免 疫 反 応 と 膜*

—補体系の反応機構を中心に—

大 木 和 夫・野 沢 義 則**

岐阜大学医学部生化学教室 〒500 岐阜市司町 40

要 旨 免疫の研究は、18世紀末の Jenner による経験的な天然痘予防法に始まり、一方では、生化学的な技術の進歩により、抗体分子の構造と機能の關係が明らかにされ、また他方では、細胞生物学や臨床医学の進歩が、免疫系の発達とリンパ球の2つの役割 (T-細胞とB-細胞) を明らかにしてきた。さらに、分子遺伝学の導入は、免疫グロブリンの合成とその多様性についての研究を進め、細胞の表面抗原の遺伝子支配という問題を解明しつつある。近年、著しい進歩をもたらした生体膜の研究も免疫学と結びつけて論じられるようになった。Kinsky らは補体反応を人工脂質膜で起こさせ、*in vitro* での研究を大きく前進させた。スピンドラベル法の創始者で、膜の動的構造の解明に多くの業績をあげてきた McConnell らも、免疫反応の究明に積極的に取り組み、“膜学者”の観点からユニークな研究を行なっている。最近では、膜表面の運動を顕微鏡下で直接に測定する FPR (Fluorescence Photobleaching Recovery) 法を導入した研究も始まっている。

1. はじめに
2. 免疫機構
 - 2.1 抗原・抗体反応
 - 2.2 抗体分子の構造
 - 2.3 抗体産生細胞
 - 2.4 免疫系
 - 2.5 補体系
3. 人工脂質膜系における補体系の作用機構
 - 3.1 人工脂質膜の応用
 - 3.2 補体系の作用機構——膜破壊のメカニズム
 - 3.3 スピンドラベル法を用いた研究
4. 細胞膜表面抗原の運動性とその測定
5. おわりに

1. はじめに

われわれは常に諸種の危険に身を曝しており、一時たりとも防禦の手を休めることはできない。その危険も、交通事故、火災、風水害など外部環境にあるものだけでなく、ウイルスや病原微生物の感染、がんの発生など、体内の目に見えない敵にも脅かされている。これらの敵に対しては、本来備わっている機構が確実な防禦作用を発揮している。

この非自己 (not self) を識別して排除する“免疫機構”は、生物の長い進化の歴史の中で発展して獲得されてきたものであり、その原始的な形態は腔腸動物に備わ

る細胞間の特異的な識別能力に見ることができる。リンパ様の組織が見られ、原始的な免疫グロブリンが存在するのは円口類のヤツメウナギからであり、両生類からは免疫グロブリンの IgG を持つようになり、鳥類以上では、IgM, IgG, IgA を持つにいたる。一方、抗体により活性化され、殺菌作用を示す補体系の存在はチョウザメから知られている。

Jenner の種痘 (1798 年) にはじまる免疫の研究は、タンパク質化学の進歩にともない、抗原と抗体の反応機構や、抗体分子の構造を詳細に調べるようになった。また、リンパ球の細胞生物学的な研究では、T-細胞とB-細胞の役割の実体が、生体の免疫系の発達とともに漸次明らかにされるようになった。一方、抗体の多様性についても、Burnett のクローン選択説 (1959 年) が受け入れられるようになり、さらに、現在では、Idiotypic と抗 Idotypic のネットワーク説という有機的なつながりを

* Immunoresponse and Membranes—Response of Complement System—

** Kazuo Ohki and Yoshinori Nozawa: Department of Biochemistry, Gifu University School of Medicine. 40 Tsukasamachi, Gifu 500, Japan

持った免疫系を考えることが提唱されている。このように、免疫学の近年の進歩は、生物科学の他の分野と同様に著しいものがある。

一方、生体膜の研究もその例外ではなく、つぎつぎと得られた新しい知見は、生体膜が多く生命現象の行なわれる場であることを明らかにし、生物科学のほとんどすべての分野に対して、膜の重要性を認識せざるにいたっている。昨年度のノーベル化学賞は、Mitchell の化学浸透圧説に与えられたが、これも、エネルギー産生という最も基本的な生命現象における膜の重要性が示されたものであり、まさに象徴的な受賞であった。

ここでは、まず、免疫の一般論を概説し、ついで、生体膜研究の方法が積極的に導入された補体系の反応機構に関して、Kinsky らと McConnell らの2つのグループの研究を中心に紹介するが、細胞表面抗原の運動についても若干ふれてみる。

2. 免疫機構

2.1 抗原・抗体反応¹⁾

抗原と抗体は、免疫反応の最小単位であり、それぞれは相対的な関係で次のように定義されてきた。つまり、抗原とは抗体産生の刺激を行なうもので、抗体とは抗原によって誘導されて生じるものである。しかし、今日では、特異的な免疫反応を生じさせるものはすべて抗原と考えられており、抗体についても、アミノ酸の一次配列さらに三次構造までがかなり解明されている。抗原となり得る物質の種類は多く、バクテリア、ウイルス、他種の血球のほかにタンパク質や多糖類なども含まれ、抗原性を有するには5,000から10,000以上の分子量が必要とされている。抗原決定基ではあるが、それ自身では免疫応答を誘起させることができない。“ハプテン”は、担体分子に結合させて、このような分子量を持たせなければならない。抗体分子には、それぞれの抗原分子の抗原決定基と相補的な結合部位を持つものが存在している。X線回折によれば、抗体分子の抗原結合部位は、cavity または cleft を形成しており、その中に抗原決定基を取り込むことが知られている²⁾。ビタミン K₁ の水酸化化合物は、結合定数を $K = \frac{[\text{抗体} \cdot \text{ハプテン}]}{[\text{抗体}][\text{ハプテン}]}$ と定義したとき、ヒトの骨髄腫患者の抗体、IgG New に対し、 $K = 1.7 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ という高い結合定数を示した。この際、3.5 Å の分解能でX線回折を行なったところ、ビタミン K₁ の水酸化物は、Fig. 1 に示すように、16 Å × 7 Å の入口を持ち、深さ 6 Å の凹みに挿入されていた。一方、ビタミン K₁ 水酸化物と部分的に類似構造を持つ、オル

Fig. 1 免疫グロブリン G New とビタミン K₁ 水酸化物の結合部位の構造²⁾

セイン、メナジオン、ウリジンでは $K \approx 1 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ という低い結合定数を有する。抗原と抗体の結合の強さは、抗原決定基と抗体の結合部位の相補性に依存しており、静電結合、水素結合、疎水結合、ファン・デル・ワールス力など、共有結合以外の結合力の総和であると考えられている。

2.2 抗体分子の構造³⁾

抗体は、血清の電気泳動上では、いわゆる γ -グロブリンの部分に存在する。ヒトでは免疫グロブリン G (IgG)、IgM、IgA、IgD、IgE の5つのクラスに分けられている。そのうち、分子量がおおよそ 150,000 の IgG は、S-S 結合によって結ばれた2本ずつの heavy chain (H鎖) と light chain (L鎖) と呼ばれるポリペプチドからなる (Fig. 2)。電子顕微鏡下の観察ではY字型に見え、Yの継ぎ部分の柔軟性によって、2価のハプテンと結合した2量体から5量体までが観察されている (Fig. 3)。正常な血清から IgG を精製したとしても、それは抗原特異性の異なる、つまりタンパクとしてアミノ酸配

Fig. 2 免疫グロブリン γ G_1 (ヒト)Eu の構造³⁾
 PCA: ピロリドンカルボキシル酸,
 CHO: 糖
 矢印は酵素による切断箇所を示す

Fig. 3 抗体とハプテンで作る 2 量体から 5 量体まで
 (Valentine, R. C. and Green, N. M.: *J. Mol. Biol.*, **27**, 615 (1967))
 電子顕微鏡写真からの模式図,
 ◆: ハプテン

列の異なる多くの種類の IgG を含んでいるために、1 次構造の決定は行なえない。しかし、多発性骨髄腫患者の尿中に多量に含まれる Bence-Jones タンパクが、IgG の 1 種類の L 鎖であることがわかり、このタンパク質を用いて抗体分子のアミノ酸配列を決定することに成功した。数人の患者の Bence-Jones タンパクについて決定されたアミノ酸配列により、L 鎖は N 末端から 108 または 109 番目のアミノ酸で分けられる 2 つの部分からなり、どの抗体でも共通な 1 次構造を持つ C 末側（不変部位）と、抗体により異なる配列を持つ N 末側（可変部位）があることがわかった。また L 鎖には、抗 κ 血清にしか反応しない κ 型と、抗 λ 血清にしか反応しない λ 型の 2 つ

の異なる型がある。どの個体でも約 2 対 1 の割合で κ 型と λ 型を持っているが、同一の免疫グロブリンには同時に存在しないことがわかっている。H 鎖の 1 次構造については、骨髄腫のタンパクを用いて調べられ、特異性の異なる抗体では、N 末端から 118 番目までのアミノ酸配列に変化が生じ得る。1 次構造のデータが集積されるにつれて、可変部位には特に変化率の高い“hypervariable region”または“hot spot”と呼ばれる部分があり、L 鎖では 26~32, 48~55, 90~95 番のアミノ酸、H 鎖では 31~37, 51~68, 84~91, 101~110 番のアミノ酸部分である。X 線回折^{2,4)} とアフニティ・ラベル法⁵⁾ により、この部分こそが 3 次元的に抗原の結合部位を形成していることが示された。ところで、H 鎖はすでに述べたように IgG, IgA, IgM, IgD, IgE の 5 つの型に分けられるが、さらに、 γ_1 , γ_2 , γ_3 , γ_4 , α_1 , α_2 , μ_1 , μ_2 などの subclass に分けることもできる。H 鎖の不変部位は、これらのサブクラスごとに 1 次構造に差があり、そのために異なる生物活性を持つことになる。IgG では、CH₂ 部位が補体の C_{1q} 成分と結合し、CH₃ 部位が単球の表面と結合することが知られている。これらの生物活性の発現には、抗体が抗原と結合することが必要である。

免疫グロブリンの遺伝子の解析を、アミノ酸の 1 次配列の比較から行なってみると、免疫グロブリンはアミノ酸が約 100 個のポリペプチド単位（相同領域）が進化の過程で重複し、変異を起こしてきたことがわかる⁶⁾。免疫グロブリンについて、もう 1 つの遺伝子上の重要な問題がある。免疫グロブリンには可変領域のアミノ酸配列の相異によって、抗原に対する特異性の異なるたいへん多種類の分子が存在するが、これらの免疫グロブリンに対するタンパク合成の情報が、本来備わったものとして生殖細胞に含まれている (germ line) ものか、体細胞の変異 (somatic mutation) によって生じたものかを決定することである。DNA 上の V 遺伝子と C 遺伝子はそれぞれ別の独立した遺伝子であり、組み換えによって 1 つの連結した遺伝子になる^{7a)}。実際、DNA にハイブリッドを形成させる実験では、L 鎖の C 部位遺伝子はハプロイドあたり 2 個か 3 個しか存在しないが^{7b)}、L 鎖の V 部位遺伝子は、生殖細胞ですでに約 5,000 回の繰り返しがあるとの報告がある。しかし、V 遺伝子の多様性が germ line か somatic mutation かという問題の解決には、今後の研究に待たなければならない。

2.3 抗体産生細胞

抗体分子の構造の研究では骨髄腫やマクログロブリン血症の患者から、単一種の免疫グロブリンが精製された

Fig. 4 哺乳類におけるリンパ球の発達と分化⁹⁾Table 1 皮膚移植に対する胸腺切除とファブリキウス嚢切除の影響⁸⁾

	10日後	27日後
対照	0/10	0/10
対照 (X線照射)	1/15	0/15
ファブリキウス嚢切除 (X線照射)	0/15	0/15
胸腺切除 (X線照射)	5/12	5/12

分子：生存移植片を有する個体数

分母：被実験個体数

ことが、ヒト免疫グロブリンのアミノ酸の1次配列の決定や、3次構造の解析を行なうことを可能にした。しかし、免疫機構の研究では実験動物を用いなければならなかったために、哺乳動物の免疫機構に関する多くの知見は、主にマウスを用いた実験系で得られている。

すべての免疫反応は、抗原が何らかのかたちで immuno-competent cell に直接作用することから始まっているが、その後の反応は2つに大別される。1つは、遅延型過敏症、移植免疫、そしてウイルスや細菌、寄生虫に対する免疫を含む細胞性免疫であり、もう1つは、循環系に抗体を産生して供給する体液性免疫である。一方では、リンパ球の分化には明白に区別される2つの方向があることが知られるようになり、それはニワトリ（ヒヨコ）を用いて、胸腺またはファブリキウス嚢を外科的に切除したときの移植片に対する拒絶反応を調べることで明らかになった⁸⁾。Table 1 に示すように胸腺を切除してX線照射した群では、27日後でも移植片は12例のうち5例で残っているが、胸腺を有する群ではすべての移植片は拒絶されて脱離している。一方、ウシ流産菌 (*Brucella abortus*) またはウシ血清アルブミンを抗原として感

作したときには、ファブリキウス嚢を切除してX線照射した群だけに抗体の存在が確認されなかった。さらに、末梢リンパ組織の観察においても、胸腺切除—X線照射の場合と、ファブリキウス嚢切除—X線照射の場合では、形態的な差が見られ、前者では小リンパ球が観察されなくなるが、後者では小リンパ球がはっきりと認められる。ところで胸腺摘出したマウスに、細胞性免疫を回復させるには、胸腺または胸管のリンパ球を注入することが必要で、骨髓細胞やX線照射した胸腺あるいは胸管リンパ球、または胸腺抽出物では免疫回復効果がないことも示された。これらの結果より、ファブリキウス嚢は体液性免疫を担う抗体産生細胞の発達に寄与し、胸腺は細胞性免疫に関わるリンパ球の分化を制御していることが明らかにされた。

哺乳類のマウスでは、ニワトリのファブリキウス嚢と同様な機能は骨髓にあるとされているが、ヒトではまだ十分に明らかにされておらず、骨髓または脾臓（胎児では肝臓）にそのような機能があると考えられている。そして、マウスを用いた一連の研究によって、リンパ球に2種類があり、B-細胞 (bone-marrow-derived cell) とT-細胞 (thymus-derived cell) が、それぞれ体液性免疫と細胞性免疫を、両者の協力関係を維持しつつ分担していることが明らかにされた⁹⁾。これらの細胞の分化の過程は、Fig. 4 に示したような経路に従うと考えられている。卵黄嚢 (yolk sac) から派生した哺乳動物胎児肝 (fetal liver) の幹細胞 (stem cell) は発達・分化して、その子孫がリンパ球 (lymphocyte)、赤血球 (erythrocyte)、巨核球 (megakaryocyte) などになる。成体では、幹細胞は骨髓で造られており、循環の途中で胸腺に入ったものはT-細胞に分化して末梢血に入り、また哺乳動物では

不明であるが、鳥のファブリウス嚢に相当する部分に入ったものは B-細胞に分化する。T-細胞と B-細胞を形態的に区別することは難しいが、細胞膜の抗原性を調べる免疫学的方法を用いると両細胞を分類することが可能である。B-細胞は、膜表面に免疫グロブリンの IgM と IgD を持っており、その数は 1 細胞あたり 10^5 個程度である¹⁰⁾。この数は T-細胞の 100 倍から 1000 倍に達するので、L 鎖に対する蛍光抗体で B-細胞を染め分けることができる。また、B-細胞は抗体の Fc 部位に対する受容体 (receptor) も持っているの、たとえば赤血球の表面をその IgG で被覆したものをを用いると、ロゼットをつくらせることができる。一方、T-細胞は Thy. 1 という脳と共通な抗原を持っており、ヒツジ赤血球と容易にロゼットを形成する。ところで、これらの方法では、B-細胞とも T-細胞とも決定できない一群の細胞が存在するが、それらは null-細胞と呼ばれている。また、T-細胞はさらに分類されて、免疫刺激を受けていない 'short-lived' T_1 -細胞と刺激を受けた 'long-lived' recirculating memory T_2 -細胞とに区別される。ネズミの Ly 抗原を用いれば、機能的に分化した T-細胞の分類が可能となる。相対的に未分化な細胞は Ly 1, 2, 3 の抗原を持つが、helper T 細胞では Ly 1 抗原だけを持ち、cytotoxic T-細胞と suppressor T-細胞では、Ly 2, 3 の抗原を持つようになる。

B-細胞の表面には、IgM とこれにほぼ等しい分子量を有し糖含量の多い IgD が存在するが、細胞表面のこれらの免疫グロブリンは小胞体で合成された後にゴルジ体で糖を付加され、ついで細胞表面に組み込まれることが ^3H -アミノ酸を用いたトレーサー実験で示された。

2.4 免疫系

免疫学は、従来どちらかといえば“非自己 (not self)”の認識とその排除ということに大きな関心が向けられてきたが、Jerne は、免疫系は“非自己”よりも、むしろ相互に“自己 (self)”を認識し合っているとの考え方から、idiotype と抗 idioype の 'net work' 説を提唱した。この理論については、最近の発展までを含めた優れた総説としてまとめられている^{11,12)}。つまりこの説¹³⁾によると、Fig. 5 に示すように、リンパ球は抗原のエピトープ (抗原決定基) を識別する抗体分子 (細胞表面の抗原レセプター) を持っているが、この抗体分子は、他のリンパ球に対しては抗原として識別されている。換言すれば、リンパ球または抗体分子は相互にその idiotype を識別しており、ここに抗 idiotype 抗体が存在することになる。したがってリンパ球は、idiotype を識別するこ

Fig. 5 リンパ球の作業ネットワーク¹³⁾

矢印の方向は刺激を、矢印の逆方向は抑制を示す。ネットワークの中には、抗原特異性が異なるが、イデオタイプ (抗体の抗原性) が等しいもの、外部抗原と等しいイデオタイプを持つものなどが存在する。

とで刺激されると同時に、自身の idiotypic が識別されることで抑制されており、リンパ球全体としては、このような刺激と抑制の net work によって恒常状態が保たれていることになる。この状態に、異物である抗原が入り込むと、この抗原刺激により恒常状態が崩れて抑制から解放される。そして、net work を通して、刺激はさらに伝播されるが、抑制作用との緩衝によって調節される。これが、net work 説の基本的な考え方であるが、一方ではこの系に T-細胞の寄与を導入し、抗原の刺激を受けた T-細胞がこの系の平衡を乱すという考え方もある。

2.5 補体系

免疫系には、今まで述べてきた抗原に特異的な抗体の系の他に、生体膜に対して生物活性を示す補体系が存在する¹⁴⁾。補体は、1880 年から 1890 年にかけての血清の殺菌作用の研究の中で発見され、この殺菌作用は補体の協力作用であることが判明した。この場合の抗体の役割は、体内に入った異端細胞を認識して、補体を活性化し、かつ侵入細胞の表面に補体を固定することによって補体の傷害作用を有効にすることにある。

補体は 11 種類のタンパク質からなる補体系を構成しており、これらの成分は、 C_{1q} , C_{1r} , C_{1s} , C_2 , C_3 , C_4 , C_5 , C_6 , C_7 , C_8 , C_9 などと命名されている。そして、これらのタンパク質はすでに精製、単離されており、その分子量や電気泳動的易動度などが明らかにされている¹⁴⁾。補体系の連鎖反応の開始は、 C_{1q} が抗体によって活性化されることで始まる。 C_{1q} は、IgM または IgG の C_{H2}

Fig. 6 補体反応の古典経路 (classical pathway)¹⁴⁾

部分に結合して活性化されるが、IgA や IgE には結合せず、IgG でもその 2 分子以上が近接して存在する状態でないと結合しない。現在考えられている補体系の反応の連鎖は Fig. 6 に示すとおりである。IgG または IgM と結合した C1q は、Ca²⁺ と C1r の仲介により C1s が酵素活性を持つようになる。この活性化された C1s は、C4 に作用し C4b と C4a に分割する。C4b の大半は不活化されてしまうが、1 部は細胞膜表面のレセプターに結合し、Mg²⁺ を仲介として C2 を吸着させる。吸着した C2 に再び活性型 C1s が作用し、C2a と C2b に分割する。この C2a は C4b に結合して、C3 コンバーターゼ (convertase) と呼ばれる酵素になる。そして、C3 はこの酵素によって C3a と C3b に分割され、C3a は体液中に遊離されて炎症に関与する因子となり、C3b は細胞に結合して C5b コンバーターゼと呼ばれる酵素を形成する。ついでこの酵素は C5 に作用して C5a と C5b に分割する。C5a は体液中に遊離されて C3a と同様に炎症に関与する因子となるが、C5b は膜傷害反応をスタートさせる。この反応はまだ十分には解明されていないが、C5b、C6、C7、C8、C9 によって、膜に傷害を与える巨大な複合体が形成されると考えられている。この複合体形成過程と傷害作用の発現機構については次章で述

べる。以上に示したものは、古典経路 (classical pathway) と呼ばれている C1q の抗体による活性化でスタートする補体系であるが、補体系にはプロパージン経路 (properdin pathway) または alternative 経路と呼ばれるもう 1 つの経路が存在する¹⁵⁾。この経路は抗体の関与がなくても多糖体やリポ多糖体、または IgA の集合体により自然に活性化される。この経路には initiating factor, C3, proactivator, proactivator convertase, properdin, C3b inactivator, C3b inactivator accelerator などのタンパク質因子があり、Fig. 7 のような反応経路が推定されている。

3. 人工脂質膜系における補体系の作用機構

3.1 人工脂質膜の応用

補体系の作用を人工脂質膜上で再現させることがすでに成功しており、多くの重要な知見が得られている^{16~18)}。最初に補体系の作用を脂質二重層の人工膜で観察したのは Barforts ら¹⁹⁾ であるが、スフィンゴミエリンと α -トコフェロールで作った膜の片側に抗血清を加えておき、反対側にリゾチーム、インスリン、リボスクレアーゼなどのタンパク抗原を添加すると膜の電気抵抗が急速に減少することを見出した (Fig. 8)。この現象は、56°C 30 分の熱処理を施した抗血清ではもはや観察されず、補体としてモルモットの血清を加えると再び電気抵抗の減少が生じた。一方、Haxby と Kinsky はタンパク質がまったく関与しない、脂質だけの人工膜として、Forssman 抗原を利用できるヒツジ赤血球の抽出脂質を用いてリボゾームを調製した²⁰⁾。このリボゾームに取り込まれたグルコースは、ウサギの抗ヒツジ血清 (抗体) とモルモット血清 (補体) の存在下で、65% が放出されることを観察した。また、Fig. 9 に示すように Forssman 抗原を加えて調製した、レシチン/コレステロール/スフィンゴミエリン系のリボゾームでも同様な結果が得られている²¹⁾。さらに、抗原としては、哺乳動物のセラミド、細菌のリポ多糖体、リポド A、またはガングリオシド、モノまたはジガラクトシルグリセリド、カルジオリピンなどを組み込んだリボゾームを用い補体系の作用が調べられた。一方、合成の両親媒性ハプテンを用いる実験もあり、ホスファチジルエタノールアミン、リゾホスファチジルエタノールアミン、グリセロホスファチジルエタノールアミンの 2,4-ジニトロフェニル誘導体がリボゾーム膜中に挿入されている²²⁾。Alving らは糖脂質の抗原性の発現に関して、その化学構造と反応の場であるリボゾームの脂質構成の影響を検討するために、糖鎖の

Table 2 フォルスマン抗原を含むリポゾムからの補体作用によるグルコースの遊出
——コレステロールと温度の影響²⁴⁾

		遊出グルコース (%)			
		DMPC- コレステロール (1:1)	DPPC- コレステロール (1:1)	DPPC	卵黄レシチン- コレステロール (1:1)
対照 (無添加)	21~23°C	0.25	0	1.89	1.0
	35°C	1.52	1.87	8.03	7.7
モルモット血清	21~23°C	60.7	53.3	16.5	70.2
+					
抗フォルスマン抗体	35°C	68.5	58.9	47.2	77.9
熱処理モルモット血清	21~23°C	2.29	1.40	1.42	2.55
+					
抗フォルスマン抗体	35°C	15.2	0.46	7.56	6.73
モルモット血清	21~23°C	0	0	0.95	3.88
	35°C	0.38	0	8.50	3.36

コースは最大でも 60 から 70% までしか遊出されない。ところが超音波処理の後にセファロース・カラムで調製した単一層リポゾムを用いて umbelliferone phosphate の遊出をその蛍光で測定すると、補体系により 100% 遊出することが示された²⁵⁾。かくして人工脂質膜の応用範囲は、単一層のリポゾムにまで広げられることになった。

なお古典経路だけでなくプロパージン経路についても、卵黄レシチンのリポゾムを用いて補体作用の研究がなされている²⁶⁾。

3.2 補体系の作用機構—膜破壊のメカニズム

補体系の一部の反応が人工脂質膜の系で再現されるようになり、その作用機構の解明に大きな進歩をもたらした。まったくタンパク質を含まない人工脂質膜において補体作用が示されることから、補体の作用点は脂質と考えられ、まず補体系のホスホリパーゼ活性が検討された。Inoue と Kinsky は巧みな実験により、補体系の作用はホスホリパーゼ活性によるのではないことを示した²⁷⁾。つまり ^{32}P -リン酸をラット腹腔内に注射し、肝臓から ^{32}P -レシチンと ^{32}P -スフィンゴミエリンを抽出し単離した。この標識リン脂質と Forssman 抗原またはグロボシド、それにコレステロールとジセチルホスフェートを加えてリポゾムを調製した。ついで Forssman 抗原を含むリポゾムに対しては、ウサギの抗ヒツジ赤血球血清とモルモット血清 (補体) によって処理が施され、グロボシドを含むリポゾムは抗グロボシド血清とモルモット血清による処理がなされた。ところで、仮に補体系にホスホリパーゼ活性があるとすれば、Fig. 11 のよ

Fig. 11 各種ホスホリパーゼによるレシチンとスフィンゴミエリンからの産生物²⁷⁾

①ホスホリパーゼC, ②ホスホリパーゼD
③スフィンゴミエリンにも活性を持つホスホリパーゼD, ④スフィンゴミエリンにも活性を持つホスホリパーゼC, ⑤スフィンゴミエリナーゼ, ⑥ホスホリパーゼAまたはB, ⑦ホスホリパーゼB, ⑧スフィンゴミエリナーゼ

* は ^{32}P の放射活性を持つ産生物

うな各種ホスホリパーゼのいずれかによる産生物が生ずるはずである。しかし、実験の結果は、抗原を含まない対照に対して3~10倍も強いグルコース遊出 (60%) を伴う場合でも、クロロホルム-メタノール相にほぼ100%の放射活性が抽出され、その抽出物をシリカゲル薄層板上でクロロホルム/メタノール/水 (70:30:5) により分離すると、97.6%以上の放射活性がレシチン部分に回収された (Table 3a)。これは、スフィンゴミエリンを用いたときも同様であり、98%以上の放射活性がスフ

Table 3 補体処理リポゾームから抽出した ^{32}P -放射活性物質の薄層上での分布²⁷⁾

a. レシチン・リポゾーム

	抗グロボシド抗体+補体		抗フォルスマン抗体+補体	
	レシチン	レシチン+ グロボシド	レシチン	レシチン+ フォルスマン抗原
薄層からの回収率 (%)	72.2	71.8	72.0	75.0
分布 (%)				
原点からレシチンの下まで	2.20	1.26	1.88	0.91
レシチン	97.6	98.5	98.0	99.0
レシチンの上から先端まで	0.20	0.24	0.12	0.89

b. スフィンゴミエリン・リポゾーム

	抗グロボシド抗体+補体		抗フォルスマン抗体+補体	
	スフィンゴ ミエリン	スフィンゴミエリ ン+グロボシド	スフィンゴ ミエリン	スフィンゴミエリン +フォルスマン抗原
薄層からの回収率 (%)	68.5	62.0	68.0	71.6
分布 (%)				
原点からスフィンゴミエリンの下まで	0.66	0.86	0.27	0.80
スフィンゴミエリン	98.5	98.0	99.4	99.2
スフィンゴミエリンの上から先端まで	0.84	1.14	0.33	0

Table 4 フォルスマン抗原を含む卵黄レシチンまたはホスホニル類縁体のリポゾームからの
グルコースの遊出²⁸⁾

	対 照	ホスホリ パーゼ C	抗血清+モル モット血清	抗血清+熱処理モ ルモット血清
卵黄レシチン/コレステロール/ジセチルホスフェート	3.5	67.5	70.2	17.2
ホスホニル類縁体/コレステロール/ジセチルホスフェート	3.7	6.0	73.4	12.4
卵黄レシチン/コレステロール/ステアシルアミン	1.0	98.8	87.4	4.9
ホスホニル類縁体/コレステロール/ステアシルアミン	1.3	3.6	65.4	6.8

数字は%を示す。

インゴミエリン 部分に認められた (Table 3b). 対照実験として、ホスホリパーゼでリポゾームを処理した場合は、グルコースの50%遊出を誘起するためには、40~50%のレシチンの分解が必要である。しかしこの際、1%の脂質の分解が補体系の作用を発現している可能性は否定できないが、このことはホスホリパーゼA, B, C, Dによって分解されないレシチンの類縁体を用いることによって明確にされた²⁸⁾。D, L-1,2-diacyloxypropyl-3-(choline) phosphate はホスホリパーゼCに対して基質にならないことを除けば、レシチンと同じような性質を示すが、このリポゾームでも補体系の作用によってグルコースが遊出された。つまり、補体系の作用はホスホリパーゼCの活性ではないことが明らかにされた (Table

4). また、D, L-1-octadecyloxy-2-hexadecyloxy-propyl- [2'-trimethylammonium) ethyl] はホスホリパーゼの A, B, Dの基質にはならないレシチン類縁体であるが、このリポゾームはやはり補体作用を介してグルコースの遊出をもたらした。したがって、補体系の作用はこれらのホスホリパーゼによるものでないことが示唆された。

ところで、リポゾームで示された補体系による膜傷害作用 (赤血球では溶血作用、細菌では溶菌作用そして動物細胞では細胞溶解作用) の機構としていくつかの仮説が提案されている^{29,30)} (Fig. 12). その1つは, leaky-patch モデルであり、補体系 (実際には $\text{C}_{5b,6,7,8,9}$ の巨大複合体) の作用により脂質二重層に leaky な部分が生じるとの考え方であり、これは脂質チャンネルモデル

Fig. 12 補体の膜障害作用機構のモデル³⁰⁾

- a. ドーナツ・モデル
- b. 脂質チャネル・モデル
- c. 混合ミセル・モデル

と混合ミセルモデルを含む。他のものは doughnut モデルと呼ばれ、巨大複合体に integral protein があり、それが膜に hydrophilic pore を作るの考え方である。補体によって膜に生ずる構造物（巨大複合体）は電子顕微鏡で調べられ、暗い中央部を取り囲む明るい環が観察されている。この暗い中央部の直径は、ヒトの補体では 100—110 Å，モルモットの補体では 85—95 Å である。より詳細な構造を調べるために、フリーズ・フラクチャー電顕が用いられたが、膜を貫通している 'hole' は確認されていない³¹⁾。なお、このような膜構造はポリエン抗生物質のフィリピンによって生じる“ピット” (pits) 構造ときわめて類似しているが、この場合にもやはり膜を貫く“孔”は認められない³²⁾。しかし、一方ではネガティブ染色により補体の巨大複合体が膜を貫通している電顕像も示されている³³⁾。また、補体系によって生じた

Fig. 13 補体成分の添加による卵黄レシチン膜のコンダクタンスの変化³⁵⁾

膜の段階的なコンダクタンスの変化から膜には 22 Å の穴が生じているとの報告もある³⁴⁾。補体作用における各成分のはたらきを調べるために、いろいろな組み合わせで加え、膜のコンダクタンスの変化を測定した実験がある³⁵⁾。それによると、卵黄レシチン膜に、C5b,6 さらに C7 まで加えてもコンダクタンスの変化は見られないが、C8 を加えると軽度のコンダクタンスの増加が生じる。さらにこの系に C9 を添加すると、量としては少ないが、その添加量に応じてコンダクタンスの増加が著明になり、最終的に膜の破壊に至る (Fig. 13)。また、C5b,6, C7, C8, C9 のいずれかの 1 つを欠いた組み合わせの系では、膜コンダクタンスの急激な増大は起こらず、4 つの成分がすべて揃っている時のみ変化が生じた。ただしこの場合でも、添加する順序が重要な因子となり、C5b,6 → C7 → C8 → C9 の順に加えた時には、コンダクタンスの急激な上昇が起こって黒膜は破壊するが、C5b,6 → C7 → C9 → C8, C5b,6 → C8 → C9 → C7, C7 → C8 → C9 → C5b,6 のような添加順序では最後の成分の添加によって、わずかなコンダクタンスの増加が見られたにすぎない (Table 5)。このことから、ある一定の決められた構造を造ることが補体作用の発現に必要であると考えられる。なお、赤血球の溶血作用に対する補体成分の影響については、次節で述べる。

3.3 スピンラベル法を用いた研究

Ohnishi と McConnell によって 1965 年に始められたスピンラベル法は生体膜研究の分野で発展し、分子レベルでの情報を得ることを可能とし、生体膜構造や物性に関して多くの知見を与えてきた。しかも McConnell は、膜流動性の測定とその理論的な裏付けを行なったのみでなく^{37,38)}、'flip-flop'³⁹⁾、'lateral diffusion'⁴⁰⁾、'lateral phase separation'⁴¹⁾ などの新しい概念を、一連の実

Table 5 補体成分の系統的な添加による卵黄レシチン膜のコンダクタンスの変化³⁵⁾

	2 回 目 の 添 加							
	C _{5b,6}		C ₇		C ₈		C ₉	
な し	0	0.1	0	0.1	0	0.1	0	0
C _{5b,6}			0	0.3	0	0	0	0.1
一 C ₇	0	0.3			0	0.1	0	0.1
回 C ₈	0	0	0	0.1			0	0
目 C _{5b,6} +C ₇					1	9	0	0.2
の C _{5b,6} +C ₈			測定せず				0	0
添 C ₇ +C ₈	測定せず						0	0
加 C _{5b,6} +C ₇ +C ₈							20	1000
C _{5b,6,7}					0	0	0	0
C _{5b,5,7,8}							0	0.1

値は $G/G_0 - 1$ の式より求めた。G₀は 1 回目の添加時の、G は 2 回目の添加時のコンダクタンスである。左側が最小値、右側は最大値。空欄は成分が重複するので実験せず。

Fig. 14 DMPC-コレステロールの相図とカルジオリピンの影響⁴²⁾

実線は Tempo・スピンプローブによる測定で得られた DMPC-コレステロールの 2 成分系の相図である (Shimshick, E. J. and McConnell, H. M.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **53**, 446 (1973)). ○印は 3 モル % の DMPC を 3 モル % のカルジオリピンに置換した時の相転移点を示す。

験結果によって明らかにしてきた。また最近に至っては、免疫領域の精力的な研究も始め、“膜学者”としての背景を十分に生かした独創的な研究の結果を報告している。以下にそれらの主ないくつかを紹介してみる。

(1) McConnell らの研究

最初の報告はコレステロールの補体結合に対する影響を調べたもので、Tempo スピンプローブを用いて得た DMPC とコレステロールの相図と補体結合の相関性が

Fig. 15 ハプテンとなるリン脂質スピンプローブの構造⁴⁵⁾

示された。つまり、カルジオリピンを抗原として含む DMPC のリポソームに対して、梅毒血清を用いてモットモットの補体結合を調べた結果、コレステロールの含量が 35 モル % 以上になってはじめて結合し始める。この値は、リポソーム中に抗原として含まれる 3 モル % のカルジオリピンが、DMPC/コレステロールの相図の固相曲線に影響し始める点のコレステロール量に一致しており (Fig. 14)、補体の結合が抗原の膜内での運動性に影響されることを示唆している。つまり、コレステロールは固相状態を崩して、より流動的にするように作用していると考えられる。抗原に対する抗体の結合をスピンプ

Fig. 16 ハプテンとなるスピンプローブの ESR スペクトル⁴³⁾

左：スピンプローブが抗体によって強く運動を制限されたときのスペクトル

右：a) 上から下へ順に、添加する抗体量を増したときの ESR スペクトルの変化，b) 最下段のスペクトルの拡大図

ベルを用いて定量する方法も考案されている⁴³⁾。Fig. 15 に示すスピンプローブの *N*-(1-oxyl-2, 2, 6, 6-tetramethylpiperidine) 部分はハプテンになるので、この脂質スピンプローブの抗体を得ることができる。膜内に取り込まれたこのスピンプローブは、15ガウスの間隔に鋭い3本の吸収線のある ESR スペクトルを示すが、抗体が結合すると運動が強く制限されたスペクトルに変化し、3本線のスペクトルの強度はその分だけ減少するので、その減少量から結合した抗体の量を直接に定量することができる (Fig. 16)。この脂質スピンプローブに対する IgG 抗体と Fab 抗体フラグメントの結合が、DPPC/コレステロールのリポゾームで調べられ⁴⁴⁾、コレステロール含量が 20~30 モル%に達すると、IgG と Fab の結合量が増加し始め、最終的な結合量は両者で等しいことが明らかにされた。また 補体の結合に関して、32°C で固相状態にある DPPC と液晶状態の DMPC の系で検討された結果、高濃度のハプテン存在下 (0.25~0.5

%) では補体の結合に差はないが、0.1 モル%以下になると DPPC では補体の結合が急激に減少するのに対して、DMPC ではその減少がゆるやかであることが示された。ただし 50 モル%のコレステロールを含む DPPC では補体結合の減少も緩和される (Fig. 17)。抗体の結合には膜の流動性が関与しており、補体結合においては、ある密度以上で抗体が均質に分布しているか、あるいは局所的にそのような抗体密度を達成できるような膜の流動状態の必要性が示唆された。ハプテンとなるニトロキシド基の膜面からの距離については (Fig. 15 参照)、極性基から離れているものほど IgG または Fab の結合量は増し、また コレステロールもこの結合

Fig. 17 リポゾーム上での補体結合に対する脂質組成、ハプテン濃度、抗体濃度の影響⁴⁴⁾

各曲線上の数値はリポゾーム中のハプテン濃度 (モル%)

量を左右し、DPPC では 20 モル%を越える付近から結合量は増え始める。補体の結合量もスピンプローブ I では対照と差がないが、II, IIIの順に増加した。コレステロールの効果が ¹³CNMR によって詳細に調べられ、20~40モル%のコレステロールを含む領域でコリンのメチル炭素の高磁場側へのケミカルシフトが見られ、50モル%のコレステロールを含む場合にコリンメチルあるいはハプテンの運動が最大になることが示された。これらの一連の実験も、抗原の運動性すなわち脂質の流動性が抗体と補体の結合に直接に関連していることを強く示唆している^{44,45)}。

抗体として IgM を用いたときの補体結合に対する効果は、やはりリポゾーム上のハプテンの分布状態に左右され、ハプテン分子間の距離が大きくなると補体結合量は減少し、均一な分布より不均一分布の方が結合量は多い。なお、この場合にも IgG に見られたのと同じコレステロール効果が観察されている⁴⁶⁾。一方、精製した

Table 6 脂質の平面多重層膜に対する補体の影響⁴⁹⁾

脂質組成, スピンラベル	添 加	$h(+1)/h(10)$	2Amax [G]
DMPC/コレステロール (1:1)	緩 衝 液	0.68	61.0
	C _{5b,6}	0.67	60.5
	C _{5b,6,7}	0.43	60.5
DMPC/コレステロール (1:1)	緩 衝 液	0.70	53.0
	C _{5b,6}	0.68	53.0
	C _{5b,6b7}	0.68	56.0
アンドロスタン・スピンプローブ	C _{5b,6,7,8}	0.52	56.0
	C _{5b,6,7,8,9}	0.36	55.0

C_{1q} 成分の結合については、ハプテンを含まないリポゾームでは1%以下の C_{1q} が結合するにすぎないが、0.2%のハプテン存在下では抗体濃度に応じた C_{1q} の結合が見られた⁴⁷⁾。フリーズ・フラクチャ電顕観察では、0.2 モルハプテン脂質を含む DPPC リポゾーム膜に、その特異抗体または特異抗体と C_{1q} を添加した場合に限って膜内粒子が観察された。C_{1q} が存在すると、液晶状態にあるリポゾームでは膜内粒子のクラスター形が生じるが、固相状態ではこのような集合体は形成されず、脂質の相転移点以上に温度を上げるとはじめて集合するようになる⁴⁸⁾。

結局、McConnell らは、膜上での抗原と抗体の結合、さらにそれらと補体の結合には、膜の動的構造つまり流動性が関与していることを、スピンプローブのハプテンを用いた一連の研究により明快に示した。

(2) 他のグループの研究

Esser らは、補体成分とその複合体が膜構造に与える変化をスピンプローブを用いて観察している⁴⁹⁾。彼等の結果によると、多重層の脂質膜に C_{5b,6}, C₇, C₈, C₉ の補体成分をそれぞれ単独に加えたときに ESR はスペクトルに変化は生じない。ところが、C_{5b,6} と C₇ が複合体を形成するように加えられた場合に、DMPC/コレステロール (1:1) の多重層膜についてコレスタノン・プローブの膜面に垂直方向の ESR スペクトルを測定すると、その低磁場側と高磁場側のピーク高の比 $h(+1)/h(0)$ は 0.7 から 0.43 に減少する。さらに DMPC/コレステロール (2:1) の多重層膜で、アンドロスタン・プローブを用いると、C_{5b,6}, C_{5b,6} と C₇ の複合体では $h(+1)/h(0)$ は 0.7, C_{5b,6}, C₇, C₈ 複合体で 0.52, C_{5b,6}, C₇, C₈, C₉ の完全系の巨大複合体で 0.36 と漸次減少する (Table 6)。同様な変化は、レシチンスピンプローブでも観察されたが、その変化はステロイドプロ

ーブに比べて少ない。C_{5b,6} と C₇ を先に結合させてから他の成分を添加すると、大きな集合体が形成されて補体活性が見られないことが知られているが、このような条件下では、C₈, C₉ を加えてもスペクトル変化は観察されない。以上の結果より、C_{5b,6}, C₇, C₈ 複合体と C_{5b,6}, C₇, C₈, C₉ の巨大複合体は膜の疎水領域まで入り込んでいると考えられる。また、膜面に平行な方向から測定したとき 2Amax が大きく変化しないことから、スピンプローブはその運動性よりも配向に大きな影響を受けていると考えられる。

ところで、生体膜における変化については、補体の溶血作用がヒト赤血球で知られており、C_{5b,6}, C₇ 複合体に C₈, C₉ を加えるとやはり膜の流動性が減少することが3種類のステアリン酸プローブ (5-NS, 12-NS, 16-NS) によって確かめられている⁵⁰⁾。しかし、レシチンプローブでは C_{5b,6}, C₇, C₈ 複合体に C₉ を加えたときに流動性が増加したとの報告もあるが⁵¹⁾、人工脂質膜に比べて得られている知見も少なく、今後の研究が待たれる。

4. 細胞膜表面抗原の運動性とその測定

リンパ球表面の抗原またはレセプターの運動として、capping という現象が知られている。この現象は、たとえば次のような実験で観察される。マウス脾臓細胞に抗マウス免疫グロブリン抗体に蛍光ラベルしたものを、NaN₃ 存在下、0°C で加えると 30~40% の細胞に蛍光の環が観察される。ところが、これを 37°C に加温するか、あるいは室温で NaN₃ を除去すると、蛍光は1個所に向かって移動しはじめ、ついには“cap”を形成する。30分ほど経過すると、この cap はバイノサイトーシスでゴルジ体に取り込まれ膜表面からは消え去る。この現象の解明のために、エネルギー要求性、マイクロ

Fig. 18 FPR 法の光学系⁵⁵⁾

ND1, ND2: 密度フィルター
SF: ガウス分布を得るためのフィルター
MR: ミラー
MON: レーザー光の強さをモニターするためのフォトダイオード
L1, L2, L3: レンズ
DM: 2色性ミラー
BF: フィルター
PMT: 光電子倍增管

チューブル、マイクロフィラメント、アデニル酸サイクレース、グアニル酸サイクレース、 Ca^{2+} などの諸因子の関与が検討されており、これらの結果は Schreiner と Unanue の総説に詳しくまとめられている⁵²⁾。cap 形成は抗体やレクチンなどのリガンドの結合によって起こる現象と考えられていたが、Yahara らは、リンパ球を高張溶液中で加温すれば、リガンドを必要とせずに cap 形成が起こることを見出している⁶³⁾。

膜における免疫現象の解明には、膜の流動性の測定とともに、膜抗原やレセプターの運動を知ることも大切である。最近、蛍光でラベルされた分子の細胞膜上での拡散速度を直接測定する方法 (fluorescence photobleaching recovery, FPR) が Axelrod らによって考案された^{54,55)}。その方法の概略が Fig. 18 に示されているが、その原理は膜の分子が蛍光でラベルされた細胞を蛍光顕微鏡下に置き、レーザー光によりスポット状に蛍光が消光 (bleach) された部分を作り、つぎに膜面内の分子拡散によりその部分に回復してくる蛍光を拡散の理論式に従って解析する。この方法を用いて、脂質やアセチルコリン受容体などの膜内拡散速度がすでに報告されている^{56,57)}。一方、McConnell らは蛍光の消光をスポットではなく格子縞を用いて行ない、その縞模様の変化より拡散速度

を求める方法⁵⁸⁾や蛍光のかわりにスピンプローブを用い格子でマスクされていない部分のラジカルをレーザー光とアルキルコバルト錯体で分解し、一定時間後に再びレーザー光を照射して、格子でマスクされない部分に拡散してきたスピンプローブの量を求め解析する方法⁵⁹⁾を考案した。今後は、これらの方法を用いて、膜表面の抗原 (抗体) やレセプターの運動が調べられ、膜免疫学が大いに進展することが期待される。

5. おわりに

免疫学はその出発の時点から、医学の要請と相まって発展しつづけ、近年の生化学の著しい進歩によって取り扱われる分野が拡大した。とくに生体膜に関する生化学的および物理化学的な多くの情報が提供されたことも、今日の免疫学を飛躍的に進展させた大きな原動力であることは疑いのない事実である。本稿では、主として膜の観点から補体系の作用機構を眺めることを試み、従来の研究経過の一端を紹介した。免疫学的重要性は、医療との関連でますます多くの人に認識されるようになり、膜の研究者、分子遺伝学者などを含めた各分野の研究者に委ねられる部分も漸次広がりつつあるのが現状である。したがって、従来難解とされていた免疫の本態が膜レベルでかなり明解にされるのもそう遠い将来のことではあるまい。

終わりにあたり、本稿の執筆の機会を与えていただいた中垣正幸教授に厚くお礼申し上げます。なお、ご要請の主旨に十分にそぐえませんでした。膜研究者の免疫に対する理解の一助となれば幸いです。

文 献

- 1) Cunningham, A. J.: "Understanding Immunology" Academic Press (1978)
- 2) Amzel, L. M., Poljak, R. J., Saul, F., Varga, J. M. and Richards, F. F.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**, 1427 (1974)
- 3) Edelman, G. M.: *Science*, **180**, 830 (1973)
- 4) Poljak, R. J., Amzel, L. M., Avey, H. P., Chen, B. L., Phizackerley, R. P. and Saul, F.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **70**, 3305 (1973)
- 5) Fleet, G. W. J., Porter, R. R. and Knowles, J. R.: *Science*, **224**, 511 (1969)
- 6) Williamson, A. R.: *Annu. Rev. Biochem.*, **45**, 467 (1976)
- 7a) Seidman, J. G., Max, E. E. and Leder, P.: *Nature*, **280**, 370 (1979)
- 7b) Honjo, T., Packman, S., Swan, D., Nau, M. and Leder, P.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**, 3659 (1974)
- 8) Cooper, M. D., Peterson, R. D. A., South, M. A.

- and Good, R. A.: *J. Exp. Med.*, **123**, 75 (1966)
- 9) Cooper, M. D. and Lawton III, A. R.: サイエンス別冊 17, 76 (1977) 木原弘二訳
- 10) Warner, N. L.: *Advances in Immunology*, **19**, 67 (1974)
- 11) 坂戸信夫: 代謝 15 (臨時増刊), 5 (1978)
- 12) 多田富雄: 代謝 15 (臨時増刊), 15 (1978)
- 13) Jerne, N. K.: *Sci. Amer.*, **228**, 52 (1973)
- 14) Mayer, M. M.: サイエンス別冊 17, 188 (1977) 甲野礼作, 山崎修道, 井上学訳
- 15) Götze, O. and Müller-Eberhard, H. J.: *Advances in Immunology*, **24**, 1 (1976)
- 16) Kinsky, S. C. and Nicoloti, R. A.: *Ann. Rev. Biochem.*, **46**, 49 (1977)
- 17) Kinsky, S. C.: "Cell Membranes" ed. by Weissman and Claiborne, p. 231 HP Publishing Co. (1975)
- 18) Kinsky, S. C.: *Biochim. Biophys. Acta*, **265**, 1 (1972)
- 19) Barfort, B., Arguilla, E. R. and Vogelhut, P. O.: *Science*, **160**, 1119 (1968)
- 20) Haxby, J. A., Kinsky, C. B. and Kinsky, S. C.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **61**, 300 (1968)
- 21) Alving, C. R., Kinsky, S. C., Haxby, J. A. and Kinsky, C. B.: *Biochemistry*, **8**, 1582 (1969)
- 22) Umehara, K. and Kinsky, S. C.: *Biochemistry*, **11**, 4085 (1972)
- 23) Alving, C. R., Fowble, J. W. and Joseph, K. C.: *Immunochem.*, **11**, 475 (1974)
- 24) Kitagawa, T. and Inoue, K.: *Nature*, **254**, 254 (1975)
- 25) Six, H. R., Young, Jr., W. W., Umehara, K. and Kinsky, S. C.: *Biochemistry*, **13**, 4050 (1974)
- 26) Lachmann: *Immunology*, **23**, 705 (1972)
- 27) Inoue, K. and Kinsky, S. C.: *Biochemistry*, **9**, 4767 (1976)
- 28) Kinsky, S. C., Bonwen, P. P. M., Kinsky, C. B., Van Deenen, L. L. M. and Rosenthal, A. F.: *Biochim. Biophys. Acta*, **233**, 815 (1971)
- 29) Mayer, M. M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **69**, 2954 (1972)
- 30) Podack, E. R., Biesecker, G. and Müller-Eberhard, H. J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 897 (1979)
- 31) Iles, G. H., Naylor, S. D. and Cinder, B.: *J. Cell. Biol.*, **56**, 528 (1973)
- 32) Kitajima, Y., Sekiya, T. and Nozawa, Y.: *Biochim. Biophys. Acta*, **445**, 452 (1976)
- 33) Bhakdi, S. and Trantum-Jensen, J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 5655 (1978)
- 34) Wobschall, D. and McKeon, C.: *Biochim. Biophys. Acta*, **413**, 317 (1975)
- 35) Michaels, D. W., Abramovitz, A. S., Hammer, C. H. and Mayer, M. M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 2852 (1976)
- 36) Ohnishi, S. and McConnell, H.: *J. Amer. Chem. Soc.*, **87**, 2293 (1965)
- 37) Hubbell, W. L. and McConnell, H. M.: *J. Amer. Chem. Soc.*, **93**, 314 (1971)
- 38) Gaffney, B. J. and McConnell, H. M.: *J. Mag. Res.*, **16**, 1 (1974)
- 39) Kornberg, R. D. and McConnell, H. M.: *Biochemistry*, **10**, 1111 (1971)
- 40) Devaux, P. and McConnell, H. M.: *J. Amer. Chem. Soc.*, **94**, 4475 (1972)
- 41) Shimshick, E. J. and McConnell, H. M.: *Biochemistry*, **12**, 2351 (1973)
- 42) Humphries, G. M. K. and McConnell, H. M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 2483 (1975)
- 43) Humphries, G. M. K. and McConnell, H. M.: *Biophys. J.*, **16**, 275 (1976)
- 44) Brûlet, P. and McConnell, H. M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 2977 (1976)
- 45) Brûlet, P. and McConnell, H. M.: *Biochemistry*, **16**, 1209 (1977)
- 46) Humphries, G. M. K. and McConnell, H. M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 3537 (1977)
- 47) Parce, J. W., Henry, N. and McConnell, H. M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 1515 (1978)
- 48) Henry, N., Parce, J. W. and McConnell, H. M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 3933 (1978)
- 49) Esser, A. F., Kolb, W. P., Podack, E. R. and Müller-Eberhard, H. J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 1410 (1979)
- 50) Dahl, C. E. and Levine, R. P.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 4930 (1978)
- 51) Nakamura, M., Ohnishi, S., Kitamura, H. and Inai, S.: *Biochemistry*, **15**, 4838 (1976)
- 52) Schreiner, G. F. and Unanue, E. R.: *Advances in Immunology*, **24**, 37 (1976)
- 53) Yahara, I. and Kakimoto-Sameshima, F.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 4511 (1977)
- 54) Axelrod, D., Koppel, D. E., Schlessinger, J., Elson, E. L. and Webb, W. W.: *Biophys. J.*, **16**, 1055 (1976)
- 55) Koppel, D. E., Axelrod, D., Schlessinger, J., Elson, E. L. and Webb, W. W.: *Biophys. J.*, **16**, 1315 (1976)
- 56) Fahey, P. F. and Webb, W. W.: *Biochemistry*, **17**, 3046 (1978)
- 57) Axelrod, D., Wight, A., Webb, W. W. and Horwitz, A.: *Biochemistry*, **17**, 3604 (1978)
- 58) Smith, B. A. and McConnell, H. M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 2759 (1978)
- 59) Sheats, J. R. and McConnell, H. M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 4661 (1978)