

## コラーゲン様補体成分 Clq の構造と機能に関する研究

—ウシおよびヒト Clq の比較研究—

奈良県立医科大学細菌学教室

佐々木 隆 子

### STUDIES ON THE STRUCTURE AND THE FUNCTION OF A COLLAGEN-LIKE COMPLEMENT COMPONENT Clq —COMPARATIVE STUDIES BETWEEN CATTLE AND MAN—

TAKAKO SASAKI

*Department of Bacteriology, Nara Medical University*

Received March 31, 1989

*Summary:* In order to find a clue to the molecular evolution mechanism of collagen-like molecules, comparative studies on the function and the structure of human and bovine Clq, a collagen-like complement component, were carried out.

The hemolytic activity of bovine Clq was conspicuously higher than that of human Clq. On the other hand, the ability of bovine Clq to bind to Fc of immune complexes was a little lower than that of human Clq. However, these activities were interchangeable between them.

Both the N-terminal collagen-like (CLF) and the C-terminal globular fragments (GF) of these Clq were highly purified by enzymic digestion followed by gel filtration, and their physicochemical and antigenic characterization was performed. Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) analyses have shown that not only whole molecules of both Clq but also CLFs and GFs seem to be composed of essentially the same peptide structures. Some similarities between amino acid compositions of both CLFs and great similarities between those of both GFs were found. Moreover, great similarities of amino acid compositions were found among three non-covalently linked chains of each GF as well as between the corresponding chains of both GFs. Immunodiffusion analyses and radioimmune inhibition tests have shown that the definitive antigenic cross-reactivity is present between these two Clq molecules, and that the regions participating in interspecies cross-reactions are located in both CLF and GF of Clq.

These results suggest that both CLF and GF on the Clq molecule remained highly conserved in their evolution, and that the hemolytic activity and the Fc-binding ability evolved independently to some extent. The possible relation of the Clq evolution to that of collagen molecules has been also discussed.

#### Index Terms

Clq, collagen-like molecule, molecular evolution

## I. 緒 言

補体系は、生体防禦機構に重要な役割を担い、免疫複合体病などの病態に深く関与する古典経路または別経路により活性化される約20種の血清蛋白質から構成されている。古典経路活性化に関与する補体第一成分(C1)は、3つの重成分 C1q, C1r, C1s が、1:2:2の分子比で  $\text{Ca}_2^+$  依存性に複合体を形成したもので、抗原抗体複合物や変性免疫グロブリンの Fc 領域に結合するのはそのうちの C1q 分子で、酵素反応により C1r, C1s が活性化され、順次後続の補体成分が活性化される<sup>1)</sup>。近年、C1q が直接細菌のリピド A<sup>2)</sup>、レトロウイルス<sup>3)</sup> や cytoskeletal filament<sup>4)</sup> などに結合し、抗体非依存的に補体系を活性化することも報告されている。

ヒト C1q は、1971年に Yonemasu と Stroud<sup>5)</sup> により初めて純化され、球状蛋白質でありながらコラーゲンに特有とされているアミノ酸(ヒドロキシプロリン、ヒドロキシリジン)を含むことが報告<sup>6)</sup> されて以来、精力

的に解析が進められ、特に Reid らによりその一次構造<sup>7)</sup>、塩基配列<sup>8)</sup>のほぼ全容が明らかにされてきているものである。ヒト C1q は分子量41万の糖蛋白質で分子量のほぼ等しい A, B, C 鎖と呼ばれる3種のペプチド鎖より構成されている。各ペプチド鎖は、N末端から約80残基がコラーゲンに特有とされているグリシン-X-Yの反復構造をとり、A, B, C 鎖各1本ずつ計3本でコラーゲン様の三重らせん構造を形成している[コラーゲン様部位; collagen-like region (fragment), 以下 CLF と略す]。それに続くC末端側約130残基は、ヒドロキシプロリンやヒドロキシリジンを含まない通常のアミノ酸よりなっている<sup>1)</sup>[球状部位; globular region (fragments), 以下 GF と略す](Fig. 1)。C1q 分子は、Fig. 1-a に示すようなサブユニットが3単位集まって、Fig. 1-c に見られるような三次構造の分子を形成している。このことは、物理化学的研究のみならず電子顕微鏡観察<sup>10)</sup>においても確認されている。また、CLF にはヒドロキシリジン結合糖鎖<sup>11)</sup>が、GF には、アスパラギン結合糖鎖が局

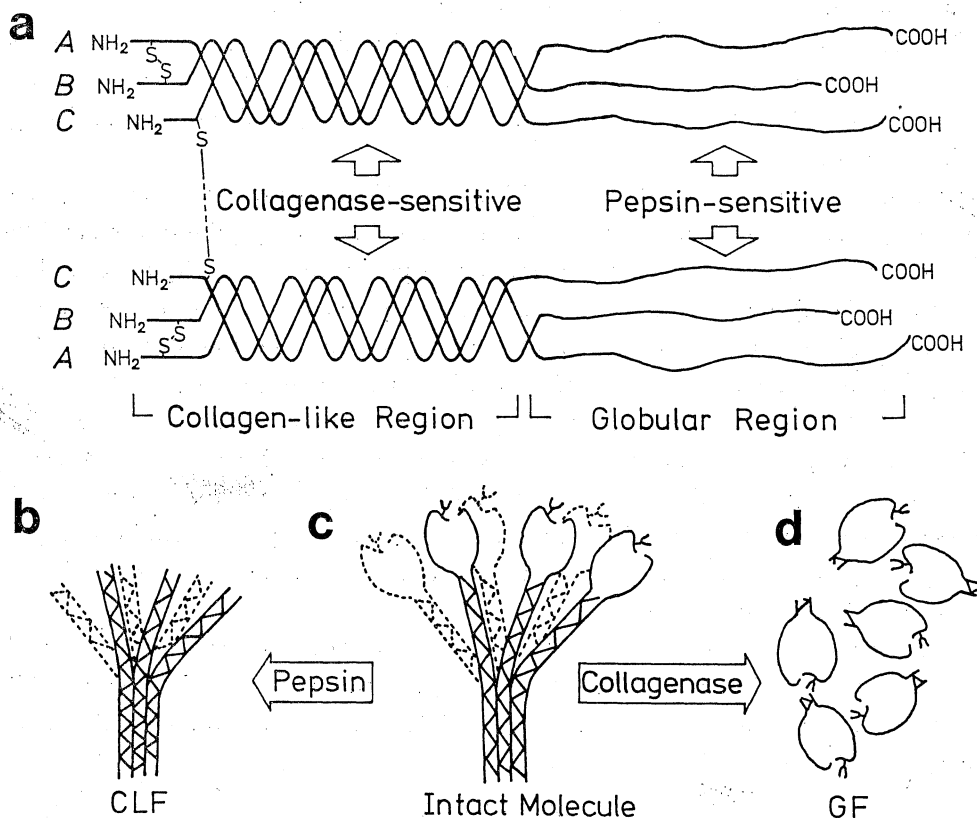


Fig. 1. Proposed peptide chain structure of C1q.

Collagenase- and pepsin-sensitive intramolecular domains are shown<sup>1)</sup><sup>10)</sup>. Asparagine-linked sugar chains located on GF domains are also shown.

在し、その構造<sup>12)</sup>も明らかにされている。ヒト Clq をペプシンで限定分解すると GF のみが消化され CLF<sup>13)</sup> が得られ、一方、コラーゲナーゼ分解では CLF が消化され GF<sup>14)15)</sup> が得られる (Fig. 1-b と d)。各フラグメントは、構造単位であるばかりでなく機能単位でもあり、GF は免疫グロブリンの Fc 領域への結合部位<sup>14)15)</sup>を、CLF は C1r, C1s の結合部位を<sup>16)17)</sup>ドメイン内に含むとされている。

このようなコラーゲン様構造を分子内に持つ Clq 分子は、ヒト、ウシ<sup>18)19)</sup>、ウマ<sup>20)</sup>を初めとする哺乳類で存在が確認され、いずれの Clq 分子もヒドロキシプロリンやヒドロキシリジンを分子内に含み、基本的にはヒト Clq とよく似た構造を持つと考えられているが、これら Clq 分子のヒト Clq との生物学的・物理化学的比較研究はほとんどなされていないのが現状である。したがって、本研究ではコラーゲン様分子である Clq の分子進化の糸口を得るために、ウシ Clq を純化し、ヒト Clq との生物学的活性の比較、さらにウシ Clq より CLF および GF を分離し、ヒト Clq のそれらとの生化学的・免疫化学的比較検討を行った。また、コラーゲン分子との進化における関わりについても考察を加えた。

## II. 材料および方法

### 1. 試薬

実験に用いた試薬ならびにその購入先を以下に示す。

セファクリル S-200, S-300; セファデックス G-25, G-50, G-150, G-200; Con A-セファローズ 4B (Pharmacia, Tokyo, Japan); DEAE-セルローズ DE-52 (Whatman, Maidstone, Kent, U.K.); アガロース (Bio-Rad, Richmond, CA, U.S.A.); ヒト IgG, ウシ IgG, ウシ肝臓カタラーゼ, 卵白リゾチーム, ヨード酢酸アミド, ウシ血清アルブミン (bovine serum albumin; BSA) (Sigma Chemicals Co., St. Louis, MO, U.S.A.); N-エチルマレイミド, ジチオスレイトール (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan); Bacto-latex (0.81  $\mu$ , Difco Lab., Detroit, MI, U.S.A.); ペプシン (pig mucosa, 2500 Anson units/mg, Boehringer Mannheim, F.R.G.); Na <sup>125</sup>I (IMS 30, Amersham Japan, Tokyo, Japan); polystyrene tube (72 $\times$ 10 mm; Shionogi Pharmaceutical Co., Osaka, Japan)。コラーゲナーゼ (Seikagaku Kogyo Co., Tokyo, Japan) はヒドロキシアパタイトでさらに純化し混入しているプロテアーゼを除去した<sup>11)</sup>。ヒト血清アルブミン (human serum albumin; HSA) (Four-times crystallized, Nutritional Biochemicals, Cleveland, OH, U.S.A.) は

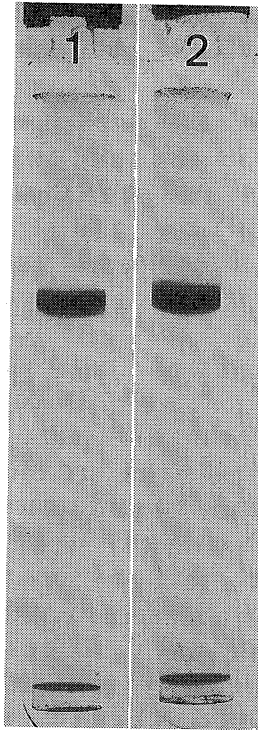


Fig. 2. SDS-PAGE of purified Clq (anode is to the bottom). Purified bovine (1) and purified human Clq (2) were analyzed on 3.75% gels at pH 8.3. The band near the anode is a non-specific band formed at the water-buffer interface.

DEAE-セルローズでさらに純化して使用した。

### 2. ウシおよびヒト Clq の純化

ウシ血液は屠殺場で入手し、37°C で60分凝固させ、さらに室温で60分放置した後、2,000 G で30分遠沈して血清を分離し、さらにこの血清を 20,000 G 90分遠沈して脂肪分を除去した。ヒト血液は正常ヒトの肘静脈より採血し、同様にして血清を分離した。各々の血清より既報の方法<sup>5)19)</sup>により Clq を分離し、さらに Con A-セファローズ 4B を使用して純化した<sup>21)</sup>。最終標品は、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) で、単一の染色バンドのみが認められる高純度のものではあった (Fig. 2)。

### 3. ウシおよびヒト Clq 分子内フラグメントの分離

1) CLF の単離: 20mg の Clq を含む 100 mM sodium acetate buffer (pH 4.5) 2.5 ml に 800  $\mu$ g のペプシンを加え、37°C 20時間分解後、得られた分解産物を 100 mM NaCl/10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) で

平衡化したセファクリル S-300 カラム (2×70 cm) でゲルろ過を行った。溶出液の 230 nm における吸光度を測定するとともに、各分画のアミノ酸分析を行い、コラーゲンに特有とされるヒドロキシプロリン、ヒドロキシリジンや多量のグリシンが含まれている分画を CLF とした。CLF 分画より消化が不完全な Clq を除去するために、本分画をヒト IgG を結合させたセファローズ CL-4B を通過させ、非結合分画を集め、再度同じセファクリル S-300 カラムでゲルろ過を行い、CLF 最終標品とした。

2) GF の単離: 30 mg の Clq を 3 ml の 0.25 mM N-エチルマレイミドを含む 300 mM NaCl/10 mM CaCl<sub>2</sub>/20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) に溶解後、1.5 mg の純化コラゲナーゼを加え、37°C で 24 時間分解した。得られた分解産物は、360 mM NaCl/10 mM CaCl<sub>2</sub>/20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.5) で平衡化したセファクリル S-200 カラム (3×110 cm) でゲルろ過を行った。溶出液の 280 nm における吸光度を測定するとともに、各分画のアミノ酸分析を行い、ヒドロキシプロリンやヒドロキシリジンを含まずコラゲナーゼ活性を持たない分画を GF として集め、再度同じセファクリル S-200 カラムでゲルろ過を行い、GF の最終標品とした。

4. Clq および分子内フラグメントの非共有結合サブユニットと共有結合ペプチド鎖の調製<sup>22)</sup>: 非共有結合サブユニットは、Clq およびそのフラグメントを 8 M 尿素と 10 mM ヨード酢酸アミドを含む 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) に 4°C で一夜透析して得た。共有結合ペプチド鎖は、ヨード酢酸アミドを含まない上記緩衝液への透析で得た Clq およびそのフラグメントの非共有結合サブユニット溶液に終濃度 0.1 M のジチオスレイトールを加え、室温で 4 時間還元後、終濃度 0.2 M のヨード酢酸アミドを添加し 1 M Tris 溶液で pH を 8.0 に維持しながら、室温で 30 分間アルキル化を行って得た。

5. SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) による解析: Clq および分子内フラグメントの非解離状態での純度検定は、Davis の原法<sup>23)</sup>に準じて、ゲルおよび緩衝液に終濃度 0.1% の SDS を添加し、Clq は 3.75% の、分子内フラグメントは 6% のポリアクリルアミドゲルを用いて行った。Clq 分子内フラグメントの解離状態での分析は、Fairbanks らの方法<sup>24)</sup>により 10% のゲルを用いて行った。泳動後のゲルの蛋白染色はクマシーブリリアントブルー・R-250 で、糖染色は Kapitany らの方法<sup>25)</sup>によりシッフ試薬で行った。各染色バンドの分子量は、ヒト Clq、分子内 A-B サブユニット、C-C サ

ブユニット、A, B, C 鎖、ウシ肝臓カタラーゼ、ヒト IgG および卵白リゾチームの分子量をそれぞれ、410,000, 47,000, 44,000, 24,000, 23,000, 22,000, 240,000, 160,000 および 14,400 として推定した。また、各染色バンドのモル比はデンスitomーター (島津 CS-930, 島津製作所, 京都) を用いて染色濃度を 600 nm での吸光度をスキャンして算定した。

6. GF を構成するペプチド鎖の相互分離: ウシおよびヒト GF 溶液に終濃度 4 M の尿素を加え、37°C 30 分反応後、構成ペプチド鎖を SDS-PAGE にて分離した。分離したペプチド鎖を含むゲル断片を切り出し、Otto らの方法<sup>26)</sup>によりゲル内のペプチド鎖を電気的に溶出した。各溶出液は蒸留水に完全透析後、凍結乾燥し、最終標品とした。

7. アミノ酸組成分析: 凍結乾燥した試料に再蒸溜した定沸点塩酸を加え、ドライアイスエタノールで凍結後真空にして封じ、110°C で 24 時間および 48 時間加水分解した。加水分解物を減圧乾固後、100 mM クエン酸緩衝液 (pH 2.2) に溶解し、アミノ酸分析計 (日立 model 835, 日立製作所, 東京) により分析した。セリン、トレオニンは零時間に補外して求めた。また、システインの残基数は、試料を過ギ酸酸化後加水分解を行い、システイン酸として求めた<sup>27)</sup>。

8. 抗血清の作製ならびに IgG およびその F(ab)<sub>2</sub> 分画の分離: ウシとヒト Clq およびそのフラグメント、HSA に対する抗血清は、以下のようにウサギを免疫して作製した。約 0.5-1 mg の抗原を含む溶液を Freund 完全アジュバントでエマルジョンとし、ウサギに皮下注射した。3 週間後、約 100-200 μg の抗原を含む溶液を Freund の不完全アジュバントでエマルジョンとし、皮下注射で追加免疫した。さらに 3 週間後より、生理食塩水に 1 mg/ml になるように溶解した抗原溶液を 0.1 ml ずつ連続して 3 日間静脈内注射し、10 日後に採血した。

羊赤血球に対するウサギ IgM-ヘモリジンおよび IgG-ヘモリジンは、大塚アッセイ研究所 (徳島) より購入した。

ウサギ各抗血清および正常ウサギ血清より、Fahey と Mckelvey の方法<sup>28)</sup>に準じ IgG 分画を分離した。すなわち、各抗血清を 1/3 飽和硫酸アンモニウムで塩析し、得られた沈澱を 20 mM NaCl/10 mM EDTA/10 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) に溶解し、同じ溶液で平衡化した DE-52 カラムにのせ、非吸着画分を集め濃縮後純化 IgG 標品とした。さらに、純化 IgG 標品より Nisonoff の方法<sup>29)</sup>によりペプシン分解を行い、F(ab)<sub>2</sub> 分画を得た。すなわち、0.1 M sodium acetate buffer

(pH 4.5) で 10-20 mg/ml の濃度に調整した IgG 溶液に、IgG の 1/50 量のペプシンを加え、37°C で 24 時間分解した後、1 M Tris 溶液で pH を中性に戻したのち、250 mM NaCl/10 mM EDTA/10 mM borate-borax buffer (pH 8.0) で平衡化したセファデックス G-150 カラムでゲルろ過を行い、F(ab')<sub>2</sub> 分画を単離した。

9. 補体成分および Clq 溶血活性の測定: ヒト Clr と Cls は Gigli らの方法<sup>30)</sup>で、モルモット C2 は Nelson らの方法<sup>31)</sup>で純化した。C3 以降の成分 (C3-C9) は、新鮮モルモット血清を 0.1% セラチンを含む 132 mM NaCl/10 mM EDTA/2 mM barbital buffer (pH 7.5) で 1/37.5 に希釈したもの (C-EDTA) を用いた。感作赤血球 (EA) は、Mayer の方法<sup>32)</sup>に準じ、ウサギ IgM-または IgG-ヘモリジンで羊赤血球を感作して調整した。EA から Borsos と Rapp の方法<sup>33)</sup>に従い、EAC4 cells を作製した。

Clq 溶血活性測定<sup>5)</sup> は、0.1% セラチンを含む 6.9% sucrose/36 mM NaCl/0.15 mM CaCl<sub>2</sub>/0.5 mM MgCl<sub>2</sub>/2 mM barbital buffer (pH 7.4) で段階希釈した Clq 溶液 0.25 ml に等量の EAC4 cells (1.5 × 10<sup>8</sup>/ml) を加え 30°C で 20 分間反応させ、まず EAC1q4 cells にした。次に、ヒト Clr と Cls を加え 30°C で 30 分間反応させた後、モルモット C2 を加え正確に 30°C で 10 分間反応させ、C-EDTA を加え 37°C、90 分間反応させた。反応終了後直ちに冷却し、溶血せずに残った赤血球を遠沈にて沈澱させ、上清の 413 nm における吸光度を測定した。完全溶血を 100% とし、それに対する溶血率 (Y%) を、さらに、 $Z = -\ln(1 - Y/100)$  を計算により求め、活性値は有効分子数 (effective molecules) で表した<sup>33)</sup>。

10. ラテックス凝集反応: Ewald と Schubart の方法<sup>34)</sup>に準じて行った。IgG-ラテックスは、150 mM NaCl/5 mM CaCl<sub>2</sub>/50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.2) 10 ml に 0.1 ml のラテックス粒子懸濁液 (Bacto-latex) を加え、さらに 0.5 ml の 10 mg/ml の濃度のヒト、ウシまたはウサギ IgG を加え室温で約 2-3 分攪拌させて作製した。Clq を 3% BSA を含む 150 mM NaCl/5 mM CaCl<sub>2</sub>/50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.2) で 2 段階希釈した溶液 (250 μg/ml から 250 × 2<sup>-10</sup> μg/ml まで) 0.25 ml に等量の IgG-ラテックス懸濁液を加えよく混和後、2 時間室温に放置し判定した。活性値は、明らかに凝集の認められる Clq の最少濃度で表した。

11. 免疫複合体 (Immune complex, 以下 IC と略す) の作製と IC への結合能の測定: HSA とウサギ抗 HSA の IgG または F(ab')<sub>2</sub> 分画による IC は、それぞれの等量域で抗原と抗体分画を混和し、37°C で 60 分反応させ、

さらに 4°C で 3 日間放置した。形成した沈澱を生理的リン酸緩衝液 (phosphate-buffered saline, PBS) で充分洗浄し、以下の実験に用いた。IC の蛋白量は、Lowry らの方法<sup>35)</sup>によりウサギ IgG を標準蛋白質として求めた。

一定量の IC と 5 mM CaCl<sub>2</sub>/2 mM barbital buffer (pH 7.4) にそれぞれのイオン強度 (3.9, 6.9, 10.2 と 13.3 mS) になるように NaCl を添加した緩衝液中で変量の Clq を 37°C で 30 分反応させた後、遠沈にて上清を回収した。上清中に残った Clq 量を溶血活性と単純放射免疫拡散法<sup>36)</sup>により測定し、IC に結合した Clq 量を算定した。F(ab')<sub>2</sub> で作製した IC は Clq を結合せず、負の対照 (negative control) として用いた。

12. 免疫拡散法: 250 mM NaCl/10 mM EDTA/50 mM Tris/50 mM glycine (pH 8.0) を溶媒とする 2% アガロースゲルを用いた免疫二重拡散法によって行った<sup>37)</sup>。

13. <sup>125</sup>I の標識 (Radioiodination) と solid phase radioimmune inhibition assay: ウシおよびヒト Clq とそのフラグメントをラクトペルオキシダーゼ法<sup>38)</sup>により <sup>125</sup>I で標識した。反応に与からなかった過剰の Na<sup>125</sup>I は、セファデックス G-50 によるゲルろ過で除去した。

solid phase radioimmune inhibition assay は、既報の方法<sup>39)</sup>に準じて行った。概説すると、ポリスチレンチューブに 1 ml の抗体の F(ab')<sub>2</sub> 分画を加え室温で 4 時間固相化した後、1.5 ml の 1% BSA を含む PBS を加え 4°C で一夜放置した。BSA 溶液を除去後、非標識の Clq やそのフラグメントを阻害剤として加え、室温で 3 時間反応させた。PBS で 3 回洗浄後、<sup>125</sup>I で標識した Clq またはフラグメントを一定量加えさらに室温で 4 時間反応させ、PBS で 3 回洗浄後、特異的に結合した <sup>125</sup>I を γ-カウンター (Model 5130: Packard Instrument Co., Inc. Illinois, U.S.A.) で測定した。抗体のない対照 (antibody free control) として正常ウサギ血清より純化した IgG の F(ab')<sub>2</sub> 分画を正の対照 (positive control) として阻害剤の代わりに PBS を用いて同様の試験を行い、下記の式により % inhibition<sup>40)</sup> を求めた。

Percentage inhibition

$$= \frac{\text{cpm in positive control} - \text{cpm in experimental series}}{\text{cpm in positive control} - \text{cpm in antibody free control}} \times 100$$

### III. 結 果

#### 1. Clq 溶血活性

IgM-ヘモリジン (Fig. 3-A) または IgG-ヘモリジン (Fig. 3-B) のどちらで羊赤血球を感作しても、溶血活性

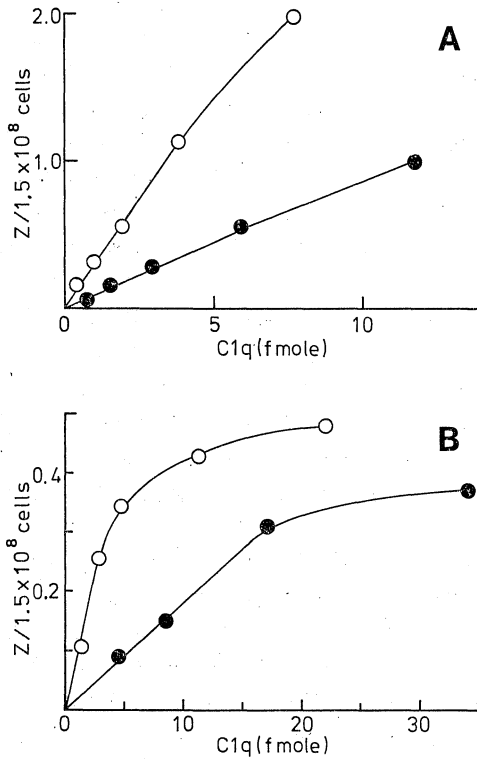


Fig. 3. Hemolytic activity of Clq using erythrocytes with rabbit IgM-(A) and IgG-(B) hemolysin. ○—○, bovine Clq; ●—●, human Clq.

は、ウシ Clq の方がヒト Clq より高値を示した。Clq の比活性は、IgM-ヘモリジンでは、ウシ Clq は  $4.5 \times 10^{10}$  effective molecules/pmol で、ヒト Clq は  $1.4 \times 10^{10}$  effective molecules/pmol、IgG-ヘモリジンでは、ウシ Clq は  $1.4 \times 10^{10}$  effective molecules/pmol でヒト Clq は  $2.8 \times 10^9$  effective molecules/pmol と算定された。

## 2. ラテックス凝集反応

250から  $250 \times 2^{-10}$   $\mu\text{g/ml}$  までの濃度の Clq について、ウシ、ヒト、ウサギ IgG を被覆したラテックス粒子の凝集を調べた結果、ウシ Clq は  $125 \mu\text{g/ml}$  以上の濃度でウシ IgG-およびウサギ IgG-ラテックスを軽度凝集させたが、用いた濃度範囲のウシ Clq はヒト IgG-ラテックスを凝集させなかった。一方、ヒト Clq は  $3.9 \mu\text{g/ml}$  の濃度でもヒト IgG-およびウシ IgG-ラテックスを凝集させ、 $125 \mu\text{g/ml}$  以上の濃度で初めてウサギ IgG-ラテックスを凝集させた。

## 3. IC への結合能

Table 1. Binding ability of bovine and human Clq to human serum albumin-anti-human serum albumin complex at various ionic strength. Values are expressed as amounts of Clq bound ( $\mu\text{g}$ ) to 1 mg of immune complex

Ionic strength (mS)	Bovine Clq	Human Clq
13.3	91.3	126.9
10.2	80.0	127.8
6.9	83.1	136.9
3.8	102.9	139.9

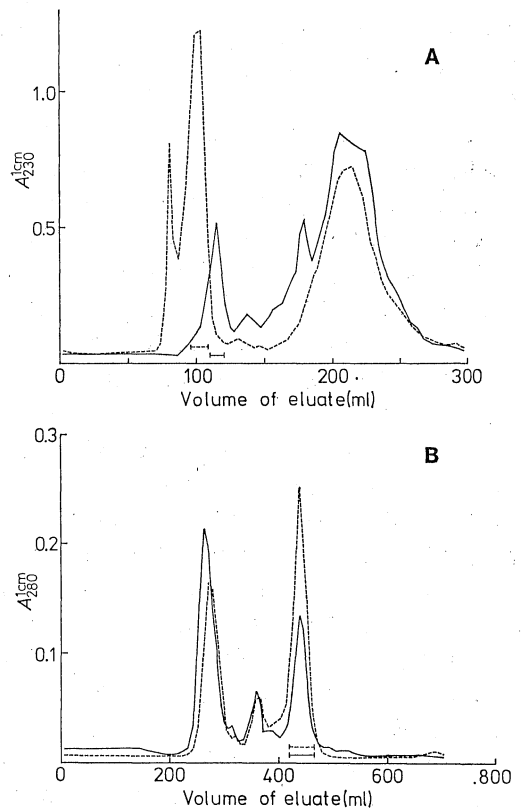


Fig. 4. Gel filtration on Sephacryl S-300 of the supernatant from peptic (A) and collagenase digest (B) of bovine and human Clq.  $A_{280}$  and  $A_{430}$  of enzymic digest of bovine (—) and of human Clq (.....) are shown.

一定量 (1 mg) の IC への Clq の結合量を種々のイオン強度で検討した (Table 1)。ウシ Clq の IC への結合能は、イオン強度に関係なくヒト Clq と比べ低か

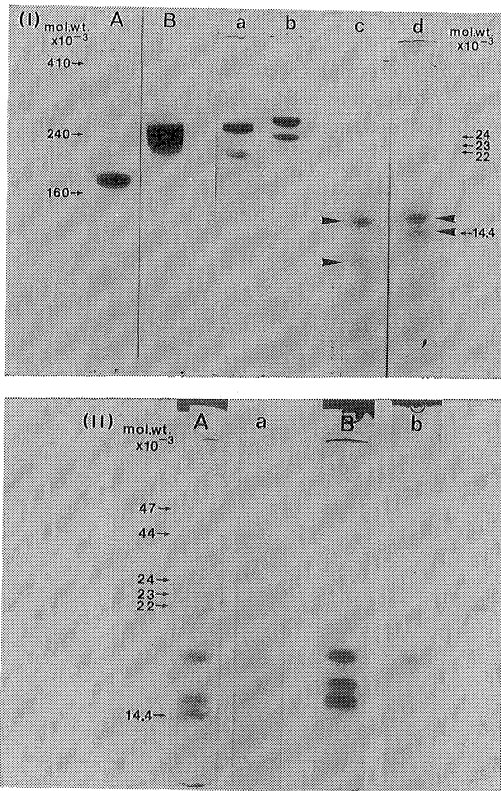


Fig. 5. SDS-PAGE of purified CLF (I) and of purified GF (II) of bovine and human Clq. In (I), A and B: 6% gels; a, b, c and d: 10% gels; bovine and human CLF analyzed in non-dissociating conditions (A and B), in non-reduced urea-treated conditions (a and b), and in reducing conditions (c and d), respectively. In (II), A and B, stained with Coomassie brilliant blue; a and b, stained with Schiff's reagent; bovine GF, A and a; human GF, B and b. The anode is at the bottom.

った。用いた IC 1 mg 中にはウサギ IgG が  $5.3 \times 10^9$  モル含まれていたのでどちらの Clq の分子量も約 40 万とすると、Clq 1 分子がウサギ IgG 15—20 分子に結合することが算定された。

#### 4. CLF および GF の分離とその純度

ウシおよびヒト Clq のペプシン分解物のセファクリル S-300 でのゲルろ過のパターンを Fig. 4-A に示す。ウシ Clq では 230 nm の一番目のピークにペプシン分解物の約 17% の、また、ヒト Clq では二番目のピークに約 30% の蛋白質が溶出され、これらの分画にのみヒドロキシプロリンおよびヒドロキシリジンが含まれてい

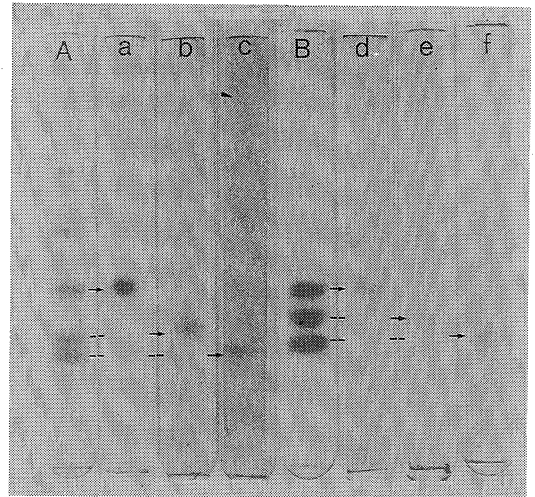


Fig. 6. Purity of three non-covalently linked peptide chains of GF of bovine and human Clq on SDS-PAGE. A and B, bovine and human GF; a, b and c: chains isolated from bovine GF; d, e and f: chains isolated from human GF. The anode is at the bottom.

た。これらの分画を集めて、IgG-セファローズ CL-4B を通過させ、セファクリル S-300 で再度ゲルろ過を行ったものを CLF とした。CLF の収量は、20 mg の Clq からウシでは約 2—3 mg、ヒトでは約 6—7 mg であった。

Clq のコラゲナーゼ分解物のセファクリル S-200 でのゲルろ過のパターンを Fig. 4-B に示す。コラゲナーゼ活性は 280 nm の二番目のピークに認められた。三番目のピークは、ヒドロキシプロリンもヒドロキシリジンも含まないのでこの分画を集めて濃縮後、同じセファクリル S-200 カラムで再度ゲルろ過を行い GF とした。最終的な GF の収量は、30 mg の Clq から、ウシで約 5—6 mg、ヒトでは約 8—10 mg であった。

CLF 最終標品は非解離状態で SDS-PAGE を行うとどちらも単一の染色バンドのみが認められ [Fig. 5-(I)], ウシ CLF [Fig. 5-(I)-A] およびヒト CLF [Fig. 5-(I)-B] の分子量は、それぞれ 170,000 と 240,000 と推定された。どちらの CLF も尿素処理で二種のバンドに分かれた。これらサブユニットの分子量は、ウシ CLF [Fig. 5-(I)-a] は 28,700 と 24,200 で、ヒト CLF [Fig. 5-(I)-b] では 30,800 と 27,400 であり、そのモル比は約 2 : 1 であった。還元アルキル化により、どちらの CLF も二つのバンドに分かれ、それらのペプチド鎖のモル比は約 2 : 1 であった。分子量は、ウシ CLF [Fig. 5-(I)-c] は 14,900

Table 2. Amino acid compositions of CLF and GF from bovine and human Clq

The measured amounts (0.3–0.5 mg) of samples were hydrolysed in 6 M HCl. Results are expressed as residues/100 amino acids. Abbreviation: n. d., not determined

Amino acid	CLF		GF	
	Bovine	Human	Bovine	Human
Hyp	12.1	10.5	0.1	0.2
Asp	5.9	5.7	9.9	8.7
Thr	5.4	2.6	6.1	7.8
Ser	5.6	2.4	10.1	8.2
Glu	7.8	8.5	10.9	10.2
Pro	5.4	8.5	4.6	4.9
Gly	26.4	28.3	10.1	10.5
Ala	4.9	4.5	4.5	4.2
Cys	1.0	1.1	1.9	2.0
Val	1.7	1.3	7.1	7.7
Met	1.5	1.5	0.7	1.5
Ile	4.9	5.4	4.1	3.4
Leu	3.3	3.4	5.8	7.0
Tyr	2.2	1.7	3.9	4.8
Phe	0.4	1.7	7.3	6.8
Hyl	3.6	5.0	0.8	0.7
Lys	2.9	3.8	5.6	4.9
His	1.4	0.8	2.3	2.1
Arg	3.6	3.3	4.3	4.5
Trp	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

と12,000で、ヒト CLF [Fig. 5-(I)-d] は15,200と13,700であった。

GF 最終標品の SDS-PAGE のパターンを Fig. 5-(II) に示す。どちらの GF も3本のペプチド鎖から構成され、それらペプチド鎖のモル比は約1:1:1であった。分子量は、ウシ GF [Fig. 5-(II)-A] は18,300, 15,000と14,400で、ヒト GF [Fig. 5-(II)-B] では19,000, 17,000と15,600であった。ウシ、ヒトどちらの GF も分子量の一番大きいペプチド鎖のみが、シッフ試薬で染色された [Fig. 5-(II)-a と b]。

GF を構成するペプチド鎖を相互分離したものは、SDS-PAGE でそれぞれ唯一のバンドとして染色され (Fig. 6); その純度は約95%以上であった。

5. CLF, GF および GF を構成するペプチド鎖のアミノ酸組成分析

ウシおよびヒト CLF と GF のアミノ酸組成を Table 2 に示す。どちらの CLF も多量のグリシン、ヒドロキシプロリンそして中等度のヒドロキシリジンを含んでお

り、全体としてはよく似ていた。しかし、これら CLF 間では、セリン、フェニルアラニンとヒスチジンの残基数に違いが認められた。一方、ウシ、ヒト GF のアミノ酸組成値はより相同性が高く、メチオニン残基数でのみ顕著な差が認められた。

GF を構成する各ペプチド鎖のアミノ酸組成を Table 3 に示す。ウシ GF では各々のペプチド鎖のアミノ酸組成は互いによく似ており、明らかな違いは、15,000の分子量のペプチド鎖のプロリンの残基数が他の二つのペプチド鎖の約2倍であることと、14,400の分子量のペプチド鎖のシステイン残基数が他のペプチド鎖の約1/2であること位であった。一方、ヒト GF では、これらペプチド鎖のアミノ酸組成は非常によく似ているが、ただ分子量15,600のペプチド鎖のメチオニン残基数が他のペプチド鎖の約2倍であった。また、ウシとヒト GF の互いに相当する分子量を持つペプチド鎖同士を比べてもアミノ酸組成値に高い相同性が認められた。

6. 免疫拡散法による Clq 抗原性解析



Table 3. Amino acid compositions of the three non-covalently linked peptide chains of GF from bovine and human Clq  
 The measured amounts (50–120  $\mu\text{g}$ ) of samples were hydrolysed in 6M HCl. Values are expressed as residues/100 amino acids. Abbreviation: n.d., not determined

Amino acid	Bovine GF			Human GF			
	MW	18300	15000	14400	19000	17000	15600
Hyp		Nil	Nil	Nil	1.5	1.0	1.5
Asp		9.6	9.1	8.3	7.3	7.5	8.9
Thr		5.4	7.1	6.1	6.1	6.7	8.3
Ser		14.5	15.0	16.2	16.8	16.3	12.1
Glu		13.1	13.9	14.8	14.1	13.9	12.1
Pro		3.5	6.2	3.5	4.3	3.8	3.0
Gly		14.9	13.7	15.8	16.5	15.1	12.4
Ala		5.6	6.2	6.2	5.4	5.9	6.8
Cys		1.5	1.3	0.5	0.6	0.8	0.8
Val		5.3	5.1	4.7	5.4	5.9	5.0
Met		0.6	0.8	0.7	0.8	0.8	1.9
Ile		3.7	3.0	2.8	3.6	2.8	2.9
Leu		5.9	5.3	6.2	4.7	6.0	6.5
Tyr		2.6	1.6	2.5	2.4	2.9	3.2
Phe		4.2	3.1	3.1	3.9	3.7	5.1
Hyl		0.7	Nil	Nil	0.3	Nil	0.5
Lys		4.2	3.5	4.2	3.4	3.9	4.6
His		1.2	1.5	1.4	1.7	1.6	1.3
Arg		3.5	3.7	3.0	2.6	2.3	4.4
Trp		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

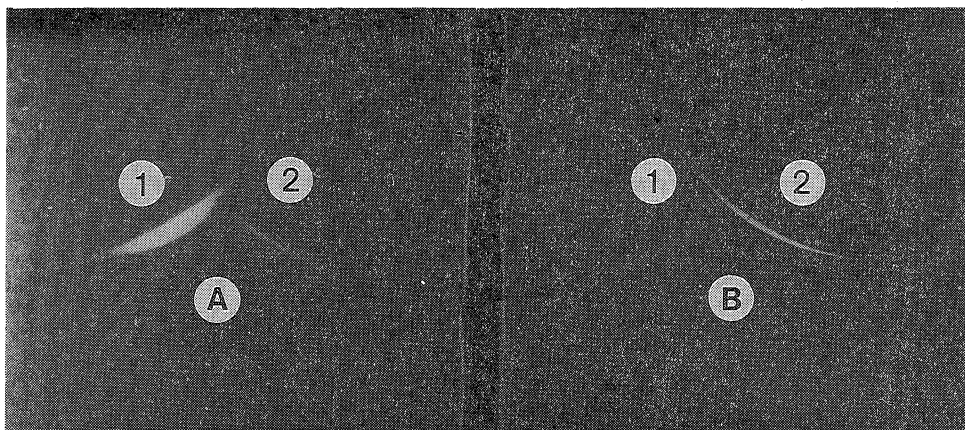


Fig. 7. Double diffusion tests of Clq against  $\text{F(ab')}_2$  of IgG from rabbit antisera. Antibodies used were  $\text{F(ab')}_2$  of IgG from anti-bovine Clq (A) and from anti-human Clq (B). 1, bovine Clq; 2, human Clq.

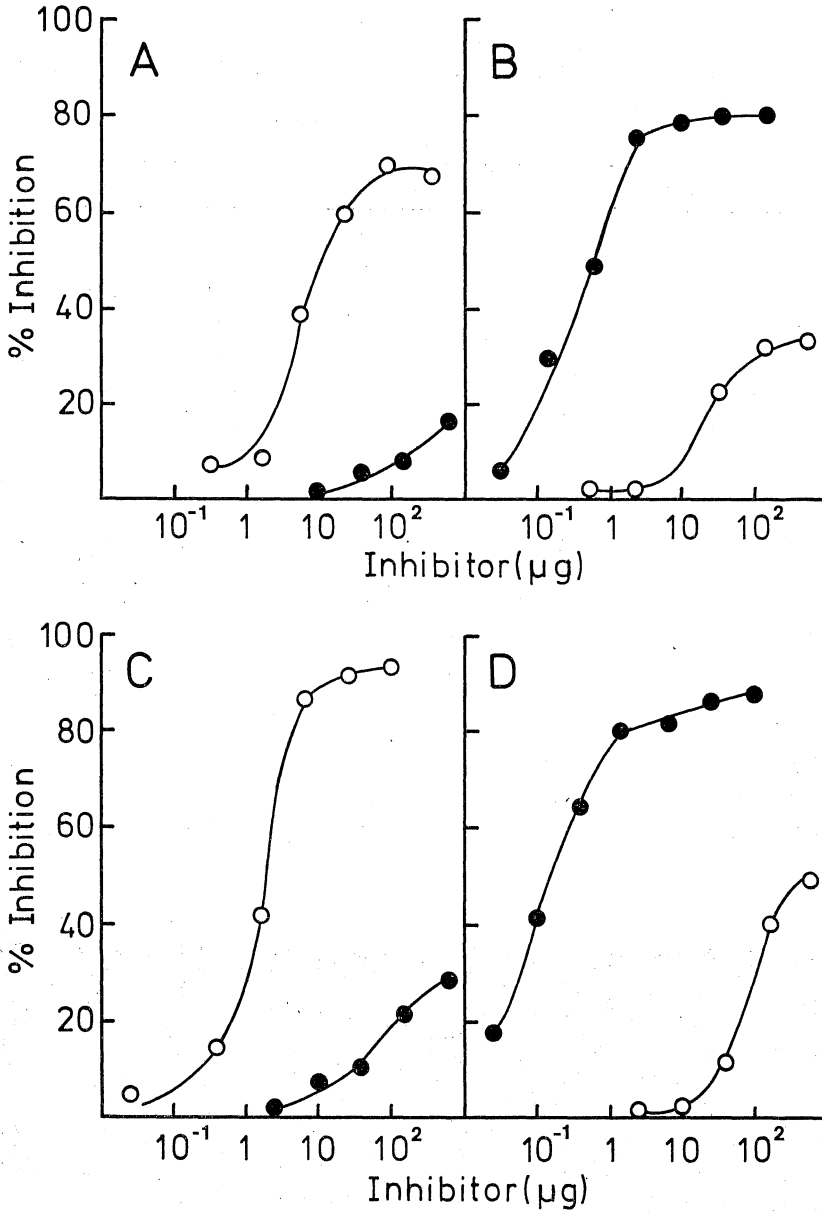


Fig. 8. Inhibition of binding of <sup>125</sup>I-labeled CLF to rabbit anti-CLF antibody (A and B) and of <sup>125</sup>I-labeled GF to rabbit anti-GF antibody (C and D). A: with F(ab')<sub>2</sub> of IgG from anti-bovine CLF. B: with F(ab')<sub>2</sub> of IgG from anti-human CLF. C: with F(ab')<sub>2</sub> of IgG from anti-bovine GF. D: with F(ab')<sub>2</sub> of IgG from anti-human GF. Inhibitors used were unlabeled bovine CLF (○ in A and B), human CLF (● in A and B), Bovine GF (○ in C and D) and human GF (● in C and D).

それぞれの特異抗血清の IgG 分画の F(ab')<sub>2</sub> を用いて、ヒトおよびウシ Clq の抗原性を二重拡散法により解析した (Fig. 7). どちらの Clq も、同種の Clq で作製した抗体の F(ab')<sub>2</sub> と唯一の明瞭な沈降線を形成し、異種 Clq で作製した抗体の F(ab')<sub>2</sub> とは一本の弱い沈降線を形成した。また、これらの沈降線には同種 Clq とその抗体の作る強い沈降線方向に spur が形成された。

#### 7. Radioimmune inhibition assay

ウシとヒト Clq 間に見られた抗原性の交差反応が、CLF か GF のどちらの抗原性によるのかを調べるために Radioimmune inhibition assay を行った (Fig. 8). 抗 CLF 抗体を用いても (Fig. 8-A と B), 抗 GF 抗体を用いても (Fig. 8-C と D) どの場合にも、程度に差はあるが、抗体の作製に用いた同種の Clq のフラグメントでは最も強い阻害が認められ、異種のもののフラグメントでも明らかな阻害が認められ、Clq 分子内の CLF と GF のどちらの部位も抗原性の交差反応に関与することが示された。

### IV. 考 察

本研究は、ウシ Clq, その分子内 CLF と GF を純化し、ヒト Clq およびその CLF と GF との生物学的活性ならびに理化学的性状の比較研究を行ったものである。

EAC4 cell 上の Clq site の形成程度をヒト Clr, Cls を用いて算定した Clq 溶血活性は、ウサギ IgM- と IgG-ヘモリジンのどちらを用いた場合も低イオン強度の緩衝液中で行った方が生理的イオン強度 (13.3 mS) で行った時より約 3-5 倍高くなるという予備実験の結果に基づいて、今回の実験は 3.8 mS のイオン強度 (NaCl 濃度で 0.040 M) の緩衝液中で EAC4 と Clq を反応させて測定した。この測定系では、ウシ Clq もヒト Clq も明らかに溶血活性を示し、特にウシ Clq は、どちらのヘモリジンを用いた系でもヒト Clq より約 2-3 倍に及ぶ高い活性を発現することが示された (Fig. 3)。

HSA とウサギ抗 HSA 抗体で作製した IC への Clq の結合能は、ヒト Clq の方がウシ Clq に比べてやや高値を示した (Table 1). IC への Clq の結合性は、イオン強度によりあまり影響されないことが示されたが、このことは既存の報告<sup>41)42)</sup>と一致するものである。一方、IgG-ラテックス凝集能は、IgG の由来する動物種によりウシ Clq とヒト Clq 間に顕著な差が認められた。しかし、ウサギ IgG で被覆したラテックス粒子を用いた場合は大した差違は認められず、このことは前述の IC への結合能の結果と矛盾するものではない。以上

の結果は、Clq の C1 形成能 (溶血活性) と Fc 結合能の間には直接的な関連性がないことを示すものであり、Clq 分子内の二つのドメインが持つ生物学的活性はドメイン間で互いに独立して機能を発現しているものであると考えられた。

ウシ CLF の分子量は 170,000 でありヒト CLF の分子量 240,000 よりかなり小さくなるが [Fig. 4-A, 5-(I)], ウシおよびヒト Clq の分子量が約 41 万であることとコラーゲナーゼ分解で得られる GF がウシおよびヒトでどちらも約 5 万と推定されることから (Fig. 4-B), CLF の動物間での分子量の違いはドメイン構造そのものの相違によるとするよりも、ペプシンの切断点がウシ Clq の方がヒト Clq よりも N 末端側寄りであると考え方が妥当と思われる。

アミノ酸組成値 (Table 2) を比較すると CLF と GF とともにウシおよびヒト両者間に高い相同性が見られ、さらに各動物の GF 構成ペプチド鎖 3 種間 (Table 3) にも高い相同性が見られた。また、純化 CLF ならびに GF の非還元状態および還元状態における SDS-PAGE での解析 (Fig. 5) から、ウシおよびヒト CLF とともに 3 種の異なったペプチド鎖が鎖間ジスルフィド結合で重合していることを、また、どちらの GF も 3 種の異なったペプチド鎖が非共有結合で重合していることが示された。さらに、Clq の抗原性の解析結果 (Fig. 7, 8) は、ウシ、ヒト両者間に、Clq 全分子間に抗原性の交差反応が認められる他、分子内 CLF と GF の両方の間にも抗原性の交差反応があることを示すものであった。以上の理化学的性状ならびに抗原性解析の結果を総合すれば、ウシ Clq とヒト Clq は、唯単に一次構造において高い相同性を示すだけでなく、ペプチド構造も本質的に同じと考えられ、抗原決定基として働く高次構造においても極めて類似していることを示すものと結論付けられる。

これらの事実より、コラーゲン類似構造を持つ Clq なる蛋白質は、抗体の Fc 領域を初めレトロウイルスやリポド A など、さらに細胞外間質の主成分であるフィブロネクチン<sup>43)</sup>などに結合し、後続補体成分を活性化するという、その極めて重要な生物学的機能のために、その基本構造が分子進化の過程を通じてよく保持されているように思われる。既に著者ら<sup>44)</sup>により鳥類の Clq も純化され、Alexander と Steiner<sup>45)</sup>により両生類の Clq も純化されているが、これら Clq の理化学的性状も、ヒト、ウシ Clq のものと酷似したものであるという事実は、Clq 分子が分子進化を通じてかなり古くから保持されて来ているという考え方を間接的に示すものであろう。また、Clq 分子内 CLF と I, III 型コラーゲンの

間にも構造上の類似がみられているが(著者ら, 未発表)分子内の約半分にコラーゲン様構造を持ち, 残り約半分に球状部位を持つ C1q の様な「準コラーゲン分子」とも言えるファミリー (Family) は, ちょうど, 免疫グロブリンが進化と共に抗原への結合性に与る Fab とエフェクター細胞上のレセプターへの情報に関与する Fc という分子内ドメインを同一分子内に兼ね備えていったとも考えられる過程と同様に, 動物の進化と共に, 細胞外間質と体液成分の間の接着因子として双方の役割を兼ね備えた分子として進化してきたものとも考えられるものであろう。

## V. 結 語

ウシ C1q, その分子内 CLF と GF を純化し, ヒト C1q ならびにその CLF と GF との生物学的活性と理化学的性状の比較研究を行い, 以下の結果が得られた。

1. ウシ C1q は, ヒト C1q に比べて IgM- と IgG-ヘモリジンどちらを用いた場合も高い溶血活性を示した。一方, IC への結合能は, ヒト C1q の方がウシ C1q に比べてやや高かった。
2. ウシ C1q, CLF と GF は, ヒトのそれらと同じペプチド鎖構造をもち, アミノ酸組成値を比較すると CLF 間で中等度の, GF ならびに GF を構成するペプチド鎖間で高い相同性が認められた。
3. 免疫拡散法と radioimmune inhibition assay で, C1q 分子間に抗原性の交差反応がみられ, 交差反応に関与する部位は, CLF と GF の両ドメインにあった。また, CLF には, I, III型コラーゲンと抗原性の交差反応がみられた。

(稿を終えるにあたり, 終始御懇篤なる御指導, 御校閲を賜った榎葉周三教授ならびに米増國雄助教授に深謝を捧げると共に, 御校閲を賜った公衆衛生学教室森山忠重教授ならびに生化学教室神谷知彌教授に深謝いたします。

なお, 本論文の要旨は第56回日本生化学会大会および The 5th International Congress of Immunology において発表した。)

## 文 献

- 1) Porter, R.R. and Reid, K.B.M.: The biochemistry of complement. *Nature* 275: 699-704, 1978
- 2) Cooper, N.R. and Morrison, D.C.: Binding and activation of the first component of human complement by lipid A region of lipopolysaccharides. *J. Immunol.* 120: 1862-1868, 1978.
- 3) Bartholomew, R.W. and Esser, A.F.: Mechanism of antibody-independent activation of the first component of complement (C1) on retrovirus membranes. *Biochemistry* 19: 2847-2853, 1980.
- 4) Linder, E.: Binding C1q and complement activation by vascular endothelium. *J. Immunol.* 126: 648-658, 1981.
- 5) Yonemasu, K. and Stroud, R.M.: C1q: rapid purification method for preparation of monospecific antisera and for biochemical studies. *J. Immunol.* 106: 304-313, 1971.
- 6) Yonemasu, K., Stroud, R.M., Niedermeier, W. and Butler, W.T.: Chemical studies on C1q: a modulator of immunoglobulin biology. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 43: 1388-1394, 1971.
- 7) Reid, K.B.M., Gagnon, J. and Frampton, J.: Completion of the amino acid sequences of the A and B chains of subcomponent C1q of the first component of human complement. *Biochem. J.* 203: 559-569, 1982.
- 8) Reid, K.B.M.: Molecular cloning and characterization of the cDNA and gene coding for the B-chain of C1q of the human complement system. *Biochem. J.* 231: 729-735, 1985.
- 9) Sellar, G.C., Goundis, D., McAdam, R., Solomon, E. and Reid, K.B.M.: Cloning and chromosomal location of the A chain of human C1q. *Complement* 4: 225, 1987.
- 10) Shelton, E., Yonemasu, K. and Stroud, R.M.: Ultrastructure of the human complement component, C1q. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 69: 65-68, 1972.
- 11) Shinkai, H. and Yonemasu, K.: Hydroxylysine-linked glycosides of human subcomponent C1q of various collagens. *Biochem. J.* 177: 847-852, 1979.
- 12) Mizuochi, T., Yonemasu, K., Yamashita, K. and Kobata, A.: The asparagine-linked sugar chains of subcomponent C1q of the first component of human complement. *J. Biol. Chem.* 253: 7404-7409, 1978.
- 13) Reid, K.B.M.: Isolation, by partial pepsin digestion, of the three collagen-like regions present in subcomponent C1q of the first component of human complement. *Biochem. J.* 155: 5-17, 1976.

- 14) **Hughes-Jones, N.C. and Gardner, B.:** Reaction between the isolated globular sub-units of the complement component Clq and IgG-complexes. *Mol. Immunol.* **16:** 697-701, 1979.
- 15) **Pâques, E.P., Huber, R. and Priess, H.:** Isolation of the globular region of the subcomponent q of the Cl component of complement. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **360:** 177-183, 1979.
- 16) **Reid, K.B.M., Sim, R.B. and Faiers, A.P.:** Inhibition of the recognition of the haemolytic activity of the first component of human complement by a pepsin-derived fragment of subcomponent Clq. *Biochem. J.* **161:** 239-245, 1977.
- 17) **Strang, C.J., Siegel, R.C., Phillips, M.L., Poon, P.H. and Schumaker, V.N.:** Ultrastructure of the first component of human complement: Electron microscopy of the cross-linked complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **79:** 586-590, 1982.
- 18) **Campbell, D., Booth, N.A. and Fothergill, J.E.:** Purification and characterization of subcomponent Clq of the first component of bovine complement. *Biochem. J.* **177:** 531-540, 1979.
- 19) **Yonemasu, K., Sasaki, T. and Shinkai, H.:** Purification and characterization of subcomponent Clq of the first component of bovine complement. *J. Biochem.* **88:** 1545-1554, 1980.
- 20) **McDonald, T.L. and Burger, D.:** Purification of subunit Clq from the first component of equine complement. *Immunology* **37:** 517-527, 1979.
- 21) **Conradie, J.D., Volanakis, J.E. and Stroud, R.M.:** Evidence for a serum inhibitor of Clq. *Immunochemistry* **9:** 545-554, 1972.
- 22) **Davis, B.J.:** Disc electrophoresis-II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **121:** 404-427, 1964.
- 23) **Fairbanks, G., Stech, T.L. and Wallach, D.F.E.:** Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry* **10:** 2606-2617, 1971.
- 24) **Kapitany, R.A. and Zebrowki, E.J.:** A high resolution PAS stain for polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* **56:** 361-369, 1973.
- 25) **Otto, M. and Šnejdárková, M.:** A simple and rapid method for the quantitative isolation of proteins from polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* **111:** 111-114, 1981.
- 26) **Hirs, C.H.W.:** The oxidation of ribonuclease with performic acid. *J. Biol. Chem.* **219:** 611-621, 1956.
- 27) **Fahey, J.L. and McKelvey, G.:** Quantitative determination of serum immunoglobulins in antibody-agar plates. *J. Immunol.* **94:** 84-93, 1965.
- 28) **Nisonoff, A.:** Enzymatic digestion of rabbit gamma globulin and antibody and chromatography of digestion products. *Meth. Med. Res.* **10:** 134-149, 1964.
- 29) **Gigli, I., Porter, R.R. and Sim, R.B.:** The unactivated form of the first component of human complement, Cl. *Biochem. J.* **157:** 541-548, 1976.
- 30) **Nelson, R.A., Jensen, J., Gigli, I. and Tamura, N.:** Methods for the separation, purification and measurement of nine components of hemolytic complement in guinea-pig serum. *Immunochemistry* **3:** 111-135, 1966.
- 31) **Mayer, M.M.:** Complement and complement fixation. *in* *Experimental immunochemistry* (Kabat, E.A. and Mayer, M.M., eds.). 2nd ed., Chales C Thomas Publisher, Springfield, Illinois, U.S.A. p 133-240, 1961.
- 32) **Borsos, T. and Rapp, H.J.:** Chromatographic separation of the first component of complement and its assay on a molecular basis. *J. Immunol.* **91:** 851-858, 1963.
- 33) **Ewald, R.W. and Schubart, A.F.:** Agglutinating activity of the complement component C'1q in the F-II latex test. *J. Immunol.* **97:** 100-105, 1966.
- 34) **Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.:** Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193:** 265-275, 1951.
- 35) **Mancini, G., Carbonara, A.O. and Heremans, J.F.:** Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry* **2:** 235-254, 1965.
- 36) **Yonemasu, K.:** Anti-human Clq: rapid and simple method for preparing monospecific antisera. *J. Immunol. Methods* **9:** 185-194, 1975.
- 37) **Morrison, M., Bayse, G.S. and Webster, R.G.:** Use of lactoperoxidase catalyzed iodination in immunochemical studies. *Immunochemistry* **8:** 289-

- 297, 1971.
- 39) **Askenes, P.W. and Leonard, E.J.:** Solid phase radioimmunoassay of human  $\beta_2$  globulin. *Immunochemistry* **7**: 29-41, 1970.
- 40) **Minden, P. and Farr, R.S.:** Ammonium sulphate method to measure antigen-binding capacity. *in* Handbook of Experimental Immunology (Weir, D.M., ed.). Chapter 13, Blackwell Scientific Publications, London, 1978.
- 41) **Lin, T. and Fletcher, D.S.:** Interaction of human Clq with insoluble immunoglobulin aggregates. *Immunochemistry* **15**: 107-117, 1978.
- 42) **Emanuel, E.J., Brampton, A.D., Burton, D.R. and Dwek, R.A.:** Formation of complement subcomponent Clq-immunoglobulin G complex. Thermodynamic and chemical-modification studies. *Biochem. J.* **205**: 361-372, 1982.
- 43) **Menzel, E.J., Smolen, J.S., Liotta, L. and Reid, K.B.M.:** Interaction of fibronectin with Clq and its collagen-like fragment (CLF). *FEBS lett.* **129**: 188-192, 1981.
- 44) **Yonemasu, K. and Sasaki, T.:** Purification, identification and characterization of chicken Clq, a subcomponent of the first component of complement subcomponent of the first component of complement. *J. Immunol. Methods* **88**: 245-253, 1986.
- 45) **Alexander, R.J. and Steiner, L.A.:** The first component of complement from the bullfrog *Rana catesbeiana*: functional properties of C1 and isolation subcomponent Clq. *J. Immunol.* **124**: 1418-1425, 1980.