

Title	補体アナフィラトキシン C5a のエピトープ解析
Author(s)	酒井, 寛
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/37786
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

氏名	酒井寛
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学位記番号	第 10081 号
学位授与年月日	平成 4 年 3 月 16 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文名	補体アナフィラトキシン C5a のエピトープ解析
論文審査委員	(主査) 教授 井上 公蔵
	(副査) 教授 越智 隆弘 教授 木下タロウ

論文内容の要旨

(目 的)

C5 は、補体の活性化に伴ってできる C5 転換酵素により、C5b と C5a に分解される。形成された intact C5a は、ただちに血中の carboxypeptidase N の作用により、C-terminal のアルギニンが切断、除去され C5a des Arg となる。これらの分子は局所における炎症反応に重要な役割を演じており、C5 の分解に伴う neoantigens の構造部位の解析は、炎症との関連性において重要な意味を持つと考えられる。Takeda らは精製した human C5a をマウスに免疫し、human C5a des Arg に対するモノクローナル抗体を分泌する 9 種類の融合細胞を得ている。これらの抗体は C5a des Arg assay 系が組めるか否かで 3 つの Group に分類されるが、Group 1 と 2 は C5a des Arg のみに結合し、Group 3 は C5a des Arg だけでなく C5a と C5 にも結合する抗体である。これらの抗体エピトープを解析するため、C5、C5a およびその合成部分ペプチドを用いて検討した。

(方 法)

Human C5a des Arg に対する抗体として、9 クローンを用いた。ハイブリドーマを CBF 1 マウスの腹腔内に接種し、得られた腹水から Ig G 分画を得た。Human C5a des Arg は affinity column と Mono S column にて精製した。Human C5、C5a 合成 porcine C5a および合成 human C5a とそれぞれの合成ペプチド、卵白アルブミンペプチドを用いて解析した。Group 別での C5、C5a 及び合成ペプチドとモノクローナル抗体の反応性を solid-phase radioimmunoassay で解析した。また、ELISA にて各モノクローナル抗体に対する合成部分ペプチドのアフィニティを比較するため、あらかじめ合成部分ペプチドを抗体 (Group 1 : 56.6, Group 2 : 238.3, Group 3 : 263.4) と反応させ、プ

レート上に固相化した human C5a des Arg との反応性の阻害濃度を求めた。

(成 績)

(1) C5a の合成部分ペプチドとの反応性を RIA により検討した結果, N-terminal [1-21] human C5a のペプチドと, C-terminal [55-74] human C5a のペプチドを用いると Group 1 と Group 2 は C-terminal ペプチドに弱く反応した。このペプチドを carboxypeptidase B で処理し, アルギニンを除去すると Group 1 と Group 2 は強く反応した。しかし, Group 3 はこれらのいずれとも反応しなかった。以上のことから Group 1 と Group 2 の抗体が認識するエピトープは C-terminal 側に存在すること, C-terminal のアルギニンの有無が反応性に大きく影響する事実が合成部分ペプチドでも見られることがわかった。また, C5a には64番目のアスパラギンに N-link 糖鎖が結合しているが, エピトープはペプチド上にあり, 糖鎖を認識していないと考えられた。合成ブタ C5a, C5a des Arg 及び C-terminal 合成部分ペプチドとの反応性においても, Group 1 と Group 2 の抗体の認識するエピトープが C-terminal 側に存在することが確認された。

(2) Group 1 (56.6) と Group 2 (238.3) のモノクローナル抗体が認識するエピトープが, RIA による反応性の解析から C-terminal 側に存在することが確認されたため, さらに, C-terminal 側のアミノ酸残基数を変化させた合成部分ペプチドを用いて, 固相化した C5a des Arg と各モノクローナル抗体との結合を阻止する濃度を ELISA にて求めた。Ovalbumin [173-196], N-terminal [1-21], C-terminal human [55-74], [58-74], [64-74] の C5a 合成部分ペプチドでは各濃度の100 μ M まで反応を阻止できなかった。ところが, C-terminal human C5a の合成部分ペプチドを carboxypeptidase B で処理し, アルギニンを除去すると, Group 1 に対する C-terminal human [55-73], [58-73], [64-73] の合成部分ペプチドの50%阻止の濃度は, それぞれ1450 nM, 980 nM, 1200 nMであり, human C5a des Arg の310 nM に比較し結合力は約 1/3 ~ 1/5 と考えられた。同様に Group 2 に対する合成部分ペプチドの50%阻止の濃度は, それぞれ495 nM, 315 nM, 475 nM と human C5a des Arg の30.5 nM に比較して約 1/10 ~ 1/16 の結合力であった。しかし, アミノ酸残基数を変化させた合成部分ペプチド間で阻止濃度にほとんど変動がみられないことより, Group 1, Group 2 のモノクローナル抗体は C-terminal 側10アミノ酸残基に存在するエピトープを認識していると考えられた。C5a から末端のアルギニンが除去され C5a des Arg になる C5a レセプターとの結合力が 1/100 以下に低下するが, この変化に対応して Group 1, Group 2 の抗体が認識する新しいエピトープが発現される。この構造変化は, 末端部分の変化に大きく依存していると考えられた。

一方, Group 3 では C-terminal human [55-73], [58-73], [64-73] C5a des Arg のいずれも, 合成部分ペプチド濃度100 μ M で阻止できなかったこと, そして, C5, C5a とも反応することから, C5a の分子内の S-S 結合で形成されるコアの部分の部分を認識していると考えられた。

(総 括)

Human C5a を免疫して得られたモノクローナル抗体を用いて C5a のエピトープ解析を実施した結果, Group 1 および Group 2 のモノクローナル抗体は human C5a des Arg の C-terminal 側のペプチド部分を認識していること, そのエピトープは C-terminal 側10アミノ酸残基中に存在しているこ

と、Group 3 は C5a 分子内のコア部分のエピトープを認識していることが明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

アナフィラトキシン C5a は補体の活性化により第 5 成分から生じる。C5a は、異物が存在する局所へ食細胞や血清成分を動員するが、高濃度に産生されると、ショック等を招来する。C5a はカルボキシペプチダーゼによってより活性の弱い C5adesArg に変換される。本研究は、C5a と C5adesArg に対する 9 種のモノクローナル抗体の認識するエピトープを解析し、(1)主たるエピトープが C 末端領域に存在することとコア部分にも存在するであろうこと、(2)糖鎖はエピトープに関係しないこと、(3)C 末端のアルギニンの存在がエピトープに大きく影響することを明らかにした。

これらの知見は C5a, C5adesArg の構造、機能研究、制御物質の開発研究の基礎となるものであり学位に値する。