LATS (long acting thyroid stimulator) の精製法 およびその免疫学的諸性状に関する研究

京都府立医科大学臨床検査部

宮 崎 忠 芳

Studies on the Purification and The Immunological Properties of LATS-Immunoglobulin

Tadayoshi MIYAZAKI

(Director: Professor Hamao Ijichi)

It has been shown that LATS activity is mainly distributed in the fraction of immunoglobulin G (IgG) in the serum from hyperthyroid patients. The present paper examined the immunological character of LATS and the method for separation of LATS activity from LATS positive serum using DEAE-Cellulose and affinity chromatography methods.

LATS activity was distributed in the IgG fraction that could be separated by the DEAE-Cellulose column equilibrated with a 0.0175 M phosphate buffer, pH 6.3 from LATS positive serum. When LATS positive serum was fractionated by affinity chromatography on a Sepharose-bound antibody against human IgG, Fab of IgG and Fc of IgG, LATS activity was always retained in IgG fraction.

When LATS positive serum was fractionated by affinity chromatography on a Sepharose-bound anti- κ chain, LATS activity was found in the fraction that reacted with the anti- κ chain. Because of the low antibody titer of the anti- λ chain, LATS activity did not react with this antibody. By affinity chromatography on Sepharose-bound Concanavalin A, serum LATS activity was also retained in IgG fraction.

LATS activity could be separated from LATS positive serum without significant loss of biological activity by affinity chromatography. When IgG (1) was purified from the fraction by affinity chromatography on anti-IgG (1)-bound Sepharose, about 80% of the original LATS activity was found in IgG (1) fraction. When the Fab fragment of IgG (1) was separated from papain hydrolysed IgG (1), using a Protein A-bound Sepharose column, a short-acting type of thyroid stimulating activity was found in only this fraction.

These data suggest that the biological activity of the thyroid stimulation is distributed mainly in the Fab fragment of IgG (1).

は じ め に

バセドウ病患者の血中に異常甲状腺刺激物質である LATS のあることが発見されて以来、この物質は本患者の病態生理に重要な役割を演ずるとされているが^{(1)~(5)}、その詳細については未だ未解決であるのが実状である。他方バセドウ病の発病機序についても未解決の面が極めて多い。LATS はバセドウ病の患者に特異的に陽性を示すので、この LATS のより詳細な追求はバセドウ病の本態につながる課題の一つと考え、LATS について検討することを試みた。LATS に関する知見は既に諸家によって研究されたが、この重要な知見は、LATS は血清 γ -globulin の IgG 分画にあり、甲状腺抗原に対する抗体と推定されていることである^{(2)~(5)}。

現在まで報告された LATS の精製法としては塩析法⁽²⁾⁽³⁾⁽⁴⁾、ゲル濾過法⁽²⁾⁽³⁾⁽⁴⁾、陰または陽イオン交換樹脂を用いる法⁽²⁾⁽³⁾⁽⁴⁾、等電点沈澱法⁽⁶⁾⁽⁷⁾⁽⁸⁾、Dextran coated charcoal⁽⁹⁾ 法などがある。

今回は LATS 陽性患者血清から活性の高い LATS を分離する方法として主に affinity chromatography を用いる方法を種々検討し更に 2, 3 の性状について検索したので報告する。

実 験 方 法

(1) LATS の血清蛋白分画における局在とその精製法

LATS 陽性血清 (100ml) を visking tube に入れ 0.005M phosphate buffer (P.B) pH 7.0 で 2 昼夜透析後、3,000 rpm, 20 分間遠心して沈澱分画 (euglobulin) と上清の pseudoglobulin 分画をえた。前者は 0.15M PB pH 7.0 に溶解して生物活性を測定した。後者は上記の緩衝液で飽和した DEAE-Cellulose カラム (4×50cm) を用いて展開した。この展開は末吸着の蛋白の溶出後、溶出液を 0.0175M PB pH 6.3, 0.04M acetate buffer pH 5.9 および 0.1M acetate buffer pH 5.8 で stepwise elution を行い各分画の LATS 活性を測定した。

(2) TSH および LATS の bioassay 法

甲状腺刺激作用は McKenzie bioassay 法の変法を用いた⁽¹⁰⁾。即ち通常 d.d 系マウス (体重 13g) にオリエンタル製の低ヨード固形餌 (ヨード含有量 <0.4mg%) を並びに飲料水としては蒸留水を一週間投与後、carrier-free ¹²⁵I を 10 μ Ci 腹腔内に注射し、3 日後に thyroxine (T₄) 水溶液 (2.5 μ g/ml) を飲料水として投与し、その 2 日後に assay を行った。検体は 0.5ml (時に 1ml) を腹腔内に注射し、その 3, 9 および 24 時間後に眼窩静脈叢から 0.1ml ずつ採血し、放射能を測定した。対照として生食水を用い、この場合の値を 100% として、増加率を百分率で表わした。通常 200% 以上を陽性とし、800% までは量的直線関係 (dose response) を示すが、800% 以上では直線関係が成立せず曲線を示した。

(3) Sepharose 結合抗体を用いる affinity chromatography による精製法

ヒト IgG は Nutritional Biochemical Corp. (米国 Cleveland) から購入した。ヒト IgG の Fab 分画と Fc 分画はミドリ十字 K.K. (大阪) から提供をうけた。Bence-Jones 蛋白の Kappa 鎖 (κ) と Lamda 鎖 (λ) は金沢大学右田教授から提供をうけた。ヒト IgG (1), κ 鎖型の monoclonal gamma globulin は佐々木助教授 (名市大, 生化学) の御好意により入手した。それぞれを抗原として complete Freund adjuvant とともにウサギを免疫し、抗体を得た。即ち通常各抗原約 5mg を 2 週間毎に注射し、2 ヶ月後に booster を注射し、その 1 週間後に抗血清をえた。

各抗原と抗血清との反応は micro-Ouchterlony 法で沈降線を検討した。各抗血清はそれぞれの対応抗原と沈降線を形成したが、抗 Fab 抗体と抗 Fc 抗体は IgG に対しても沈降線を示した。抗 κ 鎖抗体は正常ヒト血清 (NHS) ととも沈降線を示したが、抗 λ 鎖抗体は λ 鎖とわずかな沈降線を認め、NHS との反応はほとんど認められなかった。抗 λ 鎖抗体は高力価のものを得ることは非常に困難といわれ、私も成功しなかった。

IgG(1)のウサギ抗血清はIgG(2), IgG(3)およびIgG(4)の κ 鎖型の myeloma 蛋白を加えて, 1 昼夜放置し, 沈降蛋白を除去し, IgG(1)に対する特異性を増したのちに使用した。

これらの各抗血清から硫酸分画法(最終濃度43%)で γ -globulin 分画を採取し, これを0.1M, PB, pH7.8 に溶解し, 同一 buffer で1 昼夜透析後, 沈澱する分画を遠心除去後, 上清分画を Sepharose に結合させるために用いた。

Sepharose 4 B のCNBr 活性化は Porath⁽¹¹⁾の方法に準じて行った。即ち通常 Sepharose 4 B 100g を3 回蒸留水で洗滌後に10 g の CNBr 水溶液(約50ml)を徐々に添加混和し, pH を11.0~11.4に保つため1N-NaOH を少量づつ加え10分間保持した。余剰の CNBr を冷0.1N NaHCO₃ 7.000 ml で洗滌後, この活性化 Sepharose 4 B を上記の γ -globulin 分画と5°Cで攪拌下混和し, 1 昼夜この状態を保った後, 上清液のO.D 280nmの減少率から結合した蛋白量を算出した。その結果 Sepharose 1g に γ -globulin の約8~10 mg が結合した。この γ -globulin 結合 Sepharose を直径約3 cmのカラムにつめ, 未結合蛋白を0.05M, PB, pH7.8 で充分洗滌後, 各検体を apply し affinity chromatography を行った。この場合 溶出液は automatic UV recorder (東洋濾紙 K.K. 製)にて波長OD 280nm で記録したのち fraction collector で分別採取した。

その展開は未吸着の蛋白の溶出後, カラムに結合している蛋白を0.1M glycine-HCl buffer pH 2.8 で溶出した。通常この酸性 buffer での溶出分画は直ちに0.1N NaOH でpH 7.8 に中和後, 免疫電気泳動法, Ouchterlony 法あるいは bioassay の試料とした。またある場合には中和せずに凍結保存し, assay 時に溶解し生物活性を測定した。

(4) LATS-IgG(1)の papain 加水分解後の生物学的活性

LATS 陽性血清を Anti-IgG(1)結合 Sepharose カラムに apply し, 未吸着の第一分画を完全に除去したのち, 0.1M glycine-HCl buffer pH 2.8で溶出する第二分画をえた。この分画は抗 IgG(1)抗体 (Nordic Immunological Lab, Tilburg, The Netherlands)と明瞭な沈降線を示した。この IgG(1)の100mg に対して papain 100mg (Sigma 社), 0.01 M cysteine, 0.002M EDTA 含有のPB, pH 7.0中で Franklin の法に従って37°C 18時間加水分解を行った。この加水分解物を Staphylococcal protein A 結合 Sepharose カラムに apply した。Protein A を用いる affinity chromatography 法は既に発表した方法に準じて行った⁽⁷⁾。カラム未吸着分画 Fr(1) を除去後, 0.1M glycine HCl buffer で吸着分画 Fr(2)を溶出した。Ouchterlony 沈降反応でこの Fr(1)は抗 Fab 抗体と反応したが, 抗 Fc 抗体との反応は認められなかった。また Fr (2)は抗 Fc 抗体と反応を示したが, 抗 Fab 抗体とは反応しなかった。

(5) Concanavalin A (Con A) 結合 Sepharose 4 B カラムによる精製法

Con A 結合 Sepharose 4 B は Pharmacia (Uppsala) から購入した。このカラムを用いての被検血清の affinity chromatography は Porath の方法⁽¹²⁾に準じて行った。

LATS-IgG または LATS 陽性血清は0.05 MPB, pH7.8 (1.0M NaCl 含有)にて1 昼夜5°Cで透析し, LATS-IgG 50mg または LATS 陽性血清 3 ml を同一 buffer で飽和した Con A 結合 Sepharose カラム(30 × 3 cm)に apply した。まず未吸着蛋白(第一分画)の溶出後, 0.1M の α -methyl-D-mannoside 含有の同一 buffer で第二分画を溶出した。

(6) 免疫学的検索法

免疫電気泳動法は Schleidegger の変法⁽¹³⁾で行った。沈降抗体の検出は micro-Ouchterlony (1.5% agar を用いる)法に準じて行った。

(7) 各種抗血清

蛋白質の諸性状の検定にはヒト IgG, IgA または IgM のそれぞれの抗血清(ウサギ), 抗 κ 鎖または抗 λ 鎖血清(ウサギ), 抗 albumin および抗 α_2 -macroglobulin 血清(ウサギ)を用い, Hoechst (Boehringer 社)から購入した。

(8) 電気泳動法

Cellulose acetate 膜 (Sepax, 三光純薬K.K.) を用いて, $\mu=0.06$, veronal buffer, pH 8.5 で行なった。200 V で巾 1 cm に約 0.8 mA の条件で約 1 時間泳動した。

(9) 蛋白溶液の濃縮

蛋白試料を visking tube に入れ 5℃ の cold room での fun evaporation, または Hollander-Fiber 80 (DoW Chemical Lab.) または凍結乾燥にて濃縮した。

Table 1. Distribution of LATS activity in euglobulin and pseudoglobulin.

Patient	Whole serum (Assay response at 9 hr) %	Recovery (%)	
		Euglobulin	Pseudoglobulin
T.T	960 $\pm$ 120	13	80
S.H	1125 $\pm$ 175	10	85
T.O	872 $\pm$ 103	7	90

Euglobulin was obtained by dialysis against 0.005M, phosphate buffer (ph 7.0).

Fig. 1. Chromatography of LATS Positive Serum by DEAE-Cellulose.

実験成績

(1) 血清における LATS 活性の局在性について

LATS 陽性血清を 0.005M, PB, pH 7.0 で透析し, 沈澱 euglobulin 分画とその上清の pseudoglobulin 分画の生物活性を蛋白量 3 mg~10 mg を用いて検討した (Table 1). 3 例の患者血清では LATS 活性はその 7~13% が euglobulin 分画に認められたが, 他の大部分は上清の pseudoglobulin 分画に認められた。よって, pseudoglobulin 分画を DEAE-Cellulose カラムにて 0.005M, PB, pH 7.0 を用いて展開した結果, 多量の未吸着の蛋白 [Fr(1)] が溶出されたので, この蛋白溶出開始からピークまでの分画を (a) とし, ピーク後の分画を (b) として別々に bioassay した。0.0175M, PB, pH 6.3 を用いて溶出した分画を Fr(2) とした。

免疫電気泳動法にて Fr(1)は泳動速度の遅い slow migrating IgG であり, Fr(2)は泳動速度の速い fast migrating IgG であることが証明された。また0.04M acetate buffer pH 5.9での溶出分画 Fr(3)は IgG, IgA および α_2 -macroglobulin が少量混入していた。更に0.1M acetate buffer pH 5.8 での溶出分画 Fr(4)は主に albuminであったが, IgG, transferrin や α_2 -macroglobulin が少量混在した (Fig 1)。

これら各分画の LATS 活性を検討すると, 3 例中 2 例において LATS 活性は Fr(1)の(a)分画よりも Fr(1)の(b)の方が大であった。他の 1 例は両者ともほぼ同程度に分布した。しかしこれらの 3 例とも LATS 活性は Fr(2)に最高の比活性を示し, Fr(1)の約1.5~2.0倍の比活性を示した。Fr(3)では Fr(2)の約 $\frac{1}{2}$ であった。この様に IgG 分画に高い LATS 活性があることおよび IgG の混入分画に弱い LATS 活性の存在することが確認された (Table 2)。

Table 2. Distribution of LATS activity in eluted fraction from DEAE-Cellulose column.

Patient	Assay response at 9 hr (%)				
	No(a)-Fr(1)	No(b)-Fr(1)	Fr(2)	Fr(3)	Fr(4)
T.T	207 $\pm$ 20	379 $\pm$ 32	682 $\pm$ 70	380 $\pm$ 22	110 $\pm$ 27
S.H	437 $\pm$ 48	478 $\pm$ 48	832 $\pm$ 92	302 $\pm$ 52	112 $\pm$ 13
T.O	537 $\pm$ 50	580 $\pm$ 56	735 $\pm$ 85	380 $\pm$ 40	114 $\pm$ 20

Each fraction (shaded area) was assayed in 4 mg of protein.

All values are shown as mean $\pm$ standard deviation for group of 5 mice.

No(a)-Fr(1): eluted fraction before peak.

No(b)-Fr(1): eluted fraction after peak.

Fig. 2. Separation of LATS by Affinity Chromatography on Anti-IgG-Sepharose.

(2) 各種抗体結合 Sepharose を用いての affinity chromatography による検討

上記の成績により被検血清より LATS の分離には, IgG 分画の効率的な採取が妥当と考えられたので, LATS 陽性血清を0.0175M PB, pH 6.3で透析後, 同一 buffer で飽和した DEAE-Cellulose カラムで展開し, 未吸着分画を採取した。これを LATS-IgG として以下実験に供した。

Anti-IgG 結合 Sepharose カラム (3.0×15cm) に LATS-IgG を 40mg apply し, 0.05M, pH 7.8 にて溶出すると, まづ未吸着の痕跡的な蛋白の Fr 1 が出現した. ついでカラムを充分 buffer で洗滌したのち, 0.1M glycine-HCl buffer pH 2.8 で溶出させた (Fr 2). これを NaOH で pH 7.8 に中和後, 抗 IgG ウサギ血清と Ouchterlony 法で検討すると一本の沈降線をえた [Fig 2(A)].

Fr 1 を濃縮後蛋白 0.3mg と Fr 2 の 3mg をそれぞれ bioassay した (Table 3). 即ち LATS 活性は Fr 1 には全く見いだされず, Fr 2 に見いだされた. この Fr 2 分画の一定の蛋白量当りの比活性はこのカラム添加前に比べて増加はみとめられなかった. なお Fr 2 のピーク (pH 5.0) を中和せずに, 酸性液のまま直接腹腔内に投与した場合にも LATS 型の反応 (3h < 9h) がみとめられた. しかし Fr 2 を溶出後直ちに中和して bioassay した方が酸性液 (pH 5.0) のまま投与する場合に比し約 30% の反応増加がみられた. なお Fr 2 を酸性状態で -20°C に凍結保存 3 ヶ月後における活性は減弱することなく, かつ LATS 型の反応を示し, TSH 型の反応ではなかった. これは LATS の安定性を示唆するものである.

Table 3. Distribution of LATS activity by affinity chromatography on anti-IgG bound sepharose.

Test sample	Assay sample (mg)	Assay response (%)
LATS-IgG (I.T)	starting material 3.0	780 ± 77*
	Fr 1 0.3	102 ± 14
	Fr 2 ^a 3.0	590 ± 60*
	Fr 2 ^b 3.0	800 ± 94*
	Fr 2 ^{+a} 3.0	560 ± 87*
	Fr 2 ^{+b} 3.0	760 ± 80*
LATS positive sera (T.N)	whole serum 20.0	880 ± 90*
	Fr 1 6.0	108 ± 14
	Fr 2 ^b 3.0	660 ± 84*
LATS positive sera (A.S)	whole serum 20.0	778 ± 84*
	Fr 1 10.0	112 ± 12
	Fr 2 ^b 4.0	712 ± 92*

All values are shown as mean ± standard deviation.

*; $p < 0.01$, from control (100%)

a; assay in acid solution (pH 5.0) without neutralization

b; assay in neutral solution (pH 7.0) after neutralization

+: stored in acid solution (pH 5.0) for 3 months at -20°C

LATS 陽性血清を直接この Anti-IgG 結合 Sepharose カラムに apply した場合, 未吸着の第 1 分画は Ig-G のみが除去された血清蛋白から成っていることが免疫電気泳動および抗 IgG ウサギ血清を用いて確認された. ついで 0.05M, PB, pH 7.8 で未吸着蛋白を除去後 280nm の吸光度が 0.02 以下になったのち, 0.1M glycine-HCl buffer pH 2.8 で吸着蛋白を溶出すると IgG が溶出され, LATS 活性はほとんどこの Fr 2 に見いだされた [Fig. 2 (B)] 即ち Fr 1 の蛋白 6mg には LATS 活性はみとめなかったが, Fr 2 の 3mg には非常に高い活性をみとめた. 他の LATS 患者血清においても相似の結果をえた (Table 3).

Fig. 3. Separation of LATS by Affinity Chromatography on Anti-IgG-Sephrose.

Table 4. Distribution of LATS activity by affinity chromatography.

Sephrose bound fraction	Assay sample (mg)	Assay response (%)
Anti-Fab	whole serum (H.S) 20.0	508 ± 40*
	Fr I 10.0	102 ± 12
	Fr II 4.0	402 ± 18*
Anti-Fc	Fr I 10.0	114 ± 14
	Fr II 4.0	400 ± 28*
Anti-κ	Fr I 20.0	370 ± 60*
	Fr II 5.0	314 ± 55*
Anti-λ	Fr I 20.0	520 ± 36*
	Fr II 1.0	110 ± 18
Anti-IgG (1)	Fr I 10.0	200 ± 24*
	Fr II 2.5	495 ± 37*
Protein A	Fr I (Fab) 2.5	350 ± 28* (a)
		218 ± 26*
	Fr II (Fc) 2.5	102 ± 7 (a)
		108 ± 8

Experimental methods are shown in Fig. (5) and Fig. (6).

All assay response are shown as mean ± standard deviation in 9 hr except (a) that is shown in 3 hr.

*, $p < 0.01$, from control (100%)

Separation of LATS by Affinity Chromatography on Anti-lightchain Sepharose

Fig. 4. Separation of LATS by Affinity Chromatography on Anti-lightchain Sepharose.

Fig. 5. Separation of LATS by Affinity Chromatography on Anti-IgG (1)-Sepharose and Protein A-Sepharose.

抗 Fab 結合 Sepharose カラムおよび抗 Fc 結合カラムを用い同様の実験を行った。即ち LATS 陽性血清を分画した場合 (Fig. 3), 未結合の蛋白 (Fr I) はいずれの場合も IgG は除去されていた。また酸性液でカラム吸着蛋白を解離溶出した場合の Fr II には IgG 分画が溶出し、本分画に LATS 活性をみとめた (Table 4)。

免疫グロブリンの light 鎖に対する抗体即ち κ 鎖、 λ 鎖に対する抗体を結合した Sepharose カラムを用いて同様の affinity chromatography を行った (Fig. 4)。即ち 2 人の患者から得た LATS 陽性血清を抗 κ 鎖カラムにて分画した場合、LATS 活性は未吸着の Fr I 分画、および酸性解離の Fr II 分画にも見いだされた。しかし抗 λ 鎖カラムを用いた場合、この抗 λ 鎖抗体の高力価のものがえられない為、Fr I 分画にほとんどの蛋白が溶出され、酸性解離の Fr II 分画の蛋白 (IgG) は微量で、LATS 活性は Fr I 分画に見いだされたが、Fr II 分画には検出出来なかった。(Table 4)。

Fig. 6. Separation of LATS by Affinity Chromatography on Con-A Sepharose.

LATS 陽性血清を抗IgG (1)結合 Sepharose カラムにて分離すると、分画前の血清の約8倍比活性の高いIgG (1)分画がえられた。即ち LATS 陽性血清20mg (500% 9h) がこの affinity chromatography による精製でIgG (1)2.5mgに同活性を認めた (Fig. 5 および Table 4)。

このIgG (1)を papain で加水分解し、Protein A 結合 Sepharose カラムにて Fab 分画と Fc 分画に分離した (Fig 5)。Fab 分画にのみ short acting 型の甲状腺刺激作用が見い出され、Fc 分画には刺激作用がみとめられなかった (Table 4)。

(3) Con A結合 Sepharose カラムによる検討

0.05M, PB, pH7.8 (1 MNaCl 含有) buffer で十分に透析した LATS-IgGを同一 buffer で飽和した Con A 結合 Sepharoseカラムにて分画すると、まづ未吸着のFr Iが溶出した。ついで0.1M, α -methyl D-mannoside 含有の上記の buffer で溶出すると、微量の蛋白が溶出した (Fig. 6(A)) Fr I 3mgは 680%の LATS 活性を示したが、Fr IIの濃縮した分画0.5mgには活性はみとめられなかった (Table 5)。同様の実験を LATS 陽性血清で行った (Fig. 6(B))。

Fr I は主に albuminとIgGから成り立っていた、活性はFr Iに見い出され、Fr IIにはなかった (Table 5)。

Table 5. Distribution of LATS activity by affinity chromatography on Con A bound Sepharose.

Test sample	Assay sample (mg)	Assay response (%)
LATS-IgG (T.N)	starting material 3.0	635 $\pm$ 30*
	Fr I 3.0	680 $\pm$ 90*
	Fr II 0.5	110 $\pm$ 12
LATS positive sera (H.S)	whole serum 15.0	412 $\pm$ 35*
	Fr I 15.0	530 $\pm$ 70*
	Fr II 8.0	104 $\pm$ 24

All values are shown as mean $\pm$ standard deviation.

*; $p < 0.01$, from control (100%)

考 案

バセドウ病の病因は未だ不明であるが1956年 Adamsら⁽¹⁾により発見された LATS は免疫グロブリン IgG であることがみとめられ⁽²⁾, 一種の自己免疫抗体であると考えられるに至り, 本症の病態生理に重要な役割を演ずるとされている。しかし LATS はバセドウ病患者のすべてには見い出されず, また甲状腺機能亢進の程度とも比例しないとされている。むしろ眼球突出や限局性粘液水腫を伴う症例に多く見い出されるので, LATS は眼球突出や限局性粘液水腫と関係が深いと考える研究者が多い。血清からの LATS の精製法に関しては既に多くの報告がある^{(2)~(8)}。塩析法で血清の pseudoglobulin 分画に主に LATS 活性は存在するとされている⁽²⁾⁽³⁾⁽⁴⁾⁽⁵⁾が, Smith⁽¹⁴⁾らはある血清では euglobulin にかなり存在すると報告している。今回検討した3血清では7~13%が0.005M, PB (pH7.0) で透析した場合の euglobulin にも見い出された。しかしほとんどが pseudoglobulin 分画にみとめられた。

DEAE-Cellulose カラムで LATS-IgG を精製する場合

- 0.01M, PB, pH8.0 (Miyai⁽⁵⁾)
- 0.01M, PB, pH6.5 (Smith⁽¹⁴⁾, Florsheim⁽¹⁶⁾)
- 0.0175M, PB, pH6.3 (Dorrington⁽¹⁷⁾, Ohci⁽¹⁰⁾)
- 0.02M, PB, pH6.6 (Smith⁽¹⁴⁾)
- 0.05M, PB, pH6.4 (Mckenzie⁽¹⁸⁾)
- 0.0066M, PB, pH7.4 (Schleusener⁽⁶⁾)

等種々の溶出液を用いてカラムに未吸着の分画から LATS を精製している。一般にこのカラムで低イオン強度の溶出液で溶出する分画は, 電気泳動で slow migration IgG であり, イオン強度の増加に伴って fast migration IgG が溶出するとされている⁽¹⁹⁾⁽²⁰⁾。

今回の実験で3血清のうち2血清では, イオン強度をあげて溶出する IgG 分画の LATS 比活性が高いことから, slow IgG よりも fast IgG の方が高い LATS の比活性をもつこと, また最高の LATS 活性分画は 0.0175M, PB, pH6.3 で溶出する分画に見いだされた。

他方 Miyai⁽⁵⁾, Schleusener⁽⁶⁾らは LATS 活性は電気泳動で slow IgG 分画に主に存在すると述べている。しかし Smith, Dorrington⁽¹⁴⁾らは slow と fast IgG の両方にみとめられること, また fast IgG に活性が高い場合もあるとしているが, 今回の実験では slow IgG にもみとめられ, fast IgG (3血清中2例) に比活性が高いことをみとめた。他の1例では slow, fast の両分画に均等に分布していた。

また LATS 蛋白の等電点に関して Schleusener⁽⁶⁾, Lonergan⁽⁷⁾, Adlkofer⁽⁸⁾らが, それぞれ pH8.0—9.0, pH8.0—9.5 および pH7.5—9.5 の塩基性の heterogeneity の多い IgG 蛋白から成っていると報告している。

LATS-IgG を精製する場合, DEAE-Cellulose カラムを用いて, 0.0175M, PB, pH6.3 で溶出させる方法が巾広い IgG 分画を分離することが出来, 回収率が良好と考えられる。

以上の如く, 諸家の報告及び私の実験から LATS は heterogeneity の高い IgG 蛋白から成っているといえる。また私の実験での LATS-IgG 分画は DEAE Cellulose を用いて 0.0175M, PB, pH6.3 で溶出し精製したものをを用いた。この LATS-IgG 分画または LATS 陽性血清から LATS 活性を更に精製するために, 抗ヒト IgG 結合 Sepharose を用いて affinity chromatography を行った。LATS-IgG の場合は LATS 活性は IgG 分画とともに溶出された。LATS 陽性血清そのものを apply した場合には, このカラムで IgG を除く他の血清蛋白が未吸着分画として溶出され, カラムに吸着した IgG 蛋白と LATS 活性は酸性解離により溶出された。また抗 Fab (IgG), 抗 Fc (IgG) 結合 Sepharose カラムを用いた affinity chromatography 法で LATS 陽性血清を分画した場合にも, LATS 活性は IgG 分画に見い出された。またこれらの実験で酸性解離 IgG 分画を NaOH で中和せず, pH5.0 のままでマウスの腹腔内に注射した場合, TSH の様な sh-

ort acting 型の反応でなく, LATS 型の反応を示す。またこの酸性下で3ヶ月凍結保存後も相似の反応を示すので, LATS の活性は定安であると言い得る。この抗IgG 結合 Sepharose を用いる affinity chromatography 法は, カラムを大きくすることにより, 多量の LATS-IgG を簡単に精製し得る方法である。またこのカラムは使用後 pH7.8, PB buffer でよく洗滌し, 4℃に保存すれば数ヶ月間使用可能である。

2種のlight 鎖に対する抗体, 抗 κ 鎖および抗 λ 鎖を用いて affinity chromatography を行つたところ高力価の抗体の抗 κ 鎖では LATS 活性は未吸着の蛋白部分 および吸着蛋白の両分画に活性がみつめられた。しかし抗 λ 鎖では抗体価が弱い為に, affinity chromatography で未吸着蛋白分画のみに LATS 活性が見い出された。これは抗 λ 鎖力価が弱い為に IgG がカラムに吸着されなかつた可能性が大きい。即ち Ochi⁽¹⁰⁾ および Kriss⁽²¹⁾ らが LATS 活性は抗 κ 鎖および抗 λ 鎖抗体でそれぞれ50%程度中和され, 両抗体でほとんど完全に中和されると報告しているが, 今回の affinity chromatography 法では, 実験条件が不良のためか LATS-IgG への κ 鎖の関与は確認し得たが, λ 鎖の関与は明確にし得なかつた。

LATS 活性は上記の様に Immunoglobulin G に分布するが, 最近我々は staphylococcal Protein A 結合 Sepharose カラムを用いて LATS 陽性血清から IgG の subclass のうち 1, 2, および 4 を分離し, ほとんどの LATS 活性がこの3分画に分布することを報告した⁽²⁷⁾。

今回は IgG 中の主構成成分である G(1)を LATS 陽性血清から分離するために抗IgG(1)結合 Sepharose カラムを用いた。この分離 IgG(1)分画を加水分解したのち, IgG の Fc 分画と特異的に結合を示す Protein A 結合 Sepharose カラムを用いて Fab と Fc 分画に分けた。Fab 分画に short acting type の甲状腺刺激作用を認めたが, Fc 分画には刺激作用はなかつた。

既ち MeeK⁽³⁾, McKenzie⁽⁴⁾, Kriss⁽²⁸⁾ や Dorrington⁽²⁹⁾ らは LATS-IgG の papain や pepsin 加水分解にて short acting type に変わることを報告しているが, これらの実験で Fab と Fc 分画の分離は DEAE-Cellulose カラムを用いているので, 0.01M, PB, pH, 8.0 で DEAE に未吸着の分画(第1分画)は Fab の他に未分解の IgG も含まれる可能性があり, この分画が甲状腺刺激作用を示しても, 加水分解されずに残存している IgG による可能性を否定出来ない。今回の Protein A-Sepharose カラムでは未分解の IgG は Fc 分画とともにカラムに吸着され, Fab 分画はカラムに未吸着の分画であるので, この方法で Fab 分画にのみ活性があることより, LATS 活性は IgG(1)の Fab 分画に存在することを確認しえたものを思われる。

Con A は糖蛋白と糖鎖で結合することが知られ, 最近生物学の領域において広汎に用いられているが, 血清蛋白のうちでも albumin は糖蛋白でない為, Con A とは反応しないと云われている⁽²²⁾⁽²³⁾のに反し, IgM, IgA, IgD や IgE は8%以上の糖含有量を有するので, Con A と反応することが報告されている⁽²²⁾⁽²³⁾。しかし IgG の糖含有量は3.5%であるため反応し難いと報告されている⁽²³⁾。monoclonal な IgG myeloma の場合は約50%が反応するので, 蛋白構造の heterogeneity による糖鎖の反応性の変化によるものと推定されている⁽²³⁾。

したがって私は LATS と Con A との反応を Porath⁽¹²⁾の方法に準じて検討した。即ち LATS 陽性血清は Con A-Sepharose カラムにて分画すると, LATS 活性は albumin や IgG とともに未吸着の第1分画に認められた。しかも α -methyl-D-mannoside で解離した分画には活性は認められなかつた。このことから LATS は polyclonal IgG と同様に Con A に結合しない事が推定され, monoclonal IgG でない事が強く示唆された。また宇井ら⁽²⁴⁾は TSH が Con A に結合すると報じ, Con A に結合した TSH は失活せず, mannose で解離されるので, TSH の精製法に利用されている。この様に TSH と LATS は Con A への結合性が全く正反対であるので, Con A を用いる affinity chromatography はこの甲状腺刺激作用を有する2つの glycoprotein の分別のみならず, 構成或いは機能の解明に有用と考えられる。

最近 Smith⁽²⁵⁾ はバセドウ病患者血中の甲状腺刺激免疫 globulin を T S I (Thyroid Stimulating Immunoglobulin) と総称し, また女屋らはこれを H T S (Human Thyroid Stimulator)⁽²⁶⁾と呼んでおり, 本症

患者血中に高率に陽性で、ヒト甲状腺を特異的に刺激することを報告している。これらはそれぞれ異った測定法により、命名分類されているので、LATS の TSI および HTS への混入の可能性もあり、今回 LATS について検討した方法や手段により、今後上記の刺激物質も検討されるべきと思われる。

ま と め

- 1) LATS 活性は血清の pseudoglobulin 分画に見い出され、IgG 分画に存在する。
- 2) 血清から LATS 活性分画を回収率よく採取する為には、DEAE-Cellulose カラムを用いて 0.0175M, PB, pH 6.3 の条件での溶出が有用である。
- 3) Affinity chromatography を用いる LATS の精製法
 - イ. 抗ヒト IgG 結合 Sepharose カラムに LATS 活性は吸着され、酸性で溶出される。
 - ロ. 抗 Fab (IgG), 抗 Fc (IgG) を用いる affinity chromatography でも、LATS は同様にカラムに吸着される。
 - ハ. 抗 κ 鎖を用いたカラムでは、LATS 活性の一部は吸着されるので、本活性の一部は κ 鎖に起因すると考えられる。抗 λ 鎖では高力価の抗血清が得られず、結論は得られなかった。
 - ニ. これらの affinity chromatography を用いる方法で血清中から LATS 活性を IgG 分画として効率よく精製し得る。
- 4) LATS-Immunoglobulin G (1) の加水分解後の甲状腺刺激活性

抗 IgG (1) 結合 Sepharose カラムで LATS 陽性血清から IgG (1) を分離したのち、papain で加水分解し Protein A-Sepharose カラムで Fab 分画と Fc 分画を分離すると、Fab にのみ short acting type の甲状腺刺激作用が見い出された。
- 5) 以上の様に LATS 活性は IgG (主に IgG (1)) に分布するので、血清中の IgG を分離する諸種の affinity chromatography 法によって、LATS 活性を分離出来ることを確認した。

稿を終るにあたり貴重な資料をお送り下さいました金沢大学右田教授ならびに名古屋市大佐々木助教授に深謝いたします。また御校閲下さいました伊地知教授ならびに直接御指導下さいました越智助教授に深謝いたします。

文 献

- 1) Adams, D.D.: The presence of an abnormal thyroid-stimulating hormone in the serum of some thyrotoxic patients. *J.Clin. Endocr.*, 18: 699-712, 1958.
- 2) Kriss, J.P., Pleshkov, P.V. and Koblin, R.: Isolation and identification of long-acting thyroid stimulator and its relation to hyperthyroidism and circumscribed prelibial myxedema. *J. Clin. Endocr.*, 24: 1005-1028, 1964.
- 3) Meek, J.C., Jones, A.E., Lewis, V.J. and Vanderlaan, W.P.: Characterisation of the long acting thyroid stimulator of Graves' disease. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 52: 342-349, 1964.
- 4) McKenzie, J.M.: The Long-Acting Thyroid Stimulator: Its Role in Graves' disease. *Recent. Progr. Hormone. Res.*, 21: 1-46, 1967.
- 5) Burke, G.: Thyroid Stimulators And Thyroid Stimulation. *Acta. Endocr.*, 66: 558-576, 1971.
- 6) Schleusener, H., Adlkofer, F., Uher, L., Kaper-Czygan, S. and Kirstaedter, H.J.: Isoelectric focusing of long-acting thyroid stimulator. *Horm. Metab. Res.*, 3: 221-222, 1971.
- 7) Lonergan, C., Babiarz, D. and Burke, G.: Isoelectric Focusing of Long-Acting Thyroid Stimulator Immunoglobulin G. *J. Clin. Endocr.*, 36: 439-

- 444, 1973. 8) Adlkofer, F., Schleusener, H., Uher, L. and Ananos, A.: Heterogeneity of Long Acting Thyroid Stimulating (LATS)-Activity, Thyroglobulin Antibodies and Thyroid Microsomal Antibodies. *Acta. Endocrinol*, 73: 483–488, 1973.
- 9) Ochi, Y., Shiomi, K., Hachiya, T., Yoshimura, M. and Miyazaki, T.: Separation of LATS from sera containing both LATS and TSH by dextran-coated charcoal. *Endocrinol*, 91: 1389–1391, 1972. 10) Ochi, Y. and DeGroot, L.J.: Studies on the Immunological Properties of LATS. *Endocrinol*, 83: 845–854, 1968. 11) Axen, R., Porath, J. and Ernback, S.: Chemical Coupling of Peptides and Proteins to Polysaccharides by Means of Cyanogen Halides. *Nature*, 214: 1302–1304, 1967. 12) Aspberg, K. and Porath, J.: Group-specific Adsorption of Glycoproteins. *Acta. Chem. Scand.*, 24: 1839–1841, 1970.
- 13) Schleidegger, J.J.: Une micro-methode de l'immuno-electrophorese. *Int. Arch. Allergy*, 7: 103–110, 1955. 14) Smith, B.R., Munro, D.S. and Dorrington, K.J.: The Distribution of the Long-Acting Thyroid Stimulator Among G-Immunoglobulins. *Biochem. Biophys. Acta.*, 188: 89–100, 1969. 15) Miyai, K. and Werner, S.C.: Concentration of long-acting thyroid stimulator (LATS) by subfractionation of γ -G-globulin from Graves' disease serum. *J. Clin. Endocr.*, 26: 504–512, 1966. 16) Florsheim, W.H.: A Simple Method of Purifying Human Sera for the Assay of Long-Acting Thyroid Stimulator. *Experimentia*, 23: 404–406, 1967. 17) Dorrington, K.J., Munro, D.S. and Carneiro, L.: Reduction of γ -globulin with long acting thyroid-stimulating activity. *Lancet*, 2: 889–891, 1964. 18) McKenzie, J.M., Adiga, P.R. and Murthy, P.V.N.: Stimulation by Thyrotropin, Long-Acting Thyroid Stimulator, and Dibutyl 3' 5'-Adenosine Monophosphate of Protein and Ribonucleic Acid Synthesis and Ribonucleic Acid Polymerase Activities in Porcine Thyroid in Vitro. *Biochem.*, 10: 702–711, 1971.
- 19) Adams, E.C., Yoder, J.M. and Free, A.H.: Chapter 17, Serum Proteins and the Dysproteinemias, eds by Sunderman and Sunderman, Lippincott, Philadelphia, 1964. 20) Leonald, L.L., Schmidt, N.J. and Lennette, E.H.: Demonstration of Viral Antibody Activity in Two Immunoglobulin G Subclasses in Patients with Varicella-Zoster Virus Infection. *J. Immunol.*, 104: 23–27, 1970. 21) Kriss, J.P.: Inactivation of Long-Acting Thyroid Stimulator (LATS) by Antikappa and Anti-lambda Antisera. *J. Clin. Endocr.*, 28: 1440–1444, 1968. 22) Leon, M.A.: Concanavalin A Reaction with human normal immunoglobulin G and myeloma immunoglobulin G. *Science*, 158: 1325–1326, 1967. 23) Goldstein, I.J., So, L.L., Yang, Y. and Callies, Q.C.: The Interaction of Concanavalin A with IgM and the Glycoprotein Phytohemagglutinins of the Waxbean and the Soybean. *J. Immunol.*, 103: 695–698, 1969. 24) Ui, N., Takahashi, H., Yora, H. and Condliffe, P.G.: Affinity chromatography of whole and bovine TSH as columns of Concanavalin A sepharose. *Fed. Proc.*, 34: 702, 1975. 25) Mukhtar, E.D., Smith, B.R., Pyle, G.A., Hall, R. and Vice, P.: Relation of thyroid-stimulating immunoglobulins to thyroid function and effects of surgery, radioiodine and antithyroid drugs. *Lancet* 1: 713–715, 1975. 26) Onaya, T., Kotani, M., Yamada, T. and Ochi, Y.: New in vitro test to detect thyroid stimulator in sera from hypothyroid patients by measur-

ing colloid droplet and cyclic AMP. *J. Clin. Endocr.*, 36: 859—866, 1973.

27) Ochi, Y., Hachiya, T., Yoshimura, M. and Miyazaki, T.: Immunological studies on LATS-immunoglobulin by the reaction with Staphylococcal Protein A. *Endocr. Jap.*, 23: 183, 1976.

28) Kriss, J.P., Pleshakov, V., Rosenblum, A. and Chien, R.J. In; Cassano, C. and Andreoli, M., Eds.: Studies on the formation of Long-Acting Thyroid Stimulator Globulin (LATS) and the alteration of its biologic activity by enzymatic digestion and partial chemical degerenation. *Current Topics in Thyroid Research*, Academic Press, New York, London, 432, 1965.

29) Dorrington, K.J., Carneiro, L. and Munro, D.S. In; Cassano, C. and Andreoli, M., Eds.: Chemical studies on the Long-Acting Thyroid Stimulator. *Current Topics in Thyroid Research*, Academic Press, New York, London, 455, 1965.