

Title	Covalent binding of C 3 b to C 4 b within the classical complement pathway C 5 convertase : Determination of amino acid residues involved in ester-linkage formation
Author(s)	金, 然旭
Citation	大阪大学, 1992, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/37943
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について 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	金 然 旭
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 1 0 1 6 2 号
学位授与年月日	平成 4 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学研究科 病理系専攻
学位論文名	Covalent binding of C3b to C4b within the classical complement pathway C5 convertase: Determination of amino acid residues involved in ester-linkage formation (補体古典経路 C5 転換酵素内での C3b の C4b への共有結合 : エステル結合に働いているアミノ酸残基の決定)
論文審査委員	(主査) 教 授 井上 公蔵 (副査) 教 授 木下タロウ 教 授 平野 俊夫

論 文 内 容 の 要 旨

(目 的)

補体の活性化に伴ってできる C5 転換酵素は、第 5 成分 C5 を限定分解し、感染防御に重要な働きをする C5a と C5b を生成する。古典経路の C5 転換酵素は、第 4、第 2、第 3 成分由来の活性化ペプチドである C4b、C2a、C3b がこの順に集合した 3 分子集合体である。C4b は標的異物上に結合し、集合体全体を担うとともに基質である C5 の結合にも働く。酵素活性中心を持つ C2a は C4b 上に非共有結合している。C3b は、C3 に存在する分子内チオエステルを利用し、C4b 上にエステル結合し、C4b とともに基質 C5 の結合に働く。この 3 分子集合体酵素内で C3b は C4b 上の一定の部位に結合し全体として決まった 4 次構造をしていると考えられる。当教室のこれまでの研究で、C3b は分子量 18 万の C4b 上で 74 アミノ酸残基の領域に結合している事が示されていた。本研究では、この知識に基づき C3b がエステル結合している C4b 上のアミノ酸残基の決定を行い、さらにこの結合様式がマウスの補体系でも保存されている事を示した。

(方法および成績)

1) C4b 上の C3b エステル結合残基の決定。

C3b エステル結合部位を含む 74 アミノ酸残基中には、エステル結合する可能性がある、セリン、スレオニン、チロシンが 12 残基含まれていたので site-directed mutagenesis により変異 C4 を作って結合残基を決定しようとした。完全長 C4 (B アイソタイプ) cDNA を Kunkel の方法を用いて変異させた後、COS 細胞に発現させ、1 ないし数残基の水酸基保有アミノ酸残基を水酸基を持たない残基に変換した変異 C4 を得た。変異 C4 を用いてヒツジ赤血球上に C4b - C3b エステル結合複合

体ができるかどうか調べた結果、Ser 1217と Ser 1219をアラニンに変えると複合体が全く形成されない事からこの2残基が結合部位である事が分かった。Ser 1217だけを変えると正常の30%程度の形成しかなかったが Ser 1219だけを変えても正常と変わらなかった。即ち、Ser 1217が真の結合残基で、この残基が利用できない時には低効率で Ser 1219に結合すると考えられた。

2) マウス補体系での解析

ヒト C4 以外にマウス C4 の一次構造が分かっているので、C3 b 結合部位周辺の配列をくらべてみると、ヒト Ser 1217はマウスの Ser 1213と相同であったが、ヒト Ser 1219はマウスでは保存されていなかった。そこで完全長マウス C4 cDNA を変異させ、Ser 1213をアラニンに変えたマウス C4 を得た。まず正常マウス C4 を用いて実験を行い、マウス補体系においても C3 b が C4 b にエステル結合する反応が起こる事を確認した。次に変異 C4 を用いて調べると、Ser 1213を変えると C3 b が全くエステル結合しない事が分かった。即ち、マウス C4 b においてもヒト C4 b の Ser 1217と相同のセリン残基が C3 b エステル結合残基である事がわかった。

3) C3 b とエステル結合を作らない変異 C4 b の C5 転換酵素形成活性と、同変異 C4 b と C3 b 間の非共有結合複合体形成。

エステル結合形成をしない変異 C4 を正常 C4 の C5 転換酵素形成活性と比較した所、同程度の活性が認められた。また、化学架橋試薬である dithiobis (succinimidyl propionate) を用い、C5 転換酵素を形成させたヒツジ赤血球上に同変異 C4 b と C3 b の複合体を証明した。

(総括)

補体古典経路の C5 転換酵素である C4 b 2 a 3 b 複合体において、C3 b は C4 b の Ser 1217 にエステル結合している事を明らかにした。Ser 1217 が変異している時には、低効率で Ser 1219 に結合した。さらにマウス補体においても C3 b がヒト C4 b の Ser 1217 と相同な残基であるマウス C4 b の Ser 1213 にエステル結合する事を明らかにした。C3 b が分子量18万の C4 b 上の特定のセリン残基にエステル結合する事は、C4 b 2 a 3 b 複合体が一定の4次構造をしているという仮説を支持している。この特異的な結合は前段階として C4 b と C3 b の間に非共有結合的な特異的な相互作用があり、それによって C3 b のチオエステルが C4 b 上の特定のセリン残基の水酸基に選択的に反応すると考えられる。

C3 b と C4 b の間の特異的な相互作用の存在は、エステル結合を作らない変異 C4 b と C3 b の複合体を化学架橋試薬を用いる事により証明できる事、この変異 C4 b を用いても C5 転換酵素の活性が発現する事からも裏づけられた。

論文審査の結果の要旨

補体の C5 転換酵素は感染防御に重要な C5 a と C5 b を第5成分から生成する。本研究は、C4 b, 2 a, C3 b の3成分複合体である古典経路の C5 転換酵素の高次構造の解明を目的とした。

C4 b 2 a 3 b 複体内で C3 b は C4 b に共有結合 (エステル結合) している。C4 b 上の C3 b エ

エステル結合部位を分子生物学的手法により解析し、ヒト C4 では Ser 1217 が結合部位であり、マウス C4 ではこれと相同な Ser 1213 であることを証明した。C3b が分子量 18 万の C4b 上の特定のセリン残基にエステル結合することから 3 分子複合体が一定の 4 次構造をしていることが強く示唆された。

本研究は補体系の特徴であるタンパク質集合体酵素の 4 次構造の一端を明らかにしたものであり学位論文に値する。