

固定化したFabフラグメントを用いたリゾチームの 表面構造の微小な違いの検出

植田 正*、阿部義人*、赤崎健司、山口泰典***、辻宏、
河野敬一**、山田秀徳****、井本泰治*

J. Biochem. 113(2) 174-179 (1993)

Detection of subtle differences in the surface structure of lysozymes by use of an immobilized Fab fragment.

Ueda, T*., Abe, Y*., Akasaki, K., Yamaguchi, Y***.,
Tsuji, H., Kawano, K**. Yamada, H****., Imoto, T*.

Abstract A method was developed to evaluate the association constant at physiological pH (pH 7.5) between a lysozyme and the Fab fragment derived from anti-lysozyme monoclonal antibody 37-7, which was immobilized to the adsorbent for HPLC. Comparison of the association constants between lysozymes and the immobilized Fab fragment indicated that mAb 37-7 recognized the prominently exposed regions (hills and ridges) around His15 of hen lysozyme, but His15 itself was not directly involved in the binding with mAb 37-7. Moreover, the epitope was confirmed by the reactivity of His15 with monoiodoacetic acid in the presence of mAb 37-7. The association constant of 15-carboxymethylated histidine lysozyme (15CM lysozyme) with the immobilized Fab fragment was smaller by one-seventh than that of 15-carboxamidated histidine lysozyme, though the side chains introduced were almost identical in size. From the pH titration of 15CM lysozyme with ^{13}C -enriched carboxyl group by use of ^{13}C -NMR, the $\text{p}K_{\text{a}}$ of the introduced carboxyl group was evaluated to be 5.06. Since the carboxyl group was fully ionized under the conditions of measurement (pH 7.5), electrostatic repulsion was found to disturb severely the association between mAb 37-7 and hen lysozyme. Moreover, it was demonstrated that, because of the high reproducibility of measurement, the immobilized Fab fragment could detect subtle differences in the surface structure of lysozymes.

HPLC用吸着剤へ固定化した抗リゾチームモノクローナル抗体37-7由来のFabフラグメントとリゾチームの生理条件下(pH 7.5)での結合定数を評価する方法を開発した。その固定化Fabフラグメントと種々の修飾リゾチームとの結合定数の比較から、このモノクローナル抗体はニワトリリゾチームのHis15周辺の比較的露出している領域を認識しているが、His15残基は直接結合に関与していないことが結論付けられた。さらに、この結論は、モノクローナル抗体存在下でのHis15残基とモノヨード酢酸の反応結果に支持された。His15をモノカルボキシメチル化されたリゾチーム(15CMリゾチーム)と固定化したFabフラグメントとの結合定数は、His15をカルボキサミドメチル化したリゾチームのそれと比較すると、7分の1に減少した。導入したカルボキシメチル基部分の炭素を ^{13}C でラベル化した15CMリゾチームを調製し、 ^{13}C -NMRを用いて導入したカルボキシル基の $\text{p}K_{\text{a}}$ を算出したところ5.06であった。

この結果から、結合定数を評価した条件(pH 7.5)では、導入したカルボキシメチル基はほぼ完全に解離しているため、このモノクローナル抗体はニワトリリゾチームとの結合に於て、静電反発はかなりこの結合を弱めることが分かった。さらに、この実験系は再現性のよいことから、この固定化したFabフラグメントがリゾチームの表面構造の微小な違いを検出することに使用されることが示された。

*¹九州大学薬学部、*²九州大学歯学部、*³福山大学工学部、*⁴岡山大学工学部