



Title	モノクローナル抗体による補体第一成分C1の亜成分C1sの機能ドメインの解析
Author(s)	松本, 美佐子
Citation	大阪大学, 1990, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/36748
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏 名・（本籍）	まつ 松	もと 本	み 美	さ 佐	こ 子
学 位 の 種 類	薬	学	博	士	
学 位 記 番 号	第	8 9 7 7	号		
学位授与の日付	平 成	2 年	2 月	24 日	
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当				
学 位 論 文 題 目	モノクローナル抗体による補体第一成分 C1 の亜成分 C1s の機能ドメインの解析				
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 富田 研一				
	(副査) 教 授 岩田 宙造 教 授 北川 勲 教 授 井上 公蔵				

論 文 内 容 の 要 旨

補体第一成分の亜成分である C1s は、免疫複合体などによる補体系の活性化に必須の酵素で、基質である C4 と C2 を限定分解することにより、2 分子複合体の C3 コンベルターゼ (C4b2a) を形成する。C1s はセリンプロテアーゼの一種で、5 個のドメインからなる H 鎖と活性セリン残基がふくまれる L 鎖が S-S 結合で架橋された二本鎖ポリペプチド構造である。

C1s の機能ドメインを明らかにする目的で、異なるエピトープを認識する種々のモノクローナル抗体 (MAb) を作製し C1s の機能解析を行うとともに、基質結合部位の同定、更には免疫複合体と C1 の相互作用の検討を行った。

(I) 「モノクローナル抗体による C1s の機能解析」

C1s の酵素活性を阻害しうる MAb として、最終的に M365 (IgG₁, κ), M81 (IgG₁, κ) 及び M241 (IgG₂b, κ) の 3 クローンが得られた。M81 は H 鎖上のエピトープを認識し、活性型 C1s (C1s) にもプロ酵素型 C1s にも結合し、C1s の C4 分解活性を完全に抑制した。しかし、C2 分解活性は 50% しか抑制せず、低分子の合成基質の水解活性は全く阻止しなかった。故に、M81 は C4 結合部位もしくはその近傍に結合することによって、C1s の C4 分解を抑制する抗体であると思われた。このことより、C4 結合部位が H 鎖上に存在することが示された。

一方 M365 は、H 鎖上のエピトープを認識し、C4 分解活性を 50% 抑制したが、C2 分解活性には全く影響を与えなかった。この 2 種の抗体の活性阻止パターンの違いから、C4 結合部位と C2 結合部位が異なることが示唆された。M241 は C1s にのみ結合し、C1s の全ての酵素活性を Fab フラグメントにおいても完全に抑制したので、C1s の触媒部位もしくはその近傍に結合する抗体と考えられた。

(III) C $\bar{I}$ sのC4結合ドメインの同定

C $\bar{I}$ sをプラスミンで限定分解し、C4結合部位を認識するM81と反応させることによりC4結合ドメインを同定することを試みた。C $\bar{I}$ sのプラスミン分解フラグメントとして、P1(58kd)、P2(48kd)、P3(37kd)、P4(27kd)が得られた。Immuno-blottingよりM81はいずれのフラグメントにも結合することが明らかとなった。

C $\bar{I}$ sのL鎖上の異なるエピトープを認識するMAb 2種を用いてのImmuno-blotting及び二次元SDS-PAGEより、P1は26kdのH鎖由来フラグメント(26k-HF)とL鎖の一部からなりたっていることが示され、M81は26k-HFに結合した。M81と反応する最小のフラグメントである26k-HFを精製しN末アミノ酸分析を行った結果、26k-HFはC $\bar{I}$ sのH鎖のドメインIVとVより構成されていることが明らかになった。故に、C4結合部位はドメインIV/Vに存在することが示された。

C $\bar{I}$ sのドメインIV/Vは、short consensus repeat (SCR)と呼ばれる約60個のアミノ酸残基からなる構造で、補体のC3bやC4b結合性蛋白質に特徴的に見出される繰り返し構造である。

C $\bar{I}$ sのSCRsのリガンドを明確にするため、 ^{125}I 標識C4/C4bを用いたsubstrate-blottingを行った。C $\bar{I}$ sあるいはプラスミン分解フラグメント(P1-P4)をニトロセルロース膜に固定し、 ^{125}I -C4と反応させると、C4はC4bに分解され、分解された ^{125}I -C4bはC $\bar{I}$ sとP1にのみ結合した。しかしながら、セリンプロテアーゼ阻害剤共存下でC4からC4bへの変換が生じないようにした場合、 ^{125}I -C4はC $\bar{I}$ sとP1により強く結合し、20倍量の未標識C4bを加えても、その結合量はあまり低下しなかった。以上の結果より、C $\bar{I}$ sのSCRsの主なりガンドはC4bよりもむしろC4であることが明らかになった。またC $\bar{I}$ sのC4分解活性の発現には、ドメインIV、VとL鎖のみで充分であることが示された。

(III) 免疫複合体とC1の相互作用

C $\bar{I}$ sに対するモノクローナル抗体の一つであるM365を免疫複合体(抗体感羊赤血球(EA))に結合したC $\bar{I}$ と反応させると、C $\bar{I}$ はEAから遊離することが判明した。しかも、免疫複合体を構成する抗体がIgMの場合にC $\bar{I}$ 遊離が生じ、IgGの場合にはM365はIgG-C $\bar{I}$ 相互作用に影響を与えなかった。更に、M365はC1のEA IgMへの結合を完全に阻害したが、EA IgGへの結合は全く阻害しなかった。このように、免疫複合体を構成する抗体のクラスによって、C $\bar{I}$ sに対するMAbの効果が異なるということは、細胞上でのIgM-C1結合とIgG-C1結合の様式が異なっていることを示唆するものである。

また、M365とは異なるエピトープを認識するMAbでは、C $\bar{I}$ 遊離は生じないので、M365のエピトープがC1-IgM相互作用に重要であると思われた。M365のエピトープはC $\bar{I}$ sのH鎖のドメインIV/Vに存在するが、詳しい位置は不明である。

以上、モノクローナル抗体を用いて、C $\bar{I}$ sの基質結合部位の同定ならびに各ドメインの機能について、いくつかの新しい知見を得ることができた。

論文の審査結果の要旨

補体第一成分C1は、C1g, C1r, C1sよりなり、その亜成分C1の活性型C1sはC1複合体の活性中心であり、基質C2およびC4を限定分解する重要な糖蛋白質である。本研究は、C1sを認識する種々のモノクローナル抗体を用いて、C1sの基質結合部位の同定および免疫複合体とC1の相互作用の検討を行い、C1sの構造活性相関について多くの新しい知見を得た。

以上の結果は、薬学博士論文として充分価値あるものと認める。