

|         |                  |
|---------|------------------|
| 学位授与番号  | 医博乙第1212号        |
| 学位授与年月日 | 平成5年4月21日        |
| 氏名      | 松下栄紀             |
| 学位論文題目  | 抗原特異的抑制因子の生化学的解析 |

|        |             |
|--------|-------------|
| 論文審査委員 | 主査 教授 小林 健一 |
|        | 副査 教授 竹田 亮祐 |
|        | 教授 右田 俊介    |

## 内容の要旨および審査の結果の要旨

抗イディオタイプ (Id) 陽性抑制T細胞ハイブリドーマ (34S-281) は通常静止ともいえる状態にあり抑制活性を有しないが、Id陽性抑制T細胞ハイブリドーマ (34S-18) 由来の抑制因子 (TsF<sub>1</sub>) あるいは一部の抗-Keyhole limpet hemocyanin (KLH) 抗体によって活性化され、抗原 (KLH) 特異的かつ遺伝的拘束性 (H-2<sup>b</sup>) を有する抑制因子 (TsF<sub>1</sub>) を産生するようになる。免疫調節機構を分子レベルで解明するために、このTsF<sub>1</sub>の生化学的解析を試み、以下の知見を得た。

1. 無血清下に培養した34S-281の培養上清中にもKLH特異的で遺伝的拘束性を示す抑制活性が存在することを確認し、培養上清に含まれる分泌性の抑制因子を陰イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過および逆相クロマトグラフィーを用いて精製した。またカラム操作後、抑制活性を有する分画を sodium dodecyl sulfateポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (SDS-PAGE) あるいはクロマトフォカシングにて解析し、TsF<sub>1</sub>の分子量 (M. W. ) および等電点 (pI) を測定した。その結果、TsF<sub>1</sub>の分子量は22-37Kdであり等電点はpH6.0-6.1であることが判明した。さらに、この抑制活性を上記の操作により $1.5 \times 10^4$ 倍まで濃縮し得た。
2. ラビット網状赤血球ライセートを用いた無細胞蛋白合成系で得た蛋白の解析では、活性化34S-281由来のmRNA産物のみが、培養上清と同様の抗原特異的かつ遺伝的拘束性を有する抑制活性を示し、非活性化由来のmRNA産物では抑制活性は全く認められなかった。活性化34S-281由来mRNA産物をSDS-PAGEおよび等電点電気泳動法で解析した結果においても、ハイブリドーマから分泌される抑制因子と同様の分子量 (23-40Kd) および等電点 (pI 5.5-6.2) を示した。さらに、<sup>35</sup>S-メチオニンを用いて合成した蛋白質を二次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動法に展開し比較した結果、活性化ハイブリドーマ由来のmRNA産物では非活性化ハイブリドーマ由来のそれに比して、新たな2つのスポット (M. W. 28Kd, pI 5.7およびM. W. 25Kd, pI 5.5) が出現していることが判明した。

以上の結果から、2つのスポットのいずれかがTsF<sub>1</sub>である可能性が示唆され、また、TsF<sub>1</sub>が共有結合を有さない一本鎖で構成され、mRNAを介して翻訳される蛋白として糖鎖の関与を必要とせずに抗原特異的かつ遺伝的拘束を有する抑制活性の増幅に関与すると考えられた。

以上、本研究は免疫調節機構における抗原特異的抑制因子の生化学的解析を行ったものであり、免疫調節機構を分子レベルにまで発展させた意味において、価値のある労作と認められた。