

学 位 論 文 題 名

ヒト補体C 3 転換酵素の分子集合機構に関する研究

学位論文内容の要旨

抗体と共に体液性免疫を構成する補体系は、約20種類の血清蛋白質からなり、細菌膜障害、細胞性免疫因子の活性化、炎症惹起など、多彩な生理活性をしめす酵素系で、その活性化経路には古典的経路と第二経路の2種類あることが知られている。

古典的経路では、免疫複合体などの異物により活性化されたC 1が、C 4 ついでC 2 を限定分解し、C 3 転換酵素と呼ばれるプロテアーゼを標的異物表面に形成する。補体の生理活性の多くがC 3 転換酵素の作用により発現するところから、C 3 転換酵素は補体系において中枢的な位置を占めている。このC 3 転換酵素はC 4 bとC 2 aの2種類の補体フラグメントからなる分子集合体のプロテアーゼで、C 4 bとC 2 aが結合した状態の時だけプロテアーゼ活性を示し、生理的条件下では半減期約3分で解離失活する。このような不安定性ゆえに、その活性化機構の研究が極めて困難で、分子集合機構の詳細については未解決の問題が多く残されている。

本論文では、液相中でのヒト補体C 3 転換酵素の形成と安定性に関与する因子として、Mgイオン濃度だけではなくイオン強度も重要な因子であることを見だし、その機構を明らかにした。また、C 4 bに対する2種類のモノクローナル抗体のエピトープの解析を行い、C 4 b分子中のC 2 結合部位を推定するとともに、3本鎖構造(α , β , γ)をしたC 4の α - β , α - γ 鎖のジスルフィド結合形成に関与するCys残基を明らかにした。さらに、C 4からC 4 bへの変換に伴う高次構造変化により、C 4 b分子内部に隠されるドメインの構造を明らかにした。

1. 液相中でのヒト補体C 3 転換酵素の形成と安定性に対するイオン強度の影響

C 3 転換酵素活性を測定する方法としては、感作赤血球を用いた溶血反応で測定する系が知られている。しかし、本研究ではオキシ化したC 2をもちいることによりC 3 転換酵素の半減期を約30分に延長させ、高速ゲル濾過カラムを用いたHPLCでC 3 転換酵素量を直接定量し、C 3 転換酵素の形成、安定性に関与する因子の解析を進めた。

0.5mM Mgイオン存在下、種々のイオン強度でC 3 転換酵素の活性化反応を行った。その結果、活性化5分後の形成率は生理的イオン強度付近で最大となるベル型の曲線となった。300mM

NaCl 以上の高イオン強度での活性化率の低下はC 2の変性によることが、種々のイオン強度でのCl⁻によるC 2の切断実験からわかった。一方、HPLC で分取精製したC 3 転換酵素を用いてイオン強度の影響を調べたところ、解離失活化は0 - 500mM NaCl の範囲ではほぼ等しく、C 3 転換酵素自体はイオン強度の影響を受けないことが明らかになった。C 3 転換酵素が500mM NaCl 存在下でも安定なことは、C 4bとC 2a間の結合様式はイオン強度の影響を受けない疎水的な相互作用力によることを示唆している。このように、イオン強度はC 3 転換酵素の安定性には直接関係しないことから他の因子の影響が考えられた。C 3 転換酵素の活性化反応では、C 3 転換酵素の他にC 2 bが生成する。このC 2bにはC 4b結合活性があり、C 3 転換酵素の解離を促進する活性があることが報告されている。そこで、この解離促進活性に対するイオン強度の影響を調べた。その結果、塩濃度が高まるにつれてC 2bによるC 3 転換酵素の解離促進作用が抑制された。

これらの結果から、1) C 3 転換酵素の活性化反応には、生理的イオン強度も重要な因子であり、2) その機構として、C 2 bとC 4 b間のイオニックな相互作用を抑制し、C 2bによるネガティブフィードバック的なC 3 転換酵素の解離促進反応を抑制することが明らかになった。

2. C 4 b分子内のC 2 b結合部位の解析

C 4bに対するモノクローナル抗体のひとつ mAb242は、C 4bへのC 2 (C 2b) の結合を阻害することから、C 4b上のC 2b結合部位あるいはその近傍をエピトープとしていると考えられる。C 4b上のC 2b結合部位はC 3 転換酵素の活性化と制御の両面で重要な位置であるが、未だに明らかになっていない。そこで、この mAb242のエピトープの解析を進めた。C 4cをトリプシン消化し、ウエスタンブロットを行うと抗体と反応する73kDaのフラグメントが得られた。N末端アミノ酸配列から、このフラグメントは α 27鎖由来の α 19鎖と β 鎖由来の β 55鎖がS - S結合を介して結合した構造と推定された。また、還元すると抗体のエピトープが失われることから、 α 鎖のCys63と β 鎖のCys548が結合しているS - S結合近傍がこの抗体のエピトープやC 2b結合部位を構成していることが示唆された。また、このC 4 cの消化実験により、C 4の分子内ジスルフィド結合形成に関与するCys 残基についても明らかになり、 α 鎖Cys63と β 鎖Cys548が、 α 鎖Cys119と γ 鎖がそれぞれS - S結合で架橋されていることが示唆された。

3. C 4の活性化に伴う高次構造変化により分子内配位の変動するドメインの解析

アルツハイマー病の老人斑に対するモノクローナル抗体を作製したところ、その中にC 4と反応する抗体が見いだされた。ウエスタンブロット法でこの mAb (A1121/6)のエピトープを調べるとC 4dドメイン(45kDa)に位置していた。しかし、非変性条件(Native disc-PAGE

や TSK G3000SW カラムを用いた HPLC) で, A1121/6 抗体と種々の C 4 フラグメントとの反応性を調べたところ, この抗体は C 4, C 4 d とは反応するが C 4 b とは反応しないことがわかった。変性条件でのウエスタンブロットでは C 4 b と反応することから, A1121/6 抗体エピトープは C 4 の分子表面にあり C 4 の活性化に伴って C 4 b の分子内に移行するため抗体と反応できなくなるが, C 4 b がさらに C 4 c と C 4 d に切断されると, 再び分子表面に現れることを示唆している。このような C 4 の活性化に連動して分子内配位の変化するドメインに関する報告はないことから, この抗体のエピトープの解析を行った。

C 4 d をトリプシン消化すると, エピトープは C 4 d の C 末端側 13kDa 上にあること, さらに無水フタル酸で化学修飾すると抗体が反応しなくなることからエピトープの中にリシン残基が含まれていることが示唆された。一次構造上この領域には Lys341 しかないことからこの Lys341 近傍がこの抗体のエピトープであると推定された。この Lys341 近傍を含むペプチド [L-L-H-E-G-K-A-E-M-A-D] は C 4 と A1121/6 抗体との結合反応を拮抗阻害したことから, この領域が A1121/6 抗体のエピトープを含んでいることが明かとなった。

以上の結果から α 鎖の Lys341 近傍は C 4 では分子表面に配位しているが, C 4 が C 4 b への切断反応に伴う高次構造変化により, 分子内に移行する可能性が高いと推定される。

学位論文審査の要旨

主 査	教 授	長 澤 滋 治
副 査	教 授	横 沢 英 良
副 査	助教授	高 橋 和 彦
副 査	助教授	澤 田 均

補体系は, 約20種類の血清蛋白質からなる生体防御系で, 異物表面で連鎖的な活性化反応を起こし, 標的異物を攻撃する。この一連の活性化反応に於いて中心的な働きをするプロテアーゼが C 3 転換酵素である。C 3 転換酵素は 2 種類の補体成分フラグメント (C 4 b と C 2 a) から構成される分子集合型プロテアーゼで, 一般的には C 4 b, 2 a と標記される。プロテアーゼとしての活性中心は C 2 a にあるが, C 2 a 単独のときには活性がなく, C 4 b と分子集合しているときだけ活性を現す。また, この C 2 a と C 4 b の分子集合は極めて短寿命なもので, 生理的な条件で

は半減期数分で解離失活する。このような特異な性質のため、C 3 転換酵素に関する生化学的研究が困難であり、分子集合機構の詳細については未解決の問題点が多く残されていた。

申請者はC 3 転換酵素の構成因子であるC 4 b の機能部位に関する研究を進め、以下のような研究成果を挙げた。

1) C 3 転換酵素の形成と安定性に及ぼすイオン強度の影響

従来、抗体感作した赤血球の溶血率を指標にして、C 3 転換酵素の活性化量が測定されてきた。それゆえ、活性化条件は赤血球が安定な生理的イオン強度に限定されていた。本研究では、赤血球を用いなくて、溶液中でC 3 転換酵素を形成させ、高速液体クロマトグラフィーにより、活性化したC 3 転換酵素量を直接的に定量する系を確立した。その結果、C 3 転換酵素の形成率や安定性にはイオン強度が重要な因子であり、生理的なイオン強度が最適条件であることを初めて明らかにした。特に、低イオン強度で活性化した場合は、C 3 転換酵素が速やかに解離失活するが、これは活性化反応に伴って生成するC 2 b フラグメントによるC 3 転換酵素の解離促進効果によること、このC 2 b の不安定化効果は生理的なイオン強度では完全に抑制されることを明らかにした。この知見は、C 3 転換酵素の活性化は内因的な制御因子の産生を伴う反応であり、その制御因子の働きはイオン強度により調節されているという極めて特異な活性化反応であることを意味している。

一方、C 3 転換酵素を構成するC 4 b とC 2 a の相互作用力は1M NaCl の存在下でも安定であった。このことは、両者はイオン強度の影響を受けない疎水的相互作用力により分子集合していることを強く示唆する。

2) C 4 b 分子内のC 2 結合部位の解析。

C 3 転換酵素の形成機構は、a ; C 4 b とC 2 の分子集合による前駆体形成、b ; Cls による前駆体C 4 b - C 2 複合体の切断、c ; C 4 b、2 a とC 2 b への解離、の3段階からなると推定されている。即ち、C 4 b にはC 2 a とC 2 b に対する結合部位が存在すると考えられているが、C 4 b 分子内のC 2 結合部位の位置や構造に関しては明らかでなかった。

申請者の研究室では、先にC 4 b のC 2 b 結合部位に結合すると予想される抗C 4 b 単クローン抗体 (mAb242) を分離している。申請者はこの mAb242 の認識するエピトープの解析を試みた。C 4 b のフラグメントであるC 4 c (150kDa) をトリプシン分解し、mAb242 と反応する最小ペプチドフラグメントを探索した。その結果、エピトープを保存した83k、76k の2フラグメントが得られた。N-末端アミノ酸配列分析により、83k フラグメントは β 鎖由来の64kDa フラグメントと α 27k 鎖由来の19kDa フラグメントから、76k フラグメントは β 鎖由来の55k フ

ラグメントと19kDa とからなることが分かった。この単クローン抗体のエピトープはC4cを還元すると消失することから、ジスルフィド結合を含んでいる可能性を示唆する。この76kDa フラグメントには、ジスルフィド結合は α 鎖フラグメントのCys⁶³と β 鎖のCyS⁵⁴⁸の間でしかかかっていない。したがって、この二つのCys残基間で連結された領域がC2b結合部位である可能性が強いと考えられる。

3) C4からC4bへの切断に伴う高次構造変化により分子内配位の変動する領域の決定。

C4がC1sにより切断されC4bになると、高次構造が変化してC2結合部位が形成される。このとき、C4の分子表面から疎水性に富む領域がC4bの分子内部に移行することも知られている。しかし、その領域がC4bのどこかについては明らかでない。

申請者は、C4に対する単クローン抗体の中から、C4とは反応するがC4bとは反応しない単クローン抗体A1-121/6を見だし、そのエピトープ解析を行った。その結果、このA1-121/6のエピトープは α 鎖の中央部のdドメインのC末端側にあつて、Lys残基を含む領域であることが分かった。C4dドメインのC-末端側にはLys³⁴¹しか存在しない。そこで、このLys³⁴¹を含むデカペプチドを合成し、このペプチドがA1-121/6と反応することを確認した。このエピトープのN-末端側にはAla-Leu-Leu-His-Leu-Leu-Leuという極めて疎水性の高い領域が存在する。これは、この疎水性の領域がエピトープと共にC4bの分子内部に移行する可能性を強く示唆する。

以上、申請者の主要な成果のみを紹介した。近年、補体系が生体防御の外に、種々の疾患の発症とも深くかかわっていることが明らかになり、補体系が臨床の分野でも注目されつつある。また、補体系の阻害剤を指標にした新しい医薬品の開発の試みも活発になってきた。本論文はこうした流れの中で、補体系の活性化の理解を深める多くの成果を含むもので、博士(薬学)の学位をうけるに値するものと判定した。