

博士（薬学） 正 木 貴 久

学 位 論 文 題 名

ヒト補体第4成分C4の活性化とその制御に関する研究

学位論文内容の要旨

補体系は20種以上の血漿蛋白質および約10種類の膜蛋白質群からなる主要な液性の生体防御系である。補体系には2つの活性化経路があり、1つは主に抗原抗体複合物によってC1が活性化されて始まる古典経路（classical complement pathway, CCP）であり、もう1つはC3bが異物に直接沈着することによって始まる第2経路（alternative complement pathway ACP）である。いずれの経路においても、C3bの沈着やmembrane attack complex (MAC)の形成によって異物や非自己細胞は標識され、排除される。補体の活性は一般に、動物の赤血球の溶血反応を指標として測定される。しかし、赤血球は動物によって補体に対する感受性に個体差があり、さらに寿命が約1カ月と短いことから、補体活性の測定に不便であった。そこで脂質二重層で構成された人工の細胞膜モデルであるリポソームを用いて、ヒト補体活性の測定に適したリポソームを開発した。

C4はCCPに属し、C1によって活性化されたC4bはターゲット上に共有結合し、C3 convertase (C4b2a), C5 convertase (C4b2a3b)を形成し、補体による細胞障害反応を誘起する。C5 convertase形成の点からも、補体依存性の細胞障害にはC3が必須であると考えられてきた。しかし近年、C3の完全欠損患者が発見され、この患者血清はC3が存在しないにもかかわらず、補体依存性の細胞障害反応を弱いながらも引き起こすことが見い出された。さらに、その活性はC4の量に依存することが報告されているが、そのメカニズムは不明である。そこで、筆者はこのC3欠損時の補体活性化におけるC4の新しい機能について解析し、C3をバイパスする新しいpathway (C4b dimerによるC5 convertase形成)の分子機構を明らかにした。

活性化されたC4bはfactor Iとそのコファクターであるmembrane cofactor protein (MCP)およびC3b/C4b receptor (CR1)によって制御されている。MCPとCR1はC3bの制御にもfactor Iのコファクターとして働き、その活性はpH依存性 (MCPは6.0,

CR 1 は 7.5 で強く働く) であり、低イオン強度で増強される。さらに、MCP は同じ細胞膜上に沈着した C 3 b に対してより強く働き、CR 1 は自己細胞膜上以外に沈着した C 3 b に対しても働くことから、MCP は intrinsic, CR 1 は extrinsic なコファクターであると言われている。しかし、C 4 b の制御におけるこれらのコファクター活性の違いについては明らかにされていない。そこで MCP と CR 1 の C 4 b 制御反応におけるコファクター活性の違いについて解析した。

1. リポソームによるヒト補体活性の測定

リポソームは補体の膜損傷反応によって溶解する。この時、あらかじめリポソームにマーカーを封入しておくと、補体活性に応じてマーカーが放出される。そこで抗原として trinitrophenyl (TNP) 基を組み込んだ感作 TNP-cap-liposome を作成し、抗 TNP 抗体を感作して補体を活性化し、リポソームの溶解率を求めて補体活性を測定した。その結果、感作 TNP-cap-liposome (LA) はその組成を DMPC : cholesterol : TNP-cap-DPPE : DCP = 1 : 1 : 0.005 : 0.02 (モル比) とした時、ヒト補体を最も効率よく活性化し、溶解した。

2. C 4 b dimer の構造および機能

赤血球などの細胞膜上には、C 4 b が結合し得るさまざまな高分子アクセプターが存在するため、膜に結合した C 4 b の解析を複雑にしている。そこで、リポソーム (LA) と C1 および C 4 を用いて補体反応中間体 (LAC 1, 4) を作成し、リポソーム膜に結合した C 4 b の解析を行なった。その結果、リポソーム膜上で C 4 は C 4 b dimer を形成することが明らかとなった。さらに、C 4 b dimer を結合させた LAC 1, 4 は C 2 a をともなって C 3 非依存的に溶解し、C 5 a を遊離した。従って、C 4 b dimer は C 2 a をともなって C 3 非依存的に C 5 convertase を形成することが明らかとなった。C 4 には C 4 A と C 4 B の 2 つのアイソタイプが存在し、主に C 4 A はターゲット上のアミノ基、C 4 B は水酸基に結合する。そこで C 4 A, C 4 B のリポソーム膜への結合を検討した結果、C 4 A はアミド結合、C 4 B はエステル結合によって、それぞれ dimer を形成していることが明らかとなった。さらに、C 4 A および C 4 B の dimer は、いずれも C 2 a をともなって C 3 非依存的に C 5 convertase を形成し、リポソームを溶解した。その活性は C 4 B の方が C 4 A より約 2 倍高かった。

3. C 4 b 分解に対する MCP と CR 1 のコファクター活性の違い

C 4 b は factor I の存在下 MCP または CR 1 によってまず C 4 b i に切断され、続いて C 4 c と C 4 d に分解不活性化される。そこで methylamine 处理した C 4 (C 4 ma) に蛍光試薬である N-(7-dimethylamino-4-methylcoumarinyl) maleimide (DPCM) を標識した DPCM C 4 ma および ¹²⁵I で標識した C 4 を結合させた LAC 1, 4 をそれぞれ液相中および

膜上の C 4 b 基質として、MCP と CR 1 のコファクター活性を検討した。その結果、液相中および膜上の C 4 b に対して MCP は pH6.0 で最も強いコファクター活性を示した。一方、CR 1 は液相中の C 4 b に対して pH6.0 および 7.5 で強いコファクター活性を示し、膜上の C 4 b に対しては弱酸性で強いコファクター活性を示す傾向にあり、その活性は pH6.5 で最大となった。また、MCP および CR 1 はいずれも低イオン強度で強いコファクター活性を示した。さらに NP-40 を用いてリポソームを溶解し、膜上の C 4 b を可溶化すると MCP のコファクター活性は増加したが、CR 1 のコファクター活性は変化しなかった。従って、C 4 b に対して CR 1 は extrinsic に、MCP は intrinsic に働くことが示唆された。また、C 4 A および C 4 B いずれに対しても MCP および CR 1 はコファクター活性を示した。液相中で CR 1 は C 4 B に対して C 4 A に対するよりわずかに強いコファクター活性を示したが、膜上ではほとんど差が認められず、MCP のコファクター活性は C 4 A、C 4 B いずれに対してもほとんど差が認められなかった。

まとめ

ヒト補体活性の測定に、感作 TNP-cap-liposome を開発し、これを用いて C 4 の活性化ならびにその制御について解析し、以下の結論を得た。1) C 4 はリポソーム膜上で C 4 b dimer を形成し、C 2 a をともなって C 3 非依存的に C 5 convertase を形成する。従って、C 4 b 2 a 3 b、C 3 b Bb 3 b に加えて新たに C 4 b 4 b 2 a という C 3 をバイパスする C 5 convertase の存在が明らかとなった。2) C 4 のアイソタイプである C 4 A および C 4 B にそれぞれアミド結合およびエステル結合によって dimer を形成し、C 2 a をともなって C 5 convertase を形成する。3) C 4 b の制御に factor I のコファクターである MCP および CR 1 は弱酸性、低イオン強度において強く働き、膜上の C 4 b に対して MCP は intrinsic に、CR 1 は extrinsic に働くことが示唆された。

学位論文審査の要旨

主査 教授 中澤滋治
副査 教授 横沢英良
副査 教授 野村靖幸
副査 助教授 高橋和彦

約20種類の血清蛋白質からなる補体系は、標的異物表面で連鎖的なプロテアーゼの活性化反応を開始し、標的異物を攻撃する生体防御系である。その活性化経路には古典的経路と第二経路と呼ばれる2種類であって、標的異物が免疫複合体の場合は古典的経路が、一方抗体の結合していない感染菌表面では第二経路の活性化が進行し、細菌膜障害などの様々な生体防御反応を現す。

C4は古典的経路に働く補体成分で、C1sによりC4aとC4bの2フラグメントに切断される。C4bには短寿命の結合活性が現れ、様々な異物表面に結合する。この異物表面のC4bが基礎となって、C2というプロテアーゼ前駆体とともにC3転換酵素と呼ばれるプロテアーゼを形成する。C3転換酵素はC4bとC2aという2種類の補体フラグメントからなる分子集合型プロテアーゼで、活性部位はC2aに存在する。C3転換酵素は補体系の中心的な酵素で、C3を切断して様々な生理活性フラグメントを遊離する他に、C3bと共にC5転換酵素と呼ばれる3分子集合体のプロテアーゼ(C4b, 2a, 3b)を形成して、C5を切断する働きもする。

C3転換酵素は半減期約3分で自発的に解離失活する不安定な酵素であるが、補体系にはC4bに結合してC3転換酵素の形成を制御したり、C3転換酵素の解離を促進させる因子が備わっていて、補体系の活性化が適当な段階で終焉するように調節している。さらに、自己の細胞表面で補体系の活性化反応が進まないように、自己の細胞表面にはC4bからC3転換酵素への形成過程を制御する数種類の膜蛋白質が存在している。

このように、C4は補体系の活性化反応において中核的な働きをする因子である。従来、補体系の活性化反応の研究に於いては、免疫複合体のモデル物質として抗体で感作した赤血球が用いられてきた。これは、溶血率から補体活性を容易に判定できる利点があるためである。しかし、抗体感作赤血球に結合しているC4bの分子状態を解析することは極めて困難であり、免疫複合体に結合しているC4bの構造に関しては明らかでなかった。

申請者は、抗原を表面に固定化した人工膜リポソームを開発し、これが補体活性化の測定系として、従来の抗体感作赤血球に代わりうる優れたものであることを明らかにすると共に、この人

工膜を用いて C 4 b の結合状態を解析し、C 4 b - C 4 b ダイマーが構成されることを初めて証明した。さらに、この C 4 b - C 4 b ダイマーに C 2 a が結合すると、C 5 転換酵素としての働きをすることも見いだした。また、自己膜の補体制御因子の一つである MCP が C 4 b にたいしてどのような機構により C 4 b を制御するかについても検討し、興味深い知見を得た。

1) 補体研究のためのリポソーム膜の開発。

広く補体活性化の測定には、抗体感作した赤血球が用いられている。これは、補体により溶血した赤血球量が容易に測定できることによる。しかし、この抗体感作赤血球は長期保存が出来ないという難点がある。また、抗体感作赤血球を用いて補体古典的経路を活性化させると、C 4 b は様々な赤血球膜分子に結合するため、C 4 b の結合反応の解析には不向きである。そこで、申請者は、長期保存が可能な新しい補体測定用の人工膜の開発を試み、ヒト補体の測定に最適なモデル膜として、コリン誘導体、コレステロール、ハプテン抗原の TNP を結合したリン脂質とかなる 1 重層リポソーム膜の調整に成功した。

2) C 4 b ダイマーの形成と機能。

TNP 固定化リポソーム免疫複合体を用いて、古典的経路の活性化に伴う補体成分の表面への結合反応を解析した。その結果、リポソーム膜表面で C 4 b ダイマーが形成されること、この C 4 b ダイマーの形成率に比例してリポソームの破壊率が上昇することを見いだした。一般に、補体の活性化によりリポソーム等の膜が破壊されるときは、リポソーム表面で C 5 が切断され、C 6, 7, 8, 9 の後期補体成分が分子集合して、膜障害複合体 (MAC) が形成されることを意味している。申請者は、C 3 を先天的に欠損した患者の血清を補体源として用い、リポソーム膜に対する作用を調べたところ、明らかにリポソーム膜が破壊されることを見いだした。C 5 は C 5 転換酵素により切断される。C 5 転換酵素は C 3 転換酵素に C 3 b が結合した状態の酵素であるところから、その形成には C 3 が必須と考えられていた。しかし、3 C 欠陥の場合でも、リポソーム膜が補体により傷害されることは、C 4 b ダイマーが形成されると C 2 とともに C 5 転換酵素を形成する新しい反応経路の存在する可能性を示唆している。申請者の知見は、C 3 を迂回した C 5 転換酵素の形成経路の存在すること初めて証明したもので、意味深い研究成果と言える。

また、C 4 には C 4 A, C 4 B の 2 種類のアロタイプが存在する。C 4 A アロタイプは活性化されると、標的異物のアミノ基に結合する特異性を示し、一方、C 4 B アロタイプは水酸基に結合することが知られている。申請者はそれぞれのアロタイプの C 4 を用いてダイマー形成の機構を解析し、C 4 A アロタイプの場合にはアミド結合、C 4 B アロタイプの場合にはエステル結合を介してダイマーを形成していることも証明した。これは、2 種類の C 4 アロタイプの結合特異性

と符合する結果であった。

3) C 4 b に対する自己膜の制御因子, MCP と CR 1 の作用機構。

自己の細胞には、自己の補体攻撃を回避するための膜蛋白質を数種類発現している。MCP と DAF はその一つで、C 4 b に結合してプロテアーゼ（I 因子）による C 4 b の分解を誘導する働きをする。申請者はこの 2 種類の補体制御因子の C 4 b に対する作用の相違を比較検討した。その結果、CR 1 は自己細胞膜以外の膜に結合した C 4 b にも作用するのに対して、MCP は自己細胞膜に結合した C 4 b にのみ制御作用を示す点で異なることを明らかにした。

以上、申請者の主要な研究成果について紹介した。特に、C 4 b ダイマーを介した第 3 の活性化経路の可能性を示唆した研究成果は補体学の分野において特筆すべき成果であり、博士（薬学）の学位を受けるに値するものと判定した。