ウシ初乳の免疫グロブリン分子

金 丸 義 敬

岐阜大学農学部, 岐阜市柳戸 501-11

Immunoglobulin Molecules in Bovine Colostrum

Yoshihiro KANAMARU

Faculty of Agriculture, Gifu University, Gifu-shi 501-11

Key words: immune globulin, bovine colostrum, Fc fragment, Fab fragment, secretory IgA

乳腺の持つ免疫学的機能には、乳幼動物の保護と乳腺自身の感染防御の二つの側面がある。この機能が有効に働く結果、乳汁、特に初乳には、多くの可溶性 (soluble) および細胞性 (cellular) の免疫成分が出現することになる¹⁾。このような成分は独立に、あるいは共同して乳幼動物をさまざまな病原性物質から防御する役割を果たしているものと考えられるが、構造や機能に関して詳しく研究されているものは少ない。

免疫グロブリンは乳汁の免疫成分の中では最も主要なものであり、(1) 乳幼動物がほ乳後、病原性抗原に対する活性を持つ抗体として、直接これらの抗原の腸管粘膜への感染を阻止する、(2) 胎盤透過性の免疫グロブリンがないか、あるいはあってもその機能の弱い動物では、新生動物の血液中に吸収され、血清抗体として感染防御に働く、(3) 乳幼動物の液性免疫系の発達を調節する、といった役割を持つと考えられている²⁾。

ウシの免疫グロブリン分子は、詳細な研究が行なわれているヒトやマウスなどの免疫グロブリンと基本的にはよく類似したものであろうということは、免疫グロブリンに関する多くの成書を参照すれば容易に想像できるのであるが、一方でウシ (反芻動物) の免疫グロブリンにかかわる特異ともいえる現象があることも明らかになってきている。乳汁は、すべての哺乳動物で、それぞれの乳幼動物のために分泌されるという合目的性を持っており、その中に含まれている免疫グロブリンもまた、そ

れぞれの哺乳動物に特有の性質を持っているはずである。本稿は、初乳に出現するウシの免疫グロブリンの特性を中心とした研究をまとめてみたものである。

免疫グロブリンの基本構造と不均一性

1. 基本構造^{3,4)}

免疫グロブリン (Ig) 分子の構造は多様であるが、基本的には大小二種の異なるポリペプチド鎖各二本ずつ、計四本から構成される多重鎖構造をとっているのが一つの特徴である。二種のポリペプチド鎖のうち分子量の小さい方はL鎖 (light chain)、大きい方はH鎖 (heavy chain) と呼ばれている。H鎖は抗原性の違いから、 γ 鎖、 α 鎖、 μ 鎖、 δ 鎖、 ϵ 鎖に分類されており、それぞれのH鎖を持つIgは、IgG、IgA、IgM、IgD、IgEのクラス (class) に属している。同じクラスのH鎖の抗原性にもわずかな違いが見いだされる場合があるが、それらはサブクラス (subclass) として分類される。L鎖も抗原性の違いから κ 鎖と λ 鎖とに分類されているが、これはL鎖のタイプ (type) と呼ばれている。H鎖とL鎖、あるいはH鎖どうしは非共有結合と鎖間のS-S結合によって相互作用し、四本鎖構造が安定化されている。

H鎖とL鎖のN末端から約110個のアミノ酸残基からなる部分は、それぞれの標品によってアミノ酸配列が異なっており、可変領域 (variable region, V領域) と呼ばれている。Igの抗原結合部位はこの部分にあり、抗原

図 1. 免疫グロブリンの基本構造 (各ドメインを小円で表わしてある)

結合部位のアミノ酸配列が少しずつ異なることによって、それぞれの抗原に特異的に対応することができるわけである。V 領域に隣接する C 末端側の部分はアミノ酸の置換が少なく、定常領域 (constant region, C 領域) と呼ばれている。

免疫グロブリンの基本構造でもう一つ重要なものは、V 領域、C 領域ともアミノ酸約 110 残基を単位とする構造単位から成っていることである。この構造単位は一樣に約 60 個のアミノ酸残基から成るループを形成するような一本の S-S 結合を持っている。しかもこの構造単位は V 領域、C 領域に限らず、L 鎖と H 鎖の各クラス間でも類似しており、ドメイン (domain), または相同領域 (homology region) と呼ばれている。H 鎖と L 鎖の V 領域はそれぞれ一個のドメインに相当し、VH, VL で表わされる。また、L 鎖の C 領域は CL, H 鎖の C 領域は CH1, CH2, CH3 のドメインから構成されている。

基本構造にかかわるものとして、プロテアーゼによる限定分解がある。プロテアーゼ処理により、H 鎖の N 末端側半分 (Fd と呼ばれている) と L 鎖とが S-S 結合を介して結びついているもの (Fab フラグメント) と、二本の H 鎖の C 末端側半分で構成されているもの (Fc フラグメント) が生成する。つまり免疫グロブリン分子はヒンジ領域 (hinge region) を中心にふたつの主要な構造単位に分けられる。図 1 に免疫グロブリン分子の基本構造をまとめた。

2. 不均一性と分離

ウシの免疫グロブリンは IgG, IgA, IgM のクラスに分類されている⁶⁾。IgG は二種のサブクラスに分類されているが、別のサブクラスが存在を示唆するもの⁶⁾や三種類のサブクラスとして取扱っている報告^{7-9,70)}もあり、単にふたつのサブクラスだけに分類してしまうのは疑問とする考えもある^{6,10)}。しかし、ある Ig の集団がク

ラス (またはサブクラス) として認められるためには、それらの H 鎖がユニークなアミノ酸配列を持っており、その結果他のものにはない抗原性を示すことが不可欠である¹¹⁾。このようにして識別されるウシの Ig は現在のところ、IgG 1, IgG 2, IgA, IgM の四種類である。一方、ウシの Ig の L 鎖のタイプについては、Hood *et al.*¹²⁾の研究によって λ 鎖と κ 鎖の出現比率が約 9 : 1 であることが明らかにされており、また、 λ 鎖の C 末端のアミノ酸 sequence が一部報告されている¹³⁾。

ヒトやマウスの Ig の研究が進んだのは、ミエローマ蛋白質などのパラプロテイン (paraprotein) が発見されたからである。これらは monoclonal であるため均一であり、免疫グロブリンの構造研究には欠かせないものとなっている。しかし、ウシの場合、Bence-Jones 蛋白質¹⁴⁾や異常 H 鎖についての報告^{15,16)}を除けば、このようなパラプロテインは報告されておらず、polyclonal な正常免疫グロブリンを研究材料とするほかない。したがって、分離精製の方法によって Ig 標品の性質がかなり影響を受ける。

抗原特異性のはっきりしている場合^{17,18)}を除けば、ウシの Ig の分離精製には非特異的な方法が用いられている^{6,19,20)}。各クラスの Ig は分子サイズが異なっているため、それらの分離にゲル濾過が有効である。しかし、IgG 1 は会合してポリマーを形成しやすく^{21,22)}、共有結合した IgG 1 のダイマーの存在も示唆されており^{23,24)}、さらに、IgA には種々の分子型が見いだされている (IgA の項参照)。したがって、この方法による Ig の分離では、目的のクラスの特徴とされる分子サイズとは異なる分子は除外されることになる。

初期の研究で、IgG 1 と IgG 2 がそれぞれ “fast” と “slow” IgG と名付けられていた²⁶⁾のは電気泳動における移動度の差に基いているのだが、その性質とイオン交換クロマトグラフィーからの溶出挙動とは一致している。IgG 2 は陰イオン交換体の平衡化に用いる低イオン強度のバッファーでは支持体に吸着されず、一方、IgG 1 はより高いイオン強度で溶出される性質を持つため、サブクラス分離にこのクロマトグラフィーは有効である。このような比較的明瞭に区別される静電的性質を持っていることは、ウシの IgG サブクラスの一つの特徴である。しかし、V 領域に見られるアミノ酸配列の多様性は、正常な Ig が荷電の異なった不均一な分子集団 (population) であることを意味しており、しかも、その等電点の分布は広い範囲にわたっている^{27,28)}ため、異なったサブクラスに属する分子であっても同じ等電点を持ったものがかなり存在している⁹⁾。したがって、そのよ

うな分子もまた、このクロマトグラフィーによる精製で除去される。

このように、非特異的方法によって分離精製された Ig 標品は、多くの場合もはや original な分子集団の一部にしかすぎない。ウシの Ig 分子について報告されている種々の物理的、化学的パラメーターが、最近 BUTLER⁶⁾ によってまとめられているので、興味ある読者は参照されたいが、それらの報告値の間にはいくつかの不一致が見られる。こういった不一致の多くは、それらのパラメーターの測定法の違いとともに、ウシの Ig の調製法に標準的な方法が確立されていないことも原因の一つと考えられる。

以上のように、Ig 分子は一方で基本構造の類似性を有し、他方で多様性、不均一性を示すという特徴を本質的に持っていることから、蛋白質の同定や特性を示すのに通常用いられるパラメーターの重要性は、Ig の特性を示すためのものとしては限定されたものとなる。Ig 分子の特徴を明らかにするためには別の視点からの研究も必要となるわけである。

IgG サブクラス

ウシの血清ではふたつのサブクラスはほとんど同濃度で存在しているが、初乳では IgG 1 が極端に増加し、逆に IgG 2 の濃度は血清よりかなり減少する (表 1)。これは、初乳への移行の際に、乳腺でなんらかの選択性が働く結果であるが、IgG サブクラスはまた、補体結合反応や細胞親和性のような機能面でも差異を示すことが知られている²⁹⁾。また、*S. aureus* の凝集反応^{30,31)}でもサブクラス間の差異が報告されている。こういった差異の基本には、IgG サブクラスの分子構造上の違いがかかわっているはずである。

1. ヒンジ領域

ウシの IgG サブクラスの示す特徴の一つに、酵素消化における抵抗性の差がある³²⁻³⁵⁾。IgG 1 はペプシンやパパイニンによって容易に消化されるが、IgG 2 は強い抵抗

性を示す。ペプシン処理した場合、全ての IgG 1 が分解される 30 時間後でも、IgG 2 はほとんど intact なままである³⁵⁾。パパイニン消化の場合は、酵素の賦活化の目的で加えられる還元剤の濃度によって若干結果が異なってくる。KANAMARU *et al.*³²⁾ は 0.5 mM のシステイン濃度でパパイニン消化した場合、ペプシン消化と同様、IgG 2 はほとんど消化されないことを報告しているが、BUTLER and KENNEDY³⁵⁾ は 10 mM のシステイン存在下の消化性に差異を認めていない。しかし、島崎ら³⁶⁾ は 10 mM システイン濃度でも IgG 1 のほうが IgG 2 よりも容易に消化されることを報告しているし、ヤギの IgG のパパイニン消化でも同様な結果が報告されている³⁷⁾。

Ig のプロテアーゼ処理では、多くの場合最も初期の切断はヒンジ部位のペプチド鎖上に起こるから、酵素消化性の差異はヒンジ領域の構造の違いを反映したものといえる。

ヒトの IgG サブクラスにも酵素消化に対する感受性の差が報告されているが³⁸⁻⁴¹⁾、それらは H 鎖間 S-S 結合に関するヒンジ領域の構造上の差異から、部分的に説明されている⁴²⁾。アミノ酸組成の分析から、KICKHOEFEN *et al.*⁷⁾ はウシの IgG 1 の half-cystine が IgG 2 より多いことを報告しているが、LISOWSKI *et al.*⁴³⁾ は差異を見いだしていない。筆者⁴⁴⁾ は鎖間 S-S 結合の状態を、還元および再酸化処理で生成する成分の分析から比較しているが、これらの処理により生成する成分の種類や生成速度にほとんど差異は見られない。また、還元処理による遊離 SH 基の値にも差異は見られず、両サブクラスとも一本の H 鎖間 S-S 結合を持つことが示唆されている。したがって、鎖間 S-S 結合近傍はふたつのサブクラスとも類似した状態にあり、酵素消化で見られる差異の原因にはなりえないと考えられる。

一方、ヒト、ウサギ、およびウシの IgG のパパイニン消化性の比較から、ウシの IgG のヒンジ領域に糖鎖が局在していることが示唆されている⁴⁵⁾。このような結合糖鎖の酵素消化への影響は、ウサギの IgG のパパイニン消化性に関して詳しく報告されている⁴⁸⁻⁵⁰⁾。CHIRON *et al.*¹⁾ は、ウシの初乳の IgG 1 が次のような種類の糖鎖構造を持つことを示している。

表 1. ウシの血清と乳汁中の免疫グロブリン濃度 (mg/ml)⁴⁷⁾

		IgG1	IgG2	IgA	IgM
血	清	10.06 (43)	9.04 (39)	0.34 (1)	3.69 (16)
初	乳	64.9 (82)	2.2 (3)	3.5 (5)	8.70 (11)
常	乳	0.64 (74)	0.05 (6)	0.13 (15)	0.04 (5)

() 内は量比

これは Tai *et al.*⁵²⁾ が血清 IgG 由来の糖鎖に報告している構造とほとんど同一である。筆者⁴⁴⁾はサブクラスの糖組成の比較から、IgG2 も類似の糖鎖を持つことを示唆する結果を得た。さらに、後述する切断箇所異なった種々のフラグメントを用いて糖組成の比較を行なったが、糖鎖の結合位置に差異を示す結果は得られなかった。このようなことから、酵素消化への糖鎖の影響に関してもサブクラス間に差異はないものと考えられる。

還元剤による構造変化がないと IgG2 のパペインによる切断は起きないこと、またペプシン消化のような温和な処理では Ig 分子の三次構造の貧弱な部分に酵素の攻撃が集中することを考えると、IgG2 のヒンジ領域が IgG1 に比べコンパクトな構造になっているのではないかと推定される。

2. Fab 部

ウシの IgG1 のパペイン消化により生成する Fab フラグメントは分子量約 50,000 であり⁵⁴⁾、比較的容易く消化混合物から分離されている⁵⁵⁾。トリプシン消化でも同様のフラグメントが得られるらしい⁵⁴⁾。ペプシン消化では F(ab')₂ と呼ばれるフラグメント(分子量約 110,000)が分離されている^{46,54)}。いずれの Fab フラグメントも Fd と L 鎖(分子量約 25,000)から構成されているが、F(ab')₂ はふたつの Fab 部位が S-S 結合しているフラグメントであり、その Fd は Fab のものより約 2,000 程大きい分子量を持つ⁴⁴⁾。これらの Fab フラグメントは、アルカリ性のゲル電気泳動において intact な IgG より遅い移動度を示し、いちど生成するとその後はほとんど消化を受けない。

IgG2 のパペイン消化で生成する Fab フラグメントも単離されている⁴⁴⁾。これは IgG1 のパペイン消化で得られている Fab フラグメントと蛋白質化学的な性質はほとんど同一であり、やはり消化に対する抵抗性を持っている。IgG2 にもペプシン消化による F(ab')₂ フラグメントの生成が報告されている^{32,35)}が、単離されていない。

筆者らは、Fab 部を抗原性の面から比較するため、それぞれのフラグメントに対するウサギの抗血清中に生ずる抗体を分析した⁵⁶⁾。その結果ふたつのタイプの L 鎖に対する抗体がいずれの抗血清にも同定され、PRINGNITZ and BUTLER⁵⁷⁾によって報告されているふたつのサブクラスの Fab 部の免疫化学的不均一性は、この二種の抗 L 鎖抗体に起因したものであることが示唆された。Fd 部に関しては、IgG クラス特異抗体と共に、二種のタイプの L 鎖がそれぞれ結合している Fd 上の部位を識別すると考えられる抗体の存在が示唆され、この部分には抗

表 2. IgG サブクラスのアイソタイプ抗原性の分布

	Fab		Fc	
	C _L	C _H 1	C _H 2	C _H 3
IgG1	κ λ	γ (Fd), Ig(λ)	Ig(κ) Ig(λ)	γ_1 (I), γ (Fc) γ_1 (II)
IgG2	κ λ	γ (Fd), Ig(λ)	Ig(κ) Ig(λ)	γ_2 (I), γ (Fc) γ_2 (II)

原性がほとんどないという考え⁵⁵⁾とは異なった結果が得られている。一方、サブクラスに特異的な抗体はこれらの抗血清中には検出されなかった(表 2)。

このように、ふたつの IgG サブクラスの Fab 部の構造や性質に差異を示唆する結果は得られていない。

3. Fc 部

WIE *et al.*⁵⁸⁾ は初乳の IgG1 のパペイン消化で、C_H2 と C_H3 の二個のドメインから成る二種類の Fc フラグメントが生成することを見いだした。この二種の Fc フラグメント(ラットの IgG で報告されているフラグメント⁵⁹⁾との類似性から Fc(I) と Fc(II) と名付けられている)の分子量はそれぞれ 51,000 と 40,000 であり、Fc(II) は Fc(I) の C 末端側が部分的にさらに消化を受けた結果生成するものと考えられている。しかし、同様なパペイン消化により得られた Fc フラグメントについて、FANG and MUKKUR⁵⁴⁾ は一種類(分子量 50,800)と報告し、FEY は SDS-電気泳動による Fc フラグメントの分子量を約 30,000 と報告している。筆者⁴⁴⁾ もパペイン消化による Fc フラグメントを分離しているが、WIE *et al.* と同様二種の Fc フラグメントが得られた。それらはいずれも鎖間 S-S 結合を欠いており、また DEAE-cellulose からの溶出挙動も類似している。しかも SDS-電気泳動で比較するといずれも分子量約 30,000 と推定される一本のバンドとなり両者に差異は見られない。したがって、FANG and MUKKUR や FEY は二種の Fc フラグメントの混合物を分析していた可能性がある。IgG1 のペプシン消化でも分子量約 28,000 と推定されるフラグメントが分離されているが^{44,58)}、これは C_H3 ドメイン二個から成る pFc と呼ばれるフラグメントである。

一方、IgG2 からは、比較的高濃度のシステインを添加した長時間のパペイン消化物中に生ずる二種の Fc フラグメント(分子量 46,000 の S-S 結合で結合した二本鎖構造を持つものと 25,000 の非共有結合した二本のポリペプチドから成っているもの)が分離されている⁴⁴⁾。

図2. IgG サブクラスの酵素消化で得られる Fc フラグメントのポリアクリルアミドゲル電気泳動

この二種の Fc フラグメントの性質はヒト IgG のパペイン消化で生成する Fc と Fc⁶⁰⁻⁶²⁾ によく類似しており、G₂Fc と G₂Fc' と名付けられている。G₂Fc は IgG₂ の CH₂ と CH₃ の二個のドメインから構成されているが、G₂Fc' は CH₃ ドメインだけを持つものと考えられる。

これらの Fc フラグメントは、アルカリ性のゲル電気泳動ではいずれも数本のバンド群として検出される(図2)。ヒト⁶³⁾やウサギ⁶⁴⁾の Fc フラグメントでも同様の性質が報告されており、酵素による切断が近接した数箇所で行われるためと説明されている⁶⁵⁾。興味あることに、IgG₁ から得られる Fc フラグメントの移動度はほぼ類似したものであるのに対し、IgG₂ から得た二種の Fc フラグメントの移動度は全く異なっており、G₂Fc の移

動度は他のいずれの Fc フラグメントとも異なり陽極への移動が少ない。この結果は IgG₂ の CH₂ ドメインが、他に比べ高い等電点を持っていることを示唆しており、イオン交換クロマトグラフィーや電気泳動でサブクラスが比較的明瞭に分離することの一因と考えられる。

サブクラスを識別する上で最も基本的な構造の差異に関する知見は、Fc 部の抗原性を比較することによって得られるはずである。ウシの IgG サブクラスとしての抗原性は、従来主にサブクラス特異抗血清作製の面から研究されているが^{57,66,67)}、分子構造との関連からとらえた研究はあまりなかった。Wie *et al.*⁵⁸⁾ は、IgG₁ の二種の Fc (Fc (I) と Fc (II)) は同一の抗原性を示し、CH₃ ドメインの C 末端側は抗原構造を持っていないこと、また pFc' との比較から、CH₂ ドメインは CH₃ ドメインにはない抗原性を持っていることを報告している。筆者ら⁶⁶⁾ は、前述の Fc フラグメントに対するウサギの抗血清中に生ずる抗体の分析から、ふたつのサブクラスの Fc 部の抗原性を比較した(表2)。その結果、Fc 部にもクラス特異的抗原決定基が存在するが、それは CH₂ ドメイン上にあり、CH₃ ドメインには見られないこと、また、サブクラス特異抗原決定基は CH₂ と CH₃ の両方のドメインに分布していることが明らかとなった。

MILSTEIN and FEINSTEIN⁶⁸⁾ は、IgG₁ と IgG₂ の C 末端 18 残基のアミノ酸 sequence を比較し、この部分では Met と Thr の置換だけが起こっており、また他の動物との homology も見られることを報告しているが、以上のようにサブクラス分子を構造単位別に比較した場合、Fab 部以外の、CH₂ ドメインを中心とするヒンジ領域から CH₃ ドメインに至る Fc 部の構造部分は、いずれも蛋白質化学的、あるいは免疫化学的にサブクラスに特有の性質を示しており、初乳への移行にも、このような分子構造上の差異が反映しているものと考えられる。

なお、最近 LEARY *et al.*⁷³⁾ は、間接蛍光抗体法を用いてウシの乳腺組織を免疫組織化学的に研究し、IgG₁ の細胞内輸送を明確に示す結果を得ている。この細胞内輸送のメカニズムには、RODEWALD^{75,76)} が新生動物の腸管での IgG の移行について提唱しているメカニズムと類似したものが考えられており^{72,74)}、乳腺細胞上の特異的なレセプターが関与していることが示唆されている⁶⁹⁻⁷¹⁾。

分泌型の免疫グロブリン

ヒトの乳汁、唾液、腸粘液など外分泌液中の主要な Ig は、血清では minor な Ig 成分にすぎない IgA である

ことが明らかにされて⁷⁷⁾以来, IgA の関与する secretory immune system に関する研究が活発になされ, 全身免疫 (systemic immunity) とは別の局所免疫 (local immunity) による 防御機構が 次第に明らかになってきている⁷⁸⁾. すなわち, 生体の粘膜表面は外界と常に接しており, 病原性微生物などの多数の抗原となり得る物質にさらされているにもかかわらず, それらの抗原による感作は正常な状態では見られないが, これは粘膜表面にある IgA が局所の免疫機構を担っている結果, 感染防止や抗原の取込みが規制されているためである.

ヒトやウサギのように胎盤を透過する Ig を持った動物では確かに IgA が乳汁の主要な免疫グロブリンであるのだが, 前述のようにウシでは乳汁に見いだされる Ig の主要なものは IgG であるため, SULLIVAN *et al.*⁷⁹⁾ によって報告されたウシの secretory immune system に関する最も初期の研究では, 乳汁中に IgA の存在を明確に示すことはできなかった. しかし, MACH *et al.*⁸⁰⁾ によってウシの初乳中にも IgA が存在していることが初めて明らかにされ, また PORTER and NOAKES⁸¹⁾ によっても同様な結果が得られている. さらにその後, MACH and PAHUD⁸²⁾ や DUNCAN *et al.*⁸³⁾ によって, 乳汁は例外であるものの, ウシのほとんどの外分泌液でも IgA が主要な Ig であることが報告されている.

1. ポリペプチド鎖の構成

IgA 分子は二本の H 鎖と二本の L 鎖よりなる四本鎖構造を基本としていることは他の Ig と同じであるが, この Ig 分子には様々な分子型が見られる⁸⁵⁾. ヒトの血清中の IgA に見られる IgA のモノマー型とその種々のポリマー型があり, ポリマー型 IgA には普通 J 鎖と呼ばれるサブユニットが結合している. 外分泌液中に見られる IgA は, ダイマー型の IgA に secretory component (SC) と呼ばれるサブユニットが結合した分泌型 IgA (SIgA) として特徴づけられるが, これもまた種々の会合体を形成する.

MACH *et al.*⁸⁰⁾ は, ウシの初乳中の IgA には SC が結合していることを報告していたが, PORTER and NOAKES⁸¹⁾ は, ゲル濾過の結果からウシの初乳中の IgA が不均一な分子サイズを示すことを示唆した. BUTLER⁸⁴⁾ もまた, ウシの初乳中の IgA には SC を持たない IgA がかなり存在していること, SC は通常 S-S 結合によって IgA に結合しているが, 初乳の SIgA には共有結合した SC のほかに, 主に疎水結合を介して非共有結合している SC も見られることを報告している. ちなみに, ウサギの SIgA のふたつのサブクラスは, 非共有結合した SC と共有結合した SC を持つ点で異なっていること

図 3. 初乳および血清から単離された IgA の SDS 電気泳動 1. 人乳 IgA, 2. 初乳 IgA, 3. 血清 IgA.

が明らかにされている⁸⁶⁾.

IgA が実際にどのようなポリペプチド鎖から構成される分子型をとっているのかを明らかにするためには, 単離した IgA の分子集団の蛋白質化学的, 免疫化学的な分析を必要とする. そのような研究は, ウシの鼻粘膜分泌液から精製された IgA⁸⁶⁾ で報告されているが, SIgA とともに, さらに高分子量 (SIgA にモノマーの IgA が結合している) の IgA がかなり存在していることが示されている. また, 気管粘膜から単離された IgA²³⁾ では, SC を持たないダイマーの IgA も見られることが報告されている.

ホエーから非特異的分離法によって調製されたウシの初乳の IgA 含有画分に混入する Ig 成分が IgG1 のダイマーである^{23,24)}ことから, KANAMARU *et al.*⁸⁹⁾ はウサギ抗ウシ IgG1 抗体をリガンドとするイムノアフィニティークラムによって純粋な IgA 標品を調製した. さらに, この標品のゲル濾過と SDS 電気泳動による分析結果から, 初乳の IgA は J 鎖の結合しているダイマーの IgA に共有結合した SC を持つ SIgA であることを明らかにした⁹⁰⁾. その後, IgA の分子集団をウサギ抗ウシ IgA 抗体をリガンドとするアフィニティークラムを用いて初乳ホエーから直接取り出すことも試みられたが⁹¹⁾, そのようにして得られた IgA についても全く同様な結果が得られ, ウシの初乳の IgA は共有結合した SC を持つ

SIgA として、かなり均一な分子型で存在していることが明らかとなった (図 3)。

ところで、IgM もまた SC との結合性を示すことが報告されている⁹²⁾。ウシの IgM の分子構造に関する情報はあまり多くないが、血清から単離されたものについて報告されている結果⁹³⁾では、ヒトなどのものと同様、モノマー型の IgM が S-S 結合を介してペンタマーとして存在している。ウシの初乳から分離された IgM の性質は、MUKKUR and FROESE⁹⁴⁾や KUMAR and MIKOLAJCIK⁹⁵⁾によって報告されているが、血清のものと同様類似していることから、やはりペンタマーの分子型となっているものと思われる。この分子は、ポリマー型の Ig であることから、一分子当り一個の J 鎖を結合していることが確かめられているが⁹⁶⁾、これらの研究では SC の結合に関しては触れられていない。しかし、Sero *et al.*⁹⁷⁾によれば、ウシの初乳の IgM には SC が結合しているが、IgA と違って非共有結合した SC を持つものもあるらしい。しかし、どの程度の比率で非共有結合した SC を持つ IgM が存在しているかは不明である。

2. 初乳への移行

J 鎖を持っているポリマー型免疫グロブリンの上皮細胞における輸送には SC が特異的に関与し、細胞内輸送に際しポリマー型免疫グロブリンのレセプターとして働くことが明かとなっている⁹⁹⁾。MOSTOV and BLOBEL¹⁰¹⁾は、上皮細胞中に存在する SC が分泌液中に見いだされるものより分子量の大きな糖蛋白質 (SC 前駆体) であることを見だしている。また、ウサギの SC 前駆体は 773 残基のアミノ酸からなるが、ポリマー型免疫グロブリンに結合している SC に相当する部分は、18 残基のシグナルペプチド部分や 23 残基の膜透過部分、さらに 103 残基の細胞質部分を除いた、629 残基の細胞外免疫グロブリン結合部分から成っていることが明らかにされている¹⁰²⁾。

KUEN and KRAEHNBUHL¹⁰⁰⁾によると、実際のポリマー型免疫グロブリンの分泌のメカニズムは次のように考えられている。SC 前駆体は基底膜側の上皮細胞膜表面に現われ、ポリマー型免疫グロブリンと結合する。このリガンド-レセプター複合体が形成されると、endocytosis により細胞内に取り込まれ管腔側へと輸送される。最後に、小胞は exocytosis を起こし、SC を結合したポリマー型免疫グロブリンは管腔へ放出される。どの段階で SC 前駆体のプロセッシングが起きるのかは明かではないが、この過程で IgA 部分は分解を受けない。

ウシの乳腺細胞においても、このようなポリマー型 Ig の輸送機構が存在しているかどうかは明らかにされては

いない。しかし、ウシの初乳の IgM や IgA には SC を共有結合した分泌型以外のものは見られないことから、ほとんど同じ輸送のメカニズムが働いているものと思われる。ちなみに、乳汁には unbound な SC (FSC) も存在しているが、ウシの乳汁に報告されていた glycoprotein-a²⁵⁾が実はこの FSC であることが、BUTLER⁸⁴⁾によって示されている。常乳⁹⁸⁾や初乳⁸⁷⁾から単離されたウシの FSC は 76,000-79,000 の分子量を持っているが、SIgA に結合した SC と同一の移動度を示すことが SDS 電気泳動で確認されている⁸⁷⁾。

一方、ウシの血清の IgA はダイマー型の IgA であるとする報告⁸²⁻⁸⁴⁾が多いが、これらもまた単離された IgA の分析から結論されたものではなく、したがって J 鎖を結合したものであるかどうかとも明らかではなかった。しかも、ウシの血清の IgA はモノマー型であるという報告⁸¹⁾もみられる。筆者ら⁹¹⁾は、初乳ホエーの場合と同様に、ウシの血清の IgA の分子集団を単離しているが、その標品にはモノマー型の IgA は検出されず、ウシの血清 IgA は J 鎖の結合しているダイマー型の IgA として存在していることが明らかとなった (図 3)。この標品の SDS 電気泳動では、還元すると SC に相当するバンドが現われ、抗 SC 抗血清とも反応することから、微量の SIgA がウシの血液中に存在していることが示唆される。

ウシの初乳の IgA の由来は明らかではない⁶⁾が、このように血中の IgA のほとんどが J 鎖を持つダイマーの IgA であることを考えると、上述の輸送機構によって血液から取込まれ、初乳を介した local immunity における役割を果たしているのではないかと考えられる。分泌型となって初乳に出現する IgM もまた、血液中から由来するものと考えられるが、この分子の local immunity への関与は明らかではない。

ウシの初乳には、同種細胞親和抗体 (homocytotropic antibody) が比較的多く含まれていることが報告されている¹⁰³⁾。この抗体は、ウシの α , μ , γ 鎖にはない特異的な抗原決定基を持っており、ヒトのレアギン抗体 (reagin antibody) と類似した、ウシの IgE ではないかと考えられている。しかし、まだ単離されて調べられてはおらず、その実体は不明である。また、ウシの乳汁には種々の IgG のフラグメントも生じていることが報告されている¹⁰⁴⁾が、こういった Ig 関連の分子はいずれも絶対量からみると非常に minor なものである。

本稿では触れられなかったウシの乳汁中の免疫グロブリンの生物活性に関しては、初乳への IgG 1 の特異的な

出現や、分泌型免疫グロブリンとしての IgM の高濃度の出現についての生物学的な意義を含め、不明な点が多々ある。そういった問題へのアプローチに、本稿が扱った分子構造や特性に関する知見が少しでも役立つことを願っている。

文 献

- 1) OGRA, P. L., M. FISHAUT and C. THEODORE, in "Human Milk, its biological and social value" (FREIER, S. and EIDELMAN, A. I. eds.), 115-121, Excerpta Medica, Amsterdam. 1980.
- 2) BUTLER, J. E., *Seminars in Perinatology*, **3**: 255-270. 1979.
- 3) 篠田友孝, 免疫グロブリン (尾上 薫・内海 爽編), 16-27. 岩波書店, 東京, 1983.
- 4) NISONOFF, A., J. E. HOPPER and S. B. SPRING, in "The Antibody Molecule", 1-15, Academic Press, New York. 1975.
- 5) EIGEL, W. N., J. E. BUTLER, C. A. ERNSTROM, H. M. FARRELL, Jr., V. R. HARWALKAR, R. JENNESS and R. M. WHITNEY, *J. Dairy Sci.*, **67**: 1599-1631. 1984.
- 6) BUTLER, J. E., *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **4**: 43-152. 1983.
- 7) KICKHOEFEN, B., D. K. HAMMER and D. SCHEEL, *Hoppe-Zeyler's Z. Physiol. Chem.*, **349**: 1755-1773. 1968.
- 8) HAMMER, D. K., B. KICKHOEFEN and G. HENNING, *J. Immunol.*, **104**: 1016-1023. 1970.
- 9) MOSSMANN, H., K. BARTSCH, E. RUEDE, B. KICKHOEFEN and D. K. HAMMER, *Eur. J. Immunol.*, **3**: 293-298. 1973.
- 10) BUTLER, J. E., *J. Dairy Sci.*, **52**: 1895-1909. 1969.
- 11) KEHOE, J. M., *J. Dairy Sci.*, **54**: 1317. 1971.
- 12) HOOD, L., W. R. GRAY, B. G. SANDERS and W. J. DREYER, *Cold Spring Harbor Symposia*, **32**: 133-145. 1967.
- 13) BEALE, D. and M. SQUIRES, *Nature*, **226**: 1056. 1970.
- 14) RODKEY, L. S. and A. T. KIMMELL, *Immunochemistry*, **9**: 23-28. 1972.
- 15) PIESKUS, J., N. DIKINIENE and P. SADAUSKAS, *Immunol. Letter*, **3**: 283-287. 1981.
- 16) BOKHOUT, B. A., *Nature*, **271**: 374-375. 1978.
- 17) WIE, S. I., A. FROESE and K. J. DORRINGTON, *Immunochemistry*, **13**: 697-703. 1976.
- 18) MUKKUR, T. K. S. and W. D. FANG, *Immunochemistry*, **14**: 63-67. 1977.
- 19) BUTLER, J. E. and C. F. MAXWELL, *J. Dairy Sci.*, **55**: 151-164. 1972.
- 20) FEY, H., H. PFISTER, J. MESSERI, N. STURZENEGGER and F. GROLIMUND, *Zbl. Vet. Med.*, **23**: 269-300. 1976.
- 21) TEWARI, U. J. and T. K. S. MUKKUR, *Immunochemistry*, **12**: 925-930. 1975.
- 22) MUKKUR, T. K. S. and G. D. SMITH, *Biochem. J.*, **183**: 463-465. 1979.
- 23) BUTLER, J. E., L. PETERSON and P. L. MCGIVERN, *Mol. Immunol.*, **17**: 757-768. 1980.
- 24) KANAMARU, Y., T. FUJITA, S. OHYA, H. USUI, Y. KUZUYA and T. TANAHASHI, *Res. Bull. Fac. Agr. Gifu Univ.*, **43**: 215-222. 1980.
- 25) GROVES, M. L. and W. G. GORDON, *Biochemistry*, **6**: 2388-2394. 1967.
- 26) MURPHY, F. A., J. W. OSEBOLD and O. AALUND, *Arch. Biochem. Biophys.*, **112**: 126-136. 1965.
- 27) JOSEPHSON, R. V., E. M. MIKOLAJCICK and V. K. SINGH, *J. Dairy Sci.*, **55**: 1050-1057. 1972.
- 28) JOSEPHSON, R. V., E. M. MIKOLAJCICK and D. P. SINHA, *J. Dairy Sci.*, **55**: 1508-1510. 1972.
- 29) MCGIRE, T. C., A. J. MUSOKE and T. KURTTI, *Immunology*, **38**: 249-256. 1979.
- 30) 島崎敬一・青山英俊・祐川金次郎, *日畜会報*, **52**: 368-375. 1981.
- 31) 島崎敬一・祐川金次郎, *日畜会報*, **52**: 425-430. 1981.
- 32) KANAMARU, Y., R. NIKI and S. ARIMA, *Agric. Biol. Chem.*, **41**: 1203-1210. 1977.
- 33) FEY, H., *Immunochemistry*, **14**: 99-106. 1977.
- 34) DE RHAM, O. and H. ISLIKER, *Int. Archs. Allergy Appl. Immunol.*, **55**: 61-69. 1977.
- 35) BUTLER, J. E. and N. KENNEDY, *Biochim. Biophys. Acta*, **535**: 125-137. 1978.
- 36) 島崎敬一・牧 与志幸・祐川金次郎, 第 77 回日本畜産学会講演要旨, p. 151. 1985.
- 37) MICUSAN, V. V. and A. G. BORDUAS, *Immunochemistry*, **12**: 345-347. 1975.
- 38) GERGELY, J., G. A. MEDGYESI and D. R. STANWORTH, *Immunochemistry*, **4**: 369-374. 1967.
- 39) TURNER, M. W., H. H. BENNICHI and J. B. NATVIG, *Clin. Exp. Immunol.*, **7**: 603-625. 1970.
- 40) GERGELY, J., H. H. FUDENBERG and E. VAN LOGHEM, *Immunochemistry*, **7**: 1-6. 1970.
- 41) VIRELLA, G. and R. M. E. PARKHOUSE, *Immunochemistry*, **8**: 243-250. 1971.
- 42) FRANGIONE, B., C. MILSTEIN and J. R. L. PINK, *Nature*, **221**: 145-148. 1969.
- 43) LISOWSKI, J., M. JANUSZ, B. TYRAN, A. MORAWIECKI, S. GOLAB and H. B. KOWSKA, *Immunochemistry*, **12**: 167-172. 1975.
- 44) KANAMARU, Y., Thesis, Hokkaido University, 1984.
- 45) PAYNE, R. B., *Biochem. J.*, **111**: 473-478. 1969.
- 46) 熊野康隆・金丸義敬・仁木良哉・有馬俊六郎, *日畜会報*, **47**: 543-550. 1976.
- 47) BUTLER, J. E., in "The Ruminant Immune System" (BUTLER, J. E. ed.), 3-55, Plenum Press, New York. 1981.

- 48) GOODMAN, J. W., *Biochemistry*, **4**: 2350-2357. 1965.
- 49) FANGER, M. W. and D. G. SMYTH, *Biochem. J.*, **127**: 757-765. 1972.
- 50) SCHLAMOWITZ, M., M. KAPLAN, A. R. SHAW and D. D. TSAY, *J. Immunol.*, **114**: 1590-1598. 1975.
- 51) CHERON, A., B. FOURNET, G. SPIK and J. MONTREUIL, *Biochimie*, **58**: 927-942. 1976.
- 52) TAI, T., S. ITO, K. YAMASHITA, T. MURAMATSU and A. KOBATA, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **65**: 968-974. 1975.
- 53) 内海 爽, 免疫化学 (右田俊介編), 89-119. 中山書店. 東京. 1972.
- 54) FANG, W. D. and T. K. S. TUKKUR, *Biochem. J.*, **155**: 25-30. 1976.
- 55) FEY, H., *Immunochemistry*, **12**: 235-239. 1975.
- 56) KANAMARU, Y., Y. KUZUYA and T. TANAHASHI, *Proc. 5th World Confer. Anim. Prod.*, 655-656. 1983.
- 57) PRINGNITZ, D. J. and J. E. BUTLER, *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **2**: 353-366. 1981.
- 58) WIE, S. I., K. J. DORRINGTON and A. FROESE, *J. Immunol.*, **121**: 98-104. 1978.
- 59) AREND, W. P., M. A. HERNODSON and D. C. TELLER, *J. Immunol.*, **118**: 388-394. 1977.
- 60) POULIK, M., *Nature*, **210**: 133-134. 1966.
- 61) TURNER, M. W. and H. BENNICH, *Biochem. J.*, **107**: 171-178. 1968.
- 62) BENNICH, H. and M. W. TURNER, *Biochim. Biophys. Acta*, **175**: 388-395. 1969.
- 63) MIGITA, S. and F. W. PUTNAM, *J. Exp. Med.*, **117**: 81-104. 1963.
- 64) PUTNAM, F. W., M. TAN, L. T. LYNN, C. W. EASLEY and S. MIGITA, *J. Biol. Chem.*, **237**: 717-726. 1962.
- 65) 右田俊介, 免疫の生化学 (蛋白質, 核酸, 酵素編集部編), 146-158. 共立出版. 東京. 1967.
- 66) BOKHOUT, B. A. and J. J. L. VAN ASTEN-NOORDIJK, *J. Immunol. Methods*, **27**: 101-109. 1979.
- 67) NIELSEN, K. and J. R. DUNCAN, *Res. Vet. Sci.*, **31**: 147-150. 1981.
- 68) MILSTEIN, C. P. and A. FEINSTEIN, *Biochem. J.*, **107**: 559-564. 1968.
- 69) BRANDON, M. R., D. L. WATSON and A. K. LASCELLES, *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, **49**: 613-623. 1971.
- 70) KEMLER, R., H. MOSSMANN, U. STROHMAIER, B. KOCKHOEFEN and D. K. HAMMER, *Eur. J. Immunol.*, **5**: 603-608. 1975.
- 71) SASAKI, M., B. L. LARSON and D. R. NELSON, *Biochim. Biophys. Acta*, **497**: 160-170. 1977.
- 72) LASCELLES, A. K., *J. Dairy Sci.*, **62**: 154-160. 1979.
- 73) LEARY, H. L. Jr., B. L. LARSON and D. R. NELSON, *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **3**: 509-514. 1982.
- 74) WATSON, D. L., *Aust. J. Biol. Sci.*, **33**: 403-422. 1980.
- 75) RODEWALD, R., *J. Cell Biol.*, **58**: 189-211. 1973.
- 76) RODEWALD, R., *J. Cell Biol.*, **85**: 18-32. 1980.
- 77) TOMASI, T. B. Jr., E. M. TAN, A. SOLOMON and R. A. PRENDERGAST, *J. Exp. Med.*, **121**: 101-125. 1965.
- 78) 名倉 宏・渡辺慶一, 最新医学, **38**: 2440-2449. 1983.
- 79) SULLIVAN, A. L., R. A. PRENDERGAST, L. J. ANTUNES, A. M. SILVERSTEIN and T. B. TOMASI, Jr., *J. Immunol.*, **103**: 334-344. 1969.
- 80) MACH, J. P., J. J. PAHUD and H. ISLIKER, *Nature*, **223**: 952-955. 1969.
- 81) PORTER, P. and D. E. NOAKES, *Biochim. Biophys. Acta*, **214**: 107-116. 1970.
- 82) MACH, J. P. and J. J. PAHUD, *J. Immunol.*, **106**: 552-563. 1971.
- 83) DUNCAN, J. R., B. N. WILKIE, F. HIESTAND and A. J. WINTER, *J. Immunol.*, **108**: 965-976. 1972.
- 84) BUTLER, J. E., *Biochim. Biophys. Acta*, **251**: 435-449. 1971.
- 85) 小林邦彦, 免疫と疾患, **2**: 3-15. 1981.
- 86) KOMAR, R., E. C. ABSON and T. K. S. MUKKUR, *Immunochemistry*, **12**: 323-327. 1975.
- 87) KANAMARU, Y., Y. KUZUYA and T. TANAHASHI, *Res. Bull. Fac. Agr. Gifu Univ.*, **45**: 223-229. 1981.
- 88) KNIGHT, K. L., M. L. VETTER and T. R. MALEK, *J. Immunol.*, **115**: 595-598. 1975.
- 89) KANAMARU, Y., Y. KUZUYA and T. TANAHASHI, *Agric. Biol. Chem.*, **46**: 1531-1537. 1982.
- 90) KANAMARU, Y., Y. KUZUYA and T. TANAHASHI, *Agric. Biol. Chem.*, **46**: 2009-2014. 1982.
- 91) 小田切貴志・金丸義敬・葛谷泰雄・棚橋 保, 第76回日本畜産学会講演要旨, p. 89. 1984.
- 92) MACH, J. P., *Nature*, **228**: 1278-1282. 1970.
- 93) BEALE, D. and N. BUTTRESS, *Biochim. Biophys. Acta*, **257**: 372-383. 1972.
- 94) MUKKUR, T. K. S. and A. FROESE, *Immunochemistry*, **8**: 257-264. 1971.
- 95) KUMAR, S. and E. M. MIKOLAJCIK, *J. Dairy Sci.*, **56**: 255-258. 1973.
- 96) KOMAR, R. and T. K. S. MUKKUR, *Can. J. Biochem.*, **53**: 943-949. 1975.
- 97) SETO, A., T. OKABE and Y. ITO, *Am. J. Vet. Res.*, **38**: 1895-1896. 1977.
- 98) LABIB, R. S., N. J. CALVANICO and T. B. TOMASI, *J. Biol. Chem.*, **251**: 1969-1974. 1976.
- 99) BRANDTZAEG, P., *Clin. Exp. Immunol.*, **44**: 221-232. 1981.
- 100) KUEHN, L. C. and J. P. KRAEHNBUHL, *Trends*

- Biochem. Sci., 7: 299-302. 1982.
- 101) MOSTOV, K.E. and G. BLOBEL, J. Biol. Chem.,
257: 11816-11821. 1982.
- 102) MOSTOV, K.E. M. FRIEDLANDER and G. BLOBEL,
Nature, 308: 37-43. 1984.
- 103) HAMMER, D.K., B. KICKHOEFEN and T. SCHMID,
Eur. J. Immunol., 1: 249-258. 1971.
- 104) BUTLER, J.E., Biochim. Biophys. Acta, 295:
341-351. 1973.