 に

またそのプロファイルを図 19 に示す。AK
には hydrophilicity の大きなピークが3つ、小さ
なものが約10~12あり、谷(すなわち hydrophobic
な領域)が主に3つあることがわかる。ミオ
グロビンの例にならえば、AK の決定基はこ
れら hydrophilicity の高い部分にある可能性が強
い。そして、筆者らが実験と構造解析から導
いた抗原決定基の配列も、これら hydrophilicity
のピークに一致した。hydrophilicity の解析
でも、筆者らが抗原決定基として推定した配
列が強く示唆された。

次に、CBb の交差反応性決定基の位置を実
験的に確かめるために上に掲げた配列(2-7)
を含むフラグメント 1-24 を得た。CBb(2-56) の
N 末端側 42% と、CBb に欠けている配列 1 の
N - アセチルメチオニンとを持つこのフラグ

ADENYLATE KINASE				61	Met	-0.483	(-1.3)	128	Arg	1.150	(3.0)
				62	Glu	0.233	(3.0)	129	Leu	0.350	(-1.8)
HYDROPHILICITY ANALYSIS				63	Lys	1.033	(3.0)	130	Leu	0.117	(-1.8)
				64	Gly	0.983	(0.0)	131	Lys	0.833	(3.0)
NO	AA	average		65	Gln	0.517	(0.2)	132	Arg	1.400	(3.0)
				66	Leu	0.517	(-1.8)	133	Gly	0.900	(0.0)
1	Met	0.000	(-1.3)	67	Val	0.483	(-1.5)	134	Glu	0.900	(3.0)
2	Glu	0.000	(3.0)	68	Pro	-0.017	(0.0)	135	Thr	1.133	(-0.4)
3	Glu	0.000	(3.0)	69	Leu	-0.817	(-1.8)	136	Ser	1.483	(0.3)
4	Lys	0.000	(3.0)	70	Glu	-0.317	(3.0)	137	Gly	0.983	(0.0)
5	Leu	0.000	(-1.8)	71	Thr	-0.417	(-0.4)	138	Arg	0.983	(3.0)
6	Lys	1.483	(3.0)	72	Val	-0.367	(-1.5)	139	Val	0.733	(-1.5)
7	Lys	2.200	(3.0)	73	Leu	-0.417	(-1.8)	140	Asp	0.733	(3.0)
8	Ser	1.750	(0.3)	74	Asp	0.083	(3.0)	141	Asp	1.300	(3.0)
9	Lys	1.750	(3.0)	75	Met	0.167	(-1.3)	142	Asn	1.283	(0.2)
10	Ile	0.950	(-1.8)	76	Leu	-0.633	(-1.8)	143	Glu	1.783	(3.0)
11	Ile	0.950	(-1.8)	77	Arg	-0.067	(3.0)	144	Glu	1.783	(3.0)
12	Phe	0.033	(-2.5)	78	Asp	0.683	(3.0)	145	Thr	1.967	(-0.4)
13	Val	-0.717	(-1.5)	79	Ala	0.900	(-0.5)	146	Ile	1.167	(-1.8)
14	Val	-1.017	(-1.5)	80	Met	0.183	(-1.3)	147	Lys	1.167	(3.0)
15	Gly	-1.517	(0.0)	81	Val	0.150	(-1.5)	148	Lys	1.633	(3.0)
16	Gly	-1.217	(0.0)	82	Ala	0.367	(-0.5)	149	Arg	1.633	(3.0)
17	Pro	-0.917	(0.0)	83	Lys	0.367	(3.0)	150	Leu	0.833	(-1.8)
18	Gly	-0.500	(0.0)	84	Val	-0.383	(-1.5)	151	Glu	1.400	(3.0)
19	Ser	-0.200	(0.3)	85	Asp	0.200	(3.0)	152	Thr	1.633	(-0.4)
20	Gly	0.050	(0.0)	86	Thr	0.350	(-0.4)	153	Tyr	0.750	(-2.3)
21	Lys	0.550	(3.0)	87	Ser	0.650	(0.3)	154	Tyr	-0.133	(-2.3)
22	Gly	0.550	(0.0)	88	Lys	1.233	(3.0)	155	Lys	-0.133	(3.0)
23	Thr	0.483	(-0.4)	89	Gly	0.733	(0.0)	156	Ala	0.083	(-0.5)
24	Gln	0.517	(0.2)	90	Phe	0.567	(-2.5)	157	Thr	-0.483	(-0.4)
25	Cys	0.300	(-1.0)	91	Leu	-0.233	(-1.8)	158	Glu	0.083	(3.0)
26	Glu	0.800	(3.0)	92	Ile	-0.467	(-1.8)	159	Pro	0.467	(0.0)
27	Lys	0.800	(3.0)	93	Asp	-0.017	(3.0)	160	Val	0.600	(-1.5)
28	Ile	0.500	(-1.8)	94	Gly	-0.517	(0.0)	161	Ile	-0.200	(-1.8)
29	Val	0.317	(-1.5)	95	Tyr	-0.900	(-2.3)	162	Ala	-0.200	(-0.5)
30	Gln	0.317	(0.2)	96	Pro	-0.483	(0.0)	163	Phe	-0.550	(-2.5)
31	Lys	0.983	(3.0)	97	Arg	0.317	(3.0)	164	Tyr	-1.433	(-2.3)
32	Tyr	0.100	(-2.3)	98	Glu	1.117	(3.0)	165	Glu	-0.933	(3.0)
33	Gly	-0.400	(0.0)	99	Val	0.367	(-1.5)	166	Lys	-0.183	(3.0)
34	Tyr	-0.483	(-2.3)	100	Lys	0.867	(3.0)	167	Arg	0.617	(3.0)
35	Thr	-0.300	(-0.4)	101	Gln	1.283	(0.2)	168	Gly	0.700	(0.0)
36	His	-0.417	(-0.5)	102	Gly	1.283	(0.0)	169	Ile	0.817	(-1.8)
37	Leu	-1.217	(-1.8)	103	Glu	1.283	(3.0)	170	Val	0.950	(-1.5)
38	Ser	-0.783	(0.3)	104	Glu	1.283	(3.0)	171	Arg	0.950	(3.0)
39	Thr	-0.850	(-0.4)	105	Phe	1.117	(-2.5)	172	Lys	0.950	(3.0)
40	Gly	-0.467	(0.0)	106	Glu	1.117	(3.0)	173	Val	0.200	(-1.5)
41	Asp	0.100	(3.0)	107	Arg	1.583	(3.0)	174	Asn	0.233	(0.2)
42	Leu	-0.117	(-1.8)	108	Lys	2.083	(3.0)	175	Ala	0.450	(-0.5)
43	Leu	-0.117	(-1.8)	109	Ile	1.283	(-1.8)	176	Glu	1.200	(3.0)
44	Arg	0.333	(3.0)	110	Gly	0.783	(0.0)	177	Gly	0.700	(0.0)
45	Ala	0.317	(-0.5)	111	Gln	1.233	(0.2)	178	Ser	0.250	(0.3)
46	Glu	0.817	(3.0)	112	Pro	0.733	(0.0)	179	Val	0.250	(-1.5)
47	Val	0.067	(-1.5)	113	Thr	0.167	(-0.4)	180	Asp	0.717	(3.0)
48	Ser	0.417	(0.3)	114	Leu	-0.633	(-1.8)	181	Asp	1.300	(3.0)
49	Ser	0.767	(0.3)	115	Leu	-0.633	(-1.8)	182	Val	0.550	(-1.5)
50	Gly	0.267	(0.0)	116	Leu	-0.933	(-1.8)	183	Phe	0.133	(-2.5)
51	Ser	0.400	(0.3)	117	Tyr	-1.350	(-2.3)	184	Ser	0.133	(0.3)
52	Ala	-0.183	(-0.5)	118	Val	-1.600	(-1.5)	185	Gln	0.417	(0.2)
53	Arg	0.567	(3.0)	119	Asp	-1.033	(3.0)	186	Val	-0.333	(-1.5)
54	Gly	0.517	(0.0)	120	Ala	-0.817	(-0.5)	187	Cys	-1.000	(-1.0)
55	Lys	0.967	(3.0)	121	Gly	-0.517	(0.0)	188	Thr	-0.817	(-0.4)
56	Met	0.750	(-1.3)	122	Pro	-0.217	(0.0)	189	His	-0.483	(-0.5)
57	Leu	0.400	(-1.8)	123	Glu	0.667	(3.0)	190	Leu	-0.833	(-1.8)
58	Ser	0.533	(0.3)	124	Thr	0.850	(-0.4)	191	Asp	-0.367	(3.0)
59	Glu	0.533	(3.0)	125	Met	0.133	(-1.3)	192	Thr	-0.183	(-0.4)
60	Ile	0.233	(-1.8)	126	Thr	0.150	(-0.4)	193	Leu	-0.317	(-1.8)
				127	Lys	0.650	(3.0)	194	Lys	0.250	(3.0)

Table 4. Hydrophilicity analysis of AK. Averages of six-residue-hydrophilicity through AK molecule are shown. Values in parenthesis is hydrophilicity value of the amino acid its own. Details are described in the text.

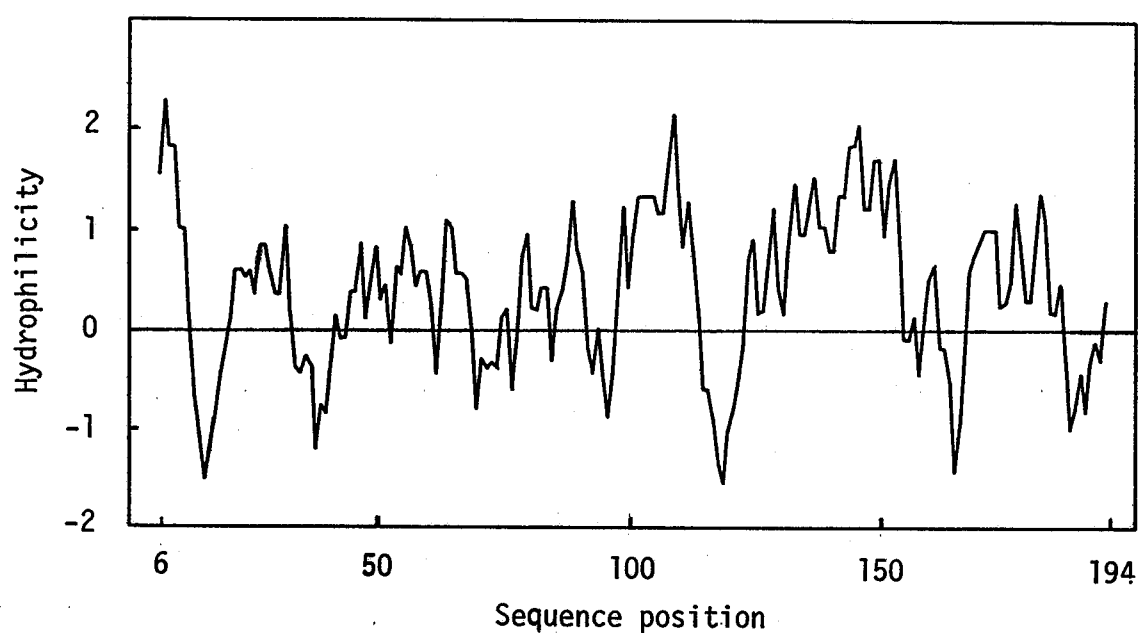


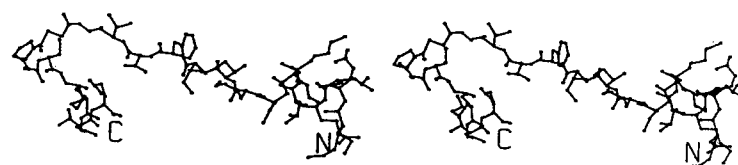
Fig. 19. Hydrophilicity analysis of AK. The six residue hydrophilicity average is listed opposite the last amino acid of the group. Therefore, the hydrophilicity average at n -th residue (i. e. from residue $n-5$ to n) will be given as:

$$\text{Hydrophilicity average}(n) = 1/6 \times \sum_{i=n-5}^n H_i$$

where H_i represents the own hydrophilicity value of amino acid residue given by Hopp & Woods (2).

メント 1-24 は、CBb とほぼ同じか、むしろ高い反応性を持つていることがわかった (Fig. 16)。従って CBb (2-56) の抗原性を支配する領域は主に配列 2-24 に存在していた。さらに、1-24 内の配列 10-18 はネイティフな AK 分子ではその内部に位置して (Fig. 17 と 20)、抗体と結合することか不可能だから、1-24 にある決定基は残りの部分 1-9、または 19-24 に存在していることになる。この発見は、CBb (2-56) 内の抗原決定基は 2-7 であるらしい、という佐藤の予想と一致した。さらに、この配列が抗原決定基であるから交差反応性の故に CBfN と CBfC の抗原決定基もこの 1-10 の中の配列に似たものであるだろう。

この章の結論として、3つの CB-7 ラグメント、CBb (2-56)、CBfN (81-125) および CBfC (126-194) 間の交差反応は、各フラグメント中の共通な配列、Glu-Glu-X-X'-Lys (or Arg)-Lys によって起こると考えられる。



WATANABE INSTRUMENTS CORP.

Fig. 20. Spatial structure of the sequence 1-24 in crystalline AK molecule.

第三章

フラグメント 1-24 の化学修飾とキモトリ
アシンによる細分化ペプチドの抗原活性

材料と方法

材料

AK のフラグメント 1-24 の調製は第二章に述べた。特異抗体、anti-CBb は第二章に述べた方法で調製した。

グアニジン塩酸（特級）は PIERCE 社より、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドとメキモトリフィン は Sigma 社より購入した。セルロース薄層シートは KODACK 社の製品を用いた。Bio-Gel P-4 は Bio-Rad Laboratories 社より購入した。

用いた他の試薬はすべて特級品を用いた。

方法

フラグメント 1-24 のサクシニル化

- 5 Chu らの方法 (42) に従い、フラグメント 1-24 をサクシニル化した。フラグメント 1-24 (1.1 mg) を 0.5 ml の 6 M グアニジン - 塩酸 - 0.1 M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 8.0) に溶かし、攪拌しながら固体の無水コハク酸 (5 mg) を
- 10 10 分ごとに 7 回加えた。この間、pH ステットを用いて 5 M NaOH で反応液を pH 8 に保った。反応終了後、固体のヒドロキシルアミン塩酸塩を終濃度 1 M にするように加え、pH 10 で室温に 1 時間放置した。酢酸で pH 5.3 にした反
- 15 応液を、0.1 M 酢酸 - コリジン緩衝液 (pH 5.35) に平衡化した。Bio-Gel P-4 カラム (1.9 × 25 cm) で脱塩し、凍結乾燥した。修飾率を調べるために、1-24 およびサクシニル化 1-24 のアミノ基を TNBS 法 (43) で検出した。

カルボキシル基のアミド化

Carraway と Koshland の方法 (44) を用い、フラグメント 1-24 のカルボキシル基をアミド化した。ペプチド (1.7 mg) とグリシンメチルエステル塩酸塩 (終濃度 1 M) を 5.0 M グアニジン-塩酸溶液 (0.85 ml) に溶かし、pH 4.75 に調節した。この溶液に 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドを固体のまま 10 mg 加えた。反応中は 2 M HCl を加えて pH 4.75 に保った。反応後 1 M 酢酸緩衝液 (pH 4.75) を加えて過剰のカルボジイミドを分解し、反応物を 0.1 M 酢酸に平衡化した Bio-Gel P-4 カラム (1.9 × 25 cm) で脱塩し、凍結乾燥した。修飾率はアミノ酸分析で計算した。

フラグメント 1-24 のキモトリプシン分解

フラグメント 1-24 (1.17 mg) を 0.05 M ホウ

5 酸緩衝液, 500 μ l (0.2 mM N - α - p - トシ
 ル - L - リジン - γ ロロナチルケトン塩酸塩
 を含む) に溶解した。これに、0.001 M 塩酸に
 1 mg/ml になるように溶かし、 α - キモトリ
 70 シン溶液を 4 μ l 加え、35°C で 1 時間反応させ
 た。1 M 塩酸を滴下し反応を止め、ちっ素ガ
 スを吹きつけ、約 100 ml に濃縮した。

10 フラグメント 1-24 のキモトリフィンペプチ
 ドの精製

セルロース薄層シート (20 x 20 cm) の片端
 から 7 cm のところに、連続的に全量の上記反
 15 応混液を風乾させながらつけた。シンフォルを
 つけた短い側を $\oplus$ 極、長い側を $\ominus$ 極とし、 L
 リジン : 酢酸 : 水 = 100 : 30 : 300 の組成の溶媒
 を用い、500 V の定電圧下、2.5 時間電気泳動し
 た。このとき、マーカーとして用いたメチル
 グリールは、 $\ominus$ 極側へ原点から 70 mm 泳動され

た。溶媒を冷風でよく乾燥させたのち、泳動方向に沿った両末端約15 mmずつと真中の5 mmの帯をセルロースシートから切り落とし、これらの本をニンヒドリン発色させてペフキド⁵の泳動位置を同定した。残りの未発色の部分で相当する泳動位置のセルロースをかきとり、0.01 M HCl でペフキドを抽出した。凍結乾燥後、アミノ酸分析でこれらを同定した。クロマトグラム上不均一のペフキド画分は、別な¹⁰溶媒系（ギ酸：酢酸：水 = 5 : 15 : 80）を用い、上記と同様な方法でさらに電気泳動を行ない精製した。

¹⁵ アミノ酸分析

第一章で述べた方法と同じ方法を用いて行った。

フラグメントの抗原活性の測定.

第二章に述べたラクトペルオキシダーゼ法でCBbを放射活性ヨード化した。この¹²⁵I-CBbとanti-CBb抗体（第二章参照）との結合反応の阻害活性を、各フラグメントについて調べた。この阻害実験も第二章に記述した方法を用いた。

結 果

1 フラグメント 1-24 の化学修飾.

フラグメント 1-24 のアミノ基のサクシニル化は定量的に進行し、サクシニル化 1-24 標品は TNBS 法によるトリニトロフェニル化が全くおこらなかった (Table 5)。従ってフラグメント 1-24 の 5 つのリジン残基 (Lys 4, 6, 7, 9, および 21, N 末端アミノ基はアセチル化されている) の全部がサクシニル化されたことがわかった。

また、フラグメント 1-24 のカルボキシル基のアミド化率をアミノ酸分析で調べた。修飾反応により、カルボキシル基 1 モルにつき 1 モルのグリシンメチルエステルが導入されるので修飾率は、修飾前、後のグリシン量をそれぞれ G_{before} , G_{after} , および全カルボキシル基量を C (量はすべてモル) とすれば、

Table 5. NH₂-groups or COOH-groups of 1-24 before and after the chemical modification

NH ₂ -group*		COOH-group**	
before	after	before	after
5	0.0	3	0.52

* by TNBS method

** by amino acid analysis

修飾率, Modified (%) は次式で表わされる:

$$\text{Modified (\%)} = (\text{G after} - \text{G before}) / \text{C} \times 100$$

5 アミノ酸分析により修飾前後のグリシン量の変化は2.48モルで、全カルボキシル基は3モル (Glu-2, 3 および C末端カルボキシル基) であるから修飾率は82.7%, すなわち3モルのカルボキシル基のうち2.48モルが修飾されたと計算された。また、2度目の修飾実験でも良好な成績が得られず、両方とも修飾反応は不完全であった。次にアミド化標品の組成を電気泳動で調べた (Fig. 21) とする、ひとつのスポットが得られた。デンストメトリーで測定する

10 と陽極側にもマイナスな成分を伴ったことが、少なくとも未修飾1-24の2つのスポット (第二章参照) は検出されなかった。

これからサリシニル化、およびアミド化1-24の抗原活性を Fig. 22 に示す。サリシニル化1-24は全く¹²⁵I-CBb と anti-CBb の結合反応を阻

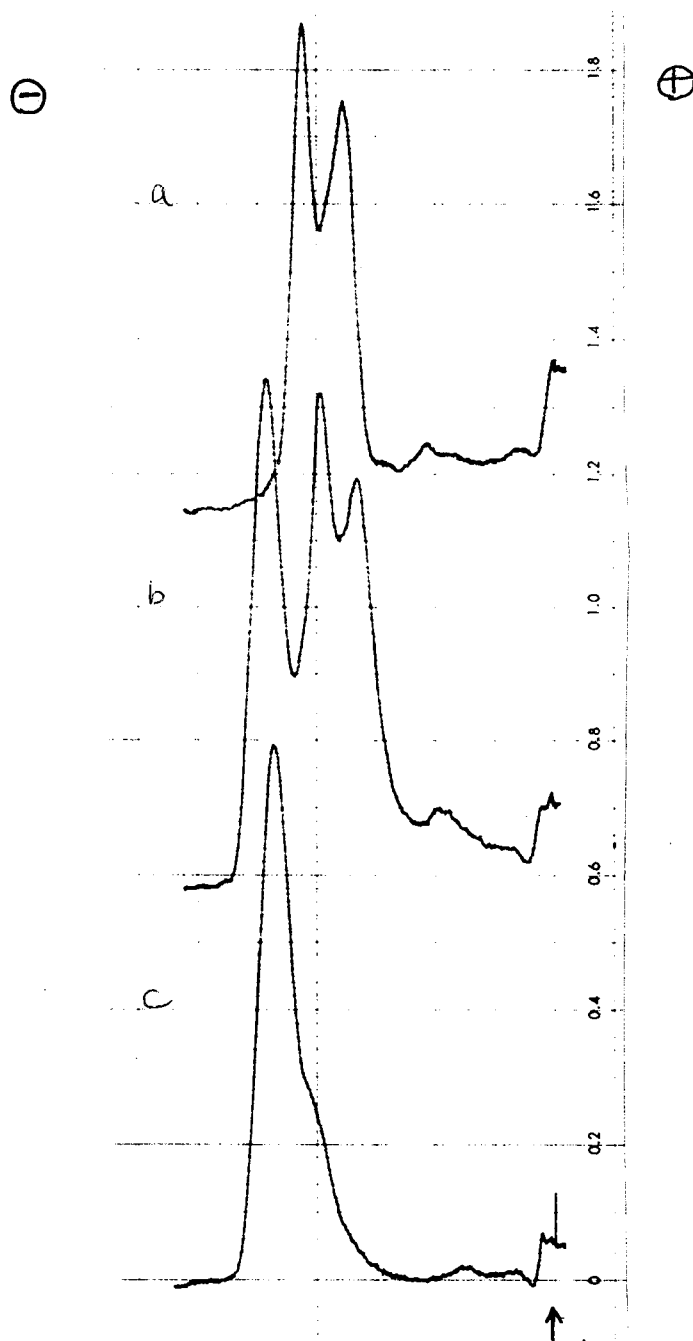


Fig. 21. Thin layer electrophoresis of modified 1-24. Fragment 1-24 and amidated 1-24 were electrophoresed on cellulose sheet at pH 6.0 and developed with ninhydrin reagent. Peptide spots were monitored with a Shimadzu TLC Chromatoscanner at 600 nm. (a); 1-24, (b); 1-24 + amidated 1-24, (c); amidated 1-24. The arrow indicates the origine.

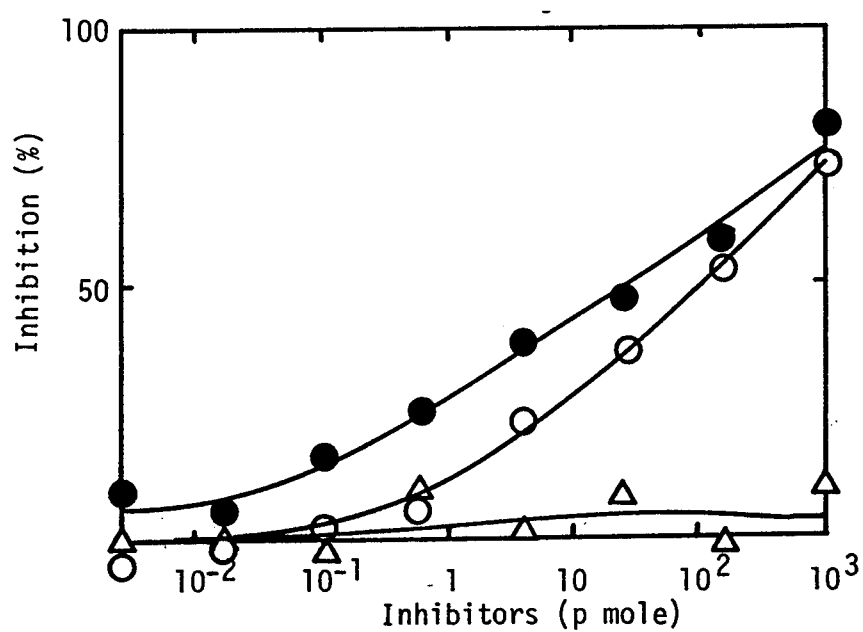


Fig. 22. Inhibition of the reaction between ^{125}I -CBb and anti-CBb by chemically modified l-24. A fixed amount of antibody solution was coated to polyvinyl microtiterplate well and incubated with each fragment at various concentrations. ^{125}I -CBb was then added and incubated overnight. The radioactivity bound was counted. Inhibitors: (●) l-24; (△) succinylated l-24; (○) amidated l-24.

害しなかったのので、アミノ基の抗原決定基への関与が示された。しかし、アミド化1-24の抗体結合能は未修飾のそれと比べて3-4倍減弱しただけなので、アミド化率が82%である事実を考えるとこの実験はカルボキシル基が抗原決定基を構成しているか、または無関係であるかの確証とはならなかった。

2 フラグメント1-24のキモトリプシン消化ペプチドの抗原活性

フラグメント1-24のキモトリプシン消化物の精製過程をFig. 23と24に示す。まず、消化物をpH 6.0で薄層セルロース上で電気泳動したとき、主に3つのメインスポット(F1~F3)と2つのマイナースポット(F4とF5)が得られた。これらのアミノ酸分析値をTable 6に示す。1-24の配列と照らし合わせると、F1が6-12, F2が1-24と13-24の混合物, F3が1-5,

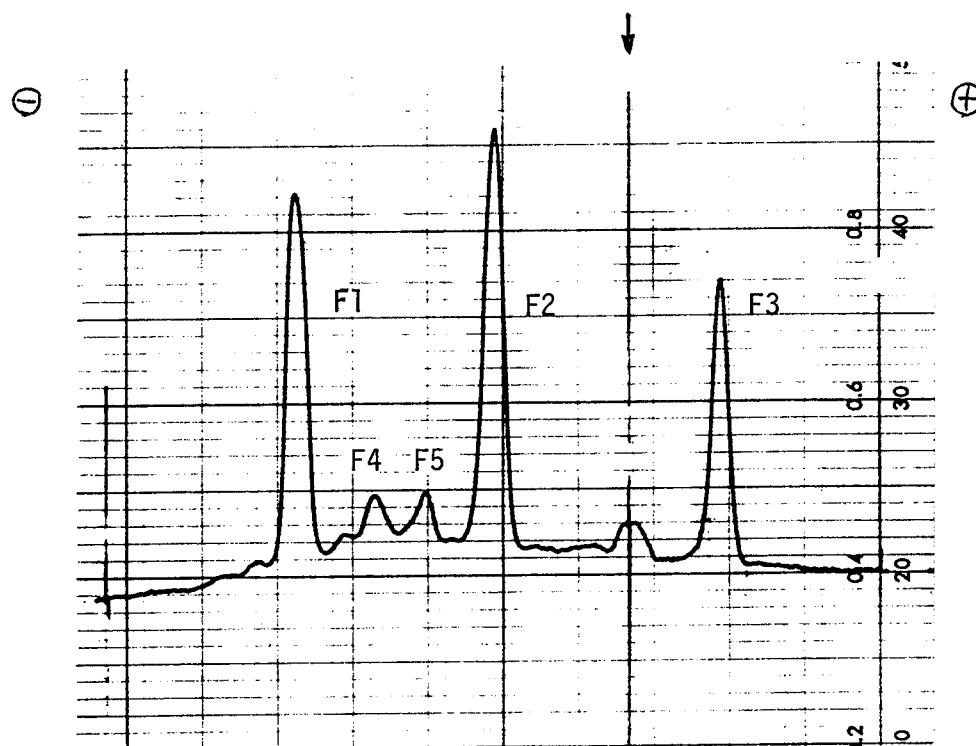


Fig. 23. Thin layer electrophoresis of chymotrypsinized 1-24. Chymotrypsinized 1-24 was electrophoresed on cellulose sheet at pH 6.0 and developed with ninhydrin reagent. Peptide spots were monitored with a Shimadzu TLC Chromatoscanner at 600 nm. The arrow indicates the origine.

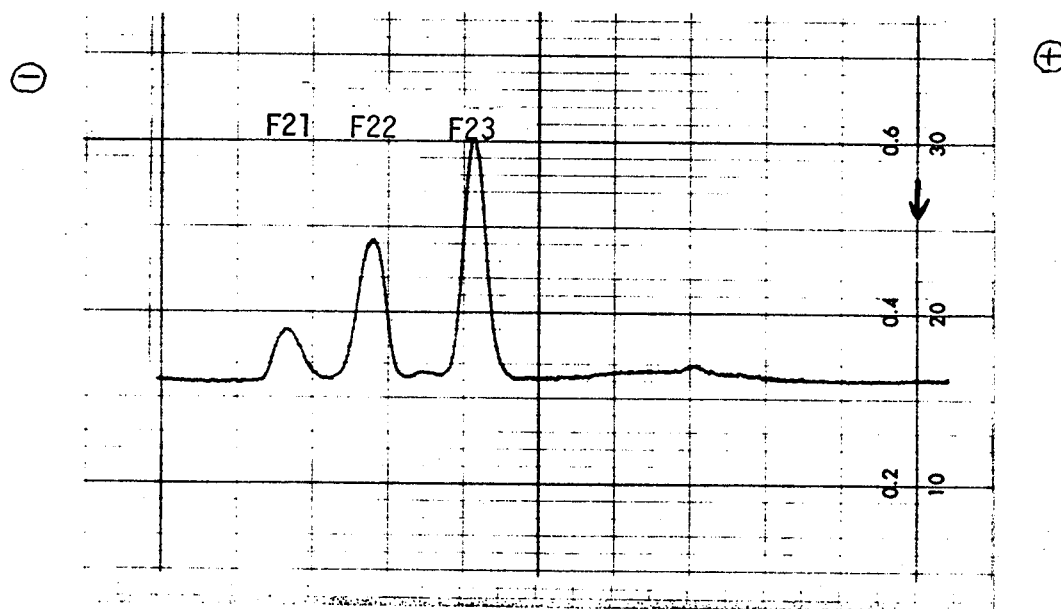


Fig. 24. Thin layer electrophoresis of F2. F2 was electrophoresed on cellulose sheet at pH 1.9 and developed with ninhydrin reagent. peptide spots were monitored with a Shimadzu TLC Chromatoscanner at 600 nm. The arrow indicates the origine.

Table 6 . Amino acid compositions of chymotryptic peptides of the fragment 1-24

Amino acid	F1	6-12	F2	1-24	13-24	F3	1-5	F4	6-24	F5	13-24
Asp	0	(0)	0	(0)	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)
Thr	0	(0)	2.24	(1)	(1)	0	(0)	0.95	(1)	0.77	(1)
Ser	0.83	(1)	2.98	(2)	(1)	0	(0)	1.87	(2)	0.87	(1)
Glu	0	(0)	4.52	(3)	(1)	2.18	(2)	1.16	(1)	1.00	(1)
Pro	0	(0)	2.67	(1)	(1)	0	(0)	0	(1)	0	(1)
Gly	0.05	(0)	11.83	(5)	(5)	0	(0)	5.00	(5)	3.98	(5)
Ala	0	(0)	0	(0)	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)
Cys	0	(0)	0	(0)	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)
Val	0	(0)	3.42	(2)	(2)	0	(0)	0.64	(2)	1.24	(2)
Met	0	(0)	0.88	(1)	(0)	1.00	(1)	0	(0)	0	(0)
Ile	1.33	(2)	1.34	(2)	(0)	0	(0)	1.12	(2)	0.19	(0)
Leu	0	(0)	0.99	(1)	(0)	1.02	(1)	0	(0)	0.13	(0)
Tyr	0	(0)	0	(0)	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)
Phe	1.00	(1)	1.00	(1)	(0)	0	(0)	1.21	(1)	0.20	(0)
Lys	2.97	(3)	6.30	(5)	(1)	1.14	(1)	4.33	(4)	1.34	(1)
His	0	(0)	0	(0)	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)
Arg	0	(0)	0	(0)	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)

Hydrolyses were done in 6 N HCl at 110°C for 22 h under vacuum.

Values are molar ratios with respect to phenylalanine, methionine, glycine or glutamic acid.

Values in parentheses are numbers expected from their sequences (Heil *et al.* (20)).

F4 が 6-24, F5 が 13-24 とそれぞれ同定できた。
 分離されてはいないと考えられる F2 をひきつづ
 き pH 1.9 で同様に電気泳動したところ、Fig. 24
 に示すように F21, F22 および F23 の 3 つの
 5 画分に分かれた。これらはそのアミノ酸組成
 から F21 は 1-12, F22 と F23 は 13-24 と同定
 された (Table 7)。

これら 1-24 のキモトリプトシンペプチドの抗
 原活性を調べた (Fig. 25) とし、それぞれのペ
 10 プチドフラグメントにも顕著な活性は認めら
 れなかった。次にこれらを 1-24 の分子全体を
 構成する様に $((1-5) + (6-12) + (13-24))$, または
 $((1-12) + (13-24))$, または $((1-5) + (6-24))$ 混
 いと阻害活性を測定すると $((1-12) + (13-24))$
 15 の組み合わせの場合には、それぞれのペプチ
 ドを単独で測定したときの阻害活性の和以上
 の抗原活性が認められた。しかし、インタク
 ト 1-24 に比べて活性は 100~1000 倍ほど低かった。
 他の 2 つの混合物は、単独時のそれぞれの活
 性の和程度の阻害を示すにすぎなかった。

Table 7 . Amino acid compositions of chymotryptic peptides of the fragment 1-24

Amino acid	<u>F21</u>	<u>1-12</u>	<u>F22</u>	<u>13-24</u>	<u>F23</u>	<u>13-24</u>
Asp	0	(0)	0	(0)	0.13	(0)
Thr	0	(0)	0.86	(1)	0.90	(1)
Ser	0.93	(1)	0.87	(1)	0.92	(1)
Glu	2.13	(2)	1.00	(1)	1.00	(1)
Pro	0	(0)	0	(1)	0	(1)
Gly	0.27	(0)	4.44	(5)	4.49	(5)
Ala	0	(0)	0	(0)	0	(0)
Cys	0	(0)	0	(0)	0	(0)
Val	0	(0)	1.11	(2)	1.28	(2)
Met	0.84	(1)	0.03	(0)	0	(0)
Ile	1.29	(2)	0.06	(0)	0.03	(0)
Leu	1.00	(1)	0.06	(0)	0.03	(0)
Tyr	0	(0)	0	(0)	0	(0)
Phe	1.00	(1)	0.06	(0)	0.05	(0)
Lys	4.07	(4)	1.10	(1)	0.93	(1)
His	0.32	(0)	0	(0)	0	(0)
Arg	0.13	(0)	0	(0)	0	(0)

Hydrolyses were done in 6 N HCl at 110°C for 22 h under vacuum.

Values are molar ratios with respect to phenylalanine, or glutamic acid.

Values in parentheses are numbers expected from their sequences (Heil *et al.* (20)).

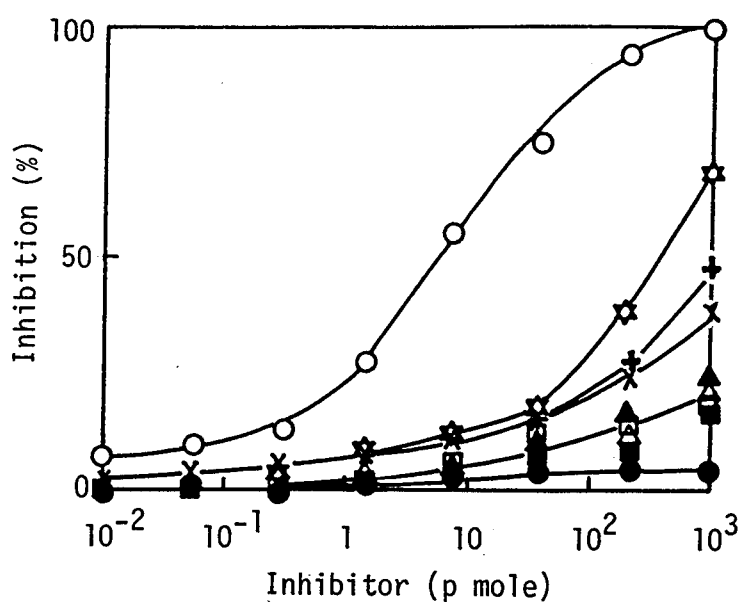


Fig. 25. Inhibition of the reaction between ^{125}I -CBb and anti-CBb by chymotryptic fragments of 1-24. A fixed amount of anti-CBb was coated to polyvinyl microtiterplate well and incubated with each fragment and mixtures: (○) 1-24; (●) 1-5; (□) 6-12; (■) 13-24; (▲) 1-12; (△) 6-24; (☆) 1-12 + 13-24; (X) 1-5 + 6-24; (+) 1-5 + 6-12 + 13-24 at various concentrations. ^{125}I -CBb was then added and incubated overnight. The radioactivity bound was counted.

考 察

序論に記述した佐藤の研究や第二章で明らかになった様には、CB-フラグメント (CBb (2-56), CBfN (81-125) および CBfC (126-194)) の交差反応性はこれらに共通に存在する Glu-Glu-X-X'-Lys (or Arg)-Lys という配列に起因するようである。本章では CBb の抗原活性を担うフラグメント 1-24 についてそのアミノ基とカルボキシル基の抗原活性への寄与を化学修飾法を用いて検討した。続いて 1-24 をキモトリプシンで消化し抗原活性を保持より小さなペプチドフラグメントを調製することを試みた。

アミノ基の化学修飾法は無水コハク酸に与るサワシニル化法を用いた。この方法の第一の特徴は、修飾後に修飾された基の電荷が正から負へ逆転することにある。従って 1-24 と抗体が静電的に相互作用してゐるとすれば、サワシニル化した 1-24 は全く抗体と結合する

ことができなくなると考えられる。第二の特徴として他の修飾法に比べてアミノ基に導入される官能基としては、よく用いられる修飾法のなかでいちばん小さいことである。かさ高い基が導入されれば、抗原決定基がもしインタクトであつたとしても立体障害で抗体が近づけなかつたり、決定基のコンホメーションが不可逆的に変化することとも十分考えられるので、導入される官能基が小さいということは重要である。また、反応も非常に簡単で定量的に進むこともこの修飾法の特長である。実際 1-24 のサリシニル化は 100 % 進行し、修飾した標品の遊離のアミノ基は TNBS 法では全く検出されなかつた。

サリシニル化 1-24 は、²⁵I-CBb と anti-CBb の結合反応を全く阻害しなかつた (Fig. 22)。1-24 はこのアミノ基が正電荷から負電荷に変化すること、抗体と相互作用することができなくなった。従つて 1-24 の 4 つのリジン残基 (Lys 4, 6, 7, 20) のいずれかが抗原決定基を

構成してゐるか、または抗原性の発現に密接に関与してゐることが示された。

一方、カルボキシル基の化学修飾はカルボジイミドを用いたアミド化法を用いた。大過剰のグリシンメチルエステル存在下、1-24のカルボキシル基 (Glu-2, 3 および C 末端カルボキシル基) を 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミドで活性化し、グリシンエステルのアミノ基とアミド結合を作らせるものである。この修飾後、カルボキシル基の負電荷は消失するので、静電的相互作用で 1-24 と抗体が結合するのであれば、アミド化 1-24 は抗原活性が消失すると思われる。修飾反応は定量的に進行するとされてゐるが、1-24 のアミド化反応を 5M グアニジン・塩酸中で行なうと最大 82.7% しか修飾されなかった。修飾率が良くない理由は不明である。このアミド化 1-24 標品は、薄層セルロースシートでの電気泳動 (pH 6.0) で未修飾 1-24 に比べより陰極側に泳動されてお

り、陽極側にマイナーコンポーネントを伴っていったが、未修飾1-24に相当する移動度のものは検出されなかった (Fig. 21)。従って1-24中の3モルのカルボキシル基がすべて修飾されたものが大部分と、2モルだけ修飾されたものが一部の2つの成分の混合物で、少なくとも全く未修飾の1-24は含まれていないと考えられた。

このアミド化1-24標品の抗体結合能を¹²⁵I-CBb と anti-CBb の結合反応の阻害試験で測定したところ、未修飾1-24に比べて3-4倍程度減弱したにとどまった。これは、1-24のアミノ基を修飾したサクシニル化1-24が全く抗体結合能を損なったのに比べれば、抗原活性が低下した程度としては非常に小さいと言える。このアミド化1-24の抗原活性の損失が小さかったことは、抗原決定基へのカルボキシル基の寄与が小さいということを示唆しているのか、またはカルボキシル基の修飾反応が不完全であったことに起因しているのかもわからない。

従って、82.7%のカルボキシル基が修飾された1-24は未修飾1-24に比べ数倍活性が低かったものの、カルボキシル基が抗原決定基を構成しているという示唆を得ることはできなかった。

これらの化学修飾の実験から、1-24の抗原決定基を構成するアミノ酸残基としてリジン残基が同定された。しかし、カルボキシル基については、いまいちど検討が必要であろう。

化学修飾の実験は、佐藤が述べ、筆者が第二章で確認した、CB-フラグメントの交差反応性に関与する決定基は配列、Glu-Glu-X-X'-Lys(or Arg)-Lys であるという仮説を部分的ではあるが、裏付けた。アミノ基のサクシニル化で活性が全く失われたことより、リジン残基の抗原決定基への関与は疑うべくもない。佐藤は、CBfNのアミノ基がその抗原性に大きくかかわっていることをそのTNP化の実験で示した(1)が、本研究においてもアミノ基の抗原活性への関与が示された。

次に 1-24 から、決定基と考えられる配列 2-7, Glu-Glu-Lys-Leu-Lys-Lys を含む、より小さなペプチドフラグメントを得る試みをした。もしこの配列を含む小さなフラグメントに抗原活性が認められれば、これが抗原決定基であることのより直接的な裏付けとなるであろう。

配列 1-24 の中で 12 残基めがフェニルアラニンであることに注目し、キモトリプシン消化によって 2-7 を含む 1-12 を得ることができると考えられた。このとき、Leu-Lys (5-6) 間のペプチド結合も加水分解される可能性があったが、プロテアーゼ量や時間を調節することでオーバーラップフラグメントが得られるようにした。

1-24 のキモトリプシン消化物を pH 6.0 で薄層セルロースを用い電気泳動して、フラグメント 1-5, 6-12 および 6-24 を単離した (Fig. 23)。

このとき不均一と思われた F2 画分はさらに pH 1.9 で同様に電気泳動し、1-12 および 13-24 を精製した。単離したペプチドはアミノ酸分析で

同定した。

13-24 に相当するアミノ酸組成を持つ F5, F22 および F23 と 3 つの画分に分けられた。1-24 が pH 6.0 の電気泳動で 2 つのスポットを与えた (第二章と Fig. 21) が、この 1-24 の不均一性をもたらす理由が配列 13-24 内に存在すると思われる。しかし、13-24 と 1-24 の電荷の不均一性が何に由来するのかは、今のところわからない。

このように単離した 1-5, 6-12, 13-24 (3 つの画分, F5, F22, F23), 1-12, および 6-24 の抗体結合能を ^{125}I -CBb と anti-CBb との結合阻害実験で測定したが、1-12 を始めそのいずれもが非常に弱いか全く阻害活性を持っていなかった。しかしながら、これら 3 つのフラグメントが 1-24 全体を構成するように混じったとき、(1-12) + (13-24) の組み合わせに阻害活性の上昇が認められた。一方他の 2 つの組み合わせにはほとんどみられなかった (Fig. 25)。

これらの実験事実は以下のように考えられ

る。抗原や抗体の構造の研究により、たんに
 一箇の抗原決定基は6-7個のアミノ酸より構
 成されると考えられていた(5)。今回得たオ
 ーバーラットを含む5つのフラグメントのい
 ずれかに、1-24の抗原決定基がそのまま保存
 されていると考えることが出来る。従って各
 フラグメントの低い反応性は抗原決定基内部
 の切断によるものでないの、抗原決定
 基を持つフラグメントのコンホメーションが
 不可逆的に変化した、抗体と相互作用できなく
 なったものと推察される。このことは、フラ
 グメント混合物の阻害実験により、いっそう
 明確になった。フラグメント(1-12)+(13-24)の
 混合物は各々単独での阻害活性の和より著し
 く高い活性を示した(Fig. 25)。これは2つのフ
 ラグメントを混じることにより、互いが相補
 的に働き、抗体との結合が可能な立体構造を
 ある程度回復したためと考えられる。このよ
 うなフラグメント間の相互作用はリボヌクレ
 ーゼ(3)やペニシリナーゼ(45)の免疫化学

的研究により報告されている。

一方、同じように混合した(1-5)+(6-24)、または(1-5)+(6-12)+(13-24)による阻害試験ではいずれも単独での阻害活性をたし合わせた程度の上昇しか見られなかった。これは(1-12)+(13-24)の混合物が高い阻害活性を回復した事実を考へれば、5-6間のペプチド結合が抗原性の保持に重要であることを示すと思われる。従って1-24の抗原決定基が2-7にあるという第二章の考察が強く支持された。

ま と め

- 1 : CB-フラグメントの精製にイオン交換クロマトグラフィーを導入し、精製時間の短縮や精製純度の向上に効果を挙げた。
- 2 : フラグメントの抗原活性の測定のために固相法RIAを確立した。この方法によって定量沈降反応阻害試験で測定系外にあった可溶性複合体をも検出できるようになった。また抗原や抗血清、阻害剤の消費量も1検体当たりそれぞれ約 $1/10000$, $1/1000$, $1/100$ と微量化でき、測定日数も5日から1~2日に短縮できた。
- 3 : CB-フラグメント(CBb(2-56), CBfN(81-125))およびCB5C(126-194)に交差反応が認められた。AKの立体構造や親水性アミノ酸の分布の解析より、交差反応性に関与する決定基として佐藤が推察した配列・Glu-Glu-X-X'-Lys(or Arg)-Lys-が強く示唆された。
- 4 : 分子内に上記配列を持つフラグメント

1-24にはCBbの抗原活性がそのまま保存されていたので(3)の推論が強く示唆された。

5: 1-24のカルキシル化とアミド化により、1-24の抗原活性にアミノ基が強く関与していることがわかったが、カルボキシル基の関与については、明確な結論は得られなかった。

6: 1-24のキモトリプシン消化ペプチドの抗原活性の測定より、1-24の抗原性の発現は高次構造に強く依存していることが示された。

10 また、アミノ酸配列5-6間のペプチド結合が抗原活性に重要な働きを持っていたことは、5-6間のペプチド結合を含む配列が抗原決定基である可能性を示唆している。

謝 辞

本研究の遂行に終始御指導して下さいた北海道大学免疫科学研究所生化学部門の塩川洋之教授に深謝いたします。

またいつも有意義な助言や議論をしていただいた元免疫科学研究所生化学部門助教授、坂井留女先生に心から感謝いたします。

有益な討論や協力をしていただいた免疫科学研究所生化学部門の水野佑亮先生、故小野寺昌彦先生、高沢俊英先生、吉田栄子さん、田村多喜子先生、三和茂先生、そして木崎節子さんと遠藤秀一さんに感謝いたします。

終始御指導して下さいた防衛医科大学校生化学教室助手、佐藤昇先生に深く御礼申し上げます。

立体画を心よく描いて下さいた坂井留女先生に改めて深く御礼申し上げます。

1983年9月 小山 芳一

1. 佐藤 昇, (1982) 学位論文, 北海道大学.
2. Hopp, T. P. & Woods, K. R. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. 78, 3826
3. Richards, F. M. & Vithayathil, P. J. (1959) J. Biol. Chem. 234, 1459
4. Brown, R. K., McEwan, M., Mikoryack, C. A. & Polkowski, J. (1967) J. Biol. Chem. 242, 3007
5. Atassi, M. Z. (1975) Immunochemistry 12, 423
6. Atassi, M. Z. (1978) Immunochemistry 15, 909
7. Atassi, M. Z. In Immunochemistry of Proteins (Edited by Atassi, M. Z.) Vol. 1. pp. 77-176. Plenum. N. Y.
8. Kazim, A. L. & Atassi, M. Z. (1980) Biochem. J. 191, 261
9. Li, S., Feldman, R. J., Okabe, M. & Pan, Y. E. (1983) J. Biol. Chem. 258, 7017
10. Parham, P., Androlewicz, M. J., Holmes, N. J. & Rothenberg, B. E. (1983) J. Biol. Chem. 258, 6179
11. Sela, M., Schechter, B., Schechter, I. & Borek, F. (1967) Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 32, 537
12. Atassi, M. Z. & Smith, J. A. (1978) Immunochemistry 15, 609
13. Kielley, W. W. & Kielley, H. M. (1951) J. Biol. Chem. 191, 485
14. Abood, L. G. & Romancheck, H. (1955) Exptl. Cell Research 8, 459
15. Tachibana, M. & Yoshikawa, H. (1958) J. Biochem. 45, 1037
16. Mazelis, M. (1937) Plant Physiol. 31, 37
17. Oliver, I. T. & Peel, H. L. (1956) Biochem. Biophys. Acta. 20, 390
18. Kornberg, A. & Pricer, W. E. (1951) J. Biol. Chem. 193, 481
19. Noda, H. L. (1973) In The Enzyme (Blyer, P. D., ed.) 8, p. 279, Academic Press, New York
20. Heil, A., Muller, G., Noda, L., Pinder, T., Schirmer, H., Schirmer, I. & von Zabern, I. (1974) Eur. J. Biochem. 43, 131

21. von Zabern, I., Wittman-Liebold, B., Untucht-Grau, R., Schirmer, H. & Pai, E. F. (1976) Eur. J. Biochem. 68, 281
22. Schulz, G. E., Elzinga, M., Marx, F. & Schirmer, R. H. (1974) Nature 250, 120
23. Noda, L., Schulz, G. E. & von Zabern, I. (1975) Eur. J. Biochem. 51, 229
24. Yazawa, W. & Noda, L. (1976) J. Biol. Chem. 251, 3021
25. Minatogawa, S. & Russell, P. J. (1968) Biochem. Biophys. Res. Commun. 31, 28
26. Minatogawa, S. (1971) D. Phil. Thesis, University of Kansas
27. Reisfeld, R. A., Lewis, U. J. & Williams, D. E. (1962) Nature 195, 281
28. Spackman, D. H., Stein, W. H. & Moore, S. (1958) Anal. Chem. 30, 1190
29. Hunter, W. M. & Greenwood, F. C. (1962) Nature 194, 495.
30. Miyachi, Y., Vaitukaitis, J. L., Nieschlag, E. & Lipsett, M. B. (1972) J. Clin. Endocrinol. Metab. 34, 23
31. Degani, Y. & Patchoraik, A. (1971) J. Org. Chem. 36, 2727
32. March, S. C. Parish. I. & Cuatrecasas, P. (1974) Anal. Biochem. 60, 149
33. Degani, Y. & Patchornik, A. (1974) Biochemistry 13, 1
34. Jacobson, J. R., Schaffer, M. H., Stark, G. R. & Vanaman, T. C. (1973) J. Biol. Chem. 248, 6583
35. Schirmer, L., Schirmer, R. H., Schulz, G. E. & Thuma, E. (1970) FEBS Lett. 10, 333
36. Haimovich, J., Schechter, I. & Sela, M. (1969) Eur. J. Biochem. 7, 537
37. Markland, F. S. & Smith, E. L. (1967) J. Biol. Chem. 242, 5198
38. Habeeb, A. F. S. A. & Atassi, M. Z. (1977) Immunochemistry 14, 449
39. Doyen, N., Pesce, A. J., & Lapresle C. (1982) J. Biol. Chem. 257, 2770
40. Atassi, M. Z., Sakata, S. & Kazim, A. L. (1979) Biochem. J. 179, 327

41. Koshland, D. E., Jr. (1973) Sci. Am., 229, 52
42. Chu, F. S., Crary, E. & Bergdoll, M. S. (1969) Biochemistry 8, 2890
43. Plapp, B. V. Moore, S. & Stein, W. H. (1971) J. Biol. Chem. 246, 939
44. Carraway, K. L. & Koshland, D. E., Jr. (1972) In Method in Enzymology (Edited by Hirs, C. H. W. & Timasheff, S. N.) vol. 25, p. 616 Academic Press, N. Y.
45. Wetlaufer, D. B. (1981) In Adv. Protein Chem. 34, p. 61-92