

補体攻撃からの自己防御機構に関する研究

中野 泰子

目 次

A 補体第二経路による自己赤血球識別機構	1
A.1 自己識別因子の検索	1
緒言	1
材料及び実験方法	2
1 試薬	2
2 緩衝液	3
3 EAC1-3b,Pの調製	3
4 活性測定用血清試薬の調製法	3
5 補体第二経路因子の活性測定法	4
6 ウサギ補体因子の精製法	4
7 アミノ酸組成分析法	6
8 アミノ酸配列の決定法	6
9 等電点の測定法	6
10 SDSゲル電気泳動法 (SDS-PAGE)	6
結果	7
1 ウサギ因子の諸性質とそのヒト因子との比較	7
1.1 P因子	7
1.2 H因子	8
1.3 C3因子	8
1.4 B因子	9
1.5 D因子	9
1.6 I因子	9
2 各因子を用いた種間組み替え実験	10
2.1 B因子	10
2.2 D因子	10
2.3 P因子	11
2.4 H因子	11
2.5 I因子	11

2.6 C3因子	11
結語	12
A.2 尿中に存在するDAFの精製及び諸性質の検討	13
緒言	13
材料及び実験方法	14
1 試薬	14
2 膜上のC3/C5転換酵素に対するDAF活性測定法	15
3 液相C3転換酵素に対するDAF活性測定法	15
4 N末アミノ酸配列決定法	15
5 イノシトール分析	15
6 ジスルフィド結合部位の決定	16
7 他の方法	17
結果および結語	17
1 尿DAFの精製	17
2 ジスルフィド結合位置の決定	19
B 自己赤血球を補体系の攻撃から守る第二の膜因子	22
B.1 新しい補体制御タンパクP-18の精製及び諸性質の検討	22
緒言	22
材料及び実験方法	22
1 試薬	22
2 緩衝液	23
3 ヒト赤血球からのストローマ調製法	23
4 溶血中間体EC5-7細胞の調製法	23
5 Reactive Lysis阻害測定法	24
6 FACSによる解析法	24
7 他の方法	25
結果	25
1 制御タンパクの精製	25
2 抗P-18IgGを用いた検討	26
3 P-18の血液細胞中の分布及びPIPLC(phosphatidyl inositol	27

specific phospholipase C)処理による効果

4	PNH患者の血液細胞上のP-18	27
	結語	27
B.2	尿P-18の精製及びC末構造解析	28
	緒言	28
	材料及び実験方法	29
1	試薬	29
2	緩衝液	30
3	溶血中間体EC5-7細胞の調製法	30
4	Reactive Lysis 阻害測定法	30
5	アミノ酸配列決定法及びアミノ酸組成分析	31
6	他の方法	31
	結果	31
	結語	32
	総合考察	34
	参考文献	37
	謝辞	45

A 補体第二経路による自己赤血球識別機構

A.1 自己識別因子の検索

[緒言]

補体系には、抗体依存性の古典経路と抗体非依存性の第二経路と呼ばれる二つの活性化経路が存在する(図1)(1, 2)。古典的経路は主に免疫複合体により活性化され、 Ca^{++} の存在下、この複合体にC1が結合すると、自発的分子内活性化反応が起こり、活性型C1になる。これがC4を限定分解し、C4bがチオエステル結合を介して複合体に結合すると、 Mg^{++} の存在下、C2がC4bに結合し、これを活性型C1がC2aとC2bに分解し、C4b, C2aというC3転換酵素を形成する。これが更にC3を限定分解し、C4bC2aC3bを形成する。これは、C5転換酵素と呼ばれるもので、更にC5をC5bとC5aに限定分解し、このC5bが結合すると、これにC6が結合し、C5b6が形成される。次に、ここにC7が結合できるようになり、このC5b-7は、寿命の短い膜結合活性を持つ。膜に結合したC5b-7にC8が、次いで複数のC9が結合し、C9のポリマーが形成され、膜攻撃複合体(Membrane attack complex, MAC)が完成する。このMACにより、異物が破壊される。

一方、第二経路は、その活性化に際して、特異抗体と補体初期成分C1, C4, C2が関与せず、C3, B, D, P, IとC5-C9の膜攻撃因子より成っている。第二経路の活性化は血清中で常に微量のC3分子内のチオエステル結合が加水分解されたC3b様C3(C3i, C3(H₂O))ができており、このC3iとB, Dにより Mg^{++} 存在下、初期C3転換酵素C3iBbが形成される。この初期C3iBbは弱いながらもC3をC3aとC3bに分解し、このC3bが近くの物質にチオエステル結合を介して結合する。結合部位が細菌や異種細胞上であれば、このC3bにBとDが反応して、C3bBbと成り、さらに安定化因子のプロパージン(P)が反応して、C3bBbP複合体(C3転換酵素)が形成される。本酵素により、さらにC3が分解され、C5転換酵素であるC3bnBbPが形成され、これによりC5がC5aとC5bに分解されると、後は古典経路と同様にMACが形成され、異物の破壊が起こる。

このように初期C3転換酵素C3iBbは血中で常時形成されており、又この酵素に

より切られて出来たC3bがチオエステル結合を介して近くのものに結合するという反応は侵入してきた細菌などの異物のみでなく自己細胞、自己赤血球上でも起こっているはずである。ところが、実際は異物上でのみ補体の活性化が進み、自己細胞上では進まない。Kazatchkineら(3)はヒト補体第二経路を活性化しないときれているヒツジ赤血球にヒトC3bを結合させ、これに Mg^{++} 存在下、 ^{125}I ラベルBまたは、 ^{125}I ラベルHを反応させる実験を行い、Hの方がBより5倍も強い親和性を示すと報告している。又、Brownら(4)は、肺炎球菌の細胞壁は、第二経路の強力な活性化物質であるにもかかわらず、莢膜は活性化物質では無いことから、細胞壁に結合したC3bと莢膜に結合したC3bに対するHとBの親和性をヒツジ赤血球に結合したC3bに対するものと比較する実験を行っている。ヒツジ赤血球に対するHの親和性に比べ、細胞壁C3b、莢膜C3bは共に、親和性が低く、活性化物質の様であるが、ここで、Bの親和性を見ると、細胞壁C3bはヒツジ赤血球C3bと同様高い親和性を示し、莢膜C3bはこれらの30分の1と、非常に結合能力が低かった。この結合C3bに対するBとHの親和性が第二経路を活性化するかしないかを決定していると、彼らは報告している。そこで、C3を中心としたB, D, P, H, Iの自己識別に果たす役割をヒト血清がウサギ赤血球をウサギ血清がヒト赤血球を溶血させることがわかっている(図2)、この系を用いて解析した。

[材料及び実験方法]

1 試薬

ポリエチレングリコール4,000(PEG4,000)は和光純薬株式会社、TPCK処理トリプシン及び分子量マーカー(SDS-6H)はSigma Co.、EACA(ϵ -アミノカプロン酸)は生化学工業株式会社、アンフォラインはLKB Co.、モルモット乾燥補体はROCKLAND Co.、非働化抗ヒツジ血球血清(ヘモリジン)はデンカ生研、ヒツジ赤血球は日本生物材料より購入した。K76-モノカルボン酸は大塚製薬より供与いただいた。DEAE-Sephacel, CM-Sephadex, DEAE-Sephadex A-50, QAE-Sephadex A-50, Sephadex G-75, Sephadex G-200, Sepharose 6BはPharmacia Fine Chemicals Co.、Bio-Rex 70, Bio Gel A-0.5mはBio Rad Laboratories Co.より購入した。

2 緩衝液は以下の組成の物を調製し、用いた。

VBS(Veronal-buffered saline) : 5 mM Barbitol Na, 145 mM NaCl, pH 7.4

GVB : VBS, 0.1% Gelatin

EDTA-GVB : GVB, 10 mM EDTA

EDTA-DGVB : EDTA-GVB, 5% Dextrose

GVB⁺⁺ : GVB, 0.15 mM CaCl₂, 0.5 mM MgCl₂

DGVB : GVB, 5% Dextrose

DGVB⁺⁺:GVB⁺⁺, 5% Dextrose

Mg-EGTA-DGVB : DGVB, 12 mM MgCl₂, 5 mM EGTA

EDTA-Saline : 145 mM NaCl, 10 mM EDTA

EDTA希釈モルモット血清 : モルモット乾燥補体3 ml分を200 mM EDTA 3 mlに溶かし、DGVB 9 mlで4分の1に希釈した。

3 EAC1-3b,Pの調製法

ヒツジ赤血球 (1×10^9 cells/ml)をEDTA-GVB中、400倍希釈ヘモリジンで処理し感作赤血球(EA)を調製する。次にHong等の方法(5)に従いK76-モノカルボン酸をGVB⁺⁺:DGVB⁺⁺(1:1)に4mg/mlとなるように溶かし、血清:K76-モノカルボン酸溶液(1:3)の割合で4℃、16時間インキュベート後、これの半分量のEA(1×10^9 cells/ml)を加えて、30℃、60分インキュベートすることによりEAC1-3b,Pが調製できる。EAC1-3bは後で述べるRPを血清の代わりに用いて同様に調製する。又、EAC4b,3bはEAC1-3b,PをEDTA-DGVB中、37℃、3時間インキュベートする事により得られる。

4 活性測定用血清試薬の調製法

RP(P因子欠損血清): ヒトRPは、サイモザンを血清5 mlに20 mg加え17℃、60分インキュベート後、1000xg、10分遠心した上清に、10 mM EGTAと5 mM MgCl₂を加えて調製した(6)。

RB(B因子欠損血清): ヒトRBは、ヒト血清10 mlに0.1 M EGTA 1 mlを加え、50℃、20分加熱処理してBを失活させ、1 M MgCl₂ 0.1 ml加えてRBとした(7)。

RD(D因子欠損血清)：ヒトRDは、ヒト血清10 mlから、VBSで平衡化したSephadex G-75カラム(2.5 x 90cm)によるゲルろ過で調製した。溶出したピークのA280の値が1.0以上の部分をプールし、元の血清量まで、Toyo Roshi UK10 filterで限外ろ過して濃縮し、RDとした(8)。

R3(Factor C3欠損血清)：飽和KBrと血清を2:1で混合し、4℃、6時間処理後、VBSに透析し、これをR3とした(1)。

5 補体第二経路因子の活性測定法

P因子：ヒトRP、ウサギ赤血球、検体をMg-EGTA-DGVB中、37℃、10分インキュベート後、1000xg、5分遠心し、上清のA413を測定した(6)。

B因子：ヒトRBを用いて、P同様に40分インキュベートして測定した(7)。

D因子：ヒトRDを用いて、B同様に測定した(8)。

H因子：ヒト血清、ウサギ赤血球、検体をMg-EGTA-DGVB中、37℃、30分インキュベート後、同様に測定した。Hを加えない場合を0%阻害、Mg-EGTA-DGVBのかわりに、EDTA-DGVBを用いた場合を100%阻害として、溶血阻害を%阻害で示した(9)。

C3：ヒトR3とEAに検体を加え、DGVB⁺⁺中、37℃、30分インキュベート後、同様に測定した(1)。

6 ウサギ補体因子の精製法

同じ血清より全ての目的因子を得るためにヒト補体因子精製法(1, 10-16)を参考にして、PEG4,000を用いて、50 mM EACA, 150 mM EDTAにしたウサギ血清を図3のように5% PEG沈澱、5-12% PEG沈澱、12-26% PEG沈澱、そして26% PEG上清の4つに分画した。

①5% PEG沈澱分画からのPの精製

5% PEG沈澱は、20 mM Tris-HCl, 0.3 M NaCl, pH 8.6(5℃)に溶解し、20 mM Tris-HCl, 35 mM NaCl, pH8.6に十分透析し、同緩衝液で平衡化したQAE-Sephadex A-50カラム(4.6 x 40cm)に添加した(図4)。この素通り画分をプールし、濃縮することによりPは容易に精製できた。血清により混在物が見られることがあがるが、Bio Gel A-0.5mによるゲルろ過で純粋なPを得ることが出来た。

② 5-12% PEG沈澱分画からのHおよびC3の精製

5-12% PEG沈澱は、3.2 mMリン酸緩衝液、50 mM EACA、10 mM EDTA、pH7.4に溶解透析後、同緩衝液で平衡化したDEAE-Sephacel (4.6 x 37cm)に添加し、0-300 mM NaCl塩濃度勾配により溶出した(図5)。SDS-PAGEと活性で確認したHとC3のフラクションを各々プールした。H画分は50%飽和硫酸沈澱し、VBSで平衡化したSephadex G-200カラム(2.5 x 100cm)にかけ2回ゲルろ過を行うことにより精製した(図6)。C3はPBS、5 mM EDTA、50 mM EACAを用いたSepharose-6Bカラム(2.5 x 100cm)によるゲルろ過(図7)後、25 mM リン酸カリウム、100 mM KCl、50 mM EACA、pH 7.4で平衡化したハイドロキシアパタイトカラムにかけ、2 M KClを含む緩衝液で洗浄後、125 mMリン酸カリウムを含む緩衝液でC3を溶出し精製した(図8)。

③ 12-26% PEG沈澱分画からのB因子の精製

12-26% PEG沈澱は、10 mMクエン酸緩衝液、pH 6.0に溶解透析後、CM-Sephadex C-50カラム(4.6 x 35cm)に添加した。洗浄後、100 mMクエン酸緩衝液、pH 6.0により溶出した(図9)。次に、30 mMリン酸緩衝液、pH 7.0を用いたDEAE-Sephadex A-50カラム(2.6 x 30cm)にかけ、0-250 mM NaCl濃度勾配により溶出した(図10)、更にPBSで平衡化したBio Gel A-0.5mカラム(2.5 x 100cm)によりゲルろ過し精製した(図11)。

④ 26% PEG沈澱分画からのD因子の精製

26% PEG上清は、Bio-Rex 70カラム(4.5 x 32cm)にそのままのせ、VBS、0.2% Triton X100、pH 7.0で洗浄後、VBSで更に洗い、350 mM NaClをふくむVBSで溶出した(図12)。これをVBS、pH 7.4で平衡化したSephadex G-75カラム(2.5 x 100cm)でゲルろ過し精製した(図13)。

⑤ Iの精製

5-12%と12-26% PEG沈澱部分の両方に存在し、他の因子を精製した残りの部分よりの精製を試みたが成功しなかった。ここでは、5-12% PEG画分のDEAE-Sephacelカラムの素通りフラクションを部分精製Iとして用いた(図5)。

7 アミノ酸組成分析法

P(60 μ g)とH(100 μ g)を50 mM NH_4OH に透析し、凍結乾燥後、6N HClを100 μ l加え、 N_2 置換して封をしたのち、110 $^\circ\text{C}$ 、24時間加水分解した。アミノ酸分析はHITACHI 835 Amino Acid Analyzerで行った。アミノ酸組成はモル%で表した。但し、トリプトファンは、4.2 N NaOH, 110 $^\circ\text{C}$ 、16時間による加水分解を行って分析した。

8 アミノ酸配列の決定法

P(33 μ g)とH(60 μ g)に8 M グアニジン塩酸、40 mM DTT, 0.2 M Tris-HCl, pH 8.0を100 μ l加え、37 $^\circ\text{C}$ 、1時間還元した後、10 μ lの0.1 M ヨードアセトアミドを加え、37 $^\circ\text{C}$ 、20分アルキル化し、50 mM NH_4OH に透析後、凍結乾燥し、30 μ lの10% SDSを加え、100 $^\circ\text{C}$ 、3分溶解した。これをApplied Bio Systems 470A Gas Phase Protein Sequencerにかけ、N末端からのアミノ酸配列を決定した。

9 等電点の測定法

O'Farrellの二次元電気泳動法の一次元目の等電点電気泳動の系を用いて行った(17)。

10 SDSゲル電気泳動法(SDS-PAGE)

Laemmliの方法に従い(18)、0.1% SDSを含む7.5%, 10%, 7.5-15%のポリアクリルアミドゲルで泳動後、クマシーブリリアントブルー染色を行った。分子量マーカーとしてmyosin 205kDa, β -galactosidase 116kDa, phosphorylase B 97.4kDa, bovine serum albumin 66kDa, egg albumin 45kDa, carbonic anhydrase 29kDaを含むSDS-6Hを用いた。

[結果]

1 ウサギ因子の諸性質とそのヒト因子との比較

1.1 P因子

PはPillemerら(19)により17°Cでサイモザンと複合体を作る血清中の物質として発見された。ヒトのPは分子量56,000のサブユニットからなり、このサブユニットは、お互いに結合しやすいように長いS字型をしており、オリゴマーとして存在するが、80%のPは2-4個のサブユニットより構成されている(20)。そこで精製したウサギのPについて構造及び蛋白化学的性質を検討した。

2-メルカプトエタノール(2-ME)の(+)と(-)、すなわち還元と非還元の条件で、10% LaemmliのSDS-PAGEを行ったところ、図14に示されるようにヒトPでは(+)2-MEで分子量58,000、(-)2-MEでは53,000から54,000の位置に3本のバンドが検出され、ウサギPでは(+)2-MEで58,000、(-)2-MEでは52,000から54,000の位置に2本のバンドが検出された。(-)2-MEで複数のバンドが認められることは、1981年にReidとGagnonが報告しており(21)、又、1984年、Smith等の報告にあるように(20)、Pの分子内ジスルフィド結合の存在から、それらによる分子多形によるものと推定される。

アミノ酸組成を調べたところヒトPに関しては、1974年、MintaとLepowの報告と一致した(22)。ウサギPをこれと比較したところ、ともにGlu, Pro, Glyが多く、Met, Ile, Tyr, Pheが少ないという特徴が認められ両者にはほとんど差はみられなかった(表I)。又、N末端アミノ酸配列は、図15に示すように33 μ gのPを用い、N末から38番目まで決定した。ヒトPについては、1981年、ReidとGagnonが36番目までのアミノ酸配列を報告しており(21)、それと比較してウサギPは8個のアミノ酸が異なっていたが他は一致しており、78%のHomologyであった。これらの結果より、精製した因子は確かにウサギのPであるものと思われた。

又、Pは補体第二経路C3/C5転換酵素を安定化させる機能を持つことが報告(20,23)されているのでウサギPの安定化作用について調べた。溶血中間体EAC₄,3bにBとDを反応させEAC₄,3b,Bbとし、洗浄後、Pを加え37°C、10分インキュベート後、EDTA希釈モルモット血清を加え溶血させて、C3b,Bbサイトの残存量を測

定した。図16に示すように、ヒトPと同様にウサギPでも量依存的に溶血の促進が認められた。次にこれがC3/C5転換酵素の安定化の結果によるのかをPを加えた後、インキュベートし、その後EDTA希釈モルモット血清を加え溶血させて、各時間におけるC3/C5転換酵素残存量を調べた。図17がその結果でPを加えないときの半減期が2.5分なのに対してヒトPで7.5分、ウサギPで12.5分とPを加えることにより半減期は3-5倍延長しており、これらから、ウサギPもヒトP同様にC3/C5転換酵素安定化機能を有し、反応の進行を促進していることが確認できた。

1.2 H因子

ヒトHは分子量150,000の一本鎖糖タンパクであり(24)、血中量も300 μ g/mlとかなり多い。今回精製したウサギH因子の構造やタンパク化学的性質を検討した。

LaemmliのSDS-PAGEを行ったところ、ヒトHは分子量155,000、ウサギHは160,000を示した(図18)。又、等電点はヒトHではNagakiら(9)の報告通り、6.2-6.3で、ウサギHは6.3-6.4となった。次に、精製したHのアミノ酸組成を解析した。ヒトHについては、SimとDiScipioが1982年に報告しており(25)、ほぼ一致していた。ウサギHは表IIに示すように、Ser, Glu, Val, Cys, Tyrで若干差が見られた以外は、一致していた。

H因子はNilssonとMuller-Eberhard(26)により、補体第二経路の制御タンパクとして単離された。このタンパクはC3転換酵素形成時にBと競合する事によりC3転換酵素の形成を阻害する。このようにヒトHは補体第二経路のC3転換酵素形成を阻害する因子であるが、ウサギより精製したH因子がどのような活性を持つか調べた。EAC4b, 3b, PにBとDを加えてC3転換酵素を作らせる際にHを加えてその効果を調べた。図19に示すようにヒトHも、弱いながらウサギHもC3転換酵素形成を阻害した。

1.3 C3因子

ウサギC3はすでにGiclas等(27)によりその精製が報告されている。今回精製したウサギのC3をSDS-PAGEで分析したところ、ヒトC3は分子量120,000と70,000、ウサギC3は125,000と68,000の二本鎖構造をとっていた(図18)。

1.4 B因子

精製したBをSDS-PAGEにかけたところ、ヒトBは分子量98,000、ウサギBは95,000を示した(図18)。又、ヒトBはC3, D, Mg^{++} の存在下、BbとBaに分解され、C3転換酵素(C3b, Bb)を形成し、これの活性部位としての機能を有している。そこでEAC4b, 3b, PにBを加え37℃, 10分インキュベート後、EDTA希釈モルモット血清を加えて溶血させ、C3転換酵素形成能を調べた。図20に示すようにウサギBの方がヒトBよりも活性は弱いC3転換酵素形成能を有していた。

1.5 D因子

精製したウサギDをSDS-PAGEで分析したところ、分子量24,000でヒトDの23,000より若干分子量が大きかった(図18)。又、ヒトDはC3bに結合したBを分解して Mg^{++} 存在下C3転換酵素を形成させる。このBを分解する活性を微量のC3とDを加えて、 Mg^{++} の存在下、37℃でインキュベート後、SDS-PAGEで生成したBbとBaを検出することにより調べた。この結果は図21に示した。但し、使用したウサギBは精製に用いた血清中で分解が起こっており二本のバンドを示している。ウサギとヒトの因子のどの組み合わせでもBからBbとBaへの分解が認められたが、その切断の程度に興味深い差が認められた。レーン3-6がヒトBを、レーン13-16がウサギBを切ったものである。まず、ヒトBについては、ヒトC3とヒトDの時(レーン3)が最も切れ方が強く、ウサギC3とウサギDの時(レーン5)は切れ方が弱かった。又、同じウサギC3でも、Dがヒトのとき(レーン4)はかなり切られており、ヒトC3にウサギDの時(レーン6)はそれよりもやや切れ方が弱かった。即ち、ヒトBはウサギDには切られ難いこと、又、ウサギC3には結合しにくいことが予想された。ウサギBについては、ほとんど切れ方に差はみられなかった。このように、親和性に多少の差はあるがウサギのC3, B, Dがヒトと交換でき同じ活性及び機能を持つことが確認できた。

1.6 I因子

IはC3bをHの助けを借りて切る因子である。このようにC3bを分解しC3転換酵素形成を阻害することにより補体系の進行を防ぐ。そこでこの活性を ^{125}I でラベルしたC3を部分精製品IとHと共にインキュベートしその分解量で調べた。図

22にこの結果を示した。この系では、ウサギHの活性がなぜか弱く、又、ウサギHとヒトIの組み合わせでは非常に分解能が低かった。しかし、ウサギIがヒトI同様にH共存下、C3を切断する事が確認できた。

2 各因子を用いた種間組み替え実験

ヒト血清がウサギ血球をウサギ血清がヒト血球を補体第二経路を介して溶血させるにもかかわらず、どちらも、同種の血球を溶血出来ない。この、同種であることを認識する機構をヒトとウサギの因子を組み替えることにより解析を試みた。

2.1 B因子

ヒトB因子は50°C, 15分間の熱処理により失活する、これを利用して、血清を15分間、50°C処理することにより、B因子が失活したB活性測定用血清(RB)を調製することが出来る。ウサギ血清も同様の熱処理により、RBを調製することができた。このRBと精製B因子を用いて、組み換え実験を行った。まず、補体は、 2×10^7 の赤血球を半分溶血する活性を1ユニット(u)と表わすので、それぞれのRBで1uにあたる量を各々のB因子で出し、その量を用いて、dose dependencyを調べた。図23に示すように、B因子の種の違いで溶血を起こさないということはなく、赤血球とRBの種が違う時のみu数に応じて、ヒト、ウサギB因子で同じように溶血を起こし、赤血球とRBが同種の時は両B因子とも溶血を起こさなかった。つまり、血清中で出来たC3iに種を越えてBは反応することができ、C3iBb形成後も、赤血球の種に関係なく、その表面上のC3bにBは反応出来ることを示している。これらの結果より、B因子そのものには、非自己認識の機構はないことが推定された。

2.2 D因子

D因子は分子量が23,000と他の補体因子に比べ小さく、このことを利用してSephadex G-75によるゲル濾過でD因子のみを除いた血清(RD)をウサギ血清からも調製することが出来る。そこで、B因子の場合と同様に、組み換えを行った結

果が図24である。やはり、B因子の時と同様の結果が得られ、D因子自体には認識能力がない事が解った。

2.3 P因子

P因子を欠損したヒト血清RPは、ヒト血清をザイモザンと17°C、60分間処理することにより得られるが、ウサギ血清からは同様の処理では、温度や時間を工夫しても得ることが出来ず、5% PEG4,000でP分画を除く等の工夫をしたが、結局、ウサギ血清からはRPを調製することは出来なかった。そこでヒトRPでB及びD因子と同様の実験を行ったが、やはり同種、即ちヒト赤血球では溶血が起ころず、ヒトRPとウサギ赤血球でのみ溶血が認められた(図25)。又、この溶血は図26に示すようにC3転換酵素の安定化による溶血の促進によっており、この効果に種差は認められなかった。即ち安定化因子Pにも種識別能力はないと結論した。

2.4 H因子

溶血を促進する因子、B、D、Pには種の識別能力が認められなかったので、抑制因子側を調べた。H因子を欠損した血清を調製する方法はないので、それぞれの血清そのものにHを追加した際の溶血に対する効果を調べた(図27)。ここでもやはり赤血球と同種のHがより強く阻害するというような識別能力は認められず、逆に血清と同種のHを加えた場合により強い阻害を示したにすぎなかった。

2.5 I因子

粗精製品を用いて組み換え実験を試みたが、血清にIを追加する系では、血清中に含まれるプロテアーゼと思われるものがある程度の阻害をしており、それにもかかわらず溶血する量を加えているのでIによる溶血阻害活性を検出する事は出来なかった。

2.6 C3因子

やはり赤血球に結合するC3因子が鍵を握ると考えられたので、R3を用いて、B、D、Hと同様の組み替え実験を試みた。ウサギR3を得るのは難しく、ヒトR3を用いて行くと、血清の場合と同様、ヒトR3とウサギ赤血球に、ヒトあるいはウ

ウサギC3を加えると溶血が起こった。しかし、ウサギC3では十分な溶血が得られなかったので、ウサギC3の活性自体が弱いのか、ウサギC3がウサギ赤血球を識別しているのかを、次のような実験により調べた。C3をトリブシン処理することによりC3b様の分子をつくり赤血球に人工的に取り込ませ、表Ⅲのような組み合わせで、C3, B, Dを加え、C3転換酵素を形成させ、EDTA希釈モルモット血清を用いて溶血させ調べた。その結果、赤血球に異種のC3bを反応させた系の方が、より強い溶血を引き起こした。ウサギ赤血球ではヒトC3の方がウサギC3の約7.5倍、ヒト赤血球では、ウサギC3でもヒトC3より約3倍強い溶血活性を示し、赤血球をC3が識別している可能性が示された。

[結語]

1982年に補体古典経路C3/C5転換酵素の崩壊促進因子(Decay-accelerating factor, DAF)がヒト赤血球膜より精製された(28)。これが、補体系のC3の段階での種の認識に関与しているのではないかと考え、当研究室でも、ヒト及びウサギ赤血球膜よりDAFを精製し、その種識別能を検討した(29)。ヒト及びウサギのC3b-Sepharoseカラムを調製し、このカラムにヒトあるいはウサギDAFを通したところ、結合はしないが、同種のC3bとのみ親和性を示して溶出が遅れる事が判明した。又、ヒト赤血球を抗ヒトDAF抗体で処理するとヒト血清でも溶血しやすくなる事、更にPNH(Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria、突発性夜間血色素尿症)患者の赤血球にDAFを取り込ませると溶血が阻害されるという報告も出ている(30)。これらの事より第二経路におけるC3の段階での識別はC3因子自体、およびDAFによって行われているのであらうと思われる。即ち、補体第二経路による攻撃から自己細胞を認識して防御する機構には、補体因子の認識機能および、膜側に自分を守る機能を持つ補体制御タンパクが有る事がわかった。即ち、補体第二経路活性化が起きたとき、最初に膜にC3bが結合してC3転換酵素(C3bBb)を形成する時点で、DAFがC3bにBが結合するのを阻害したり、形成されたC3bBbからのBbの放出を促進したりしてこの酵素を崩壊させる事により、自己細胞を保護していた(31-34)。これはC3bに対するBとHの親和性で説明していた今までの説をきれいに証明している。即ち、自己赤血球上では、結合したC3bにDAFが妨

害するためにBがつきにくく、フリーのC3bはHとIにより分解が進み、補体による攻撃が進行しなくなってしまうということであった。

A.2 尿中に存在するDAFの精製及び諸性質の検討

[緒言]

1981年にモルモット赤血球膜上に、C3/C5転換酵素崩壊促進活性をもつタンパクが存在する事が報告され(35)、1982年には、ヒト赤血球より、Nicholson-WellerらがC3/C5転換酵素の崩壊促進因子(Decay-accelerating factor, DAF)を精製した(28)。さらに、この因子はほとんど全ての血液細胞膜上に同定された(36)。このDAFは補体の活性化による攻撃から、これらの自己細胞を守る重要な機能を担っている(34、37、38)。膜上に存在するDAFはGPI-アンカーと呼ばれる、C末アミノ酸の次にエタノールアミン、リン酸、オリゴ糖、グルコサミンそして一番C末側にフォスファチジルイノシトールを持つ新しい膜結合様式を持つタンパクの1種である(39)。この糖脂質部は、細胞膜へのアンカーの機能を持っており、PIPLC処理により、脂質二重膜への結合能力を失いタンパク部分は放出されてくる(40、41)。最近Medofらにより、涙、唾液、血漿、尿中にもDAFが存在している事(42)、又、Hela細胞では、DAFは膜上にあるだけでなく培養上清にも放出されていると報告され(41)。更に、2つのグループが別々にDAFのcDNAをクローニングし報告しているが、この中でCarasらはDAFに対するcDNAを2種得ている(43、44)。1つはGPI-アンカータンパク前駆体に共通の構造であるC末に疎水性アミノ酸配列を持ち、これは膜型のDAFをコードするものと思われる。しかし、もう1つは、この部分に、挿入があり、フレームシフトによりC末に疎水性のアミノ酸配列を欠いている。これは可溶性のDAFをコードするものと想定されたが、現在までのところ、この可溶性DAFに相当する分子種は同定されておらず、このcDNAに対応する分子の存在は確認できていない。膜上のDAFがPIPLC又は、何らかのタンパク分解酵素により可溶化されることは可能であり、尿中のDAFがどのような構造を持つかはたいへん興味深い。Medofら(42)は抗DAFモノクローナル抗体カラムを用いて、尿中のDAFを少量、精製しているが、その構造解析は行

っていない。又、DAFは、H, C4-binding protein(C4bp), Complement receptor 1(CR1), Complement receptor 2(CR2), Membrane cofactor protein(MCP)といった6種のC3を制御するタンパクの1つであり、これらの6種のタンパクの遺伝子はヒト第一染色体のRegulator of complement activation(RCA)座にクラスターを作って存在している(45)。これらは、種々の数のShort consensus repeat(SCR)ドメインを含んでおり、DAFには4個のSCRが存在している。この約60個のアミノ酸より成るSCR内には4個のCysが存在し、その位置が保存されている。これらのCysがどのように結合してドメインを構成しているかは興味ある点である。これまでに β_2 -glycoprotein 1(β_2 I)に存在する5個のSCR内の10個のジスルフィド結合の内6個が、IL-2レセプター内の2個のSCR内の4個のジスルフィド結合の全てが、そしてC4 binding protein (C4bp)の8個のSCR内の16個のジスルフィド結合の内7個が決められた(46-49)。 β_2 IとC4bpでは1個のSCR内の4個のCysの1番目と3番目、2番目と4番目がジスルフィド結合していた。IL-2レセプターでは2研究室からの報告で、2個のSCR間にまたがって1個目のSCRの1番目と2個目のSCRの3番目のCysが、又、1個目のSCRの3番目と2個目のSCRの1番目のCysが結合しており、残りの2番目と4番目のCysは同じSCR内で結合していた。全てのジスルフィド結合が決められているのはIL-2レセプターのみで、他の2つのタンパクでSCR間にまたがる結合のある可能性が残っているので、DAFではどのような結合をしているのかの解析や、又、GPI-アンカーが結合しているアミノ酸残基の決定というDAF自体の構造解析のためにも赤血球膜から得るより大量精製が容易であると考え、今回尿からの大量精製を試みた。

[材料及び実験方法]

1 試薬

K76-モノカルボン酸は大塚製薬より供与していただいた。マウスモノクローナル抗赤血球膜DAF抗体は大阪大学木下先生より分与していただいた(50)。ヒト補体因子C3, B, D, Hはヒト血漿より本論文第一章で述べた方法で精製した(5-8)。膜DAFはヒト赤血球より精製した(51)。ヒトC3aのRadioimmunoassayキットはAmersham社より購入した。高分子マーカ- (SDS-6H)、TPCK-トリプシン、サー

モリジン、サチライシンはシグマ社より購入した。SBD-F(Ammonium 7-fluorobenzo-2-oxa-1,3-diazole-4-sulfonate)および4-ビニルピリジン、トリ-n-ブチルホスフィン、N-エチルモルホリンは和光純薬株式会社より購入した。

2 膜上のC3/C5転換酵素に対するDAF活性測定法

溶血中間体EAC1-3b,PはHongらの方法(5)に従い、感作ヒツジ赤血球(EA)、K76-モノカルボン酸(3mg/ml)で4°C、一晩処理したモルモット血清と30°C、30分インキュベートし、調製した。このようにして調製したEAC1-3b,Pにサンプルを加え、37°C、15分間インキュベート後、残存C3/C5転換酵素活性をEDTA希釈モルモット血清で溶血させる事により測定した。得られた溶血率より、細胞当たりの溶血サイト数(Z)を求め、サンプル無しで求めたZ値をコントロールとし、下の式により溶血阻害率(Reduction %)を求めた。

$$Z(\text{control}) - Z(\text{sample})$$

$$\% \text{ Reduction} = \frac{\quad}{Z(\text{control})} \times 100$$

3 液相C3転換酵素に対するDAF活性測定法

10 mM MgCl₂を含むPBS中、C3を凍結融解させて調製したC3(H₂O)(0.05μg)、C3(10μg)、B(2μg)、D(0.2μg)とサンプルを加え、37°C、30分インキュベートした(52)。液相C3転換酵素により放出されたC3aの量をRadioimmunoassayにより求めた。

4 N末アミノ酸配列決定法

尿DAF(0.3-0.6nmol)のN末アミノ酸配列は、Applied Biosystem 470Aシーケンサーを用いて解析した。各サイクルで出るPhenylthiohydantoin (PTH)アミノ酸はYMC-Pack ODS-AM、AM-302(4.6mmx15cm)カラムと8 mMギ酸ナトリウム、pH 3.1/アセトニトリル(605/400, w/w)、0.0006%SDSを用いて同定した(53)。

5 イノシトール分析

イノシトール含量は、各サンプル2 nmol分を、1.4 Mメタノール塩酸中90°C、

2時間メタノリシスし、次に10%ピリジンメタノールと無水酢酸を加え、室温で数分処理した。この再アセチル化産物をトリメチルシリル(TMS)化剤、Tri-Sil (Pierce社)を用いて、50°C、10分処理し、TMS化イノシトールを島津ガスクロマトグラフモデルGC-4B PFと水素炎検出器(FID)を用いてOV-17カラム(4mm径、2m長)で、注入後110°C、10分、毎分3°Cずつ昇温し、250°Cまでのグラジエントにより分析した(54)。

6 ジスルフィド結合部位の決定

DAF-U1(2mg)を0.1 M酢酸アンモニア、1 mM酢酸カルシウム、pH 6.5中で、2.5%(w/w)トリブシンで37°C、17時間、2.5%(w/w)サーモリジンで56°C、2時間、2.5%(w/w)トリブシンで37°C、4時間処理した。この消化物をTosoh TSKgel ODS-120Tカラム(7.3mmx30cm)を用い、0.1% TFA存在下、アセトニトリルのグラジエントにより分画した。各ピークのCysの有無をSBD-Fを用いたSueyoshi等の方法(55)で調べ、Cys含量の高いピークのPICO TAGによるアミノ酸組成分析を行った。(56)。次に、まずシークエンサー用グラスフィルターに試料をスポット後、アセトニトリル250μl、0.25 M N-エチルモルホリン-ギ酸緩衝液、pH 8.5 250μl、4-ビニルピリジン 25μl、トリ-n-ブチルホスフィン 10μlを混合したS-ビリジルエチル化液を用いて、気相でCysをビリジルエチル化して、シークエンサーにセット後、アミノ酸配列を分析した(57)。

又、複数のペプチドが混在するピークのいくつかは、ODS-80TMカラム(4.6mmx15cm)を用いて、15 mM酢酸アンモニア、pH 6.5存在下のアセトニトリルグラジエントによりさらに分画し、同様の方法で分析した。

以上の操作で同定出来なかったジスルフィド結合部位を探すために、DAF-U1(4mg)を1%(w/w)サチライシンで0.2 M重炭酸アンモニウム、1 mM塩化カルシウム中、37°C、一晚処理し、生成ペプチドをTosoh TSK gel ODS-120Tカラム(7.3mmx30cm)で0.1% TFA存在下アセトニトリルのグラジエントにより分離した。各ピークのアミノ酸組成をPICO TAGにより分析し、求める結合部位を含むと思われるピークを更に0.1 M酢酸アンモニア、1 mM酢酸カルシウム、pH 6.5中、2.5%(w/w)トリブシンで37°C、4時間処理し、Wskosil 5C₁₈カラム(4.6mmx15cm)でさらに分離後、同様に分析した。

7 他の方法

SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動はLaemmliの方法で行った(18)。Immuno blottingはモノクローナル抗DAF抗体を用い、Vector社のVectastainキットを用いて行った。モノクローナル抗DAF抗体カラムは、抗体を2.5 mg/ml濃度で、臭化シアンにより活性化したSephacel 4Bに結合させ調製した(58)。

[結果および結語]

1 尿DAFの精製

表IVに示す方法で尿DAFを精製した。まず、ヒト尿を限外濾過により200倍程度に濃縮後、80%飽和硫酸沈澱を分画した。これを水に透析後、DAFが高温に対して安定なのを利用して、80°C、20分間加熱し、熱変性タンパクを除去した。上清を20 mM リン酸ナトリウム緩衝液、pH 7.5で平衡化したDEAE-Sephacelカラムにかけ0.0-0.3 M NaClグラジエントで溶出し(図28)、膜C3/C5転換酵素崩壊促進活性を調べ、活性ピークをPBSで平衡化したBio Gel A-0.5mカラムにかけた(図29)。このゲル濾過で、2つのDAF活性ピークが得られ、それぞれプールI、プールIIとした。プールIをTSK gel Phenyl 5PWカラムを用いたHPLCで0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液、pH 7.0中、1.0-0.0 M硫酸のグラジエントで分画したところ、最初のピークにDAFが溶出されてきた(図31)。これをDAF-U1と命名した。プールIIのDAFは上記のカラムに吸着してしまい回収できなかったため、Medof等の方法(42)に従い抗-DAFモノクローナル抗体カラムを用いて精製し(図30)、これはDAF-U2と名付けた。このようにして原尿187 LよりDAF-U1を2.3mg、DAF-U2を0.19mg精製する事ができた。

精製した尿DAFを電気泳動し、銀染色及びモノクローナル抗DAF抗体を用いてImmunoblottingしたところ、図32にあるように赤血球膜DAF(M.W.70,000)をはさんでDAF-U1は55,000-65,000、DAF-U2は60,000-85,000の分子量を示した。この分子量の多様性は精製段階での分解のよる可能性があったので新鮮尿から直接モノクローナル抗DAF抗体-Sepharoseを用いて精製し、尿DAFの分子量を調べたところ、精製DAF-U1、DAF-U2と同じものが得られ(図33、レーン9)、又、同時に

個人差を調べるために4人より尿を少量採取し、2.5 mlの尿に抗-DAF抗体-Sepharoseを加えて免疫沈澱させ、同様に調べたところ、DAF-U1と同じものが量には差があるが被検者全員の尿に検出された(図33、レーン4-7))。DAF-U2は量が少ないため検出出来なかったものと思われる。これらの結果より尿中に元々このように不均一なDAFが存在していることが確認できた。

次に尿DAFのC3/C5転換酵素崩壊活性を調べた。まず、膜上のC3/C5転換酵素に対する阻害活性を測定した。EAC1-3b,Pに赤血球膜DAF(mfDAF)、またはDAF-U1またはDAF-U2の各DAFを加え、37°C、15分間インキュベート後、残存C3/C5転換酵素活性を測定し、これらの阻害活性を調べた(図34)。DAF-U2はmfDAFと同程度の阻害活性を示したのに対し、DAF-U1は他の2つに比べタンパク量当たり40分の1程度の低い活性しか示さなかった。これはDAF-U1がmfDAFのように赤血球にとりこまれる性質を持たないせいではないかと推測された。又、DAF-U2はTSK gel Phenyl 5PWカラムに吸着する事から、疎水性が高いと想像されたので、mfDAF同様に膜に取り込まれ高い活性を示すものと思われた。

次に、液相で形成されるC3転換酵素に対する阻害活性を調べた(図35)。少量のC3(H₂O)とC3, B, D, Mg⁺⁺に各DAFとHを加えて、37°C、30分間インキュベート後に、C3転換酵素によりC3から切られて放出されてくるC3a量を測定した。液相C3転換酵素に対する阻害はHが一番弱く、DAF-U1とDAF-U2はほぼ同じで強い活性を示し、mfDAFよりもやや強い傾向を示した。

これらの実験で、DAF-U2はDAF-U1と比べ、よりmfDAFに似た性質を示した。又、DAF-U1もDAF-U2も液相C3転換酵素に対して強い阻害効果を持つことから、これら2種の尿DAFがどのようにして生じるのか、又、どのようなC末構造を持っているのか、さらには血清中のDAF濃度の2-6倍という高濃度で尿中に存在するので、どういう機能を担っているのか等、大変興味深い。NCAMにはmRNAプライシングの違いにより膜貫通型及びGPIアンカー型の2種が存在しているが、これらの膜型の物以外に、分泌型をコードするmRNAの存在も最近報告された(59)。これはC末部に1つのExonにコードされた配列が入っておりそのためにこの挿入の後でstopコドンが出来てしまいその結果として短い可溶性の分泌型のNCAMが作られてしまう。GPIアンカー型とこのような分泌型の両方が同定されたタンパクの報告は、尿DAFについて2個目でありCarasら(44)の報告した分泌型のタンパク

が実際同定出来ないため分泌型の存在が疑問視されていたが、あるいは尿DAFは分泌型の分子を含んでいるかも知れない。又、膜型のもがタンパク分解酵素や血清中のPIPLD等のフォスフォリパーゼにより切られて遊離したものである可能性もあり、この点を解明するために、C末部のGPI-アンカー構造に特異的なイノシトール含量をガスクロマトグラフィーにより分析した。mfDAFでは予想通りDAF1分子にイノシトール1分子がDAF-U1にはDAF1分子に0.7分子がDAF-U2にはDAF1分子に1.0分子が存在していた。又、エタノールアミンに関しては、ヒト赤血球AchEでタンパク1分子に2分子存在していると報告(60)されており、やはりmfDAFではDAF1分子にエタノールアミン2分子、DAF-U1ではDAF1分子にエタノールアミンが1.4分子存在していた。以上の事より、尿DAFはGPI-アンカーを持った膜型分子由来であり、分泌型の分子ではないと予想される。しかしながら、DAF-U1はおそらくPIPLCまたはPIPLDにより、又一部はタンパク分解酵素により切られて出来ていると思われるのに対してDAF-U2は疎水性を示しており、どの様に産生されているのか予想できない。これら尿DAFの産生経路を解明するためにはC末端部分の解析が必要であり、現在C末断片を両DAFより得る努力をしている。又、脂質部の解析もする予定である。

2 ジスルフィド結合位置の決定

DAF-U1をトリブシンとサーモリジンで処理し、TSK gel ODS-120Tカラムで分画したものが図38である。SBD-Fと反応したCys含有ペプチドの蛍光強度の強いピークを実験方法のところで述べた方法で分析した。これらのうち、ピーク13, 22, 31は一つのジスルフィド結合ペプチドのみを含んでいた。例えば、ピーク13のアミノ酸配列は図40に示すようにCysGluGluSerとPheCysAsnArgの二つが同定され、表Vに示したこれのアミノ酸組成と一致している。この配列より31番目と60番目のCysが結合していることが解った。これは一個目のSCR内の2番目と4番目のCysの間でジスルフィド結合が形成されていることを示している。同様に、ピーク22は3個目のSCR内の1番目と3番目のCysが、ピーク31は4個目のSCR内の1番目と3番目のCysが結合したペプチドであった。他のピークは一つ以上のジスルフィド結合ペプチドを含んでいたため更に酢酸アンモニア、pH 6.5を用いて実験方法のところで述べた方法でODS-80TMカラムで再分画し、同様に分析した。

ピーク15, 23, 33を分けたものが図37である。これらの分析結果は図40と表Vに示してある。これらの分析結果より8個のジスルフィド結合の内7個が決定できた。

更に、残る一個の結合場所を同定するために新たにDAF-U1をタンパク分解する事にした。単独の酵素では、ただ一つサチライシンでのみ切れることがわかったので、サチライシンで消化した。これをODS-120Tカラムで分画したものが図38である。このピーク18が残る部分に相当するペプチドであったが、サチライシンは特異性が低いため綺麗なシークエンスが得られなかった。そこでこのピークを更にトリプシン処理し、Wakosil 5C₁₈カラムにより分画(図39)し解析した(図40)。これにより全てのジスルフィド結合が決定できた(図41)。

以上の解析により得られた結果はジスルフィド結合が全て、一つのSCR内で1番目と3番目のCys、2番目と4番目のCysの間で1-3、2-4結合していることを示していた。これはLozierらの β_{21} での結果(46)やJanatovaらのC4bpでの結果(49)と一致した。従って、これらのタンパク内でも決められていないジスルフィド結合全てが上の法則で結合しているものと思われる。IL-2では、第一SCRの2番目と4番目のCysが2個ずつ、即ち、28と30番目、59と61番目がCysになっていたり、第二SCRとの間に36個アミノ酸が入っていたりしており、又、2教室がIL-2を常に発現しているHUT 102B2細胞よりとったIL-2とCHO(Chinese hamster ovary cell)で発現させたIL-2を解析して全く同じ二つのSCRに跨る結合方式を報告(47、48)している事より、このタンパクが特別に機能を担うために獲得した結合方式であろうと思われる。

DAFの遺伝子構造の報告(61)より、1個目、2個目、4個目は一つのSCRが一つのエクソンにのっているが、3個目のSCRは2つのエクソンに跨っていることがわかっている。この様にエクソン2個に分かれて存在するSCRはCR1、MCP(Membrane cofactor protein)、Hで一個、CR2では3個報告(62-65)されており、このような場合のジスルフィド結合や、又、DAFやCR2(66)の様にそのリガンドであるC3dgやEpstein barr virusの結合に関与する事が解っているN末1個目と2個目の2個のSCR内での結合などに特別な様式が存在するかと思われたが、今回のDAFの結果よりその様な特別なジスルフィド結合の変化は無く、皆一つのSCR内で1-3、2-4結合するものと思われる。

ReidとDayの総説(67)によると種々のタンパクのSCRはアミノ酸レベルで20-40%相同であり、100個以上のSCRを調べたところ、いずれのSCRでも21-51個のアミノ酸が4個の β 構造と β ターンを作っている。上で調べたようにCysが1-3、2-4結合しているとこれらにより安定した逆平行 β -Strandをとるものと思われる。

B 自己赤血球を補体系の攻撃から守る第二の膜因子

B.1 新しい補体制御タンパクP-18の精製及び諸性質の検討

[緒言]

C8とC9が赤血球と同種の場合、溶血が起こりにくい事(68-71)や、PNH患者の赤血球が正常人の赤血球と異なり、Reactive Lysis*と呼ばれるC5b6複合体及びC7-C9の因子による溶血を起こしやすい(72-74)という2つの事より、溶血の最終段階で働く制御因子が膜に存在する事が予想されていた。最近、この制御因子として、Reactive Lysis阻害活性を指標に精製されたC8 binding protein(C8bp)(75)とC9-Sepharoseに結合するという性質で精製されたHomologous restriction factor(HRF)(76)が報告された。そこで当教室でも追試を試みたが成功せず、独自のReactive Lysisの阻害活性を指標に、赤血球膜から、膜に存在する制御因子の精製を試みた。

*Reactive Lysis

補体系が活性化された時に、そのC5転換酵素により切られたC5bにC6がついてC5b6になった後、これが放出されてC7と結合し、近くに存在する膜に潜りこみ、これにC8、C9が反応してMAC(Membrane attack complex)を形成し、赤血球であれば溶血が起こる。このように補体の活性化が起こっている異物に隣接する細胞が非特異的に破壊される現象をReactive Lysis又はBystander Lysisと呼ぶ。

[材料及び実験方法]

1 試薬

パバインはシグマ社より、ペルオキシダーゼ標識坑ウサギ Ig G 抗体はMBL社より、FITC(fluorescence iso-thiocyanate)標識F(ab')₂ヤギ 坑ウサギ IgG (H&L)はJackson Immuno Research Lab. Inc.より、Bacillus thuringiensis由来のPIPLC(Phosphatidyl-inositol specific phospholipase C)はフナコシ薬品

より購入した。ヒト補体因子C5, C6, C7, C8, C9はHammerら(10)の方法及び「補体学」(1)及び74-78の文献を参考にしてヒト血清より精製した。ウサギ血清及びウサギ抗血清は赤血球膜DAFをFreundの完全アジュバントを用いて家兎を免疫し抗DAFウサギ血清を、今回精製したP-18を同様に家兎に免疫し抗P-18ウサギ血清を調整し、各々を56°C, 30分インキュベートし、非働化した。Aggregated IgGはヒト血清を10 mMナトリウムリン酸緩衝液、1 mM EDTA、pH 7.4に透析後、同緩衝液で平衡化したDE52-celluloseにのせ、その素通りピークをブール後、33%飽和硫酸により沈殿させ、ヒトIgGを得た。このIgGを蒸留水によく透析後、63°C、20分インキュベート後、氷冷し、aggregated IgGを得、50.0 mg/ml PBSとして用いた(82)。

2 緩衝液は以下の組成のものを用いた。

SGVB⁺⁺ : 4.9 mMバルビタールナトリウム、pH 7.4、9.73% sucrose、0.15 mM CaCl₂、1 mM MgCl₂、0.1%ゼラチン

EDTA-saline : 145 mM NaCl、10 mM EDTA、pH 7.4

PBS : 15 mMナトリウムリン酸緩衝液、pH 7.4、145 mM NaCl

PBS-BSA : PBS、2 mg/ml BSA

PBS-BSA-NaN₃ : PBS-BSA、0.1% NaN₃

Lysis buffer : 0.83% NH₄Cl、mM EDTA、mM KHCO₃、pH 7.4

PIPLC処理用緩衝液 : RPMI1640、5 mM HEPES、2 mg/ml BSA、50 μM 2-メルカプトエタノール(83)

3 ヒト赤血球からのストローマ調製法

ヒト全血を遠心し、赤血球画分をPBSで洗い、次にLysis buffer中で溶血させる。これを限外ろ過により濃縮し、得られたストローマ画分を、100,000xg、1時間、4°Cで遠心し、この沈殿をLysis bufferでさらに5回洗い、これをストローマとした。

4 溶血中間体EC5-7細胞の調製法

Dessauerら(84)の方法、即ちC5とC6を混合し、35°C、3分間インキュベート後、

-70°Cで凍らせることによりC5b6の代わりに使えるC5,6^fを調製する事が出来る。このC5,6^fをモルモット赤血球(E)に加え、33°C, 5分間インキュベートしさらにC7を加え、15分間インキュベート後、赤血球を洗いEAC5-7を得た。

5 Reactive Lysis阻害測定法

A. Co-incubation法

試料に溶血中間体EC5-7(1×10^7 cells)とヒトC8, C9を200 ngずつ加え、SGVB⁺⁺緩衝液中、37°C, 60分インキュベートし、氷冷EDTA-salineを加えて、反応を止め、遠心後、その上清の414 nmでの吸光度を測定する。得られた溶血率より、細胞当たりの溶血サイト数(z)を求めた。試料なしで求めたZ値をコントロールとし、下の式により(%) Reductionを求めた。

$$\begin{aligned} Z(\text{control}) - Z(\text{sample}) \\ (\%) \text{ Reduction} = \frac{\quad}{Z(\text{control})} \times 100 \end{aligned}$$

B. Pre-incubation法

試料に溶血中間体EC5-7(1×10^7 cells)を加え、SGVB⁺⁺中37°C, 10分インキュベート後、よく洗浄する。次に洗ったEC5-7にヒトC8, C9を200 ngずつ加え、SGVB⁺⁺中、37°C, 60分インキュベートし、氷冷EDTA-salineを加えて、反応を止め、遠心後、その上清の414 nmでの吸光度を測定し、上と同様の方法で(%) Reductionを求めた。

6 FACSによる解析法

PNH患者あるいは正常人よりヘパリン採血し、PBS-BSAで洗浄し、一部赤血球を残し、他の血球画分は、Lysis bufferに懸濁し、赤血球を溶血させ、白血球画分を回収後、さらに、PBS-BSAで洗浄する。得られた洗浄赤血球と白血球をPIPLC処理用緩衝液に 1×10^6 cells/mlになるように懸濁し、これに3ユニット(u)/mlになるようにPIPLC(60u/ml, 5 mM Tris-HCl, pH7.0, 50% glycerol)又は、同量の5 mM Tris-HCl, pH7.0, 50% glycerolを加え、37°C, 40分インキュベートした。これをPBS-BSA-Na₃で洗浄後、aggregated IgG 5mg/mlで室温、15分処

理し、Fcレセプターをブロック後、そこへPBS-BSA-Na₂S₂O₈で希釈した種々の血清を加え、氷上、30分処理する。この後、細胞をよく洗浄し、FITC標識抗ウサギIgGで処理し、ORTHO SPECTRUM III(Ortho Diagnostic System Inc.)により解析した。

7 他の方法

SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)はLaemmliの系で非還元下で行った(18)。ImmunoblottingはSDS-PAGE後、それをニトロセルロース膜に転写し、ウサギ抗P-18抗体で処理し、次にペルオキシダーゼ標識抗ウサギIgGを反応させ、H₂O₂とDAB(ジアミノベンジジン酸)でバンドを発色させ検出するという方法で行った。タンパク量はMarkwellらの方法(85)で測定した。

[結果]

1 制御タンパクの精製

Schonermarkら(75)により、C8bpはトリプシン又はババインで消化されず、ババイン消化ストローマより効果的に精製できると報告されていたので、ババイン消化ストローマより制御タンパクを精製する事にした。

表VIに精製過程をまとめて示した。まず、ストローマ(2.76gタンパク/276 ml 10 mMリン酸緩衝液、1 mM EDTA、pH7.4)に200 µg/mlになるようにババインを加え、氷中一晚消化した。この処理によりストローマ中の30%のタンパクが除去された。次にこのストローマを276 mlの上記緩衝液に懸濁し、これに69 mlのn-ブタノールを加えて、0°C、30分抽出した。この水層を回収し、10 mM Tris-HCl、0.1% NP-40、pH8.0に調製し、同緩衝液で平衡化したDEAE-Sephacelカラム(3.5x35cm)にのせ、0-0.5 M NaClグラジエント(1.6 L)により溶出した(図42.a)。co-incubation法により各ピークの活性を測定し、活性部分をブールし、限外濾過により濃縮後、PBS、0.1% NP40、pH 7.4で平衡化したBio Gel A-0.5mカラム(2.5x90cm)にのせゲル濾過した(図42.b)。DAFはDEAE-Sephacelカラムでは15 mSのところ、又、Bio Gel A-0.5mカラムでは、ほぼ50本目のところに溶出

され、これら2つのカラムにより、Reactive Lysis阻害タンパクとDAFは分離できた。次にもう一度DEAE-Sephacelカラム(2.5x9cm)に一回目と同じようにのせ、溶出した(図42.c)。この活性ピークをSDS-PAGEにかけたところ、18kDaに主なバンドを示した。そこで、SDS-PAGE後、ニトロセルロース膜に転写し、その膜を5mm幅に20等分し、各切片をSGVB⁺⁺中、4°C一晩抽出した。その抽出液の阻害活性をco-incubation法により測定したところ図43に示すように18kDaのところに活性ピークが検出できた。そこで、この方法により、さらに精製する事にした。まず2回目のDEAE-SephacelカラムブールをSDS-PAGEし、ニトロセルロース膜に転写後、18kDaに相当する部分を切りとり、10 mM Tris-HCl, 2% NP-40, pH 8.0を加えて4°C一晩抽出した。抽出液を小さなDEAE-Sephacelカラム(1x1.5cm)に吸着させ、0.15M NaClにより溶出するという方法により濃縮回収した。回収タンパクをSDS-PAGE後、銀染色したものが図44で、18kDaの単一バンドに精製されており、これをP-18と名づけた。

なおこのタンパクの活性はpre-incubation法によっても測定でき、この事は、P-18が膜に結合できる事を示している。図45にpre-incubation法によるdose-responseを調べた結果を示した。P-18はngレベルで充分活性を発揮する溶血阻害タンパクである事がわかる。

2 抗P-18IgGを用いた検討

ストローマ及び精製P-18をSDS-PAGE後ウサギ抗P-18IgGを用いてimmunoblottingしたところ図46のようになり、ババイン処理ストローマから精製したP-18が未処理のストローマ上のP-18と同じ分子量を示す事が確認できた。

次に、P-18とpre-incubationしたEC5-7を抗P-18IgGで処理した時の影響を調べてみた。まずEC5-7にP-18を加え、37°C, 10分インキュベート後、洗浄した。次に抗P-18IgGを加え、37°C, 15分インキュベートし、よく洗浄後、C8とC9を加えて、溶血率を調べた。図47に示すように、P-18の阻害活性はこの抗体処理により抗体量に依存して、消失した。即ち、P-18はEC5-7に加えた後、洗っても膜に取り込まれて残っている事、また、その活性はC5-7を分解する事によるのではなく、膜上でC5-7がC8とC9でMACを形成する際のどこかの段階で、相互作用をする事により溶血阻害効果を示すことがわかった。これらの特徴は、DAFとよく

似ており、DAFはC末のGPI-アンカー(glycosyl phosphatidyl inositol-アンカー)により膜に取り込まれる事がわかっているので、P-18もGPI-アンカータンパクであろうと思われた。

3 P-18の血液細胞中の分布及びPIPLC(phosphatidyl inositol specific phospholipase C)処理による効果

まず、P-18の血液細胞中での分布を正常人末梢血より、赤血球と白血球画分を調製し、次にcontrolにはウサギ血清、DAFはウサギ抗赤血球膜DAF血清、P-18はウサギ抗赤血球膜P-18血清で処理し、各々、FITC(fluorescence isothiocyanate)標識抗ウサギIgGで染色し、FACSで分析した。図48に示すように、P-18は、赤血球、リンパ球、顆粒球、単球等全ての血球上に存在している事がわかった。また、DAF同様、これらの細胞上のP-18はPIPLC処理により、消失する事より、GPI-アンカータンパクである事が示唆された。なお、赤血球では、GPI-アンカー部のイノシトールが脂肪酸によりアシル化されており、そのためPIPLC処理に耐性である事が、すでにDAFとAchEで示されているので行わなかった(86、87)。

4 PNH患者の血液細胞上のP-18

PNH患者では、GPI-アンカータンパク、例えばDAF、LFA-3(Lymphocyte function-associated antigen-3)、AchE(アセチルコリンエステラーゼ)が欠損していると報告されている(88-90)。又、PNH患者の赤血球がReactive Lysisをおこしやすいという事実もあり、P-18の欠損が推定された。そこで、2人のPNH患者の血液細胞についてP-18の存在をFACSにより分析した。図49に示すように明らかに全細胞上のDAFとP-18が減少していた。そこでPNH患者赤血球のReactive Lysisの系での溶血を調べ、更にこの系にP-18を加え、Reactive Lysisが抑制されるかどうかを検討したところ、完全阻害には大量のP-18を必要とするらしく、ほぼ30%程度の阻害しか得られなかった。

[結語]

P-18とEC5-7細胞をブレインキューベートすると、C8とC9を加えた時に溶血が阻

害された。又、このP-18による溶血阻害は、抗P-18抗体でブレインキュベート後のEC5-7細胞を処理する事により消失した。これらの事により、P-18の効果は、P-18が赤血球に結合する事により起こっており、又、抗体処理で消失する事より、P-18がC5-7を壊すために起こるのではない事がわかった。DAFも同様の性質をもち、DAFではその、C末部の、GPI-アンカー部で膜に取り込まれる事がわかっている(37)。そこでP-18がGPI-アンカータンパクであるか、また血液細胞での分布をFACSを用いて調べたところ、P-18もGPI-アンカー型タンパクである事、又、ほとんどの血液細胞上に存在することがわかった。

今までのところ、ヒト赤血球膜には、DAF(40, 41)、AchE(86, 91)、LFA-3(89, 92)の3個のタンパクがGPIアンカータンパクであると報告されており、PNH患者ではこれら全てが欠損していると報告されている(30, 89)。それ故、PNH患者ではGPI-アンカーの生合成ができないのであろうと思われる。そこで、P-18の有無をPNH患者赤血球について検討したところ欠損している事がわかった。又、弱いながらもPNH患者赤血球にP-18を加えると、30%程度Reactive Lysisが阻害された。他のグループからも同様の結果が報告されており、又、Whitlowら(93)とRollinsとSim(94)により、P-18は溶血過程のC9の段階でより阻害活性を示す事、又、膜上でのC9 polymerの形成を阻害する事が最近明らかにされた。これらの事より、P-18の溶血阻害が、C9の重合を抑制する事によるため充分な時間をおくと最終的には溶血が起こってしまうであろうと思われる。正常細胞でReactive lysisが起こらないのは、P-18以外にさらに制御因子の存在が予想される。

B.2 尿P-18の精製及びC末構造解析

[緒言]

GPI(Glycosyl-phosphatidyl inositol)アンカー型タンパクとは、従来の膜貫通型のタンパクと異なり、そのC末部に糖脂質を持っており、これを介して膜に結合しているタンパクの事である。これまでに約40種類のGPIアンカータンパクが報告されている。このGPIアンカータンパクについてこれまでに解っているこ

とは、これらのタンパクが細胞表面に局在しかつGPIアンカーを持つためにN末シグナル配列の他にもう一つのシグナル配列、即ち、C末端にも17-31個の疎水性アミノ酸配列を持ち、解明されたタンパクでは、その3-8個前のアミノ酸にGPIアンカーがついているという事である(95, 96)。又、このC末シグナル配列にもこれといって共通のアミノ酸が無く、GPIアンカーの付くアミノ酸もいままで解っているものにAsp, Gly, Ala, Cys, Asn, Serの6種類がある。この他のアミノ酸には付かないであろう事は、Micanovicら(97)のPlacental alkaline phosphatase(PLAP)のアンカーの付くアミノ酸Aspを他のアミノ酸に置き換えるとGPIアンカータンパクとして膜上に発現してこないという実験によりほぼ確かであると思われる。更に、このアンカー構造は粗面小胞体でタンパクが合成される際にC末シグナル配列がco-translationalに切断されずでに小胞体に用意されているGPIに転移される事で付くとされている(95, 98)。又、このGPI部の構造はTrypanosoma bruceiのVariant surface glycoprotein(VSG)(99)、ラットThy-1(100)、不完全ながらヒト赤血球膜AchE(60)、およびLeishmania majorのPromastigote surface protease(PSP)(101)で報告されている(図50)。

しかしながら、C末アミノ酸の報告は少なく、又、ヒトではGPIの糖部分の構造の完全な報告がない事より、大量に得る事が難しい赤血球膜のものより、尿DAFが大量に精製でき、かつ、GPIアンカー部を脂質以外はもっていそうだったので同じように尿P-18を100倍濃縮尿より精製した。又、尿DAFではC末端部分にO-グリコシドが多く存在するため、GPIアンカー部のペプチド精製を試みたが成功しなかったが、P-18では、N-グリコシドがN末に1個存在するのみで、簡単な構造をしているので、P-18からC末ペプチドを調製し、GPIアンカーが結合しているC末アミノ酸や、GPIアンカー部の構造、またどのような機構で尿中に放出され存在しているのかを検討できると考え以下の実験を行った。。

[材料及び実験方法]

1 試薬

TPCK-トリプシンはシグマ社より購入した。モノクローナル抗P-18IgG-Sepharoseは赤血球膜P-18を用い常法に従い調製したモノクローナル抗P-18IgGをBrC

Nにより活性化したSepharose-4Bに結合させて、調製した。

2 緩衝液は以下の組成のものを用いた。

SGVB⁺⁺ : 4.9 mMバルビタールナトリウム、pH 7.4、9.73% sucrose、0.15 mM CaCl₂、1 mM MgCl₂、0.1% ゼラチン

EDTA-saline : 145 mM NaCl、10 mM EDTA、pH 7.4

PBS : 15 mMナトリウムリン酸緩衝液、pH 7.4、145 mM NaCl

3 溶血中間体EC5-7細胞の調製法

Dessauerら(84)の方法、即ちC5とC6を混合し、35°C、3分間インキュベート後、-70°Cで凍らせることによりC5b6の代わりに使えるC5,6^fを調製する事が出来る。このC5,6^fをモルモット赤血球(E)に加え、33°C、5分間インキュベートしさらにC7を加え、15分間インキュベート後、赤血球を洗いEAC5-7を得た。

4 Reactive Lysis阻害測定法

A. Co-incubation法

試料に溶血中間体EC5-7(1x10⁷ cell)とヒトC8、C9を200 ngずつ加え、SGVB⁺⁺緩衝液中、37°C、60分インキュベートし、氷冷EDTA-salineを加えて、反応を止め、遠心後、その上清の414 nmでの吸光度を測定する。得られた溶血率より、細胞当たりの溶血サイト数(z)を求めた。試料なしで求めたZ値をコントロールとし、下の式により(%) Reductionを求めた。

$$Z(\text{control}) - Z(\text{sample})$$

$$(\%) \text{ Reduction} = \frac{\quad}{Z(\text{control})} \times 100$$

$$Z(\text{control})$$

B. Pre-incubation法

試料に溶血中間体EC5-7(1x10⁷ cell)を加え、SGVB⁺⁺中37°C、10分インキュベート後、よく洗浄する。次に洗ったEC5-7にヒトC8、C9を200 ngずつ加え、SGVB⁺⁺中、37°C、60分インキュベートし、氷冷EDTA-salineを加えて、反応を止め、遠心後、その上清の414 nmでの吸光度を測定し、上と同様の方法で(%) Re

ductionを求めた。

5 アミノ酸配列決定法およびアミノ酸組成分析

N末からのアミノ酸配列は、Applied Biosystem 470Aシーケンサーを用いて解析した。各サイクルで出るPhenylthiohydantoin (PTH)アミノ酸はYMC-Pack ODS-AM、AM-302(4.6mmx15cm)カラムと8 mMギ酸ナトリウム、pH 3.1/アセトニトリル(605/400, w/w)、0.0006%SDSを用いて同定した(53)。又、アミノ酸組成はPICO TAGワークステーションを用いて、サンプルを塩酸分解後、直接PITCでアミノ酸を誘導化後、出来たPTC-アミノ酸をTSK gel ODS-80TMカラム(4.6x150 mm)で30 mMナトリウムリン酸緩衝液、pH 7.0とアセトニトリルを用いたグラジエントで分離定量した。

6 他の方法

SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)はLaemmliの系を用い還元下で行った(18)。

[結果]

ヒト尿を分子量10,000以下をカットするフィルターで約100倍に限外ろ過濃縮し、これを尿DAF同様、60%飽和硫酸沈澱し、PBSに透析後、抗赤血球膜P-18モノクローナル抗体カラムを用いて精製した。まず、PBSで平衡化した抗P-18IgG-Sepharoseカラム(2.5x4cm)にアプライし、10 mMナトリウムリン酸緩衝液、0.5 M NaCl、pH 7.4で洗浄後、3 M KSCNを用いて溶出した。これをPBSに透析後濃縮した。極少量ながら混在タンパクが存在したのでこれをさらにPBSで平衡化したBio Gel A-0.5m(1.5x100cm)を用いてゲルろ過し、P-18を精製した(図51)。co-incubation法での活性はタンパクのピークと一致したところに高く出たが、pre-incubation法ではこの部分ではなくタンパクピークの直前の少し分子量の大きいところに活性が現れた。この部分にはほとんどタンパクが存在せず、綺麗になった主なタンパクピークのP-18を尿P-18をして以下の実験に用いた。

次にC末構造解析のために、ゲルろ過により得た尿P-18(1.5 mg)を6 M Guan

ジン塩酸、0.4 M トリス塩酸、2 mM EDTA、34 mM DTT(ジチオスレイトール)、pH 8.0で還元後、69 mM ヨード酢酸を加えて、カルボキシルメチル(CM)化後、10 mM ナトリウムリン酸緩衝液、pH 7.4に透析した。得られたCM化P-18(1.5mg/ml) 1mlにトリブシンを2%(w/w)になるように加え、37°C、22時間処理した。消化産物をTSK gel ODS-120Tカラム(4.6x250mm)を用いて、0.1% TFA(トリフルオロ酢酸)存在下、アセトニトリルのグラジエントで分画したところ図52のようになった。*印のピークのアミノ酸組成をPICO TAGで分析したところGPIアンカー部に存在するエタノールアミンを含むことがわかり(図53)、このアミノ酸配列を解析し既に当教室で決定しているP-18のcDNA配列(102)と比べたところ、N末から77個目のアミノ酸アスパラギン(Asn)まで同定できた(図54)。又、このペプチドの配列は、アミノ酸組成とも一致しており、このアスパラギンにエタノールアミンを介してGPIアンカーが結合している事が確認できた。又、得られたピークの全てのアミノ酸を解析し、どの部分のペプチドかも同定したがアミノ酸の配列より予想されたペプチドは全て回収されており、又*印のピークも他のピークも等モルずつ回収されていた。この結果より、ヒト赤血球AchEでの報告(60)と同様に1分子のP-18に2分子のエタノールアミンを含み、脂質を欠いたGPIアンカー部分を全ての尿P-18分子が持っていると推定される。現在、このC末ペプチド部からGPIアンカー部を精製して、糖部分の構造解析を行っている。

[結語]

尿P-18は尿からDAF同様容易に大量精製でき100倍濃縮尿100mlより約2.5 mg得られた。又、ゲルろ過によりマイナーな分子種である膜型活性P-18の存在が示唆されたがこれは尿DAFとして精製できたDAF-U1とDAF-U2の關係に似ておりDAF-U2に相当するものであろうと思われる。この分子の同定を試みているが、量が非常に少ないのと理由は解らないが、尿P-18がImmunoblottingで検出できないという特殊な性質を持つ事よりまだ同定には到っていない。しかしながら、GPIアンカータンパクからは尿中に異なる2種の可溶性分子がでるとすると、この機構および機能は大変興味深いものがある。

C末部に関しては、C末端のアンカーの付くアミノ酸がAsnである事、又、C末

の疎水性領域の10個前のアミノ酸で切れてアンカーが付く事が解った。このC末アミノ酸がAsnである事は今までのデータと矛盾せず、Micanovicら(97)の報告の法則を満たしている。更に現在糖部分の解析を進めており、現在までのデータでは、マンノース3個、ガラクトース1個、グルコサミン1個、エタノールアミン2個、リン酸2個がいままで報告された基本骨格通りに並んでイノシトールにつながっているものが予想される構造であり、更に確定を急いでいる。又、尿DAFと同様この尿P-18もその生成機構を探るには脂質部の解析が必要でありこの目的のためにGC-MSやFAB-MSによる分析を計画中である。

【総合考察】

第二経路は血清中で常に活性化の準備段階にあり、特異的抗体の関与しない機構で始まる。この非特異的活性化で自己細胞が攻撃を受けて破壊される事を防いでいるのがDAFであった。その機構は常に血清中で少量出来ている初期C3転換酵素により切られてできたC3bが標的細胞に結合し、これにBとDが作用して膜上にC3転換酵素が形成されるが、自己細胞上に結合したC3bにより形成されたC3転換酵素からDAFがBbを追い出したり、Bの結合を妨害したりする事によりC3転換酵素形成を阻害するという物であった。この際、C3が異種のDAFには親和性を持たず、これにより異種の補体による攻撃にはこのC3転換酵素崩壊能力を持たないため、C3とDAFにより第二経路の活性化の際の自己識別はなされていると結論できた。

このDAFは、赤血球上のみでなく、顆粒球、Tリンパ球、Bリンパ球、単球、血小板にも存在し(36, 50)、さらにMedof等(42)により、血液細胞以外に血清、涙、唾液、脳脊髄液、関節液にも可溶性の状態が存在する事が報告されている。又、臍静脈表皮細胞(103)や角膜、結膜、口、胃腸の粘膜、外分泌腺、腎小管、膀胱、尿管、子宮の粘膜、胸膜、心臓の周囲や関節のしょう膜など、色々な組織の細胞表面に存在している事が報告(42)されており、人体のあらゆるところで補体系の活性化による攻撃から、自己を守っている物と考えられる。

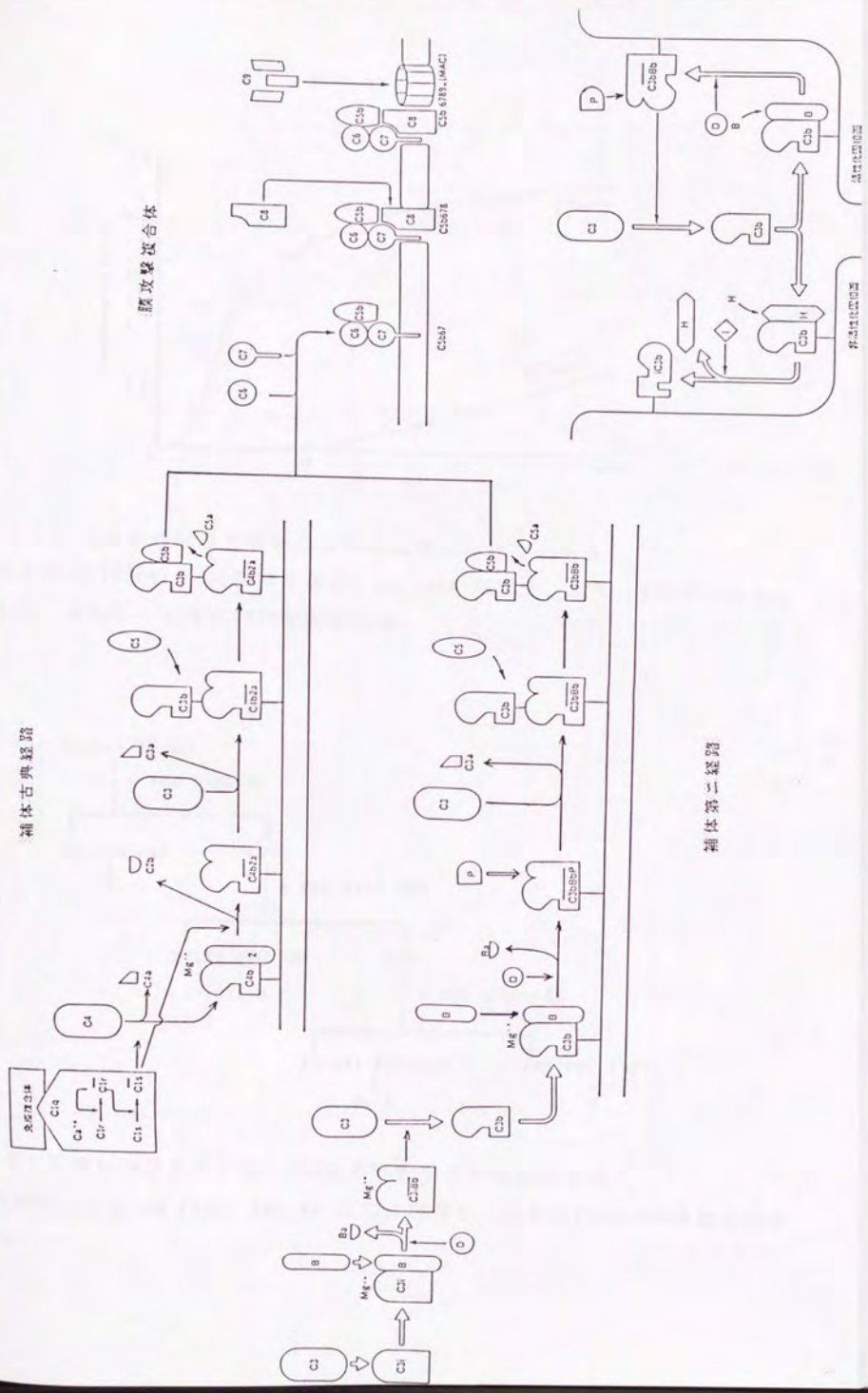
DAFはこのように補体系の暴走を止める機能を持ったタンパクであったが、それとは別にやはり、抗体特異性の無い反応として、細菌などの異物を補体が攻撃する際にReactive lysisというものがある。これは細菌の表面で活性化を起こしている補体系がC5b6を放出しこれがC7と結合して付近に存在する物に結合し、その結合のあとC8およびC9によりMACを形成して破壊するという物である。この異物攻撃の際の非特異的C5b67による攻撃を阻止する因子としてP-18を今回、発見、精製した。このP-18はC8の段階と、C9のポリメライズを特に阻害し、それによりMAC形成即ち自己細胞破壊を防いでいた。そこでその機能より、MACIF (Membrane attack complex inhibition factor)と名前を変更し、現在はこの名前を使用している。又、このMACIFは当教室のウサギC8、C9に対する作用を調べた実験でウサギ因子には作用しない事や、山之内製薬のデータによるとヒトか

サルの C8 と C9 にしか作用せず、同種識別能力は DAF 以上に強固である。

その後、五つの教室より同じタンパクが異なった性質を指標に精製報告された。一つはシアル酸処理したヒト赤血球をヒト血清で処理した時に、本来は第二経路では溶血しないヒト赤血球を溶血させるように作用するモノクローナル抗体を得、この抗体により精製した HRF20 (Homologous restriction factor 20) である (104)。MIRL (Membrane inhibitor of reactive lysis) と命名された物は名前通り、コブラベノムファクターで血清の補体第二経路を活性化させ、これにモルモットの赤血球をいれて Reactive lysis を起こす系を使い、その溶血を防ぐ因子として精製されてきた (105)。H19 はヒト赤血球と T リンパ球間のロゼット形成に関与する因子として精製されており、これは T 細胞の活性化にも関すると報告されている (106)。後の二つは T リンパ球抗原として MEM-43 と YTH53.1 というモノクローナル抗体により機能不明のまま精製された CD59 である (107, 108)。Davies 等 (108) は血球細胞、T 細胞株、B 細胞株、骨髄細胞株、上皮細胞株の全てに存在している事、及び、尿から CD59 タンパクを精製し、N 末アミノ酸配列を決め、cDNA クローニングもしている。この結果と当教室と山之内 (株) で決めた MACIF のデータ (102) が一致し、又、岡田 (109) 等が出したシーケンスも一致したためこれら全てのタンパクは同じ物である事が確認できた。補体系のみならずリンパ球の機能を調節する分子としての可能性もあり、どの様な機能をリンパ球に対して持つのか、またロゼット形成の際の結合相手の解明など興味深い。さらに cDNA の配列よりホモロジーを示す唯一のタンパクとしてマウスの GPI アンカータンパクである Ly-6 が見つかった。Ly-6 はリンパ球上の抗原であり PMA と抗 Ly-6 モノクローナル抗体で T 細胞が、又 IL-4 や IFN- γ と抗 Ly-6 モノクローナル抗体で B 細胞が活性化する事よりリンパ球の活性化に関与するタンパクではあるが、はっきりした機能はいまだ解っていない (110-113)。Ly-6 と CD59、MACIF のホモロジーは 26% 程度であり、10 個ある Cys が保存されているのと N 末部、C 末部に 2-3 個同じアミノ酸があるだけである。従って、MACIF がヒトの Ly-6 であるとは思えないが Ly-6 の様に遺伝子ファミリーを形成しているタンパクである可能性がある。従って、MACIF の構造解析は大変意味のある事であると思われる。現在、立体構造の解析を当教室で行っている。

又、DAF も MACIF も GPI アンカー型膜タンパクであるが、血清や尿、他の体液中

に可溶性のタンパクとして存在している。そこで尿MACIFのC末ペプチドを調製し、GPIアンカーの結合アミノ酸を同定した。この結果より尿MACIFはペプチド部分が切れて生じているのではない事が解ったのでそれ以降のGPIアンカー部の糖鎖部分の解析を現在進行中である。しかしながら、この部分も欠損していないようなのでこれらGPIアンカータンパクの生成機構を解明する事はその機能の解明にとって大事であると思われるのでイノシトール以降の脂質部の解析をする予定である。



補體古典通路

補體第一通路

膜攻擊複合體

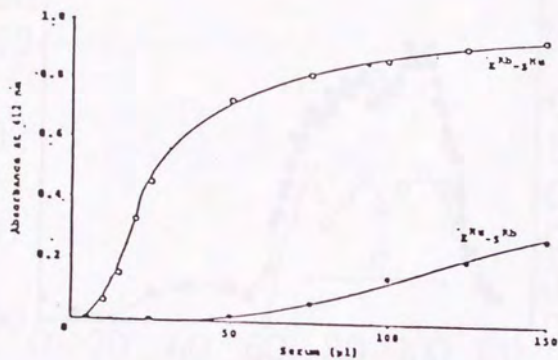


図2 ヒトとウサギの組み合わせによる補体第二経路での溶血
赤血球 (5×10^7 cells) に血清を加え、Mg-EGTA-DGVB中、 37°C 、1時間インキュベート後、遠心し、上清のA413を測定した。

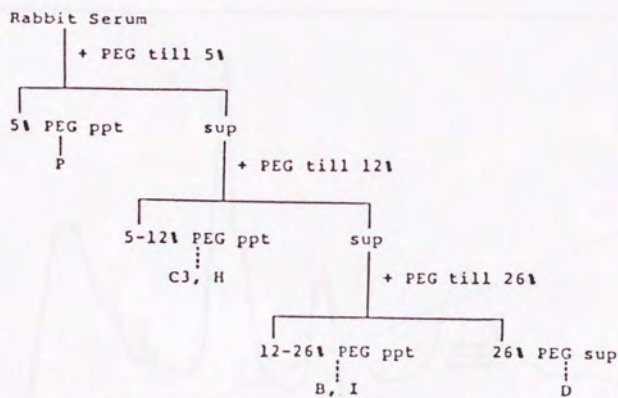


図3 ポリエチレングリコール4,000を用いたウサギ血清の分画
ウサギ血清を50 mM EACA、150 mM EDTAに調製し、これにPEG4,000を加えて分画した。

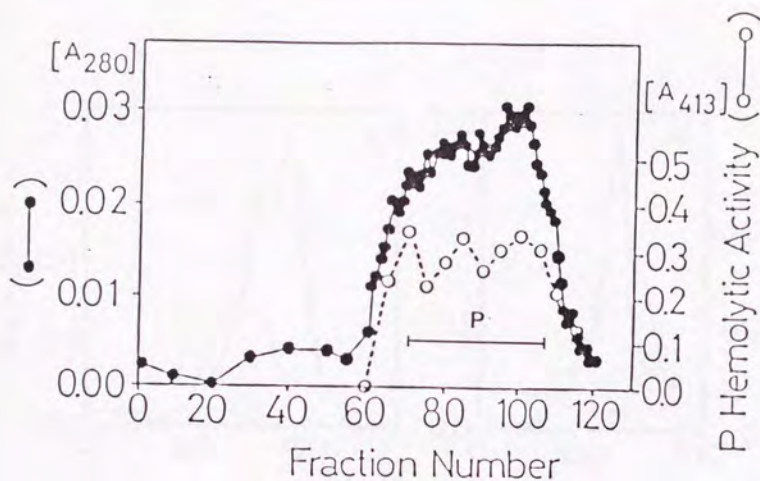


図4 5% PEG沈澱分画からのPの精製

5% PEG沈澱を、20 mM Tris-HCl, 0.3 M NaCl, pH 8.6(5°C)に溶解し、20 mM Tris-HCl, 35 mM NaCl, pH8.6に十分透析し、同緩衝液で平衡化したQAE-Sephadex A-50カラム(4.6 x 40cm)に添加した。この素通り画分をブールし、濃縮した。混在物が認められた場合は、Bio Gel A-0.5mによるゲルろ過により、更に精製した。

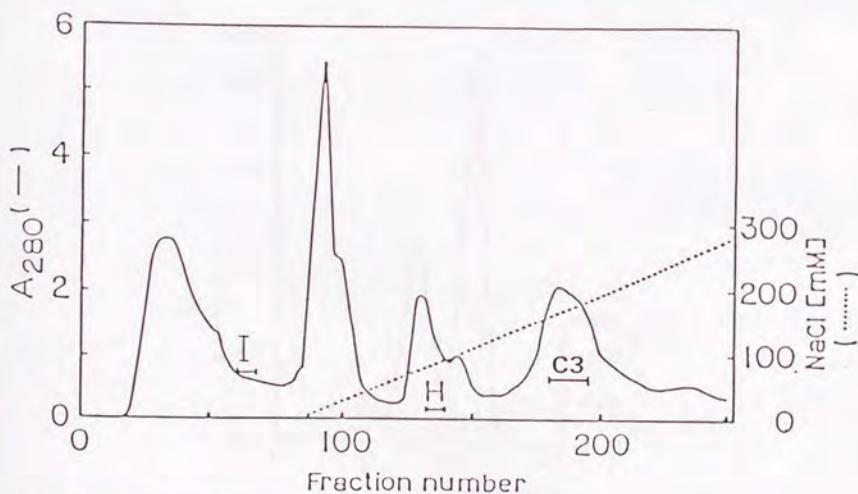


図5 5-12% PEG沈澱分画からのIIおよびC3の精製

5-12% PEG沈澱を、3.2 mMリン酸緩衝液、50 mM EACA, 10 mM EDTA, pH7.4に溶解透析後、同緩衝液で平衡化したDEAE-Sephacel (4.6 x 37cm)に添加し、0-300 mM NaCl塩濃度勾配により溜出した。SDS-PAGEと活性で確認したIIとC3のフラクションを各々ブールした。

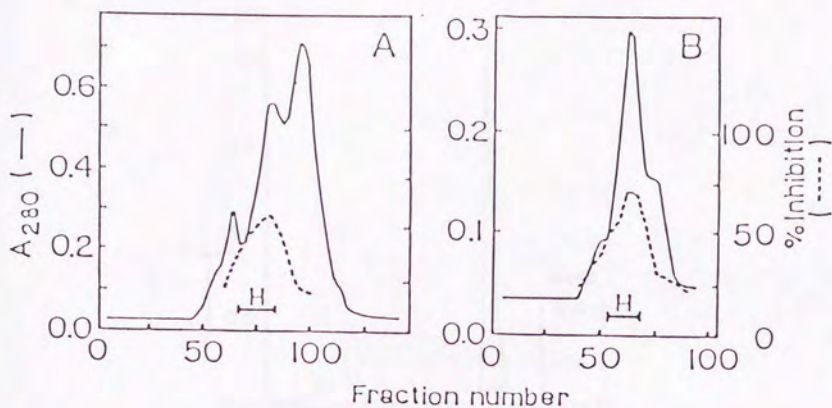


図6 IIのSephadex G-200カラムクロマトグラフィー

図5で得られたII画分を50%飽和硫酸沈澱し、VBSで平衡化したSephadex G-200カラム(2.5 x 100cm)によるゲルろ過を2回行い精製した。

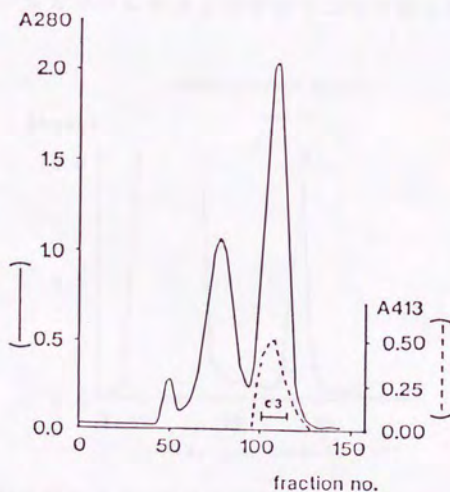


図7 C3のSepharose-6Bカラムクロマトグラフィー

図5で得られたC3画分をPBS, 5 mM EDTA, 50 mM EACAを用いたSepharose-6Bカラム(2.5 x 100cm)によるゲルろ過し、SDS-PAGE及び活性測定によりC3のフラクションをブールした。

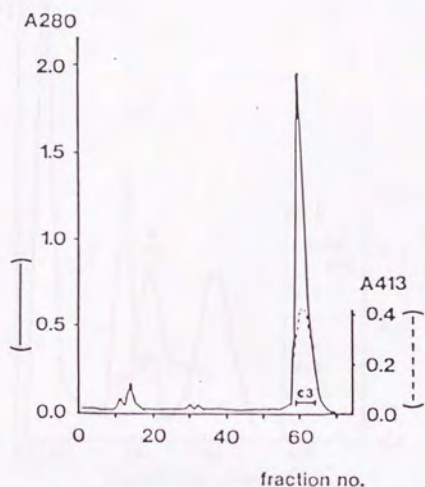


図8 C3のハイドロキシアパタイトカラムクロマトグラフィー

図7で得られたc3画分を、25 mM リン酸カリウム、100 mM KCl、50 mM EACA、pH 7.4で平衡化したハイドロキシアパタイトカラムにかけ、2 M KClを含む緩衝液で洗浄後、125 mM リン酸カリウムを含む緩衝液でC3を溶出し精製した。

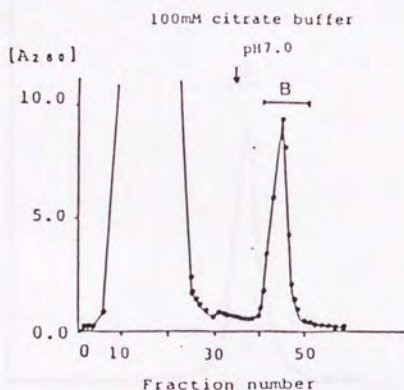


図9 12-26% PEG沈殿分画からのB因子の精製

12-26% PEG沈殿を、10 mMクエン酸緩衝液、pH 6.0に溶解透析後、CM-Sephadex C-50カラム(4.6 x 35cm)に添加した。洗浄後、100 mMクエン酸緩衝液、pH 6.0により溶出した。B活性を測定し活性画分をブールした。

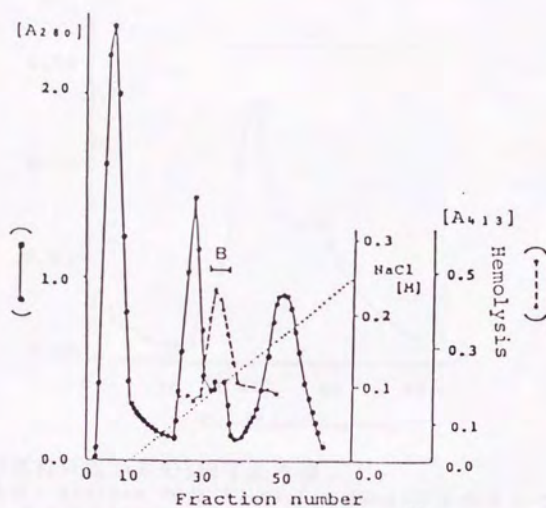


図10 BのDEAE-Sephadexカラムクロマトグラフィー

図9で得られたB画分を、30 mMリン酸緩衝液、pH 7.0を用いたDEAE-Sephadex A-50カラム(2.6 x 30cm)にかけ、0-250 mM NaCl濃度勾配により溶出した。図9同様にB活性画分をブールした。

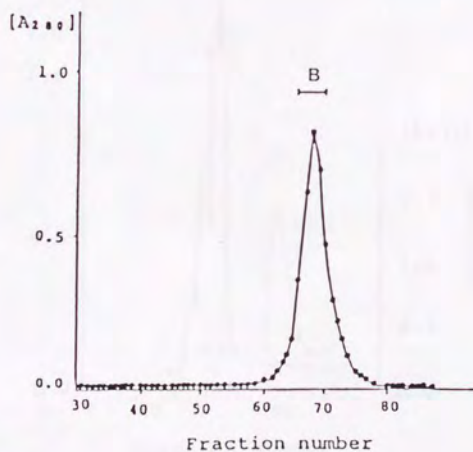


図11 BのBio Gel A-0.5mカラムクロマトグラフィー

図10で得られたB画分を、PBSで平衡化したBio Gel A-0.5mカラム(2.5 x 100cm)によりゲルろ過し精製した。

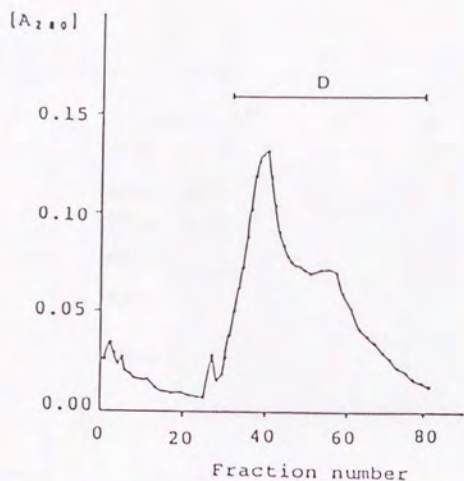


図12 26% PEG沈澱分画からのD因子の精製

26% PEG上清を、Bio-Rex 70カラム(4.5 x 32cm)にそのままのせ、VBS, 0.2% Triton X100, pH 7.0で洗浄後、VBSで更に洗い、350 mM NaClをふくむVBSで溶出した。SDS-PAGE及び活性測定によりD画分をプールした。

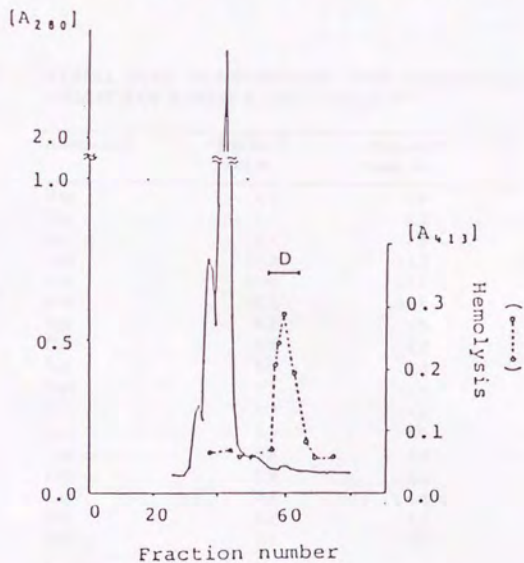


図13 DのSephadex G-75カラムクロマトグラフィー

図12で得られたD画分を、VBS, pH 7.4で平衡化したSephadex G-75カラム(2.5 x 100cm)でゲルろ過し精製した。



图 14 Slab-gel electrophoresis of human P and rabbit P. SDS-PAGE was performed using 10% acrylamide gel and the buffer system described by Laemmli (1970). Samples were reduced with 5% 2-ME. SDS-6H and mouse IgG were used as standard protein markers.

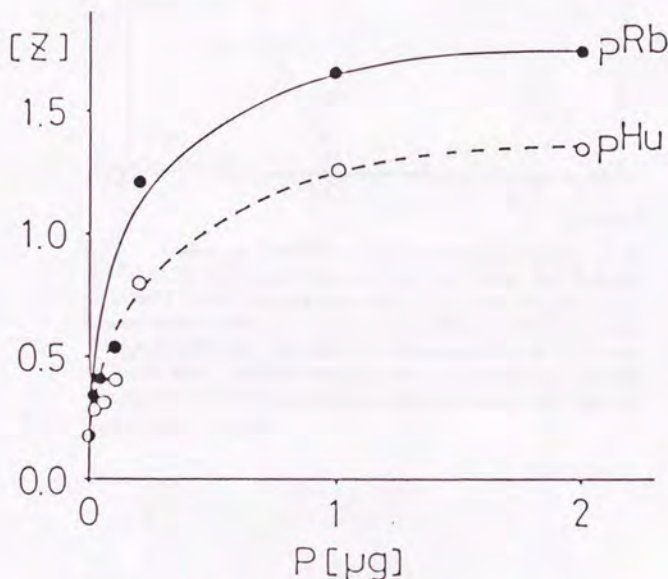
表 1 AMINO ACID COMPOSITIONS AND MOLECULAR WEIGHTS OF RABBIT P AND HUMAN P *

Amino acid	Rabbit P (mol %)	Human P (mol %)
Asp	5.7	5.5
Thr	5.5	6.2
Ser	7.7	7.8
Glu	12.9	13.3
Pro	12.0	11.1
Gly	12.1	11.8
Ala	6.2	5.5
Cys	5.2	4.7
Val	6.0	6.3
Met	1.2	1.6
Ile	1.9	1.8
Leu	5.4	6.0
Tyr	0.8	1.0
Phe	1.9	2.1
Lys	5.4	4.6
His	2.7	3.2
Arg	7.5	7.4
Molecular weight	58000	59000

* Values are not corrected for losses during hydrolysis (24 h).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Human	Asp	Pro	Val	Leu	Cys	Phe	Tyr	Gln	Tyr	Glu	Glu	Ser	Ser	Gly
Rabbit	-----Val-----							Glu		Asp		Pro		
	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
Human	Lys	Cys	Lys	Gly	Leu	Leu	Gly	Gly	Gly	Val	Ser	Val	Gln	Asp
Rabbit	-----Glu-Pro-----													
	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38				
Human	Cys	Cys	Leu	Asn	Gly	Ala	Ile	Ala						
Rabbit	-----Ala-----						Tyr			Phe	Gln			

15 Amino terminal amino acid sequence of rabbit P. P (33 μ g) was applied to a 470A gas phase protein sequencer as described in the materials and methods section. The sequence is compared with the sequence of human P reported by Reid and Gagnon (1981).



16 Stabilization of C3 convertase C3b,Bb with P. 200 μ l of 2.5% (v/v) EAC4,3b and 4 μ g human D and 10 μ g human B in 1 ml Mg-EGTA-DGVB were incubated at 37°C for 2 min and then washed immediately with ice-cold VBS. The precipitate was then resuspended with 800 μ l of 10 mM EDTA-DGVB. 100 μ l aliquots from the mixture were added to 50 μ l rabbit P (●) or human P (○) in 10 mM EDTA-DGVB and incubated at 37°C. After 10 min of incubation, to each tube was added 50 μ l of 50 mM EDTA-S^{8P} and incubated at 37°C for 20 min. Then ice-cold EDTA-saline (3 ml) was added and the mixture was centrifuged. The absorbance at 413 nm of the supernatant was measured. The average number of residual C3b,Bb sites per cell (Z) was determined from the percent hemolysis.

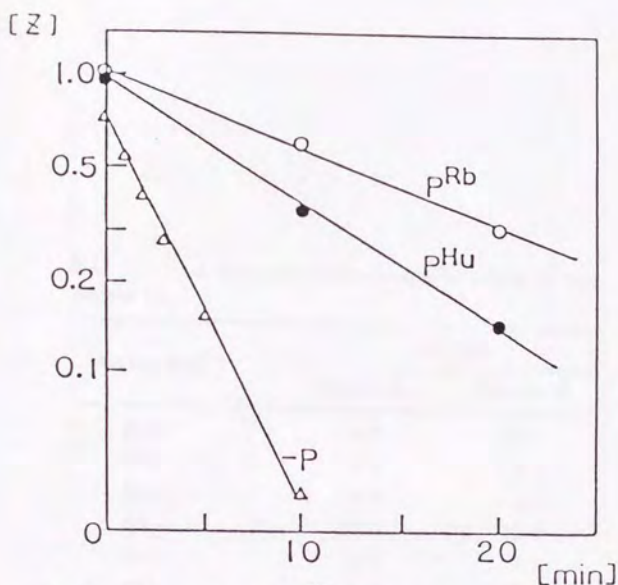


図17 Decay of C3b,Bb in the presence or absence of P. EAC4,3b,Bb was prepared as in Fig. 7 and 800 μ l EAC4,3b,Bb in 10 mM EDTA-DGVB was added 8 μ g rabbit P (O) or 8 μ g human P (●) in 400 μ l 10 mM EDTA-DGVB or 400 μ l 10 mM EDTA-DGVB (Δ). The mixtures were incubated at 37°C and at each time, 150 μ l aliquots were removed and residual enzymatic activity was determined as described in the materials and methods section.

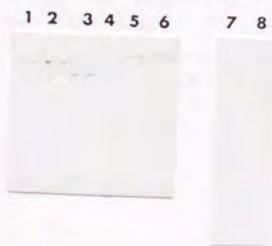


図18 精製因子のSDS-PAGEによる分析
ヒト及びウサギの精製因子 (C3, B, H, D) 各 1 μ g を、7.5%ゲルを用いてLaemmliの系で還元条件下で分析した。D因子は15%ゲルを用いて同様に分析した。lane1: ヒトC3, lane2: ウサギC3, lane3: ヒトB, lane4: ウサギB, lane5: ヒトH, lane6: ウサギH, lane7: ヒトD, lane8: ウサギD

表 II Amino acid compositions of rabbit H and human H.

Amino acid	mol % ^a	
	Rabbit H	Human H
Asp	8.6	9.1
Thr	7.3	6.1
Ser	8.0	6.7
Glu	10.6	11.8
Pro	8.0	7.8
Gly	8.3	7.9
Ala	4.9	4.4
Val	6.9	5.3
Cys	4.0	5.2
Met	1.2	1.7
Ile	4.5	5.3
Leu	6.1	5.4
Tyr	4.5	5.8
Phe	3.2	2.6
Trp	1.2	1.4
Lys	6.5	6.7
His	2.1	2.2
Arg	4.1	4.5

^a Values are not corrected for losses during hydrolysis (24 h).

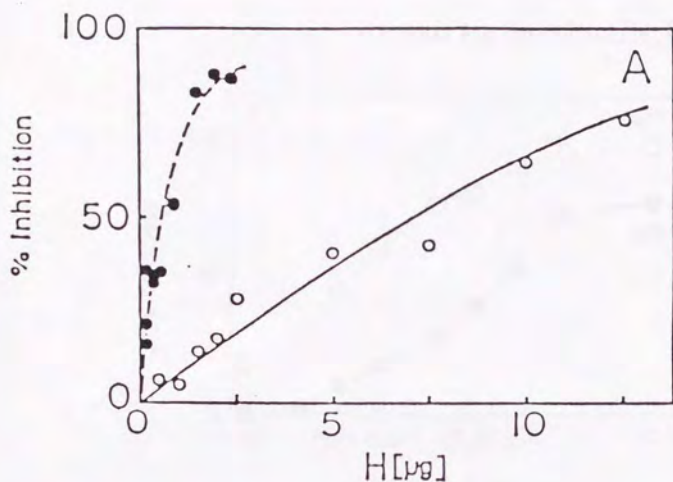


图 19 Effect of human H and rabbit H on hemolysis of EAC4b,3b,P. (A) Twenty-five μ l of 2.5% (v/v) EAC4b,3b,P, 10 ng of human B, 2.3 ng of D and human H (●) or rabbit H (○) solution in 75 μ l of DGVB-Mg-EGTA were incubated at 37°C for 2 min. To each tube was added 50 μ l of guinea pig serum diluted (1 : 2) with 100 mM EDTA-DGVB. After incubation at 37°C for 20 min, ice-cold EDTA-saline (3 ml) was added, and the mixture was centrifuged. The absorbance at 413 nm of the supernatant was measured. The sample without addition of H was set as 0% inhibition, and the sample with DGVB-EDTA instead of DGVB-Mg-EGTA was set as 100% inhibition.

B CONCENTRATION DEPENDENT C3 CONVERTASE

FORMATION ON EAC4_b,3_b,P^{Hu}

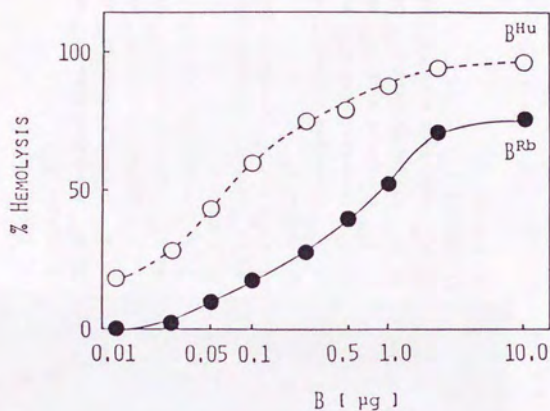


図20 ヒト及びウサギB因子のC3転換酵素形成能の比較

EAC4_b,3_b,P (1×10⁷cells) にヒトあるいはウサギBを加え37°C, 10分インキュベート後、EDTA希釈モルモット血清を加えて溶血させ、C3転換酵素形成能を調べた。

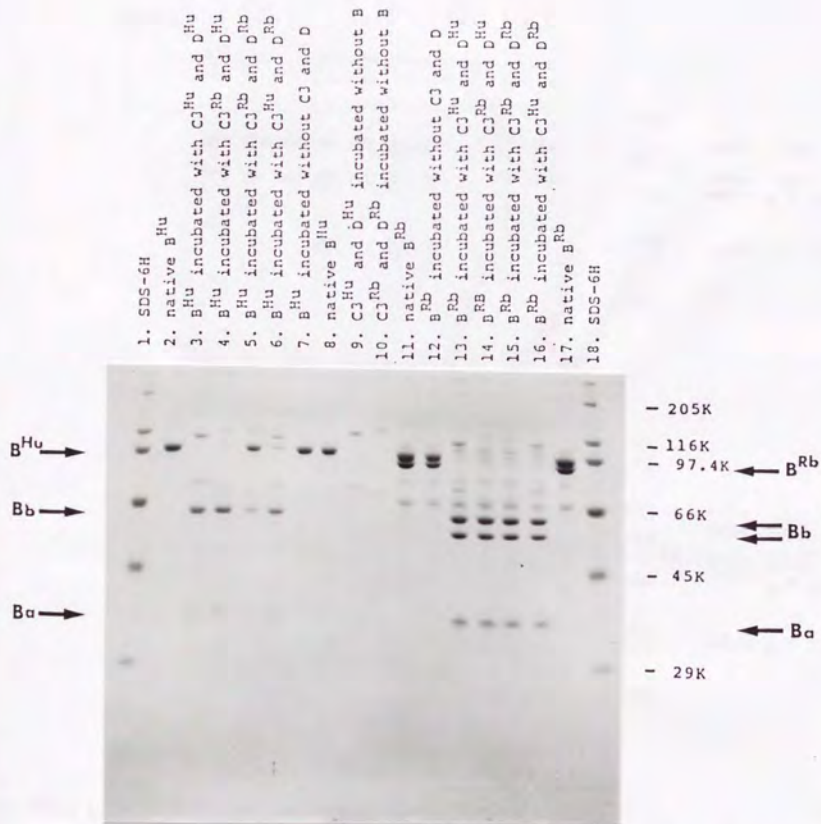
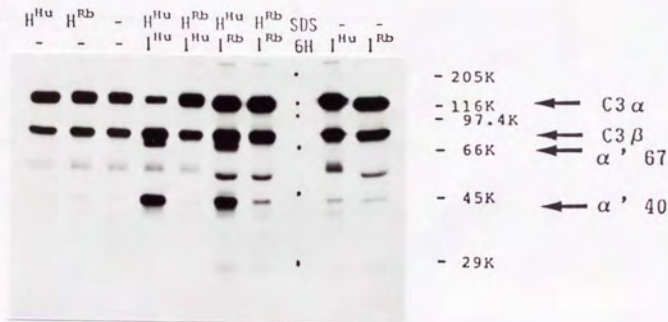


図21 ヒト及びウサギD因子によるヒトあるいはウサギB因子の切断
 精製ヒトあるいはウサギD因子によるヒト及びウサギB因子の切断を調べた。各B因子に凍結融解により失活させた改変のヒトあるいはウサギC₃iとDを加えて、Mg⁺⁺の存在下、37℃でインキュベートし初期C₃転換酵素を形成させた後、さらにnative C₃を添加しC₃転換酵素を形成させ、この転換酵素によるB因子の切断を、SDS-PAGEでB^bとB^aを検出することにより調べた。

C3^{Hu}



C3^{Rb}



図22 C3のヒトあるいはウサギI因子とII因子による切断
¹²⁵IでラベルしたヒトあるいはウサギC3を部分精製ヒトあるいはウサギI及びIIと共にインキュベート後、SDS-PAGEによりC3を分離し、オートラジオグラフィにより生成C3断片を調べた。

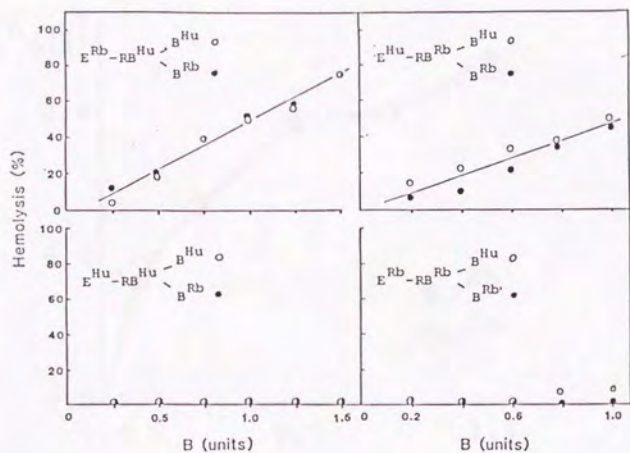


図23 B因子の組み替え実験

赤血球 (2×10^7 cells) に RB (B 欠損血清)、B 因子を加え、Mg-EGTA-DGVB 中、37℃、1 時間インキュベート後、遠心し、上清の A413 を測定した。

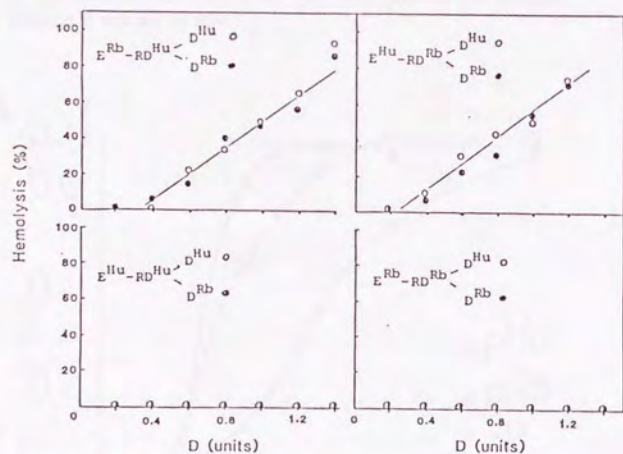


図24 D因子の組み替え実験

赤血球 (2×10^7 cells) に RD (D 欠損血清)、D 因子を加え、Mg-EGTA-DGVB 中、37℃、1 時間インキュベート後、遠心し、上清の A413 を測定した。

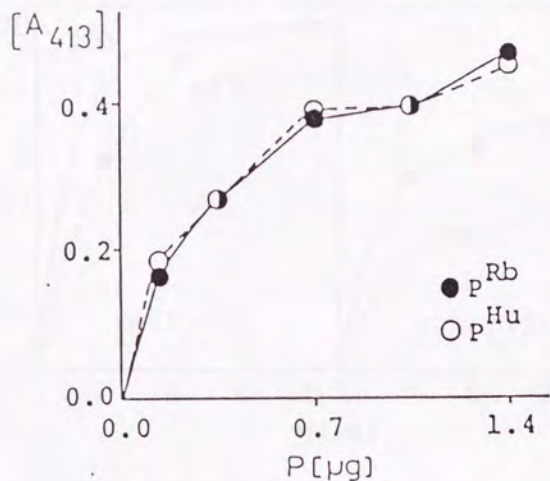


Fig. 25 P dose-dependent hemolysis of E^{Rb} with RP^{Hu} . 20 μ l of 5% (v/v) E^{Rb} , 30 μ l RP^{Hu} and 100 μ l of rabbit P (●) or human P (○) in Mg-EGTA-DGVB were incubated at 37°C. After 10 min of incubation, ice-cold EDTA-saline (3 ml) was added, and the mixture centrifuged. The absorbance at 413 nm of supernatant was measured. The hemolysis of the sample without P was set as 0.0.

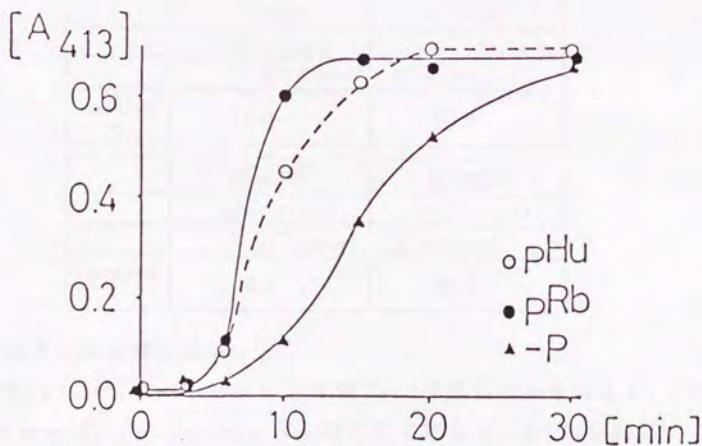


Fig. 26 Time course of the hemolysis with or without P. 160 μ l of 5% (v/v) E^{Rb} , 240 μ l RP^{Hu} and 5.6 μ g rabbit P (●) or 5.6 μ g human P (○) in 800 μ l Mg-EGTA-DGVB or 800 μ l Mg-EGTA-DGVB (▲) were mixed and incubated at 37°C. At each time interval, 150 μ l of aliquots were taken and the hemolyses were measured as in Fig. 5.

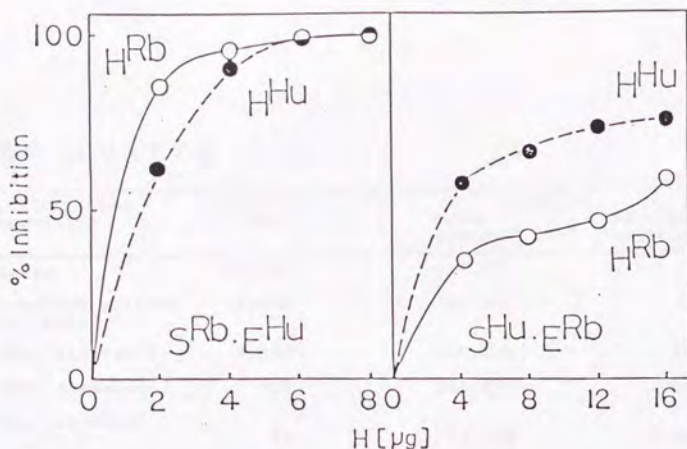


図27 H因子の組み換え実験

赤血球 (2×10^7 cells) に血清及びH因子を加え、Mg-EGTA-DGVB中、37°C、1じかんインキュベート後、遠心し、上清のA413を測定した。この際、Hを加えない場合を0%阻害、EDTA-DGVBを用いた場合を100%阻害として溶血阻害を%阻害で表した。H^{Rb}：ウサギH因子、H^{Hu}：ヒトH因子、S^{Rb}：ウサギ血清、S^{Hu}：ヒト血清、E^{Rb}：ウサギ赤血球、E^{Hu}：ヒト赤血球

	E-C3b ^{Rb}	E-C3b ^{Hu}
	C3 ^{Rb} (7.8 μg)	C3 ^{Hu} (7.8 μg)
	D ^{Hu} (34 U)	B ^{Hu} (147 U)
HEMOLYSIS %	10.4	76.8
	E-C3b ^{Hu}	E-C3b ^{Rb}
	C3 ^{Hu} (44.2 μg)	C3 ^{Rb} (44.2 μg)
	D ^{Hu} (68 U)	B ^{Hu} (184 U)
HEMOLYSIS %	9.3	27.2

表III C3因子の組み替え実験

C3(273 μg)を3%(w/w)トリプシンで23°C、5分処理する事により、C3b様分子を作り、赤血球(E, 10^9 cells)に人工的に取り込ませ、E-C3bを調製する。できたE-C3b(2×10^7 cells)に上の量でC3、B、Dを加えてMg-EGTA-DGVB中、37°C、2分インキュベートし、C3転換酵素を形成させ、更にEDTA希釈モルモット血清を加えて37°C、15分インキュベートして溶血させ上清のA413を測定した。

表IV 尿DAF精製

purification procedure	protein (mg)	Activity	
		Total (units)	specific (units/mg)
urine	15,000	444,563	30
ammonium sulfate 60% ppt.	4,676	305,840	65
heat treatment	1,399	346,170	247
DEAE-Sephacel	583	316,067	542
Bio Gel A0.5m			
pool I	19	72,585	3,806
pool II	41	120,310	2,896
pool I HPLC (phenyl 5PW)	2.3	21,191	9,325
pool II Affinity column	0.19	30,480	157,561

Assays of decay-accelerating activity were done in the range that the dose-response was linear, and one unit of activity was defined as the amount of activity to cause a 30% reduction of membrane-phase C5 convertase.

ヒト尿を限外濾過により200倍程度に濃縮後、60%飽和硫酸沈澱をとり、水に透析後、DAFが高温に対して安定なのを利用して、80°C、20分間加熱し、熱変性タンパクを除去した。上清をDEAE-Sephacel、BioGelA-0.5mにかけた。このゲル濾過で、2つのDAF活性ピークが得られ、それぞれプールI、プールIIとした。プールIをTSK gel phenyl 5PWカラムを用いたHPLCで分画したところ、最初のピークにDAFが精製された。プールIIのDAFは、抗-DAFモノクローナル抗体カラムを用いて精製した。

尿中に存在するDAFの精製

図28 DEAE-Sephacel カラム

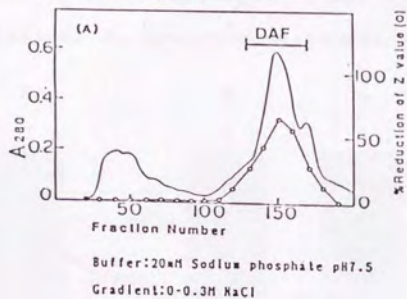


図29 BiogelA-0.5m によるゲル濾過

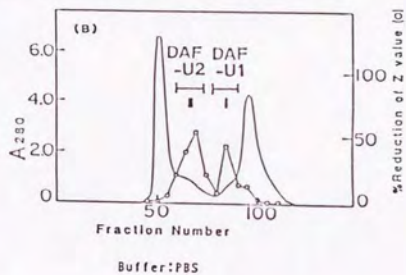


図30 抗-DAFモノクローナル抗体カラム

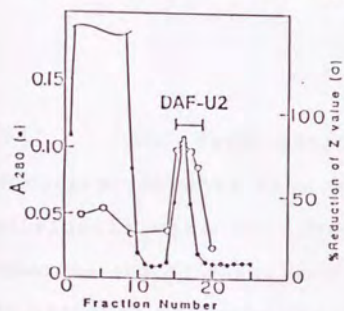
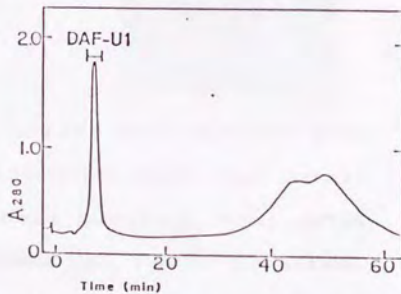
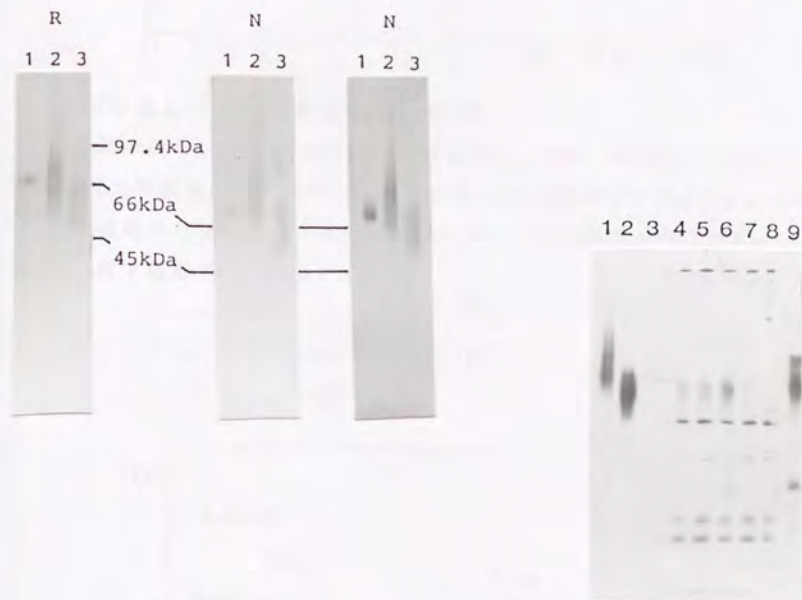


図31 TSK gel phenyl 5PW



チューブに glycine と 0.1M Tris, pH6.0 をあらかじめ入れた中に溜出

32 SDS-PAGE analysis of purified DAFs. The samples were electrophoresed on 10 % gel and the left two panels were detected by silver staining and the other was by immunoblotting. Lane 1, membrane form DAF; lane 2, DAF-U2; lane 3, DAF-U1. R, reducing condition; N, nonreducing condition.



33 DAF from fresh urine. Urine DAF samples were immunoprecipitated from 2.5 ml fresh urine from four normal individuals with anti-DAF monoclonal antibody conjugated Sepharose and compared with E^{hu} membrane DAF, DAF-U1 and DAF-U2. The proteins were electrophoresed on 10% gel under nonreducing conditions and detected by immunoblotting. Lane 1, DAF-U2; lane 2, DAF-U1; lane 3, membrane form DAF; lane 4-7, urine DAF from four individuals; lane 8, no urine; lane 9, urine DAF which was purified directly from fresh urine by a immunoaffinity chromatography.

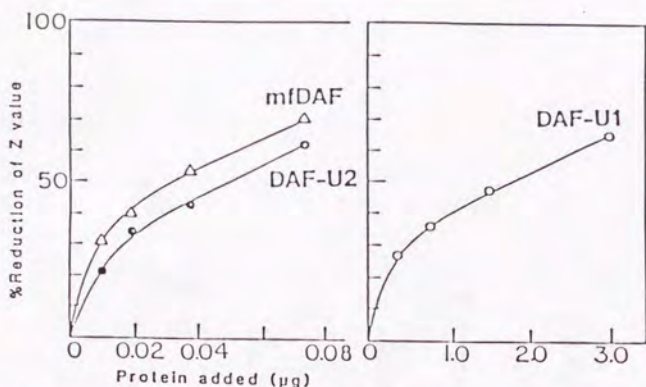


図34 尿DAFの膜上C3/C5転換酵素崩壊促進活性

溶血中間体EAC1-3b, P(10^7 cells)に各DAFを加え、 37°C 、15分間インキュベート後、残存C3/C5転換酵素活性をDETA入りモルモット血清で溶血させ測定した。得られた溶血率より細胞当たりの溶血サイト(Z)数を求め、DAF無しでのZ値をコントロールとし、下の式で阻害率を求めた。

$$\% \text{ Reduction} = \frac{Z(\text{control}) - Z(\text{sample})}{Z(\text{control})} \times 100$$

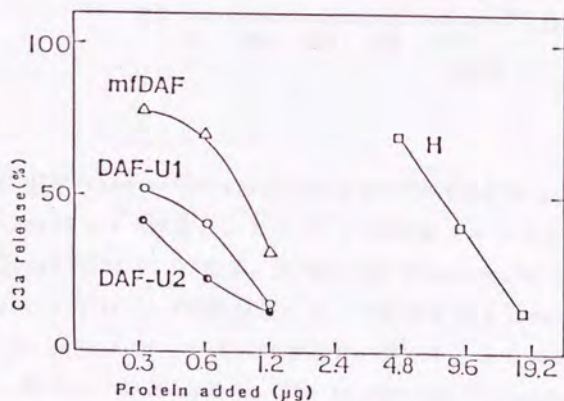


図35 尿DAFの液相C3転換酵素崩壊促進活性

10mM MgCl_2 を含むPBS中、C3を凍結融解させて調製したC3(H_2O)($0.05 \mu\text{g}$)及び、C3($10 \mu\text{g}$)、B($2 \mu\text{g}$)、D($0.2 \mu\text{g}$)とサンプルを加え、 37°C 、30分インキュベートした。この溶液中で生成した液相C3転換酵素によりC3が切られて放出されたC3aの量をRadioimmunoassayにより求めた。

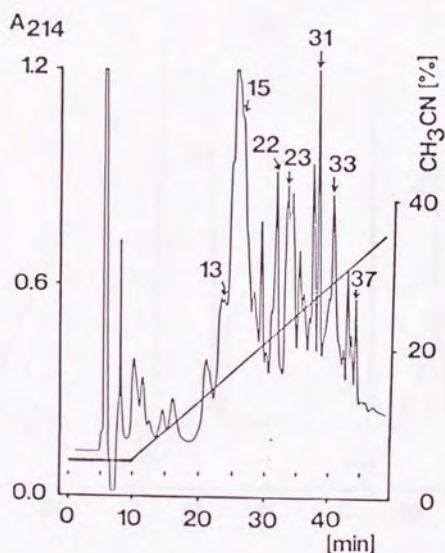


図36 DAF-U1のTrypsin-Thermolysin消化物のHPLCによる分画

DAF-U1(2mg)を0.1 M酢酸アンモニア、1 mM酢酸カルシウム、pH 6.5中で、2.5% (w/w) Trypsin で37°C、17時間、2.5%(w/w) Thermolysin で56°C、2時間、2.5% (w/w) Trypsin で37°C、4時間処理した。この消化物をTosoh TSK gel ODS-120T (7.3mm x 30 cm)にかけ、0.1% TFA存在下、アセトニトリルのグラジエントにより分画した。各ピークのCys含量を、SBD-F(ammonium 7-fluorobenzo-2-oxa-1,3-diazole-4-sulfate)を用いて測定した。

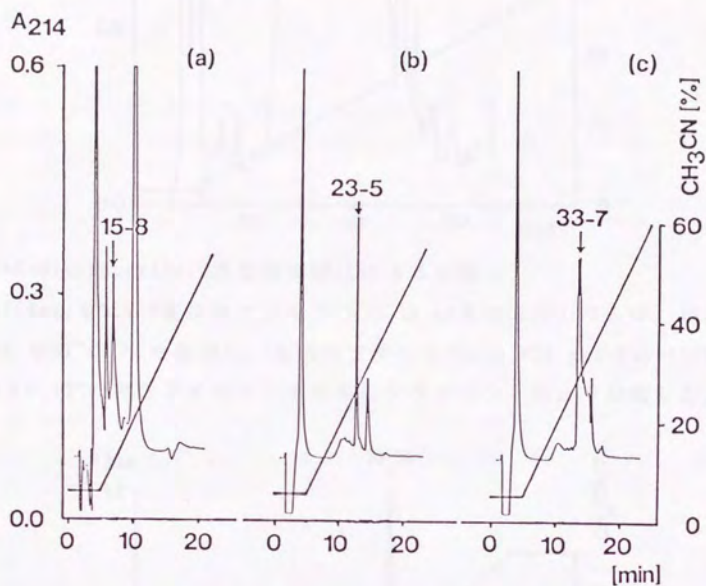


図37 ピークの中性緩衝液を用いた再分画

図36のピーク15(A), 23(B), 33(C)をTSK gel ODS-80TM(4.6mm x 15cm)を用いて、15 mM酢酸アンモニア、pH 6.5存在下のアセトニトリルグラジエントにより更に分画した。

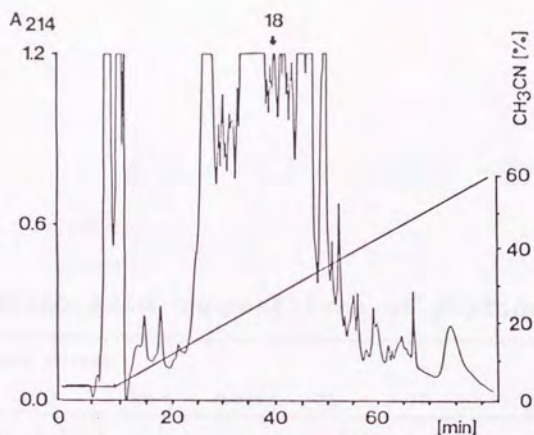


図38 DAF-U1のSubtilisin消化物のHPLCによる分画

DAF-U1(4mg)を0.2 M重炭酸アンモニウム、1 mM塩化カルシウム中、1%(w/w) subtilisin で37°C、一晚処理し、生成ペプチドをTosoh TSK gel ODS-120T(7.3mm x 30cm)で0.1%TFA存在下アセロニトリルのグラジエントにより分離した。

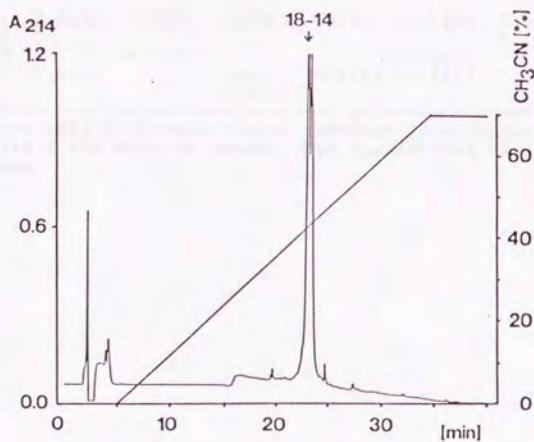


図39 SubtilisinペプチドのTrypsin消化後のHPLCによる分画

図38 のピークを0.1 M酢酸アンモニア、1 mM酢酸カルシウム、pH 6.5中、2.5%(W/W) Trypsin で37°C、4時間処理し、Wakosil 5C18 (4.6mm x 15cm)で0.1%TF A存在下アセロニトリルのグラジエントにより分離した。

表V Amino Acid compositions of peptides

	Peak number							
	33-7	13	23-5	18-14	22	37	31	15-8
Asx	2.1(2)	0.9(1)			1.0(1)	1.6(2)		0.4(1)
Glx		2.0(2)	1.2(1)	1.5(2)	1.3(1)	2.4(2)	1.4(1)	1.2(1)
Ser		1.1(1)	1.2(1)		0.7(1)	2.1(2)		1.4(1)
Gly	0.5(1)			1.4(1)	1.1(1)			2.8(1)
His								
Thr			1.6(2)			0.8(1)	0.8(1)	
Ala							1.0(1)	1.0(1)
Pro	2.6(2)		1.0(1)	1.3(1)	1.8(2)	2.6(2)	3.5(3)	2.7(3)
Arg		0.6(1)	1.0(1)	1.2(1)		1.0(1)		1.0(1)
Tyr				1.1(1)			1.4(2)	
Val	2.0(1)		1.0(1)	1.3(1)		1.3(1)		
Met								
Cys	1.3(2)	1.2(2)	1.1(2)	0.8(2)	0.7(2)	0.7(2)	1.2(2)	0.5(2)
Ile	0.7(1)						1.6(2)	
Leu	1.0(1)		0.7(1)			1.6(1)		
Phe		1.0(1)		1.0(1)	0.7(1)	0.7(1)		
Lys				0.4(1)				

The values are ratios of amino acids obtained after hydrolysis with 6 M HCl at 110 C for 24 h in vacuo. The theoretical values are given in parentheses.

Sequence of disulfide-containing peptides

Peak number	Sequence	SCR number	C number
33-7	2	I	1
	DCGLPPD		
	VIC 47		
13	31	I	2
	CEES		
	FCNR 60		
23-5	64	II	1
	SCEVPTR		
	LTC 111		
18-14	95	II	2
	ECRPGYR		
	VEFCK 124		
22	129	III	1
	SCPMPGE		
	FC 169		
37	156	III	2
	FSCNT		
	VQWSDPLPECR 186		
31	191	IV	1
	IYCPAPPQ		
	IYCT 233		
15-8	219	IV	2
	ACN		
	SGPPPPECR 249		

Numbers indicate the corresponding C (Cys) residues in DAF-U1. SCR number is I (1st), II (2nd), III (3rd) and IV (4th) from N-terminal of DAF-U1. C number is from N-terminal of one SCR.

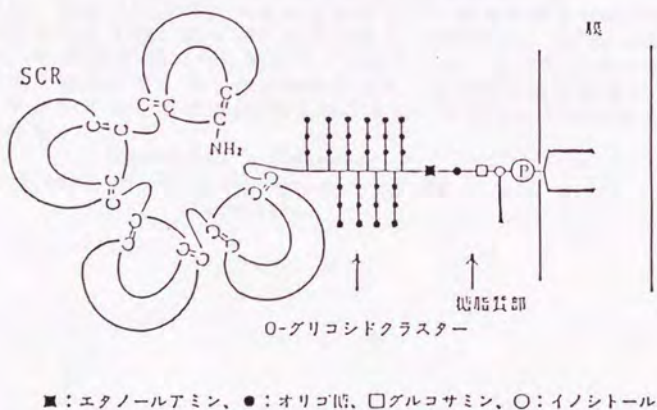
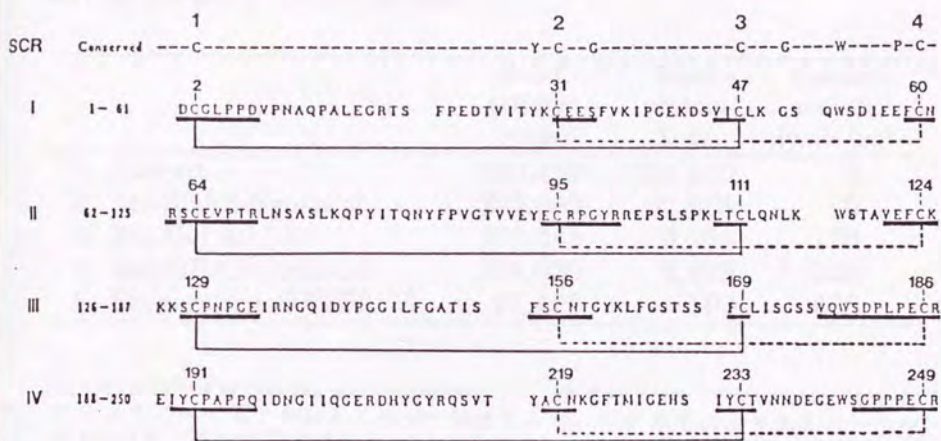


図41 DAF-U1 4個のSCR内におけるジスルフィド結合

図40に示されたジスルフィド結合のDAF分子内における位置関係を図示した。最上段にSCR内に保存されているCysの位置を示した。下段はDAFに含まれる4個のSCRを示す。Cysの上の数字はN末からのアミノ酸番号である。SCR内の1番目と3番目のCysのジスルフィド結合は実線で、2番目と4番目のCysのジスルフィド結合は破線で示してある。下線で示したアミノ酸は図40で決定されたアミノ酸配列を示す。最下段には赤血球膜DAFの分子構造を模式化したものを示してある。

表VI 新しい制御タンパクP-18の精製

	Total activity (units)	Total protein (μ g)	Specific activity (units/ μ g)
1. Extract	660,450	234,600	3
2. 1st DEAE-Sepacel	737,660	91,968	8
3. Bio-Gel A0.5 m	480,375	3,038	158
4. 2nd DEAE-Sepacel	331,625	1,699	195
5. Preparative SDS-PAGE	81,493	160	509

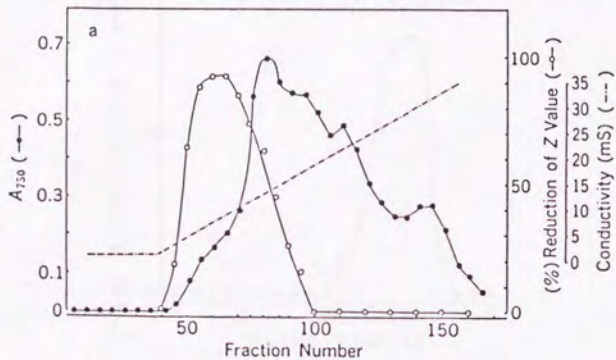
ストローマ(1g/ml 10 mMリン酸緩衝液、1 mM EDTA、pH 7.4)に200 μ g/mlになるようにバインを加え、氷中一晩消化した。この処理によりストローマ中の30%のタンパクが除去された。次にこのストローマを上記緩衝液に懸濁し、これにn-ブタノールを加えて20%ブタノールとし、0°C、30分抽出した。この水層を回収し、DEAE-Sepacelカラム、Bio Gel A-0.5mカラム、次にもう一度DEAE-Sepacelカラムに一回目と同じようにのせ溶出した。

ただし、活性は以下のようにして測定した。溶血中間体EC5-7を 1×10^7 cell分にサンプルとヒトC8、C9を200 ngずつ加え、SGVB**中、37°C、60分インキュベートし、氷冷EDTA-salineを加えて、反応を止め、遠心後、その上清の414nmでの吸光度を測定する。得られた溶血率より、細胞当たりの溶血サイト数(Z)を求めた。サンプルなしで求めたZ値をコントロールとし、下の式により% Reductionを求めた。

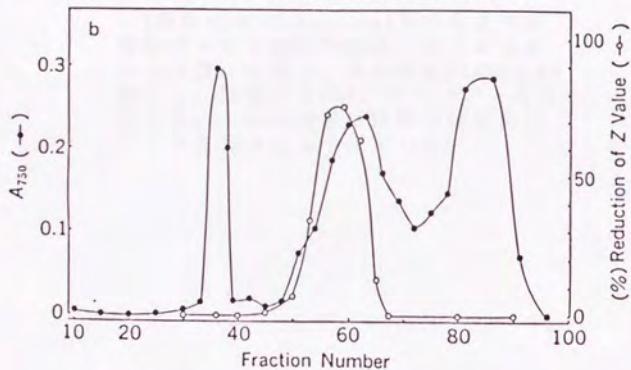
$$\% \text{ Reduction} = \frac{Z(\text{control}) - Z(\text{sample})}{Z(\text{control})} \times 100$$

図42 新しい制御タンパクP-18の精製

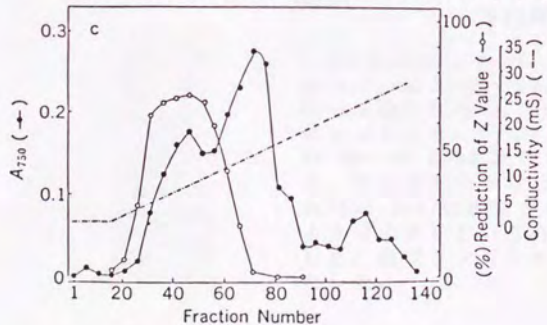
1st DEAE-Sephacelカラムクロマトグラフィー



Bio-Gel A0.5mカラムクロマトグラフィー



2nd DEAE-Sephacelカラムクロマトグラフィー



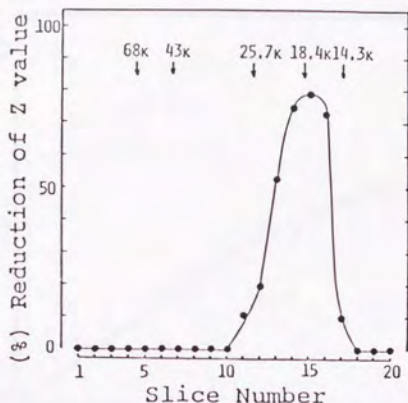
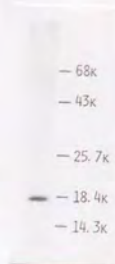


図43 ニトロセルロース膜への転写を用いた制御タンパクの検出

2回目のDEAE-Sephacelカラムよりの活性プールをSDS-PAGE後、ニトロセルロース膜に転写し、その膜を5mm幅に20等分し、各切片をSGVB⁺⁺中、4°C一晩抽出した。その抽出液の阻害活性を図15で述べた方法により測定した。

図44 ニトロセルロース膜より抽出精製したP-18



2回目のDEAE-Sephacelカラムよりの活性プールをSDS-PAGE後、ニトロセルロース膜に転写後、18kDaに相当する部分を切りとり、10 mM Tris-HCl, 2% NP-40, pH 8.0を加えて4°C一晩抽出した。抽出液を小さなDEAE-Sephacelカラム(1x1.5cm)に吸着させ、0.15M NaClにより溶出するという方法により濃縮回収した。回収タンパクをSDS-PAGE後、銀染色した。

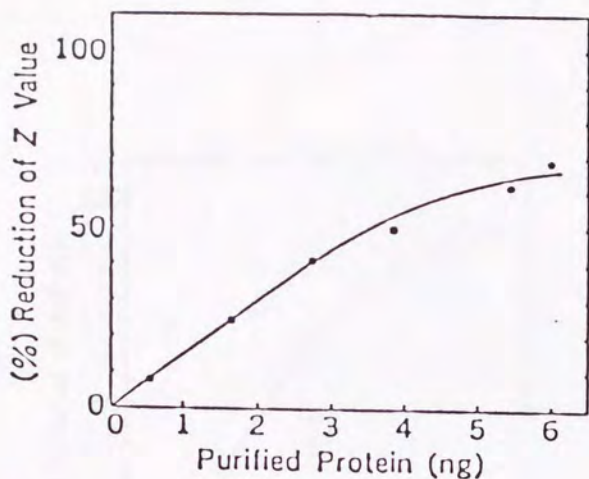


図45 精製P-18のReactive Lysis阻害活性

溶血中間体EC5-7を 10^7 cell 1分にサンプルを加え、SGVB⁺⁺中37°C、10分インキュベート後、よく洗浄する。次に洗ったEC5-7にヒトC8、C9を200 ngずつ加え、SGVB⁺⁺中、37°C、60分インキュベートし、氷冷EDTA-salineを加えて、反応を止め、遠心後、その上清の414nmでの吸光度を測定する。得られた溶血率より、細胞当たりの溶血サイト数(Z)を求めた。サンプルなしで求めたZ値をコントロールとし、下の式により% Reductionを求めた。

$$\% \text{ Reduction} = \frac{Z(\text{control}) - Z(\text{Sample})}{Z(\text{control})} \times 100$$

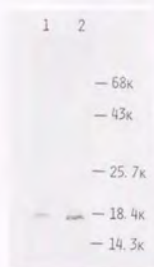
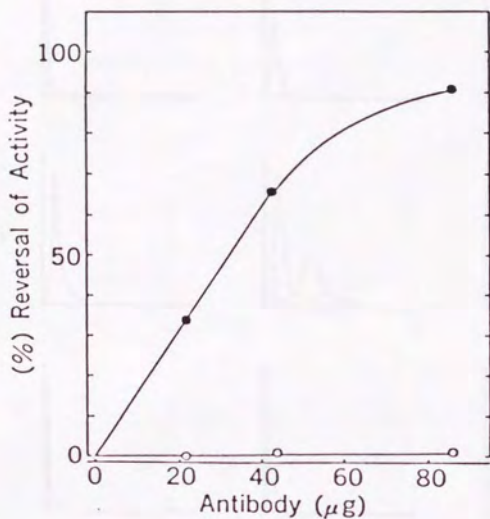


図46 Immunoblotting analysis of native stroma and purified P-18. Native stroma (30 μ g) (lane 1) or purified P-18 (50 ng) (lane 2) was subjected to SDS-PAGE, followed by transfer to nitrocellulose paper. P-18 was detected immunochemically with anti-P-18 antibody.



47 Inhibition of the P-18 activity by anti-P-18 antibody. EC5-7 cells (1×10^7) were incubated with P-18 (5 ng) or SGVB^{2*} as a control for 10 min at 37°C. After extensive washing, the cells were incubated with increasing amounts of anti-P-18 IgG (●) or non-immune rabbit IgG (○) for 15 min at 37°C. After a further wash, C5-7 sites on the cells were developed by incubation with C8 and C9 for 60 min at 37°C. The percent reversal of P-18-mediated inhibition of hemolytic activity is shown as a function of IgG concentration.

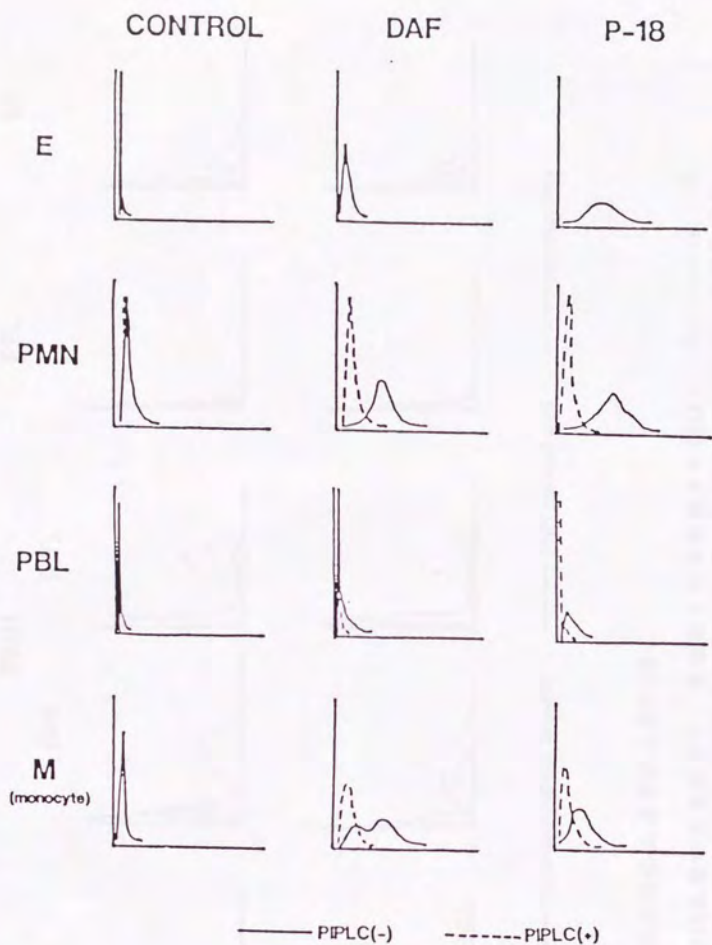


図48 P-18の血液細胞中の分布及びPIPLC(phosphatidyl inositol specific phospholipase C)処理による効果のFACSによる分析

まず、正常人末梢血より、赤血球と白血球画分を調製し、次にcontrolにはウサギ血清、DAFはウサギ抗赤血球膜DAF血清、P-18はウサギ抗赤血球膜P-18血清で処理し、各々、FITC(fluorescence isothiocyanate)標識抗ウサギIgGで染色し、FACSで分析した。

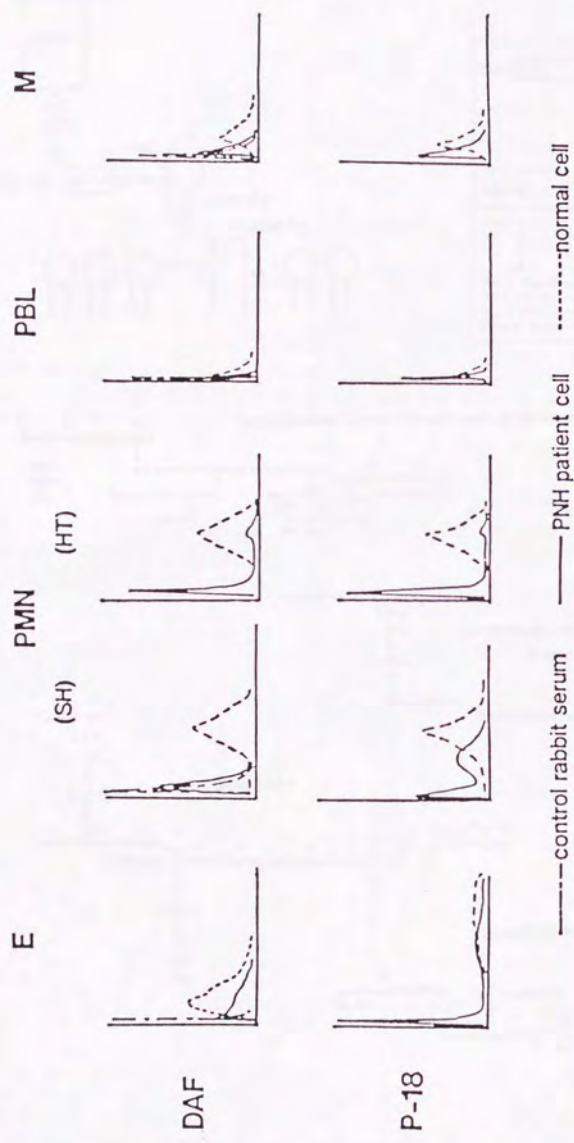


図49 PNH患者の血液細胞上のP-18

2人のPNH患者の末梢血より、赤血球と白血球画分を調製し、次にcontrolにはウサギ血清、DAFはウサギ抗赤血球膜DAF血清、P-18はウサギ抗赤血球膜P-18血清で処理し、各々、FITC(fluorescence isothiocyanate)標識抗ウサギIgGで染色し、FACSで分析した。

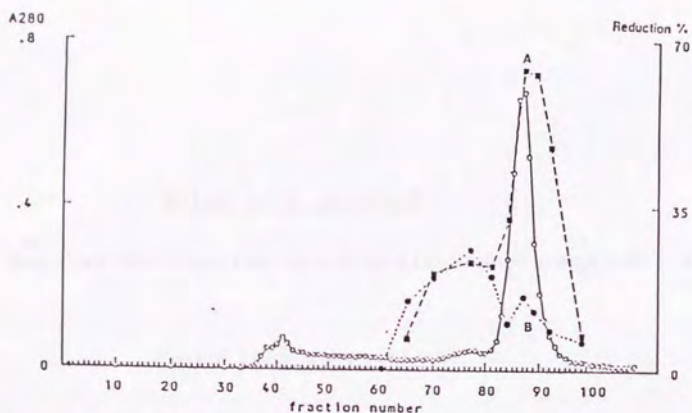


図 51

抗赤血球膜 P-18 モノクローナル抗体カラムを用いて精製後、更に PBS で平衡化した Bio Gel A-0.5m カラム (1.5x100 cm) でゲルろ過した。co-incubation 法と、pre-incubation 法両方で活性を測定した。

■ - - - - - ■ : co-incubation 法、● ● : pre-incubation 法

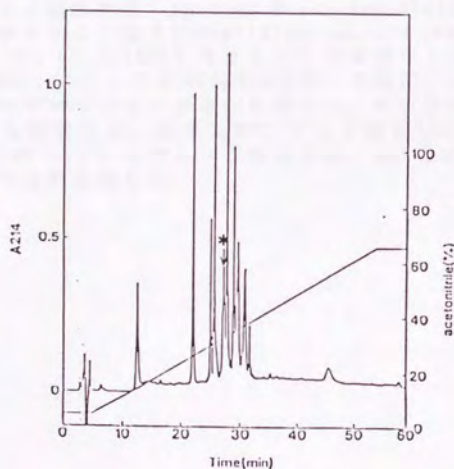


図 52 C 末ペプチドの HPLC による分離

尿 P-18 を CM 化後、トリプシン分解し、消化産物を TSK gel ODS-120T カラム (4.6x250cm) を用いて、0.1% TFA (トリフルオロ酢酸) 存在下、アセトニトリルのグラジエントで分画した。

Amino acid sequence

⁶⁷ Asp-Leu-Cys-Asn-Phe-Asn-Gln-Glu-Leu-Glu-Asn—⁷⁷ GPI anchor

Amino acid composition

Asx	4.1	(4)
Glx	3.0	(3)
CN-Cys	1.1	(1)
Eta	1.7	(2)
Leu	1.9	(2)
Phe	1.5	(1)

図53 アミノ酸配列決定法及びアミノ酸組成分析

N末からのアミノ酸配列は、Applied Biosystem 470Aシーケンサーを用いて解析した。各サイクルで出るPhenylthiohydantoin (PTH) アミノ酸はYMC-Pack ODS-AM、AM-302 (4.6x15cm) カラムと8 mMギ酸ナトリウム、pH3.1/アセトニトリル (605/400, w/w)、0.0006% SDSを用いて同定した (53)。又、アミノ酸組成はPICO TAGワークステーションを用いて、サンプルを塩酸分解後、直接PITCでアミノ酸を誘導化後、出来たPTC-アミノ酸をTSK gel ODS-80TMカラム (4.6x150mm) で30 mMナトリウムリン酸緩衝液、pH7.0とアセトニトリルを用いたグラジエントで分離定量した。

参考文献

- 1 稲井 真弥、井上 公蔵、田村 昇、「補体学」(1982) 医歯薬出版
- 2 多田 富雄 監訳 「免疫学イラストレイテッド」(1990) 南江堂
- 3 Kazatchkine, M.D., Fearon, O.T. and Austen, K.F., (1979) J. Immunol. 122, 75-81
- 4 Brown, E.J., Joiner, K.A., Gaither, T.A., Hammer, C.H. and Frank, M.M. (1983) J. Immunol. 131, 409-415
- 5 Hong, k., Kinoshita, T. and Inoue, K. (1984) J. Immunol. 127, 109-114
- 6 Pensky, J., Hinz, C.F., Jr., Todd, E.W., Wedgwood, R.J., Boyer, J. T. and Lepow, I.H. (1968) J. Immunol. 100, 142-158
- 7 Lesavre, P.H., Hugli, T.E., Esser, A.F. and Muller-Eberhard, H.J. (1979) J. Immunol. 123, 529-534
- 8 Volanaskis, J.E., Schrohenlohen, R.E. and Stroud, R.M. (1977) J. Immunol. 119, 337-342
- 9 Nagaki, K., Iida, K., Okubo, M. and Inai, S. (1978) Int. Archs. Allergy appl. Immun. 57, 221-232
- 10 Hammer, C.H., Wirtz, G.H., Renfer, L., Gresham, H.D. and Tack, B. F. (1981) J. Biol. Chem. 256, 3995-4006
- 11 Tack, B.F., Janatova, M.L., Harrison, T.R.A. and Hammer, C.H. (1981) in Methods in Enzymology, vol.80, part C, pp64-101, Academic Press
- 12 Kerr, M.A. (1981) in Methods in Enzymology, vol.80, part C, pp102-112, Academic Press
- 13 Crossley, L.G. (1981) in Methods in Enzymology, vol.80, part C, pp112-124, Academic Press
- 14 Reid, K.B.M., Johnson, D.M.A., Gagnon, J. and Prohaska, R. (1981) in Methods in Enzymology, vol.80, part C, pp134-143, Academic Press

- 15 Reid, K.B.M. (1981) in *Methods in Enzymology*, vol.80, part C, pp134-143, Academic Press
- 16 高田明和、山下昭、近藤元治、高橋守信 (1981) 「補体とその周辺」 医歯薬出版
- 17 O'Farrell, P.H. (1975) *J. Biol. Chem.* 250, 4007-4021
- 18 Laemmli, U.K. (1970) *Nature* 227, 680-685
- 19 Pillmer, L., Blum, L., Lepow, I.H., Ross, O.A., Todd, E.W. and Wardlaw, A.W. (1952) *Science* 120, 279-
- 20 Smith, C.A., Pangburn, M.K., Vogel, C.W. and Muller-Eberhard, H.J. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 4582-4584
- 21 Reid, K.B.M. and Gagnon, J. (1981) *Mol. Immunol.* 18, 949-959
- 22 Minta, J.Q. and Lepow, I.H. (1974) *Immunochem.* 11, 361-368
- 23 Fearon, D.T. and Austen, F. (1975) *J. Exp. Med.* 142, 856-863
- 24 Nagasawa, S. and Stroud, R.M. (1980) *Mol. Immunol.* 17, 1365-1372
- 25 Sim, R.B. and DiScipio, R.G. (1982) *Biochem. J.* 205, 285-292
- 26 Nilsson, U.R. and Muller-Eberhard, H.J. (1965) *J. Exp. Med.* 122, 277-298
- 27 Giclas, P.C., Kelling, P.J. and Henson, P.M. (1981) *Mol. Immunol.* 18, 113-123
- 28 Nicholson-Weller, A., Burge, J., Fearon, D.T., Weller, P.E. and Austen, K.F. (1982) *J. Immunol.* 129, 184-189
- 29 Sugita, Y., Uzawa, M. and Tomita, M. (1987) *J. Immunol. Methods* 104, 123-130
- 30 Medof, M.E., Gottlieb, A., Kinoshita, T., Hall, S., Silber, R., Nussenzweig, V. and Rosse, W.F. (1987) *J. Clin. Invest.* 80, 165-174
- 31 Fujita, T., Inoue, T., Ogawa, K., Iida, K., Tamura, N. (1987) *J. Exp. Med.* 167, 1221-1228
- 32 Kinoshita, T., Medof, M.E., Nussenzweig, V. (1986) *J. Immunol.* 136, 3390-3395

- 33 Pangburn, M.K. (1986) *J. Immunol.* 136, 2216-2221
- 34 Lublin, D.M. and Atkinson, J.P. (1989) *Ann. Rev. Immunol.* 7, 35-58
- 35 Nicholson-Weller, A., Burge, J. and Austen, K.F. (1981) *J. Immunol.* 127, 2035-2039
- 36 Nicholson-Weller, A., March, J.P., Rosen, C.E., Spicer, D.B. and Austen, K.F. (1985) *Blood* 65, 1237-1244
- 37 Medof, M.E., Kinoshita, T. and Nussenzweig, V. (1984) *J. Exp. Med.* 160, 1558-1578
- 38 Medof, M.E., Kinoshita, T., Silber, R. and Nussenzweig, V. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 2980-2984
- 39 Ferguson, M.A.J. and Williams, A.F. (1988) *Ann. Rev. Biochem.* 57, 285-320
- 40 Davitz, M.A., Low, M.G. and Nussenzweig, V. (1986) *J. Exp. Med.* 163, 1150-1161
- 41 Medof, M.E., Walter, E.I., Roberts, W.E., Hass, R. and Rosenberry, T.L. (1986) *Biochemistry* 25, 6740-6747
- 42 Medof, M.E., Walter, E.I., Rutgers, J.L., Knowles, D.M. and Nussenzweig, V. (1987) *J. Exp. Med.* 165, 848-864
- 43 Caras, I.W., Davitz, M.A., Rhee, L., Weddell, G., Martin, D.W., Jr. and Nussenzweig, V. (1987) *Nature* 325, 545-549
- 44 Medof, M.E., Lublin, D.M., Holers, V.M., Ayers, D.J., Getty, R.R., Leykam, J.F., Atkinson, J.P. and Tykocinski, M.L. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 2007-2011
- 45 Rey-Campos, J., Rubinstein, P. and de Cordoba, S.R. (1987) *J. Exp. Med.* 166, 246-252
- 46 Lozier, J., Takahashi, N. and Putnam, F.W. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 3640-3644
- 47 Rusk, C.M., Neeper, M.P., Kuo, L-M., Kutny, R.M. and Robb, R.J. (1988) *J. Immunol.* 140, 2249-2259

- 48 Miedel, M.C., Hulmes, J.D., Weber, D.V., Bailon, P. and Pan, Y-C. E. (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 154, 372-379
- 49 Janatova, J., Reid, K.B.M. and Willis, A.C. (1989) *Biochemistry* 28, 4754-4761
- 50 Kinoshita, T., Medof, M.E., Silber, R. and Nussenzweig, V. (1985) *J. Exp. Med.* 162, 75-92
- 51 Sugita, Y., Negoro, T., Matsuda, T., Sakamoto, T. and Tomita, M. (1986) *J. Biochem.* 100, 143-150
- 52 Seya, T., Holers, V.M. and Atkinson, J.P. (1985) *J. Immunol.* 135, 2661-2667
- 53 Aoyama, H., Iwamatsu, A., Dibo, G., Tsunasawa, S. and Sakiyama, F. (1988) *J. Protein Chem.* 17, 191-
- 54 Reinhold, V.N. (1972) in *Methods in Enzymology*, vol.25, pp244-249, Academic Press
- 55 Sueyoshi, T., Miyata, T., Iwanaga, S., Toyo'oka, T. and Imai, K. (1985) *J. Biochem.* 97, 1811-1813
- 56 PICO TAG Work Station Operator's Manual (Waters)
- 57 Protein Sequencer User Bulletin (Applied Biosystems)
- 58 Hisiung, L.M., Barclay, A.N., Branton, M.R., Sim, E. and Porter, R.P. (1982) *Biochem. J.* 203m 293-298
- 59 Gower, H.J., Barton, C.H., Elsom, V.L., Thompson, J., Moore, S.E., Dickson, G. and Walsh, F.S. (1988) *CELL* 55, 955-964
- 60 Roberts, W.L., Santikarn, S., Reinhold, V.N. and Rosenberry, T.L. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 18776-18784
- 61 Post, T.W., Arce, M.A., Liszewski, M.K., Thompson, E.S., Atkinson, J.P. and Lublin, D.M. (1990) *J. Immunol.* 144, 740-744
- 62 Hourcade, D., Miesner, D.R., Atkinson, J.P. and Holers, V.M. (1988) *J. Exp. Med.* 168, 1255-1270
- 63 Post, T.W. and Atkinson, J.P. (1989) *FASEB. J.* 3, A368 (Abstr.)
- 64 Fujisaku, A., Harley, J.B., Frank, M.B., Gruner, B.A., Frazier, G.

- B. and Holers, V.M. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 2118-2125
- 65 Vik, D.P., Keeney, J.B., Munoz-Canoves, P., Chaplin, D.D. and Tack, B.F. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 16720-16724
- 66 Carel, J-C., Myones, B.L., Frazier, B. and Holers, V.M. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 12293-12299
- 67 Reid, K.B.M. and Day, A.J. (1989) *Immunol. Today* 10, 177-180
- 68 Yamamoto, K. (1977) *J. Immunol.* 119, 1482-1485
- 69 Hansch, G.M., Hammer, C.H. and Shin, M.L. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 5118-5121
- 70 Hu, V.W. and Shin, M.L. (1984) *J. Immunol.* 133, 2133-2137
- 71 Shin, M.L., Hansch, G.M., Hu, V.W. and Nicholson-Weller, A. (1986) *J. Immunol.* 136, 1777-1782
- 72 Hu, V.W. and Nicholson-Weller, A. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 5520-5524
- 73 Rosenfeld, S.I., Jenkins, D.E. and Leddy, J.P. (1985) *J. Immunol.* 134, 508-511
- 74 Rosenfeld, S.I., Jenkins, D.E. Jr., and Leddy, J.P. (1986) *J. Exp. Med.* 164, 981-997
- 75 Schonermark, S., Rauterberg, E.W., Shin, M.L., Loke, S., Roelcke, D. and Hansch, G.M. (1986) *J. Immunol.* 136, 1772-1776
- 76 Zalman, L.S., Wood, L.M. and Muller-Eberhard, H.J. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 6975-6979
- 77 Wetsel, R.A., Jones, M.A. and Kolb, W.P. (1980) *J. Immunol. Method.* 35, 319-335
- 78 Dessauer, A. and Rother, U. (1983) *Immunobiology* 164, 370-379
- 79 Podack, E.R., Kolb, W.P., Esser, A.F. and Muller-Eberhard, H.J. (1979) *J. Immunol.* 123, 1071-1077
- 80 Komatsu, M., Yamamoto, K., Kawashima, T. and Migita, S. (1985) *J. Immunol.* 134, 2607-2609
- 81 Rauterberg, E.W., Schieck, C.H. and Hansh, G. (1979)

- 82 Zubler, R.H., Carpentier, N. and Lambert, P-H. (1981) in *Methods in Enzymology* 74, part C, pp530-537, Academic Press
- 83 Haziot, A., Chen, S., Ferrero, E., Low, M.G., Silber, R. and Goyert, S.M. (1988) *J. Immunol.* 141, 547-552
- 84 Dessauer, A., Rother, U. and Rother, K. (1984) *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. Sect. C. Suppl.* 284, 75-81
- 85 Markwell, M.A.K., Haas, S.M., Bieber, L.L. and Tolbert, N.E. (1978) *Anal. Biochem.* 87, 206-210
- 86 Roberts, W.L., Kim, B.H. and Rosenberry, T.L. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 7817-7821
- 87 Toutant, J-P., Roberts, W.L., Murray, N.R. and Rosenberry, T.L. (1989) *Eur. J. Biochem.* 180, 503-508
- 88 Stafford, H.A., Tykocinski, M.L., Lublin, D.M., Holers, V.M., Rosse, W.F., Atkinson, J.P. and Medof, M.E. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 880-884
- 89 Selvaraj, P., Dustin, M.L., Silber, R., Low, M.G. and Springer, T. A. (1987) *J. Exp. Med.* 166, 1011-1025
- 90 Auditore, J.V. and Hartmann, R.C. (1959) *Am. J. Med.* 27, 401-410
- 91 Rosenberry, T.L., Roberts, W. and Haas, R. (1986) *Fed. Proc.* 45, 2970-2975
- 92 Dustin, M.L., Selvaraj, P., Mattaliano, R.J. and Spronger, T.A. (1987) *Nature* 329, 846-848
- 93 Whitlow, M.B., Iida, K., Stefanova, I., Bernard, A. and Nussenzweig, V. (1990) *Cell. Immunol.* 126, 176-184
- 94 Rollins, S.A. and Sims, P.J. (1990) *J. Immunol.* 144, 3478-3483
- 95 Ferguson, M.A.J. and Williams, A.F. (1988) *Ann. Rev. Biochem.* 57, 285-320
- 96 池原征夫 (1989) *Med. Immunol.* 18, 832-834
- 97 Micanovic, R., Gerber, L.D., Berger, J., Kodukula, K. and

- Udenfriend, S. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 157-161
- 98 Takami, N., Ogata, S., Oda, K., Misuni, Y. and Ikehara, Y. (1988)
J. Biol. Chem. 263, 3016-3021
(1988) J. Biol. Chem. 263, 3016-3021
- 99 Ferguson, M.A.J., Homans, S.W., Dwek, R.A. and Rademacher, T.W.
(1988) Science, 239, 753-759
- 100 Homans, S.W., Ferguson, M.A.J., Dwek, R.A., Rademacher, T.W.,
Anand, R. and Williams, A.F. (1988) Nature 133, 269-272
- 101 Schneider, P., Ferguson, M.A.J., McConville, M.J., Mehlert, A.,
Homans, S.W. and Bordier, C. (1990) J. Biol. Chem. 265, 16955-
16964
- 102 Sugita, Y., Tobe, T., Oda, E., Tomita, M., Yasukawa, K., Yamaji,
N., Takemoto, T., Furuichi, K., Takayama, M. and Yano, S. (1989)
J. Biochem. 106, 555-557
- 103 Asch, A.S., Kinoshita, T., Jaffe, E.A. and Nussenzweig, V. (1986)
J. Exp. Med. 163, 221-226
- 104 Okada, N., Harada, R., Fujita, T. and Okada, H. (1989) J. Immunol.
143, 2262-2266
- 105 Holguin, M.H., Fredrick, L.R., Bernshaw, N.J., Wilcox, L.A. and
Parker, C.J. (1989) J. Clin. Invest. 84, 7-17
- 106 Groux, H., Huet, S., Aubrit, F., Tran, H.C., Boumsell, L. and
Bernard, A. (1989) J. Immunol. 142, 3013-3020
- 107 Stefanova, I., Hilgert, I., Kristofova, H., Brown, R., Low, M.G.
and Horejsi, V. (1989) Mol. Immunol. 26, 153-161
- 108 Davies, A., Simmons, D.L., Hale, G., Harrison, R.A., Tighe, H.,
Lachmann, P.J. and Waldmann, H. (1989) J. Exp. Med. 170, 637-654
- 109 Nose, M., Katoh, M., Okada, N., Kyogoku, M. and Okada, H. (1990)
Immunology 70, 145-149
- 110 Malek, T.R., Ortega, G., Chan, C., Kroczeck, R.A. and Shevach, E.M.
(1986) J. Exp. Med. 164, 709-722

- 111 Rock, K.L., Yeh, E.T.H., Gramm, C.F., Haber, S.I., Reiser, H. and Benacerraf, B. (1986) J. Exp. Med. 163, 315-333
- 112 Codias, E.K. and Malek, T.R. (1990) J. Immunol. 144, 2197-2204
- 113 Shevach, E.M. and Korty, P.E. (1989) Immunol. Today 10, 195-200

[謝 辞]

本論文作成にあたり、御指導、御鞭撻を賜りました東京大学薬学部大沢利昭教授に深く感謝申し上げます。

また本研究の機会を与えられ、終始御指導、御鞭撻を頂きました昭和大学薬学部富田基郎教授に心からお礼申し上げます。

さらに本研究に終始変わらぬ御協力と御助言を頂きました昭和大学薬学部生理化学教室の皆様に深くお礼申し上げます。

