



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	8977		号	
学位授与の日付	平成	2	年	2	月
学位授与の要件	24	日			
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 獄	教 授 井上 公藏

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コンペルターゼ(C4b2a)を形成する。C1sはセリンプロテアーゼの一一種で、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(IgG_{2b}, 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たなかった。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。

(II) C₁⁻sのC4結合ドメインの同定

C₁⁻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。C₁⁻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。

C₁⁻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末端アミノ酸分析を行った結果、26k-HFはC₁⁻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。

C₁⁻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。

C₁⁻sのSCRsのリガンドを明確にするため、¹²⁵I標識C4/C4bを用いたsubstrate-blottingを行った。C₁⁻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、¹²⁵I-C4と反応させると、C4はC4bに分解され、分解された¹²⁵I-C4bはC₁⁻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、¹²⁵I-C4はC₁⁻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、C₁⁻sのSCRsの主なリガンドはC4bよりもむしろC4であることが明らかになった。またC₁⁻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

C₁⁻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C₁⁻と反応させると、C₁⁻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C₁⁻遊離が生じ、IgGの場合にはM365はIgG-C₁⁻相互作用に影響を与えたなかった。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、C₁⁻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、C₁⁻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C₁⁻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、C₁⁻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 $\bar{C}1s$ 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、 $\bar{C}1s$ を認識する種々のモノクローナル抗体を用いて、 $\bar{C}1s$ 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、 $\bar{C}1s$ 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。