

C5b-8複合体のタンパク分解：  
C5b-8複合体中におけるC8サブユニットの役割

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/9077">http://hdl.handle.net/2297/9077</a>

## C5b-8 複合体のタンパク分解： C5b-8 複合体中における C8 サブユニットの役割

金沢大学がん研究所分子免疫部（指導：右田俊介教授）

川 島 孝 則

（昭和58年5月13日受付）

ヒト補体第8成分（C8）は、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 鎖の3本鎖から構成されている。 $\alpha$ 鎖は $\gamma$ 鎖とジスルフィド結合によって $\alpha$ - $\gamma$ 鎖を形成し、 $\alpha$ - $\gamma$ 鎖は $\beta$ 鎖と非共有結合によって結合している。今回C8に対するタンパク分解酵素の作用を、freeのC8とC5b-8複合体に組み込まれた状態のC8とで比較した。freeのC8では $\alpha$ - $\gamma$ 鎖も $\beta$ 鎖も両方とも、タンパク分解酵素（トリプシンおよびキモトリプシン）によって分解された。各サブユニットの分解速度を比べると、 $\beta$ 鎖は $\alpha$ - $\gamma$ 鎖よりもトリプシンおよびキモトリプシンの作用を受けやすかった。 $\beta$ 鎖からはトリプシンの作用により、分子量54,000および44,000のフラグメントを生じた。還元状態では、分子量54,000のフラグメントは分子量38,000と18,000のフラグメントに、分子量44,000のフラグメントは分子量26,000と18,000のフラグメントに、それぞれ分解された。トリプシン分解によって生ずるフラグメントが、還元と非還元状態により異なることから、 $\beta$ 鎖には鎖内ジスルフィド結合の存在することが示唆された。C5b-7複合体にC8が結合すると、 $\beta$ 鎖はトリプシンおよびキモトリプシンでは全く分解されなくなった。一方、 $\alpha$ - $\gamma$ 鎖はこれら2種類のタンパク分解酵素で分解はされたが、freeのC8とは全く異なる部位で切断された。さらに機能面での影響として、C5b-8複合体のトリプシン処理により、C5b-8複合体に存在するC9結合能および溶血活性が抑制された。タンパク分解酵素の作用部位が基質タンパクの分子表面であって、高次構造の内部は分解を受けにくいとすれば、以上の結果はC5b-7複合体とC8との結合にはC8の $\beta$ 鎖が関与し、C5b-8複合体とC9との結合にはC8の $\alpha$ - $\gamma$ 鎖が関与しているを示唆している。

**Key words** human complement, proteolysis, membrane attack mechanism

補体の示す様々な生体活性のひとつに、膜に対する傷害作用がある。補体が赤血球に作用すれば溶血をおこし、細菌・細胞に作用すれば溶菌・細胞融解をひきおこす。

補体成分は現在約20種類の成分が知られているが、このうち膜に直接作用して膜を傷害するのは、C5b、C6、C7、C8、C9の5成分である<sup>1)2)</sup>。C5bはC5コンベルターゼの作用により生じたC5のフラグメントである<sup>3)</sup>。この5成分が膜上で番号順に分子集合してC5b-9複合体を形成し、膜攻撃複合体（membrane attack complex, 以下MACと略）となり、膜に傷害を与える<sup>4)7)</sup>。しかしMACのなかで各成分がどのように結合しあい、また膜とどのように作用して傷害を

起こすのかは不明である。

5成分のなかでも、C8は構造的にも機能的にも特異な存在である。C8は三本鎖（ $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 鎖）から成るタンパクで、 $\alpha$ 鎖は $\gamma$ 鎖とジスルフィド結合によって $\alpha$ - $\gamma$ 鎖を形成し、 $\alpha$ - $\gamma$ 鎖は $\beta$ 鎖と非共有結合によって結合している<sup>8)</sup>。さらに補体が結合した感作ヒツジ赤血球（EAC；補体に関する研究に使われる略号で、Eは赤血球、Aは感作抗体、Cは補体を意味する）は、EAC1-8の状態では徐々に溶血することが知られている<sup>9)10)</sup>。

C5b-8までの段階で僅かながらも溶血がおこることから、C8は膜傷害の最初の段階に関与しているものと思われる。またC8を介して多分子のC9が結合

Proteolysis of the C5b-8 Complex: The Role of the Subunits of C8 in the C5b-8 Complex.  
**Takanori Kawashima**, Department of Molecular Immunology, Cancer Research Institute,  
Kanazawa University.

した時、溶血は飛躍的に増大することから、C8が膜傷害に重要な働きをしていると考えられる<sup>7,11</sup>。

MACの膜傷害作用を解析するのに、リポゾーム人工膜を用いることは非常に有用である。生体膜における様々な構造物(糖やタンパクなど)の影響を除外できるし、人工膜であるから膜の修復もみられない。したがって、MACの傷害作用を、MACと膜だけの関係に単純化できるのである。

リポゾーム膜上にMACが形成される過程で、C8がはたしている役割を調べるため、今回の実験をおこなった。そこで、C8に対するタンパク分解酵素の作用について、精製したC8と複合体に組み込まれたC8とで比較し、C8が複合体に組み込まれることによって生ずる構造的な変化をとらえた。またC5b-8複合体をタンパク分解酵素で処理することにより、C5b-8複合体とC9との関係を明らかにした。その結果、C8の高次構造とC5b-9複合体中におけるC8の役割を示唆する実験結果を得ることができた。

## 材料と方法

### 1. 試薬類

トリプシン、キモトリプシン、soybean trypsin inhibitor (以下SBTIと略)(以上3種, PL Biochemicals, Inc., Milwaukee, WI); dimyristoyl phosphatidyl choline (以下DMPCと略)(Sigma Chemical CO., St. Louis, CA); glucose oxidase, lactoperoxidase (以上2種, Calbiochem, La Jolla, CA); デオキシコール酸ナトリウム (sodium deoxycholate, 以下DOCと略), ジチオスレイトール (dithiothreitol, 以下DTTと略)(以上2種, 半井化学); ラウリル硫酸ナトリウム (sodium dodecyl sulfate, 以下SDSと略), エチレンジアミン四酢酸 (ethylenediaminetetraacetic acid, 以下EDTAと略)(以上2種, 和光純薬); キャリアフリーの放射性ヨウ素 (NaI: [<sup>125</sup>I] および [<sup>131</sup>I]) (New England Nuclear) これらの試薬類はそれぞれ括弧内に記入した市販品を用いた。

### 2. ヒト補体成分の精製

C5b-6はYamamotoらの方法<sup>12,13</sup>、C7はPodackらの方法<sup>14</sup>、C8はKolbらの方法<sup>8</sup>、C9はBieseckerらの方法<sup>15</sup>により、ヒトプール血清からそれぞれ精製した。C5b-9二量体はBieseckerらの方法<sup>5</sup>に従い、ヒト血清により溶血したウサギ赤血球膜から単離した。C5b-9単量体はYamamotoらの方法<sup>10</sup>に従い、ごく少量のC9(30 µg/ml)を含むC9欠損ヒト血清(2倍希釈)に反応したウサギ赤血球(2 × 10<sup>9</sup>/ml)から単離した。この条件ではウサギ赤血球はほとんど溶血せず、赤血球膜上にはC5b-9単量体が

形成されていた<sup>10</sup>。

### 3. 放射性ヨウ素によるタンパクの標識

lactoperoxidase法<sup>17</sup>を用いて精製C8を<sup>131</sup>Iで、精製C9を<sup>125</sup>Iでそれぞれ標識した。

### 4. リポゾームに結合したC5b-8複合体の調製

リポゾームはLittmanらによって報告されている方法<sup>18</sup>に従い、DMPCを用いて調製した。DMPCのクロロホルム溶液をチッ素ガスでエバポレートし、残渣に1%DOCを含む20mM トリス-酢酸緩衝液(0.1M NaCl, 0.1mM EDTA, 0.01%NaN<sub>3</sub>, pH 8.1)を加え、DMPCの濃度が最終10mMになるようにした。Branson B-12 sonifierを用い、40mWで15分間sonicateし、透析によりDOCを除いた後、さらに5分間40mWでsonicateしてDMPCリポゾームを調製した。

調製したリポゾームをC5b-6(23.2 µg)、C7(16.1 µg)とともに37°Cで10分間保温した後、<sup>131</sup>Iで標識したC8(<sup>131</sup>I-C8)を加え、さらに10分間37°Cで保温した。この溶液(0.5 ml)に66% (wt/wt) ショ糖液を0.55 ml 加え、最終ショ糖濃度を40%とした。Yamamotoによって報告されている方法<sup>13</sup>に従い、前出のトリス-酢酸緩衝液(pH 8.1)で作製した35%ショ糖溶液(3.0 ml)とさらに同じトリス-酢酸緩衝液(1.0 ml)とを重ねた後、Beckman SW 50.1 ローターを用いた不連続密度勾配超遠心をおこない(4°C, 45,000 rpm, 16時間)、リポゾーム画分を得た。

### 5. ショ糖連続密度勾配超遠心法による沈降係数の解析

10% (wt/v) から50% (wt/v) のショ糖による連続密度勾配を、0.1M NaCl, 0.1mM EDTA, 0.01% NaN<sub>3</sub>, 1%DOCを含む20mM トリス-酢酸緩衝液(pH 8.1)にて調製した。超遠心はBeckman SW 50.1 ローターを用い、4°Cで16時間、36,000 rpmで行った。遠心後、遠心チューブの底に穴をあけ、5滴ずつフラクションチューブにあつめ、その放射活性をAuto-Gamma Scintillation Spectrometer (Packard)で測定した。C5b-9二量体(33S)、C5b-9単量体(23S)、C7(5.6S)を沈降係数のマーカーとした。

### 6. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, 以下SDS-PAGEと略)

泳動試料(タンパク量約25 µg)は、非還元の場合には2%SDSと15mM ヨードアセトアミドを加え、還元する場合には2%SDSと20mM DTTを加え、それぞれ100°Cで2分間煮沸した。Weberらの方法<sup>19</sup>に従い、0.1%SDSを含む0.1M リン酸緩衝液(pH 7.2)を泳動用緩衝液とし、ゲル濃度は7.5%を用いた。泳動

終了後、ゲルを Coomassie Brilliant Blue G 250 にて染色、または 2 mm 幅に切断してその放射活性を測定した。

### 7. 溶血活性の測定

ヘモリジン(感作抗体)、C1、C4bの結合したヒツジ赤血球 (EAC I $\bar{4}$ ) は、飯田らにより報告されている方法<sup>20)</sup>で作製した。C8 枯濁血清 (C8 depleted serum, 以下 C8 dS と略) は、抗ヒト C8 カラムに正常ヒト新鮮血清を通し、C8 だけをカラムに免疫吸着させることにより調製した<sup>21)</sup>。EAC 1-7 は、EAC I $\bar{4}$  ( $4 \times 10^8$ /ml) 10 ml と C8 dS 0.5 ml を、37°C で 20 分間保温して作製した。

C8 の溶血活性測定には、EAC 1-7 に limiting factor として C8 を希釈して加え、過剰の C9 とともに 37°C、20 分間保温した。反応停止には 0.15 M NaCl を加えてただちに遠心し、未溶血の赤血球を分離した後、上清中のヘモグロビンを 412 nm の吸光度で測定した。

C9 の溶血活性測定には、EAC 1-8 とともに limiting factor として C9 を希釈して用い、C8 の溶血活性

測定の場合と同様の操作を行った。

### 成 績

#### 1. タンパク分解酵素による精製 C8 の分解

トリプシンおよびキモトリプシンによる C8 分解の経時的变化を SDS-PAGE で分析し、その結果を図 1 と図 2 に示した。図 1 は非還元、図 2 は還元 SDS-PAGE である。C8 (基質) 25  $\mu$ g とタンパク分解酵素 0.5  $\mu$ g とを 37°C (pH 7.5) で保温し、一定時間後に酵素の 2 倍量の SBTI (soybean trypsin inhibitor) を加えて反応を停止させ、SDS-PAGE の泳動試料とした。放射性ヨウ素で標識した C8 を非還元 SDS-PAGE で分析した場合、 $\beta$  鎖に比べ  $\alpha$ - $\gamma$  鎖の放射活性ははるかに弱かった<sup>9)</sup>(図 3, Control)。しかも還元して  $\alpha$  鎖と  $\gamma$  鎖とを分離した場合、 $\alpha$ - $\gamma$  鎖における放射活性はほとんど  $\gamma$  鎖に存在していた(図 2, Control)。したがって C8 を構成する 3 本鎖のうち、放射性ヨウ素で標識されるのは  $\beta$  鎖と  $\gamma$  鎖で、 $\alpha$  鎖はほとんど標識されなかったため、 $\alpha$ - $\gamma$  鎖と  $\beta$  鎖の分解過程を区別することができた。

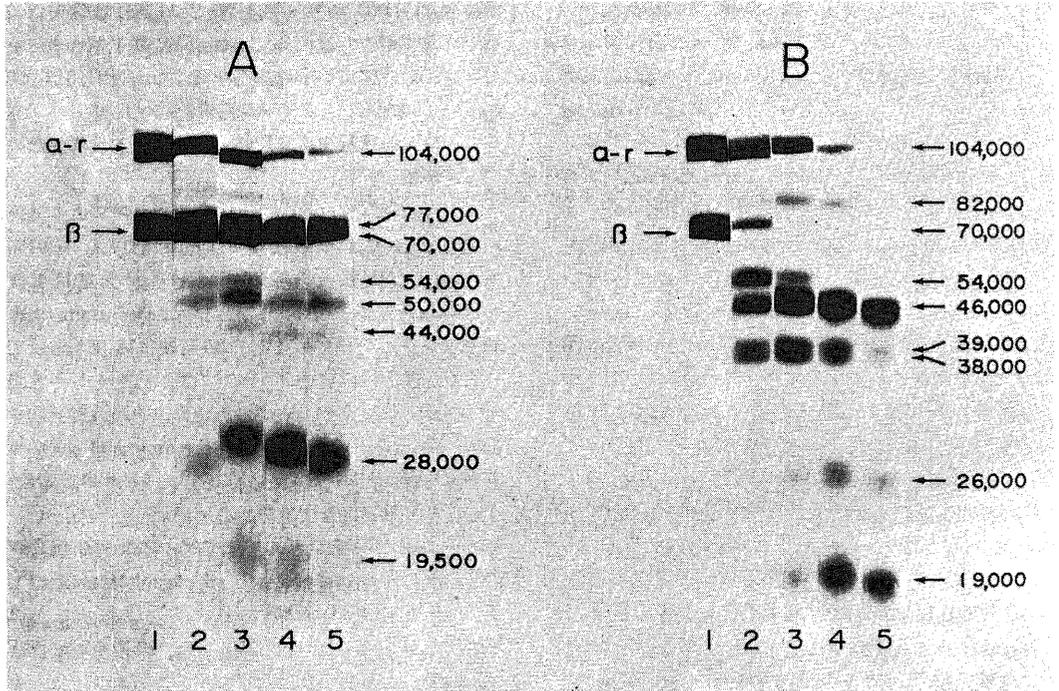


Fig. 1. Sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis of C8 fragments produced by trypsin and chymotrypsin. C8 was digested with trypsin (A) or chymotrypsin (B) at 37°C (enzyme/substrate=1/50, wt/wt): lane 1, control; lane 2, 10 min; lane 3, 20 min; lane 4, 40 min; lane 5, 60 min. After the indicated incubation time, the reaction was stopped by addition of SBTI, and analyzed under nonreducing condition.

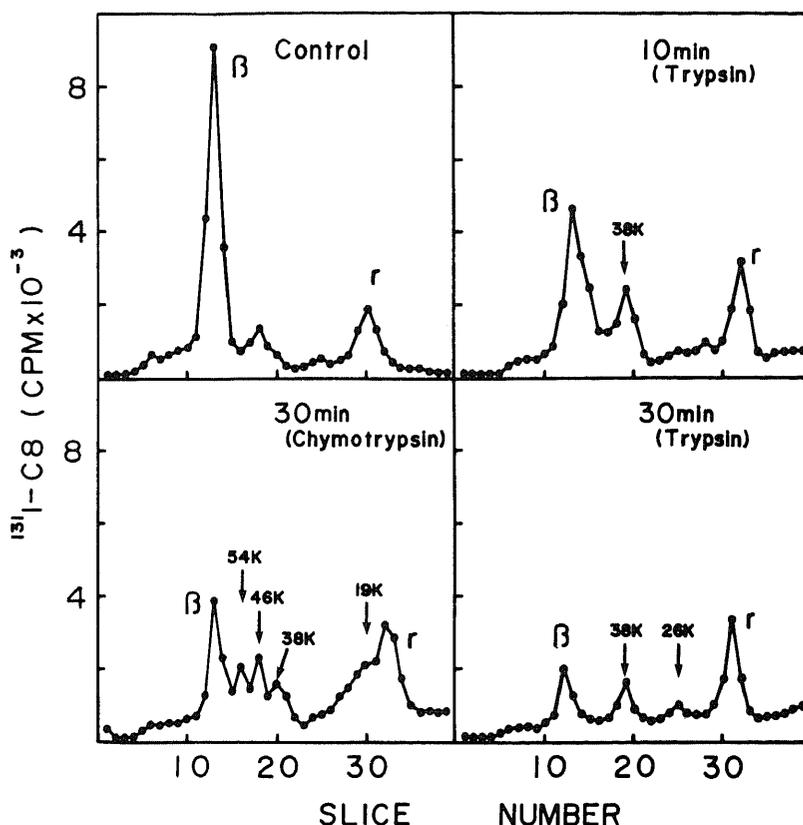


Fig. 2. Cleavage by proteolytic enzymes of  $^{131}\text{I}$ -C8. The incubation conditions were the same as in Fig. 1. The samples were analyzed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis under reducing conditions. The gels were cut into 2mm segments, and counted its radioactivities. Control shows the radioiodinated  $\beta$ - and  $\gamma$ -chains of C8.

### 1) 精製 C8 のトリプシン分解

還元 SDS-PAGE によれば、トリプシンの作用により  $\beta$  鎖(分子量 70,000)からは、分子量 38,000 のフラグメント (fragment, 以下 Fr と略) と  $\gamma$  鎖(分子量 18,000) とほぼ同じ分子量をもつ Fr とが生じた(図 2, Trypsin 10 min). 分子量 38,000 の Fr はさらに分子量 26,000 の Fr に分解された(図 2, Trypsin 30 min). 分子量 38,000 または分子量 26,000 の Fr と分子量 18,000 の Fr とが、ジスルフィド結合により結合しているとすれば、非還元 SDS-PAGE においてみられる分子量 54,000 および 44,000 の Fr と、分子量の一致がみられた(図 1, A).

したがって非還元状態で、 $\beta$  鎖はトリプシンによりまず分子量 54,000 の Fr に分解され、この Fr はさらに分子量 44,000 の Fr に分解されると考えられる。しかもこれらの Fr は、それぞれ分子量 38,000 と 18,000 あるいは分子量 26,000 と 18,000 の Fr が、ジスル

フィド結合によって結合していると思われる。このことは  $\beta$  鎖には鎖内ジスルフィドの結合のループが存在し、このループのなかにトリプシンによる切断部位があることを示唆している。

以上の  $\beta$  鎖の分解物を除外して考えると、 $\alpha$ - $\gamma$  鎖(分子量 104,000)はトリプシンの作用によりまず、分子量 77,000 と 28,000 の Fr に分解された(図 1, A). しかし分子量 77,000 の Fr は比較的安定で、 $\beta$  鎖が分解された後、はじめてトリプシンの作用をうけるものと思われる。なぜならば、分子量 104,000 のバンドは経時的に減少しているにもかかわらず、分子量 77,000 のバンドは一時増加したのち、徐々に減少しているからである(図 1, A). これは  $\beta$  鎖がまだ十分に分解されていない時期に、分子量 77,000 の Fr が蓄積してくることをしめている(図 1, A, lane 2, 3). また別の理由として、 $\beta$  鎖は 30 分間のトリプシン処理により、その大部分が分解されてしまうにもかかわらず(図

2, Trypsin 30 min), 分子量 77,000 のバンドは 60 分後でも残っていたからである (図 1, A, lane 5).

$\beta$  鎖が分解されたのち, 分子量 77,000 の Fr は徐々にトリプシンの作用をうけはじめ, 分子量 50,000 と 28,000 の Fr に分解され, 分子量 50,000 の Fr はさらに分解されて, 分子量 28,000 と 19,500 の Fr になると考えられる (図 1, A).

## 2) 精製 C8 のキモトリプシン分解

キモトリプシンによる精製 C8 の分解過程を非還元 SDS-PAGE で分析した結果, 明らかに  $\alpha$ - $\gamma$  鎖よりも  $\beta$  鎖の分解速度の方が速かった (図 1, B). 還元 SDS-PAGE の結果,  $\beta$  鎖からは分子量 54,000, 46,000, 38,000, 19,000 の各 Fr が生じた (図 2, Chymotrypsin). 非還元 SDS-PAGE においてもこれらの Fr がみられたので (図 1, B),  $\beta$  鎖のトリプシン分解の場合に示唆された鎖内ジスルフィド結合のループのなかには, キモトリプシンによる切断部位はないと考えられる. したがって  $\beta$  鎖はキモトリプシンにより, まず分子量 54,000 の Fr に分解され, この Fr がさらに分解されて分子量 46,000 の Fr に, 続いて分子量 38,000 の Fr に順次分解されてゆき, 分子量 38,000 の Fr は最終的にふたつの分子量 19,000 の Fr に分解されると思われる.

非還元 SDS-PAGE による分析では,  $\alpha$ - $\gamma$  鎖はまず分子量 82,000 と 19,000 の Fr に分解され, 分子量 82,000 の Fr は分子量 46,000 と 39,000 の Fr に分解された (図 1, B). さらに分子量 46,000 の Fr は分子量 26,000 と 19,000 の Fr に, また分子量 39,000 の Fr はふたつの分子量 19,000 の Fr にそれぞれ分解された.

## 2. Lipo-C5b-8 複合体中の C8 の分解

DMPC リポソームに結合した C5b-8 複合体 (Lipo-C5b-8) 中の  $^{131}\text{I}$ -C8 に対する, タンパク分解酵素の作用を調べた (図 3). Lipo-C5b-8 の総タンパク量 160 ng に対して酵素 16 ng の割合で, 37°C, 30 分間保温した後 (pH 7.5), ただちに非還元 SDS-PAGE にて分析した.

C8 の  $\beta$  鎖は, C5b-8 複合体中では, トリプシンおよびキモトリプシンの作用を全くうけなかった.  $\alpha$ - $\gamma$  鎖は free の状態にある C8 の場合 (図 1) とは, 全く別の部位で切断された. つまりトリプシンにより  $\alpha$ - $\gamma$  鎖は分子量 87,000 の Fr を生じ (図 3, Trypsin), キモトリプシンによって  $\alpha$ - $\gamma$  鎖は  $\beta$  鎖とほぼ同じ分子量の Fr を生じた (図 3, Chymotrypsin).

## 3. C5b-8 複合体の C9 結合能に対するトリプシンの影響

C5b-8 複合体は, 多分子の C9 と結合して MAC

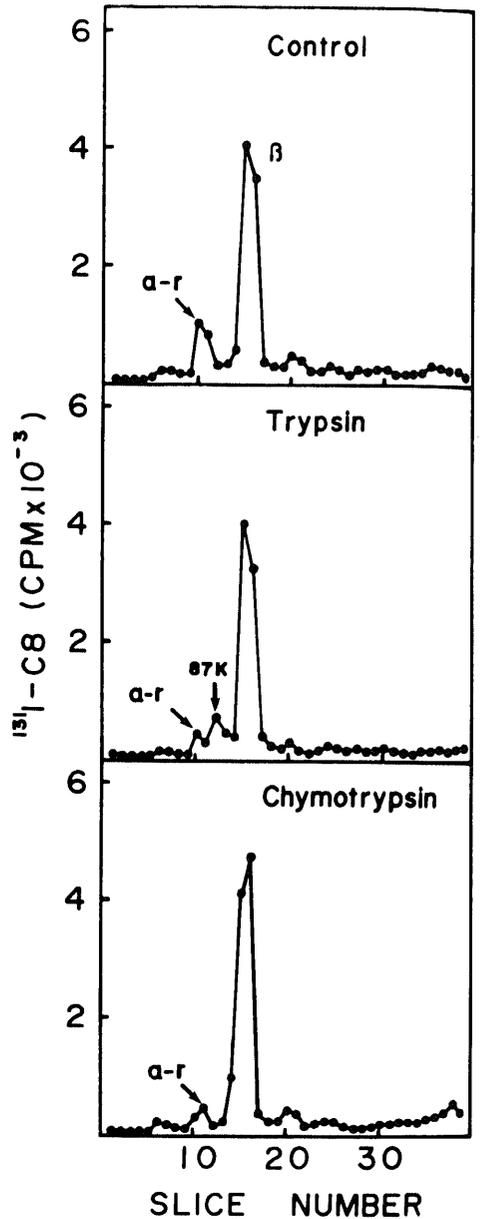


Fig. 3. Cleavage by proteolytic enzymes of  $^{131}\text{I}$ -C8 in the C5b-8 complex bound to DMPC liposomes. The C5b-8 complex was proteolyzed at 37°C for 30 min with trypsin or chymotrypsin at an enzyme to substrate ratio of 1:10 (wt/wt), and analyzed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis under nonreducing condition. Control shows that the  $\alpha$ - $\gamma$  subunit is less radioiodinated than  $\beta$ -chain is.

(membrane attack complex) を形成する。そこで、DMPC リポソームに結合した C5b-8 複合体のもつ C9 結合能について、トリプシンがどのように影響するかを、 $^{131}\text{I}$ -C8 を組み込んだ C5b-8 複合体 (C5b-8 ( $^{131}\text{I}$ -C8) 複合体) と  $^{125}\text{I}$ -C9 とを用いて調べた。

図 4 は、C5b-8 ( $^{131}\text{I}$ -C8) および C5b-9 ( $^{131}\text{I}$ -C8,  $^{125}\text{I}$ -C9) 複合体を、DMPC リポソームから 1% DOC (deoxycholate) で可溶化した後 (室温, 1 時間), ショ糖連続密度勾配超遠心法によって沈降係数を解析した結果である。A では、C5b-8 ( $^{131}\text{I}$ -C8) 複合体が沈降係数 18 S, 25 S および 33 S の成分として分布することを示した。これらの成分はそれぞれ、C5b-8 複合体の単量体, 二量体およびそれ以上の重合体であると考えられる。B では  $^{125}\text{I}$ -C9 と C5b-8 ( $^{131}\text{I}$ -C8) 複合体とが結合して、C5b-9 複合体の単量体 (23 S) および二量体 (33 S) を形成することを示した。

以上を対照実験として、C ではリポソームに結合した C5b-8 ( $^{131}\text{I}$ -C8) 複合体を、あらかじめ  $37^\circ\text{C}$  で 30 分間トリプシン処理 (酵素/基質 = 1/5, pH 7.5) した。SBTI を加えてトリプシンの作用を停止させた後、 $^{125}\text{I}$ -C9 を加えて  $37^\circ\text{C}$  で 30 分間保温し、DOC で可溶化してショ糖連続密度勾配超遠心にかけて。トリプシン処理しない場合に比べ (図 4, B), 33 S C5b-9 複合体の形成は抑制されており、また複合体中からの C8 あるいは C8 のフラグメントの遊離もみられた (図 4, C)。

#### 4. 溶血活性におよぼすトリプシンの影響

C5b-8 複合体に対するトリプシンの影響が、構造的な変化だけでなく、その生理活性にも影響することを確かめた。EAC 1-8 ( $1 \times 10^8/\text{ml}$ ) 2 ml に対し、トリプシン (1 mg/ml) 20  $\mu\text{l}$  を加え、または加えないで  $37^\circ\text{C}$  で 10 分間保温し、細胞を洗浄した後 C9 を加えてその溶血活性をもとめた。トリプシン処理した EAC 1-8 では、無処理の場合とくらべて、溶血活性が抑制された (図 5, B)。しかし EAC 1-7 を同様にトリプシン処理しても、その溶血活性には全く影響がなかった (図 5, A)。したがって、EAC 1-8 においてトリプシンの影響を受けたのは C8 分子だと考えられた。

#### 考 察

C8 に対するタンパク分解酵素の作用を、free の状態の C8 と C5b-8 複合体に組み込まれた状態の C8 とで比較した。

free の C8 では、タンパク分解酵素 (トリプシンおよびキモトリプシン) の作用により、サブユニットの  $\alpha$ - $\gamma$  鎖も  $\beta$  鎖も両方とも分解された。図 6 に各サブユニットの分解の様子を模式的に示した。トリプシンの

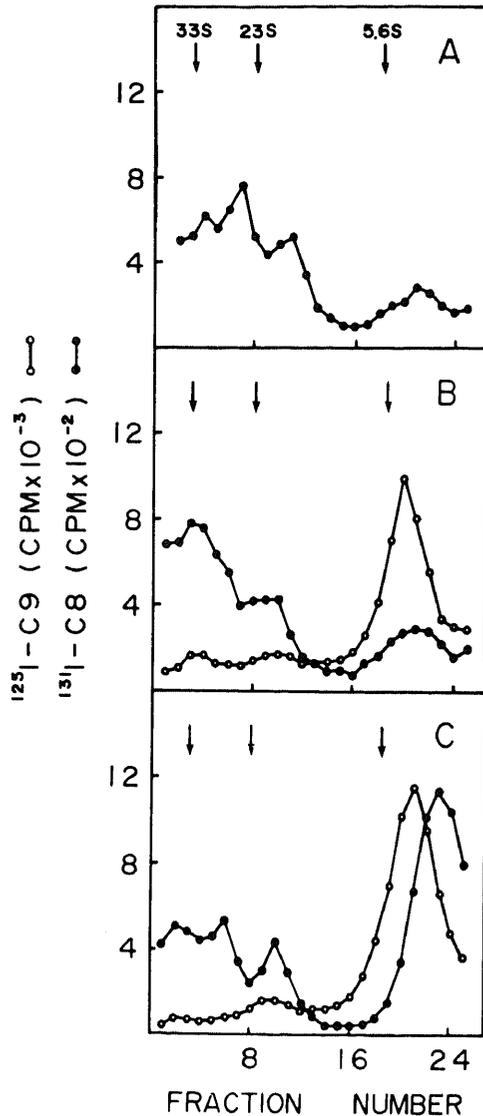


Fig. 4. Analysis of the formation of C5b-9 dimer (33S) by sucrose density gradient ultracentrifugation. (A) C5b-8 complex containing  $^{131}\text{I}$ -C8. (B) C5b-9 complex containing  $^{131}\text{I}$ -C8 and  $^{125}\text{I}$ -C9. (C) C5b-8 complex bound to DMPC liposomes was proteolyzed at  $37^\circ\text{C}$  for 30 min with trypsin at an enzyme to substrate ratio of 1:5 (wt/wt). After the addition of SBTI, the C5b-8 complex was incubated at  $37^\circ\text{C}$  for 30 min with  $^{125}\text{I}$ -C9. These C5b-8 and C5b-9 complexes were extracted from DMPC liposomes with 1% DOC at room temperature for 1 hr. The arrows indicate the position of reference proteins.

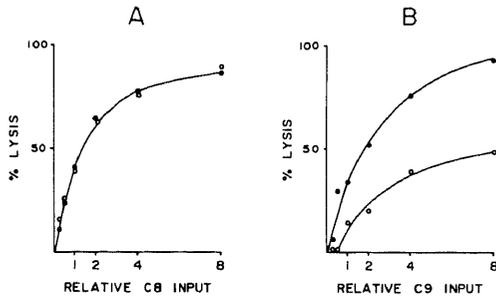


Fig. 5. Effect of trypsin on the hemolytic activity of the membrane-bound C5b-8 complex. EAC1-7 cells (A) and EAC1-8 cells (B) were incubated at 37°C for 10 min with trypsin (○) or without trypsin (●); 2 ml of the intermediated cells ( $1 \times 10^8$ /ml) were proteolyzed with 20  $\mu$ l of trypsin (1 mg/ml). The cells were washed three times and analyzed for its hemolytic activity; the EAC1-7 cells were incubated with various amounts of C8 and excess of C9, and the EAC1-8 cells were incubated with various amounts of C9.

作用により、 $\beta$ 鎖から分子量 54,000 および 44,000 のフラグメントが生じた。しかも、これらのフラグメントを還元すると、それぞれ分子量 38,000 と 18,000 および 26,000 と 18,000 のフラグメントに分離することがわかった。これらの結果から、 $\beta$ 鎖には鎖内ジスルフィド結合のループが存在し、このループのなかにトリプシンによる切断部位が存在すると考えられる。しかし、鎖内ジスルフィド結合の正確な位置、およびトリプシン、キモトリプシンによる他の切断部位との相対的な位置関係は不明である。

タンパク分解酵素による C8 分解の経時的変化を比較した結果、 $\alpha$ - $\gamma$ 鎖(おそらくは  $\alpha$ 鎖)は  $\beta$ 鎖に比べ、タンパク分解酵素の作用を受けにくいと思われた。さらに  $\beta$ 鎖が分解されてはじめて、 $\alpha$ 鎖(正確には  $\alpha$ - $\gamma$ 鎖の分子量 77,000 のフラグメント)はタンパク分解酵素の作用を受けようであった。おそらく free の C8 においては、 $\alpha$ 鎖は  $\beta$ 鎖と  $\gamma$ 鎖とによって包み込まれたような構造になっていて、液相から隔離された状態にあると考えられる(図 7)。このことは、free の C8 では  $\alpha$ 鎖がほとんど放射性ヨウ素で標識されないことから推察される<sup>9)</sup>(図 2, 3, Control)。

もともと  $\alpha$ 鎖にチロシン残基が少ないために、 $\alpha$ 鎖が標識されないのではない。尿素 (6 M)、グアニジン塩酸 (6 M) などの変性剤存在下において、C8 を IODOGEN 法<sup>22)</sup>によって標識すると、 $\alpha$ 鎖も  $\beta$ 鎖と同じ程度に標識されたからである<sup>9)</sup>。実際サブユニットのアミノ酸組成を比較してみると、 $\alpha$ 鎖、 $\beta$ 鎖ともほと

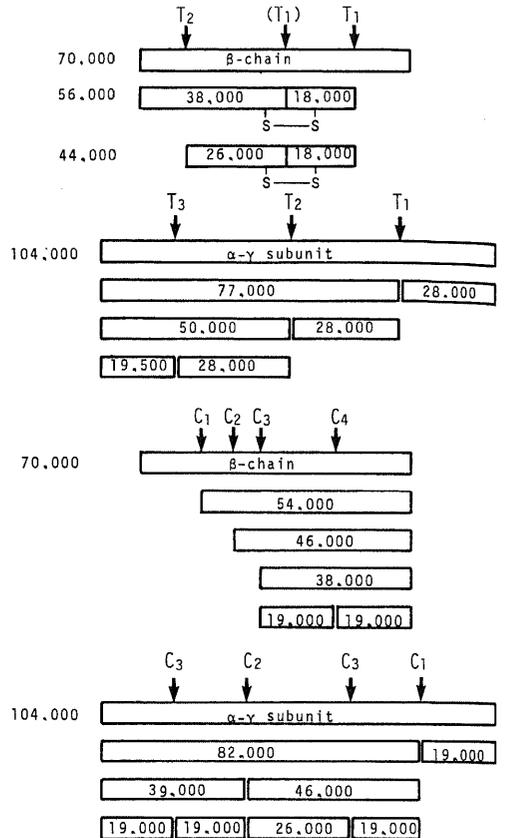


Fig. 6. Schematic representation of proteolytic cleavage of purified C8. The site of proteolytic cleavage ( $\downarrow$ ) are tentative. T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>,..., and C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>,..., primary, secondary,... trypsin and chymotrypsin cleavage sites.

んど同じぐらいのチロシン残基を有していた<sup>23)</sup>。 $\alpha$ 鎖の総アミノ酸残基数は 568 残基であるが、そのうち 25 残基がチロシン残基であった。また  $\beta$ 鎖では、総アミノ酸残基数 553 に対して、チロシン残基は 28 残基であった。free の C8 に前記のような高次構造を考えれば、まずタンパク分解酵素の作用を受けるのは、液相に接している  $\beta$ 鎖で、 $\beta$ 鎖が分解されて  $\alpha$ 鎖が露出されるとはじめて、 $\alpha$ 鎖はタンパク分解酵素の作用を受けるものと思われる。

C5b-7 複合体に C8 が結合したとき、変化を示すのは  $\beta$ 鎖である。 $\beta$ 鎖は Lipo-C5b-8 中においては、タンパク分解酵素の作用を全く受けなかった(図 3)。一方、 $\alpha$ 鎖はトリプシンおよびキモトリプシンによって分解されたが、free の場合とは全く異なる部位で切断された。C5b-8 複合体におけるこのような C8 の高次構造上での変化は、以下のような機能面における変化

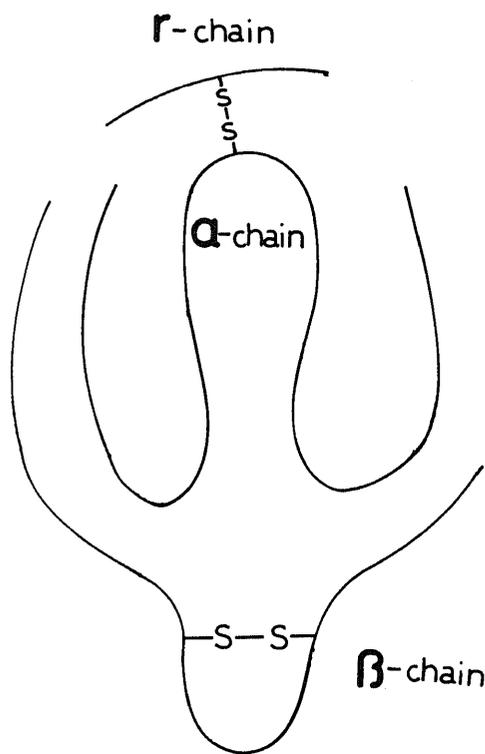


Fig. 7. Schematic representation of the C8 structure.

をひきおこした。Lipo-C5b-8 に対するトリプシン処理により、まず C9 の C5b-8 複合体への結合が抑制されることがわかった(図 4)。次に EAC1-8 に対するトリプシン処理により、C8 の溶血活性が抑制されることもわかった(図 5, B)。しかし EAC1-7 を同様にトリプシン処理しても、C8 についての溶血活性に何らの影響を与えなかった(図 5, A)。以上のことから、EAC1-8 においてトリプシンの作用したのは C8 分子で、その機能に影響をおよぼしたものと考えられる。

Steckel ら<sup>23)</sup>は SDS 存在下でのゲルろ過により C8 を  $\alpha$ - $\gamma$  鎖と  $\beta$  鎖とに分離し、それぞれから SDS を除いた後、ふたたびそれらを再結合させることに成功した。さらに彼らは、再結合した  $\alpha$ - $\gamma$  鎖と  $\beta$  鎖は、ほとんど溶血活性をうしなっていないことも示した。Monahan ら<sup>24)25)</sup>は  $\beta$  鎖が単独で C5b-7 複合体と結合して C5b-7( $\beta$ ) を形成すること、さらに C5b-7( $\beta$ ) に  $\alpha$ - $\gamma$  鎖を加えると、 $\alpha$ - $\gamma$  鎖と  $\beta$  鎖が再結合することを示して、C5b-7 複合体と C8 との結合は C8 の  $\beta$  鎖を介しておこなわれていることを証明した。

著者の実験結果は、間接的な証拠ではあるが、Monahan らの結果と一致するものであった。しかし

新たに、C5b-8 複合体中における  $\beta$  鎖は、タンパク分解酵素の作用を全くうけないことを明らかにした。 $\beta$  鎖はおそらく液相中に露出していないか、あるいは露出しているとしても、C5b-7 複合体と  $\alpha$ - $\gamma$  鎖、あるいは膜構造を含めた三者が立体障害となってタンパク分解酵素の作用を阻止していると思われる。また C5b-8 複合体に対するトリプシンの作用で  $\alpha$  鎖が分解されたが、それに伴って C9 結合能および溶血活性が抑制されたので、C9 の結合部位は C5b-8 複合体中の C8  $\alpha$ - $\gamma$  鎖に存在していることが確かめられた。

### 結 論

C8 に対するタンパク分解酵素の作用を、free にある場合と、C5b-7 複合体に結合した場合とで比較した。

1. free の C8 では、 $\alpha$ - $\gamma$  鎖および  $\beta$  鎖が、両方ともトリプシンおよびキモトリプシンによって分解された。 $\alpha$ - $\gamma$  鎖は  $\beta$  鎖にくらべ、分解されにくかった。
2.  $\beta$  鎖のトリプシン分解の結果から、 $\beta$  鎖には鎖内ジスルフィド結合の存在することが判明した。
3. C5b-7 複合体に結合した C8 では、 $\beta$  鎖は全くトリプシンおよびキモトリプシンの作用を受けなかった。 $\alpha$ - $\gamma$  鎖は、free の C8 の場合とは全く異なる部位で切断された。
4. C5b-8 複合体のトリプシン処理により、その C9 結合能と溶血活性とが抑制された。

### 謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導、御校閲を賜った右田俊介教授に深く感謝いたします。また終始、御指導、御教示を頂いた山本健一助手に深く感謝いたします。併せて、御助言、御協力を頂いた研究室の各位に深く感謝いたします。

### 文 献

- 1) Götze, O. and Müller-Eberhard, H. J.: Lysis of erythrocytes by complement in the absence of antibody. *J. Exp. Med.*, **132**, 898-915 (1970).
- 2) Kolb, W. P., Haxby, J. A., Arroyave, C. M., and Müller-Eberhard, H. J.: Molecular analysis of the membrane attack mechanism of complement. *J. Exp. Med.*, **135**, 549-566 (1972).
- 3) Cooper, N. R. and Müller-Eberhard, H. J.: The reaction mechanism of human C5 in immune hemolysis. *J. Exp. Med.*, **132**, 775-793 (1970).
- 4) Kolb, W. P. and Müller-Eberhard, H. J.: The membrane attack mechanism of complement. Isolation and subunit composition of the C5b-9

complex. *J. Exp. Med.*, **141**, 724-735 (1975).

- 5) **Biesecker, G., Podack, E. R., Halverson, C. A. and Müller-Eberhard, H. J.**: C5b-9 dimer: Isolation from complement lysed cells and ultrastructural identification with complement-dependent membrane lesions. *J. Exp. Med.*, **149**, 448-458 (1979).
- 6) **Podack, E. R., Esser, A. F., Biesecker, G., and Müller-Eberhard, H. J.**: Membrane attack complex of complement. A structural analysis of its assembly. *J. Exp. Med.*, **151**, 301-313 (1980).
- 7) **Esser, A. F.**: Interactions between complement proteins and biological and model membranes, p294-325. *In* D. Chapman (ed.), *Biological membranes*, vol. 4 Academic Press, 1982.
- 8) **Kolb, W. P. and Müller-Eberhard, H. J.**: The membrane attack mechanism of complement: The three polypeptide chain structure of the eighth component (C8). *J. Exp. Med.*, **143**, 1131-1139 (1976).
- 9) **Stolfi, R. L.**: Immune lytic transformation: A state of irreversible damage generated as a result of the reaction of the eighth component in the guinea pig complement system. *J. Immunol.*, **100**, 46-54 (1968).
- 10) **Tamura, N., Shimada, A., and Chang, S.**: Further evidence for immune cytolysis by antibody and the first eight components of complement in the absence of C9. *Immunol.*, **22**, 131-140 (1972).
- 11) **Kolb, W. P. and Müller-Eberhard, H. J.**: Mode of action of human C9: Adsorption of multiple C9 molecules to cell-bound C8. *J. Immunol.*, **113**, 479-488 (1974).
- 12) **Yamamoto, K. and Gewurz, H.**: The complex of C5b and C6: Isolation, characterization, and identification of a modified form of C5b consisting of three polypeptide chains. *J. Immunol.*, **120**, 2008-2015 (1978).
- 13) **Yamamoto, K.**: Proteolysis of the C5b-7 complex: Cleavage of the C5b and C6 subunits and its effect on the interaction of the complex with phospholipid bilayers. *J. Immunol.*, **125**, 1745-1750 (1980).
- 14) **Podack, E. R., Kolb, W. P., and Müller-Eberhard, H. J.**: Purification of the sixth and seventh component of human complement without loss of hemolytic activity. *J. Immunol.*, **116**, 263-269 (1976).
- 15) **Biesecker, G. and Müller-Eberhard, H. J.**:

The ninth component of human complement: Purification and physicochemical characterization. *J. Immunol.*, **124**, 1291-1296 (1980).

- 16) **Yamamoto, K. and Migita, S.**: Proteolysis of the monomeric and dimeric C5b-9 complexes of complement: Alteration in the susceptibility to proteases of the C9 subunits associated with C5b-9 dimerization. *J. Immunol.*, **127**, 423-426 (1981).
- 17) **Walsh, F. S. and Crumpton, M. J.**: Orientation of cell-surface antigens in the lipid bilayer of lymphocyte plasma membrane. *Nature*, **269**, 307-311 (1977).
- 18) **Littman, D. R., Cullen, S. E., and Schwartz, B. D.**: Insertion of Ia and H-2 alloantigens into model membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **76**, 902-906 (1979).
- 19) **Weber, K. and Osborn, M.**: The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.*, **244**, 4406-4412 (1969).
- 20) 飯田恭子・永木和義, 稲井真弥: TTHAを用いたEAC1.4 cellの作り方. 免疫実験操作法B (日本免疫学会編), 1389-1391頁, 1974.
- 21) **Podack, E. R., Kolb, W. P., Esser, A. F., and Müller-Eberhard, H. J.**: Structural similarities between C6 and C7 of human complement. *J. Immunol.*, **123**, 1071-1077 (1979).
- 22) **Markwell, M. A. K. and Fox, C. F.**: Surface-specific iodination of membrane proteins of viruses and eucaryotic cells using 1, 3, 4, 6-tetrachloro-3 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -diphenylglycoluril. *Biochem.*, **17**, 4807-4817 (1978).
- 23) **Steckel, E. W., York, R. G., Monahan, J. B., and Sodetz, J. M.**: The eighth component of human complement. Purification and physicochemical characterization of its unusual subunit structure. *J. Biol. Chem.*, **255**, 11997-12005 (1980).
- 24) **Monahan, J. B. and Sodetz, J. M.**: Binding of the eighth component of human complement to the soluble cytolytic complex is mediated by its  $\beta$  subunit. *J. Biol. Chem.*, **255**, 10579-10582 (1980).
- 25) **Monahan, J. B. and Sodetz, J. M.**: Role of the  $\beta$  subunit in interaction of the eighth component of human complement with the membrane-bound cytolytic complex. *J. Biol. Chem.*, **256**, 3258-3262 (1981).

**Proteolysis of the C5b-8 Complex: The Role of the Subunits of C8 in the C5b-8 Complex**  
Takanori Kawashima, Department of Molecular Immunology, Cancer Research Institute, Kanazawa University, Kanazawa, 920 - J. Juzen Med. Soc., 92, 490-499 (1983)

**Key words:** human complement, proteolysis, membrane attack mechanism

#### Abstract

The eighth component of human complement (C8) consists of three subunits,  $\alpha$ -,  $\beta$ -, and  $\gamma$ -chains. The  $\alpha$ - and  $\gamma$ -chains are covalently linked to each other by a disulfide bond and form the  $\alpha$ - $\gamma$  subunit; the  $\alpha$ - $\gamma$  subunit is noncovalently linked to the  $\beta$ -chain. Both subunits of purified C8 ( $\alpha$ - $\gamma$  and  $\beta$  subunits) were found to be susceptible to trypsin and chymotrypsin. However, the  $\beta$ -chain was more sensitive to both enzymes than the  $\alpha$ - $\gamma$  subunit was. Trypsin cleavage of the  $\beta$ -chain yielded fragments with molecular weights of 54,000 and 44,000 daltons. Under reducing conditions, the 54,000-dalton fragment was dissociated to the 38,000-dalton and 18,000-dalton fragments, and the 44,000-dalton fragment to the 26,000-dalton and 18,000-dalton fragments. These results indicate the presence of an intrachain disulfide bond in the  $\beta$ -chain. Upon binding of C8 to the C5b-7 complex, the  $\beta$ -chain became completely resistant to trypsin and chymotrypsin. By contrast, the  $\alpha$ - $\gamma$  subunit remained susceptible to both enzymes and cleaved at the sites that were different from the cleavage sites in the uncomplexed C8. Trypsin cleavage of the C5b-8 complex inhibited the C9-binding and hemolytic activity of the complex. Thus, the results presented suggest that the binding of C8 to the C5b-7 complex is mediated by its  $\beta$ -chain, while the binding of C9 to the C5b-8 complex is mediated by its  $\alpha$ - $\gamma$  subunit.