免疫グロブリンの構造

大阪大学理学部 浜口 浩三
生物学教室

抗体蛋白であるグロブリンは、分子量約50,000のH (heavy) 鎖と分子量約23,000のL (light) 鎖がそれぞれ2本ずつ非共有結合とS-S結合で集まった4本鎖構造を基本としている(図1)。正常人の血清γグロブ

図1 ヒトIgG1免疫グロブリンの基本構造。
矢印は酵素による切断箇所を示す。

リン分画からえられる抗体は一次構造的に異なる不均一な分子集団であり、構造の研究には限界があった。しかし、多発性骨髄腫の患者からえられるミエローマ蛋白は極めて均一な分子集団であり、免疫グロブリンの基本構造と同じく4本鎖構造をもつこと、また、この患者の尿中に多量に排泄されるBence Jones蛋白がL鎖に相当することがわかってから、免疫グロブリンの構造研究は飛躍的に発展した。ミエローマ蛋白やBence Jones蛋白は、1人の患者からえられるものは均一であるが、患者が異なるとそれぞれ一次構造は異なる。L鎖は抗原型によってκ型とλ型に区別される。H鎖にはγ、α、μ、δ、εの5種類があり、IgG、IgA、IgM、IgD、IgEの5つのクラスにわけられる。クラスが異なると、H鎖の分子量や鎖間S-S結合の位置と数、J鎖やsecretory componentとよばれる蛋白質の存在するなどの相違はあるが、基本はいずれも

4本鎖構造である。

H鎖もL鎖もN末端から約110番目までのアミノ酸配列順序は標品によって異なり、可変構造部分とよばれそれぞれV_H、V_Lであらわす。抗原結合部位はこの部分に存在する。のこりの部分は標品によるアミノ酸の置換が少なく一定構造部分(Cであらわす)とよぶ。図1に示すように、鎖内S-S結合の配置は極めて規則的で約110個のアミノ酸残基から成るくりかえし構造をもっており、ドメイン構造とよぶ。L鎖はV_LとC_Lのドメインから成り、H鎖はV_H、C_{H1}、C_{H2}、C_{H3}の4つのドメインより成る。免疫グロブリンは酵素による限定分解によっていくつかのフラグメントにわけられることもでき、このことは構造の研究を容易にしている。

X線解析

免疫グロブリン分子全体についてのX線解析は成功していないが、Bence Jones蛋白、酵素消化でえられるFabフラグメント、Fcフラグメント(図1参照)については高分解能の解析が成功しており、これらをもとにして抗体分子全体の模型がくみだられている。抗体分子の構造の非常に特徴的なことは、各ドメインがいずれも共通の二次構造(immunoglobulin fold)をもっていることである。すなわち、各ドメインは逆平行に並んだポリペプチド鎖より成るシートがサンドウィッチ状に2層あり、この2つの層の間には疎水性残基がつまっている。そして、各ドメイン内にある1本のS-S結合は2つの層の中心にあって2層を結びつけている。図2はBence Jones蛋白(Mcg)のポリペプチド主鎖の並びを示したもので、^{1,2)}C_L領域は4本の逆平行の鎖から成る層と、3本の逆平行の鎖から成る層とが9~10 Åはなれて存在している。V_Lの二次構造も大体同じである。各ドメインの真中にあるS-S結合は、V_LではTrp 37(標品による置換がない)、C_LではTrp 152で遮蔽されている。このようにV_LとC_Lの構造は極めてよく似ているが、V_Lポリペプチド鎖はC_Lにくらべて不規則であり、特に48~60番目の間は

図2 Bence Jones 蛋白 (Mcg) の二次構造²⁾

不規則でいくつかの折れまがりがある。V領域のなかでも特にアミノ酸残基の置換、欠損、挿入のはげしい部分があって、hypervariable region とよび、L鎖には3ヶ所(24~34, 50~56, 89~97), H鎖には4ヶ所(31~37, 50~65, 86~91, 101~109)存在する。Mcg蛋白の48~60番目のセグメントは第二のhypervariable regionを含んでいる。これらのhypervariable regionは抗原との結合部位を形成し抗原の特異性を発揮するうえで特に重要な領域である。

C_H1ドメインの構造はC_Lによく似ていて4本鎖の層と3本鎖の層とから成る。C_H2ドメインは4本鎖の層が2つ、C_H3ドメインは3本鎖の層と4本鎖の層とから成る。このような各ドメインの二次構造の共通性については図3に示した立体図からよく理解されるであろう。³⁾

Bence Jones 蛋白 Mcg は鎖間 S-S 結合をもつ二重体であるが、ドメインの空間的配置は2つの単量体でちがって二量体を形成する2つの単量体(単量体1と2であらわす)を区別することができる。^{1,2)} すなわち、2つのV_Lの間および2つのC_Lの間には2回回転軸が存在するが、2本のL鎖全体としてみると2回回転軸は存在しない(図4)。Mcg蛋白では、単量体1ではVとCの長軸は110番目の残基のところで約70°の角度で交叉しているのに対して、単量体2ではこの角度は約110°である。一方、何種類かのFabフラグメントについてみると、⁴⁾ C_LとV_Lの長軸のなす角は約100°であるのに対して、C_H1とV_Hのなす角度は約80°である。このようにMcg蛋白の単量体1はFabのH鎖(Fdとよぶ)に、単量体2はFabのL鎖の空間的配置に極めてよく対応し、単量体1はFdの、単量体2

はL鎖の役割りを果しているらしい。このようなことからBence Jones 蛋白は原始抗体であろうと考えられている。

Bence Jones 蛋白やFabのドメインの空間的配置が対称でないのはV_HとV_L(あるいはV_LとV_L)とC_H1とC_L(あるいはC_LとC_L)の間の相互作用の様式のちがいに由来するものである。V_HとV_Lの間の相互作用は3本鎖の層の間でなされておられ、hypervariable regionが互に接近して抗原結合部位をうまく形成できるようになっている。一方、C_H1とC_Lの間の相互作用は4本鎖から成る層の間でおこり広い領域での相互作用がみられる。その結果、C_H1とC_Lの領域はV_LとV_Hの領域にくらべてよりコンパクトになっているという。

FcフラグメントのC_H2とC_H3の空間的配置はFabにおける各ドメインの配置と異なりミッキーマウスのような形になっている。^{3,5)} (図5)。2つのC_H3はコンパクトに集まって頭の部分に相当し、2つのC_H2ドメインは互いに接触せずに2つの耳に相当するというのである。2つのC_H3の間の相互作用はC_H1とC_Lの間の相互作用に似て強いが、2つのC_H2の間の相互作用はこれまで述べたどのドメイン間の相互作用の様式とも異なっており、S-S結合以外の相互作用はみあたらない。C_H2には糖類が存在するために相互作用ができないらしい。

以上述べたFab、FcのX線解析の結果やIgG分子についての低分解能の結果をもとにして抗体分子の模型が提出されている。ミエローマ蛋白(Dob)についてはT字型の⁶⁾ Kol蛋白についてはY字型の模型が提出されている。^{5,7)}

図3 a) Bence Jones 蛋白 Re1 の V_L , b) McPC603 の CH_1 , c) CH_2 , d) CH_3 の二次構造の立体図。

図4 Bence Jones 蛋白の二量体を構成する各ドメインの空間的配置²⁾ 図5 Fcフラグメントの二次構造の立体図³⁾

溶液中の構造

CD,⁹⁾ 赤外吸収,¹⁰⁾ ラマン散乱¹¹⁾ の結果はX線解析の結果と一致して抗体分子は α -ヘリックスをほとんどもたず、 β 構造から成ることを示す。

λ 型Bence Jones蛋白は36, 148, 182番目にTrpをもち、これ以外に91番目にTrpをもつものである。 κ 型Bence Jones蛋白は36と148番目に共通にTrpをもつ。化学修飾および変性に伴う吸収スペクトルの変化から36と148番目のTrpは分子内部に埋もれており、Trp 182は分子表面近くに存在することが示される。¹²⁾ X線解析の結果からもTrp 36とTrp 148は V_L および C_L の分子内S-S結合のそばにあることが示されている。Bence Jones蛋白のTrpによる蛍光は著しく消光された状態にある。

Bence Jones蛋白の C_L には2個のHis(189と198)がある。数多くのBence Jones蛋白のHisのNMRによる滴定の結果によると、 λ 型蛋白のHis189はいずれもほとんど同じpK(7.3 ± 0.1)を示すのに対し、His198のpKは標品によるばらつきが大きくpKは異常に低い($pK \leq 4.5$)。 κ 型蛋白のHis189のpKは λ 型のそれに近く、His198のpKは λ 型蛋白にくらべてプロトン化されにくいことが示されている。¹³⁾

免疫グロブリンおよびBence Jones蛋白の鎖間S-S結合は変性剤なしに切断することができるが、各ドメイン内にあるS-S結合は変性させなければ切断できない。図1に示したように、HおよびL鎖のS-S結合の位置は極めて規則的であるので、鎖間S-S結合を切断したものや単離した各ドメインのラマン散乱の測定から各S-S結合のコンホメーションを知ること

とができよう。V_Lフラグメントは525 cm⁻¹にS-S結合によるラマン線をもち、結晶解析の行なわれたV_Lフラグメント¹⁴⁾のS-S結合と同じだとすると、525 cm⁻¹のラマン線は—C(—S—S—C—結合のTGGコンホメーションに対応することが示された。¹¹⁾

λ型 Bence Jones 蛋白を塩酸グアニジンで変性させると、約1.5 M付近でV_Lは変性せずC_Lのみが変性した中間状態をへてVもCも完全に変性した状態に到達する。¹⁵⁾ 酸変性、¹⁶⁾ 尿素変性¹⁷⁾からもC_Lの方がV_Lにくらべて不安定であることが示される。塩酸グアニジンで完全に変性させたλ型蛋白から変性剤を希釈して元の構造に還元する過程を調べると、V_Lの構造はすみやかに形成され、C_Lの還元はV_Lにくらべておそい。¹⁸⁾ VもCも同じimmunoglobulin foldをもつのに何故に還元過程にこのようなちがいがいるのかわからない。

Bence Jones 蛋白の鎖間S-S結合を還元アルキル化したものは単量体と二量体の平衡にある。この平衡定数は標品によって異なり、V_Lの相互作用のちがいを反映する。Bence Jones 蛋白から単離したC_Lフラグメントに単量体として存在するが、V_Lフラグメントは単量体と二量体の平衡にある。おもしろいことに、V_Lのこの平衡定数はもとのL鎖の平衡定数より大きい。¹⁹⁾ V_Lフラグメントとして存在するときとL鎖内のV_Lドメインとして存在するときでV_L間の相互作用はちがうらしい。IgGのFdも単量体と二量体の平衡にあり、この平衡定数は標品によって異なるが、H鎖は通常の場合では二量体として存在し単量体への解離は観察されない。

ミエローマ蛋白の鎖間S-S結合を還元アルキル化してHとL鎖を単離することができる。単離したHとL鎖のORD、CD曲線から等モル混合物の曲線を計算で求めると、もとの蛋白の曲線にならない。HとL鎖を混合してORD、CD曲線を実測するともとの蛋白と同じ曲線がえられる。²⁰⁾ Fabフラグメントの鎖間S-S結合を還元アルキル化して、FdへのL鎖の結合を調べると、ひとつの結合定数でこの相互作用をあらわすことができる。一方、二量体を形成しているH鎖(H₂)へL鎖が結合して4本鎖構造を形成するとき、最初にL鎖の結合するときの結合定数と、第二のL鎖の結合定数とは異なる。L鎖が最初にH₂に結合するときの結合定数はFdとLとの結合定数と同じであるが、第二のL鎖の結合定数は最初のL鎖の結合定数より小さい。²¹⁾

これまで、完全に変性させたL鎖からもとの構造への還元、L鎖間あるいはLとH鎖間の非共有相互作用

用について述べた。最後に鎖間S-S結合の形成機構について述べたい。Bence Jones 蛋白の鎖間S-S結合形成に関与するSH基はκ型ではC末端に、λ型ではC末端よりひとつ前にある。これら鎖間S-S還元後、酸化型グルタチオン(GSSG)の存在下でS-S結合の再形成を調べてみると、κ型では全くS-S結合の再形成はみられず、λ型ではS-S結合の再形成がみられるが標品間に著しい差のあることがわかった。²²⁾ 実際に尿中に排泄されるBence Jones 蛋白をみると、κ型では単量体やS-S結合をもたずに二量体を形成しているものが多く、λ型では鎖間S-S結合をもつ二量体の多いことがわかっている。一方、ミエローマ蛋白やそのFabフラグメントの鎖間S-S結合を還元後、GSSGの存在下でS-S結合の再形成をみると100%形成される。²²⁾ 鎖間S-S結合を還元した蛋白からGSSG存在下で形成される種々の分子種(鎖間S-S結合を形成したもの、GSSGと混合ジスルフィドを形成したものなど)の形成速度、²²⁾ GSSG以外の種々のジスルフィド試薬存在下でのS-S結合の再形成、²³⁾ 還元したBence Jones 蛋白やFabのSH基のpK値とクロロアセトアミドの反応性の研究²⁴⁾から、ジスルフィド試薬存在下でのS-S結合の再形成あるいは図6のような反応機構で進行することがわかった。この反応機構の特徴は、FabにおいてはFdとLは区別されるが、

図6 Bence Jones 蛋白およびFabフラグメントにおける鎖間S-S結合の形成機構^{22,23)}

Bence Jones 蛋白の二量体を形成する2本のL鎖も区別していることである。そしてλ型 Bence Jones 蛋白ではC→Dの変化はおこらず、FabにおいてはC→Dの変化はB→Dと同様におこりうる。しかし、現在のところ、κ型 Bence Jones 蛋白において何故にS-S結合が全く再形成されないのかわからない。

以上、免疫グロブリンのなかで IgG 分子の基本的な構造について解説した。抗原結合部位の構造についてはくわしく解説できなかったが、X線解析や NMR²⁵⁻²⁸⁾によって活発に研究されている。また、4 本鎖構造がさらにいくつか集合した IaA や IgM の構造についても多くの研究が進行中である。

文 献

- 1) Schiffer, M., Girling, R. L., Ely, K. R., Edmundson, A. B. (1973) *Biochemistry*, 12, 4620-4631
- 2) Edmundson, A. B., Ely, K. R., Abola, E. E., Schiffer, M., Panagiotopoulos, N. (1975) *Biochemistry*, 14, 3953-3961
- 3) Deisenhofer, J., Colman, P. M., Epp, O., Huber, R. (1976) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 357, 1421-1434
- 4) Saul, F. A., Amzel, L. M., Poljak, R. J. (1978) *J. Biol. Chem.*, 253, 585-597
- 5) Huber, R., Deisenhofer, J., Colman, P. M., Matsushima, M., Palm, W. (1976) *Nature*, 264, 415-420
- 6) Silverton, E. W., Navia, M. A., Davies, D. R. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 5140-5144
- 7) Huber, R. (1976) *TIBS* (Aug), 174-178
- 8) Matsushima, M., Marquart, M., Jones, T. A., Colman, P. M., Bartels, K., Huber, R., Palm, W. (1978) *J. Mol. Biol.*, 121, 441-459
- 9) Ikeda, K., Hamaguchi, K., Migita, S. (1968) *J. Biochem.*, 63, 654-660
- 10) Abaturov, L. V., Nezlin, R. S., Vengerova, T. I., Varsharsky, J. M. (1969) *Biochim. Biophys. Acta*, 194, 386-396
- 11) Kitagawa, T., Azuma, T., Hamaguchi, K. (1979) *Biopolymers*, 印刷中
- 12) Azuma, T., Hamaguchi, K., Migita, S. (1971) *J. Biochem.*, 69, 535-541
- 13) 荒田洋治, 清水章 (1978) 蛋白質構造討論会予稿集 57
- 14) Epp, O., Lattman, E.E., Schiffer, M., Huber, R., Palm, W. (1975) *Biochemistry*, 14, 4943-4952
- 15) Azuma, T., Hamaguchi, K., Migita, S. (1972) *J. Biochem.*, 72, 1457-1467
- 16) Azuma, T., Hamaguchi, K., Migita, S. (1972) *J. Biochem.*, 71, 379-386
- 17) Azuma, T., Hamaguchi, K., Migita, S. (1973) *J. Biochem.*, 73, 1259-1268
- 18) 後藤祐児, 東隆規, 浜口浩三 (1978) 蛋白質構造討論会予稿集 153 - 156
- 19) Azuma, T., Kobayashi, O., Goto, Y., Hamaguchi, K. (1978) *J. Biochem.*, 83, 1485-1492
- 20) Azuma, T., Hamaguchi, K., Migita, S. (1974) *J. Biochem.*, 76, 685-693
- 21) Azuma, T., Hamaguchi, K. (1976) *J. Biochem.*, 80, 1023-1038
- 22) Kishida, F., Azuma, T., Hamaguchi, K. (1976) *J. Biochem.*, 79, 91-105
- 23) Kato, M., Azuma, T., Isobe, T., Hamaguchi, K. (1978) *J. Biochem.*, 84, 1475-1483
- 24) Tanaka, Y., Azuma, T., Hamaguchi, K. (1978) *J. Biochem.*, 83, 1249-1263
- 25) Sutton, B. J., Gettins, P., Givol, D., Marsh, D., Wain-Hobson, S., Willan, K. J., Dwek, R. A. (1977) *Biochem. J.*, 165, 177-197
- 26) Willan, K. J., Marsh, D., Sunderland, C. A., Sutton, B. J., Wain-Hobson, S., Dwek, R. A., Givol, D. (1977) *Biochem. J.*, 165, 199-206
- 27) Dower, S. K., Wain-Hobson, S., Gettins, P., Givol, D., Jackson, W.R.C., Perkins, S. J., Sunderland, C.A., Sutton, B.J., Wright, C. E., Dwek, R. A. (1977) *Biochem. J.*, 165, 207-225
- 28) Wain-Hobson, S., Dower, S. K., Gettins, P., Givol, D., McLaughlin, A.C., Pecht, I., Sunderland, C. A., Dwek, R. A. (1977) *Biochem. J.*, 165, 227-235

ABSTRACT

Structure of Immunoglobulin

Kozo HAMAGUCH

Department of Biology, Faculty of Science, Osaka University

X-ray crystallographic studies show that the four domains of the H chain and two domains of the L chain in immunoglobulin G have very similar tertiary structures referred to as immunoglobulin fold and consist of two β -sheets. The states of tryptophyl, tyrosyl, histidyl residues, and disulfide bonds of Bence Jones proteins determined by physical and chemical methods are described. The V_L domain is more resistant against denaturants than the C_L domain. Studies on refolding of Bence Jones proteins from 4 M GuHCl shows that the V_L domain refolds much faster than the C_L domain. The noncovalent interaction of L chain to one of the two sites on H chain dimer decreases the affinity of the other site for L chain. The mechanism of formation of interchain disulfide bonds in Bence Jones proteins, Fab fragments, and immunoglobulin G is described.

現代科学 シリーズ

アルガー / 磯部太郎監訳

電子スピン共鳴

——実験技術とその応用——

電子スピン共鳴(ESR)の応用分野は、物理・化学のみならず、生物・医学・工学など、きわめて多岐にわたっている。しかし測定装置は一樣でなく、操作法もかなり複雑である。著者は欧米43の研究室を訪問し、いまだ未発表の技術をも含めた、成功と失敗を分かつ微妙な実験技術の詳細を本書に集積した。豊富な図とデータとを駆使した解説は、現在欧米においてハンドブック的な役目をなす不可欠な実験技術書とされている。634頁 6,800円

▶ 主 要 内 容 ◀

第I章 序論/第II章 ESRの用語と理論/第III章 スペクトロメーター:感度と分解能/第IV章 構成要素/第V章 測定技術/第VI章 空気・液体のESR/第VII章 個体のESR

ファラー、ベッカー / 赤坂一之, 井元敏明訳

パルスおよび

フーリエ変換NMR

——理論および方法への入門——

この原理によって、パルスNMR法は単に物理学者のものではなく、分子の基礎的研究や、薬・高分子・酵素などの構造や働きなど、多くの生化学的応用へも利用されるようになった。しかし一般の利用者にとって理解し易いものではないが、著者の多年の研究体験に加えて、訳者により70頁におよぶ訳注と最近の研究例が補なわれ、特に理解しやすいよう配慮されている。240頁 2,400円

▶ 主 要 内 容 ◀

第1章 NMRの基礎的概念/第2章 自由誘導とスピネコー/第3章 装置/第4章 緩和機構/第5章 フーリエ変換NMR/第6章 回転系での実験/第7章 応用例/参考文献/訳者補遺

■ 図書目録をご請求ください ■

606 京都市左京区田中門前町87
TEL (075) 781-4747

吉岡書店