

Title	モルモット補体後期反応成分の可溶性複合体SC5b-9の不均一性と、複合体が示すC9溶血活性の発現機序の解析
Author(s)	木下, タロウ
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/32701
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/repo/ouka/all/>

氏名・(本籍)	木 下 夕 郎
学位の種類	医 学 博 士
学位記番号	第 5 2 0 8 号
学位授与の日付	昭 和 5 6 年 3 月 2 5 日
学位授与の要件	医学研究科 病理系専攻 学位規則第 5 条第 1 項該当
学位論文題目	モルモット補体後期反応成分の可溶性複合体 SC5b-9 の不均一性と、複合体が示す C9 溶血活性の発現機序の解析
論文審査委員	(主査) 教授 天野 恒久 (副査) 教授 山野 俊雄 教授 萩原 文二

論 文 内 容 の 要 旨

[目 的]

補体の主要な働きのひとつに、免疫溶血反応、免疫溶菌反応といった生体膜傷害作用がある。膜傷害は、活性化された第 5 成分(C5b)から第 9 成分までの 5 成分が膜上で順次反応してドーナツ型の C5b-9 複合体を形成し、脂質二重層を貫通する事によって起こると説明されている。C5b-9 複合体が、膜上でなく、液相中で形成される時には、さらに S 蛋白質と呼ばれる血清蛋白質が結合し、SC5b-9 複合体となる。ヒト補体での研究から、SC5b-9 は、C5b-9 が脂質と反応する部分に S 蛋白質が結合していると考えられ、もはや膜傷害活性を示さない複合体であると言われてきた。

私は、モルモット SC5b-9 複合体の解析をはじめた所、この複合体が、C8 までの補体成分を結合した感作赤血球を溶血させる事、即ち C9 としての溶血活性を示す事を見出した。

本研究は、モルモット SC5b-9 複合体の構造を解析し、C9 溶血活性発現の機序を明らかにする事を目的として行った。

[方法ならびに成績]

C5 と C9 をモルモット血清から精製し、それぞれ ^{125}I または ^{131}I で標識した。 ^{125}I -C5 と ^{131}I -C9 あるいは ^{131}I -C5 と ^{125}I -C9 をモルモット血清に添加後、ザイモザン (10 mg/ml) と 37°C で 60 分間反応させて補体の alternative pathway を活性化させた。遠心でザイモザンを除去した上清を、Sephadex G200, Sepharose 4B で分画し、高分子領域に取り込まれた放射活性と C9 溶血活性を指標にして、SC5b-9 を精製した。この段階で、遊離の C5 や C9 とは完全に分離された。

SC5b-9 画分を、さらに 10—40% のショ糖密度勾配遠心にかけて、C5 と C9 の分布にずれが認め

られた。重い画分では、C5b 1分子当り4ないし6分子のC9が含まれ、軽い画分では、2ないし3分子含まれていると計算された。さらに、C9溶血活性は、軽い部分に強く認められた。

SC5b-9は、ウサギで作製した抗C5と抗C9に対して、fuseする1本の沈降線を形成し、非還元SDS-PAGEでは、6本のmajor bandと4本のminor bandが認められた。

感作赤血球から、C7までを結合した感作赤血球までのすべての中間反応段階の血球に、SC5b-9を作用させた所、溶血活性は全くなかった。また、各段階の血球と各精製成分を組み合わせ、C1からC8までの各成分としての溶血活性を調べると、C7としての活性だけがわずかに認められたが、これもC9の活性の百分の一以下であった。

C9溶血活性に対する抗C5と抗C9の効果を調べると、抗C9では濃度に応じて溶血が阻害されたが、抗C5は全く効果がなかった。

¹³¹I-C5と¹²⁵I-C9を取り込んだSC5b-9の、C9活性の強い軽い画分に、精製したC9を種々の濃度で加え、37℃で60分間、さらに4℃で一夜反応させた後、10—40%のショ糖密度勾配遠心にかけて、放射活性の分布の変化を調べた。C9を加えないで同様に処理したSC5b-9を遠心した対照では、もとの位置にC5とC9の放射活性が認められ、全く変化がなかった。C9を反応させた系でも、C5の分布は殆んど変化せず、わずかに重い部分に移動するものがあつたのみで、新たにC9を取り込んで重い複合体になる完成途上のもはごく一部であると考えられた。C9の放射活性の分布は、ピークは元の位置にあるが、カウントの山が下がり、その分のカウントが遊離のC9の位置に出現した。遊離したC9は、加えた精製C9の濃度に応じて増加し、最大で全体の10から15%に達した。この事から、SC5b-9の中には、加えたC9と交換され得るような、可逆的な結合をしたC9を含むものがあると考えられた。さらにショ糖密度勾配の画分から回収した遊離¹²⁵I-C9をモルモット血清に加え、ザイモザンで活性化後もう一度ショ糖密度勾配遠心を行うと、再びSC5b-9に取り込まれている事がわかり、遊離されたC9が活性を保持している事がわかつた。

[総括]

以上の成績をまとめると、1)モルモット補体のalternative pathwayをザイモザンで活性化した時、液相中に形成されるSC5b-9複合体には、C5b 1分子当り含まれるC9の数が異なつた集団が混在している。C9含量の少ない複合体は、C9が未飽和で完成途上の複合体ではなく、それ自体安定な状態にある。2)SC5b-9はC9溶血活性を示し、C9含量が少なく軽い複合体に、特に強い活性が認められた。抗血清による阻害実験と、活性を保持した状態で遊離され得るC9が存在する事から、C9溶血活性は、この可逆的に結合しているC9が、血球上のC5b-8複合体に転移して起こるのであると考えられた。

論文の審査結果の要旨

本論文は、従来ヒト補体系での研究から不活化浪費複合体と考えられて来た可溶性複合体SC5b-9

を、ザイモザンで活性化したモルモット血清から分離し、ヒト複合体と異なり、C9溶血活性をもち、且つ、得られた複合体は従来考えられた均一な組成をもつのではなく、大きさも組成も不均一で、特に、軽くて、C9含量の少ない複合体が強いC9活性をもち、この複合体中に取り込まれたC9の一部が可逆的に遊離C9と交換出来ることを見出した。

この可逆的結合をしたC9が、近接したEAC1-8上の膜侵襲中間複合体C5b-8へ転移することによって溶血活性が発揮されることを明らかにした。本研究は、補体活性化経路に関する知見を拡大明確化したのみならず、ヒト及びモルモット両種の補体系の差異を明らかにし、極めて価値あるものと認める。