

### 30) Ayu血清中抗体 (IgM) の粗精製

金辻宏明・二宮浩司

#### 【目的】

*Flavobacterium psychrophilum* を原因菌とするAyu冷水病は近年、非常に問題となっており、早急に対策を講じる必要がある。当場では16種類の新規ワクチンを作製してその効果を調べたところ、従来の注射ワクチンを上回る効果は認められなかった。しかし冷水病菌にAyuを浸漬すると、一定条件下で冷水病に抗病性を示すことを明らかにした。これらのことから、冷水病ワクチンの開発には基礎的知見の集積が急務であると考えられる。そこで、本研究では冷水病に対するAyuの免疫応答を明らかにする一環として、Ayu抗体に対する抗血清を用いた免疫学的分手法を開発するため、Ayu血清中の抗体を精製した。

#### 【方法】

Ayu抗体は硫酸アンモニウム塩析、イオン交換クロマトグラフィーおよびゲル濾過法で粗精製した。すなわち、体重約40gの正常Ayuから血清を分離し、7.5mlの血清に硫酸アンモニウム【酵素精製用：和光純薬】を50%飽和になるように加えて4°Cで1h静置した。その後10,000rpm(12,300×g)で30min遠心分離し、塩析画分を15mM トリス塩酸緩衝液 (THB) pH8.0 1mlに溶解し、同緩衝液で一晩透析した。その後、DEAE-cellulose タイプII【和光純薬】カラム(2cm<sup>2</sup>×30cm)に透析試料を展開し、非吸着成分を15mM THB pH8.0を用いて流速12ml/hで溶出させた。その後、0.1M 塩化ナトリウムを含む15mM THB pH8.0を用いて抗体画分を溶出させてイオン交換クロマトグラフィーを行った。溶出後、280nmの吸光度が0.15以上の画分をプールし、ポリエチレングリコール20,000【和光純薬】で2mlに濃縮した。濃縮液はSepharose 6B【Pharmacia】カラム(2cm<sup>2</sup>×100cm)に展開し、0.1%アジ化ナトリウム、2%塩化ナトリウムを含む20mM THB pH7.0で溶出させてゲル濾過クロマトグラフィーを行った。ゲル濾過画分は7.5%ゲルを用いたNative Disc-PAGE<sup>1)</sup>を行って純度を調べ、Rf値0.01<sup>2)</sup>に単一のバンドがある画分を粗精製標品とした。

#### 【結果】

50%飽和硫酸アンモニウム塩析画分をイオン交換クロマトグラフィーで分画した結果は図1に示した。すなわち、0.1M塩化ナトリウムで溶出される主要なピークが1つ認められた。つぎにこの画分を濃縮後、ゲル濾過クロマトグラフィーで分画すると図2に示すように主要な5つのピークが認められた。過去の知見<sup>2)</sup>から最大吸光度約0.45を示す第2ピークが抗体と考えられた(データは示さないもののこの画分は2メルカプトエタノールで還元され、2つの分子量を示す)。この第2ピークの純度をNative Disc-PAGEで分析した結果を図3に示した。すなわち、Rf値約0.01のところ単一のバンドが認められ、おおむね純粋に精製されたと考えられる。しかし、完全精製にはさらなる精製ステップが必要である。

- 
- 1) Davis B. J. (1964): Disc electrophoresis-L; Method and application to human serum proteins, *Annals N. Y. Acad. Sci.*, **121**, 404-427.
  - 2) Itami T., Y. Takahashi, T. Okamoto and K. Kubono (1988): Purification and characterization of immunoglobulin in skin mucus and serum of Ayu, *Nippon suisan Gakkaishi*, **54**, 1611-1617.

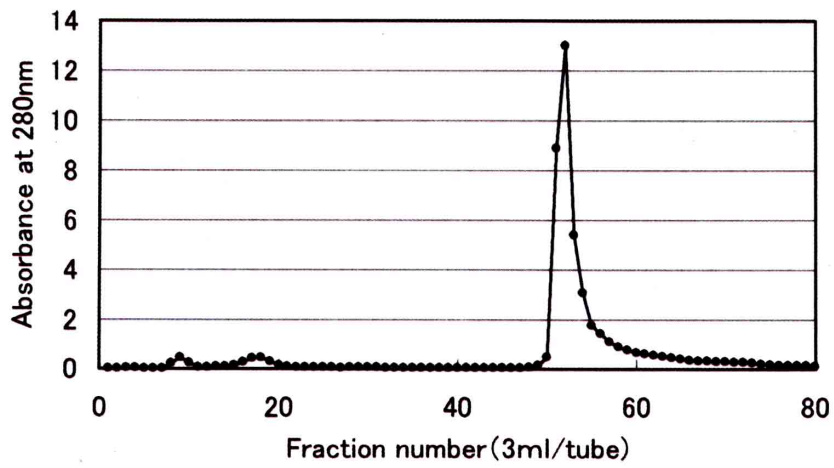


図1. DEAE-celluloseを用いたイオン交換クロマトグラフィーによるアユ正常血清の分画結果.

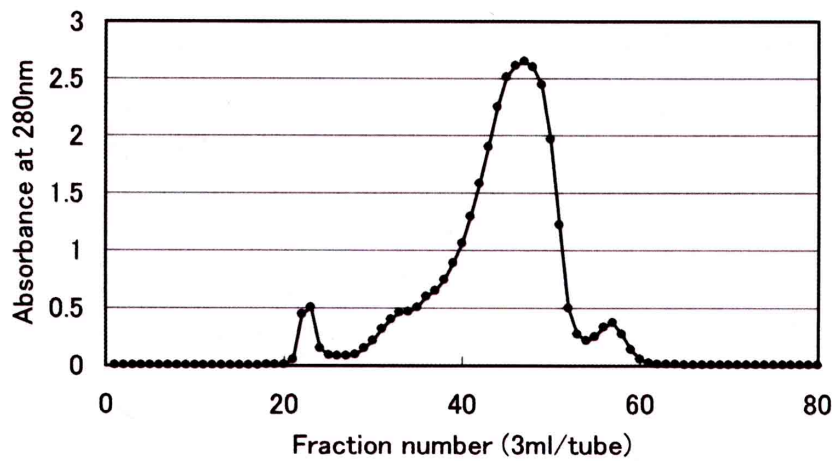


図2. Sepharose 6Bを用いたゲル濾過クロマトグラフィーによるアユ正常血清の分画結果.

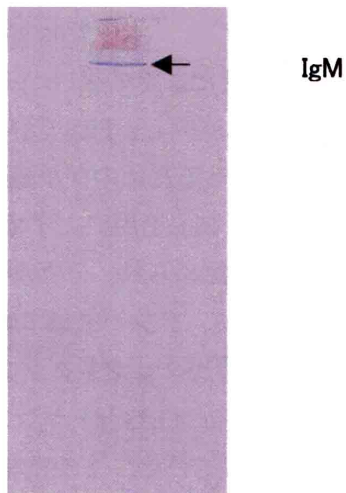


図3. 精製アユIgM標品のNative-Disc PAGEによる分析像.