ニワトリの多量体免疫グロブリン

2. J-chain の精製とその免疫学的, 物理化学的性質について*

小林邦彦**・平井秀松***

Summary

A homologue of J-chain was purified from chicken serum IgM by ion-exchange chromatography on DEAE-cellulose followed by gel-filtration. Purified chicken J-chain showed a similar molecular weight to human J-chain and its molecular weight was calculated to be 19,000 daltons.

The amino acid composition of chicken J-chain was also determined and a striking similarity in the content of cysteine was found between J-chain of chicken and mammals. However, marked differences in amino acid composition of chicken J-chain were also observed in the contents of glutamic acid, aspartic acid, isoleucine, glycine, leucine and phenylalanine, when compared with those of mammalian J-chains. In spite of such differences in amino acid composition between J-chain of chickens and mammals, a precipitative cross-reaction between J-chain of chickens and human was observed with the antiserum to human J-chain, when reaction was proceeded in agarose gel incorporated with polyethylene glycol (Precipitex).

NH₂-terminal amino acid could not be detected in the dansylated J-chain, possibly indicating the blocked terminus similar to the human counterpart.

A component which was different from the J-chain in respects of its antigenicity and molecular weight (30,000 daltons) but which had an electrophoretic mobility similar to J-chain on alkaline-urea-PAGE was identified in the chicken IgM. It was associated with the IgM by disulfide linkage and could possibly be confused with the chicken J-chain.

Key words : Igs of chickens, J-chain, alkaline urea PAGE, cross-reaction, amino acid composition.

緒 言

多量体免疫グロブリンにはH鎖, L鎖のほかにも多量体免疫グロブリンにのみ共通な subunit として J-chain がある.¹⁻⁶⁾ 一般に J-chain の同定は S-S 結合切断後の免疫グロブリン (以下 Ig とする) をアルカリ尿素ポリアクリルアミド電気泳動法にて分析し, H鎖, L鎖以外でこれらよりほかに陽極に泳動される物質の有無によりなされる.^{7,8)} しかし, この方法のみでは精製 Ig 中にアルブミンや α_1 -アンチトリプシンなどの易動度の速い物

質が混在していると J-chain との混同がおこる可能性がある.⁹⁾ 最も信頼のおける同定法は J-chain に対する抗血清による免疫学的交差反応による方法である. J-chain の交差反応性は非常に高く, ヒト J-chain に対するウサギ抗血清は, ほとんどの哺乳動物の J-chain と交差反応を呈することはすでに我々¹⁰⁾ と Meinke ら¹¹⁾ により報告されている. 一方, Koshland¹²⁾ によるとヒトの J-chain に対する抗体はサメのそれとも交差反応すると述べており, Hadji-Azimi ら¹³⁾ はカエルの J-chain も同様の交差反応性があると報告している. このような J-chain の高

* Polymeric immunoglobulins of chickens.

2. Isolation of J-chain and its immunological and physicochemical properties.

** Kunihiro Kobayashi, 北海道大学医学部第1生化学教室 (現山口大学医学部小児科教室).

*** Hidematsu Hirai, 北海道大学医学部第1生化学教室.

(受付 1979年12月27日)

い交差反応性は、種々の動物間における J-chain のアミノ酸配列に高い相似性を示すことを意味する。

種々の動物 Ig の J-chain 精製とその性質についての報告はこれまで多数見られるが、^{1-6, 13-22)} 鳥類の J-chain についての報告はない。Ig の系統発生学的研究上、鳥類の Ig の緒性質を知ることは哺乳類以下の primitive な動物の Ig 研究に到る中間的存在として重要である。今回我々はニワトリの IgM より J-chain を同定、精製し、その性質を調べたので報告する。

材料と方法

1. 免疫グロブリンの精製：ニワトリの血清 IgG, IgM および胆汁 IgA, 腸内液 IgA の精製、またそれらの DTT (dithiothreitol) による還元後、ゲル透過による H 鎖, L 鎖分画の採集法については前報の通りである。²³⁾

2. ヒト J-chain の精製：ヒト J-chain は Waldenström macroglobulinemia IgM より既報の方法で得た。¹⁵⁾

3. ポリアクリルアミド電気泳動 (PAGE)：SDS-PAGE は 12.5% アクリルアミドに行った。アルカリ尿素 PAGE は前報と同様である。²³⁾

4. 免疫学的手技：免疫電気泳動、オクタロニー法は 1% agarose に行った。抗血清の作製は、ウサギの両膝窩リンパ節に直接抗原を注入する Goudie ら²⁴⁾ の方法で行った。抗原はすべて等量の Freund's complete adjuvant と混合して用いた。ヒトの抗 J-chain ウサギ血清は既報の方法で得た。²⁵⁾

5. アミノ酸分析：標品は 6.1 N 塩酸にて 24 時間および 72 時間水解後、JCL-6AH アミノ酸分析器で分析した。²⁶⁾ シスチンは carboxymethyl cysteine として算出した。

6. NH_2 末端アミノ酸の分析：ダンシル法により NH_2 末端標識後、ポリアミドゲル薄層クロマトグラフィーにより解析した。²⁶⁾

結 果

1. IgM より得た L 鎖分画の DEAE セルロースによる分画

430 mg の精製ニワトリ IgM より得られた L 鎖分画 (140 mg) を 0.05 M Tris-HCl, pH 8.5 に 8 M の尿素を加えた緩衝液に透析後、同液にて平衡化した DEAE セルロースカラム (1.8 × 25 cm) に添加した。同緩衝液を starting buffer とし、これに NaCl を 0.2 M になるよう加えた緩衝液との間で linear gradient 溶出を行ったところ Fig. 1 (A) に示す如く数個の peak が得られた。これらの peak は Fig. 1 (A) に示す斜線の如く分

画し、凍結乾燥後それぞれの分画をアルカリ尿素 PAGE にて解析した。DEAE 分画前の標品 (Fig. 1(B) の 0) は L 鎖特有の polymorphic な多数の band のほか陽極側に泳動される数本の band が存在するが、これと比較すると DEAE 分画 4 から 7 まではその易動度より主として L 鎖から構成されていることがわかった。一方、分画 9 は電気泳動上、明らかに L 鎖とは異なる易動度を示す polymorphic な数本の band よりなっていた。さらに分画 11 は易動度としては分画 9 に近似するが band の構成が分画 9 とは異なる band からなっていた。Fig. 1 (B) に見る如く、分画 9 と 11 はそれぞれ易動度が速く、いずれかが J-chain であろうとの予測より、これらをそれぞれさらに Sephadex G-75 によるゲル透過で精製を

Fig. 1. A: A DEAE cellulose chromatography of the light-chain fraction obtained from IgM after disulfide disruption.

A linear gradient elution between the buffer of 0.05 M Tris-HCl, pH 8.0 plus 8 M urea and the same buffer containing 0.2 M NaCl was used. Fractions collected are indicated by hatched areas.

B: Alkaline-urea-PAGE analysis of the fractions from the DEAE column chromatography.

Numbers are corresponded to the fraction of DEAE chromatography. A light-chain fraction before DEAE chromatography is numbered as "0."

行った. Sephadex G-75 のゲル濾過ではいずれの分画 (9 と 11) も小さな第 1 peak にひきつづき symmetric な第 2 peak が得られた. 分画 9 と 11 より得られたそれぞれの第 2 ピークを精製標品とし D-9, D-11 と命名した. この段階における D-9 と D-11 の収量はそれぞれ 13 mg と 6 mg であった.

2. 精製 D-9 と D-11 の電気泳動解析

アルカリ尿素電気泳動では D-9 は L 鎖 (IgG より得た) に比し, はるかに陽極側に 4 本の band として泳動された. また D-11 は D-9 同様 L 鎖とは異なる速い移動度を示したが, 構成 band は 1 本の main band と数本の minor な band よりなっていた. しかし D-11 の示す main band は D-9 の示す 4 本のいずれの band と異なる移動度を示していた (Fig. 2(A)). 一方, SDS-PAGE では D-9 は単一の band を呈し, 分子量的には L 鎖よりやや小さな値を示したが, D-11 は L 鎖よりやや大きな分子量を示す main band と, 数本の分子量の小さな band に分かれた (Fig. 2(B)).

3. ニワトリ Ig より得られる L 鎖分画中における D-9 と D-11 の抗原分析

精製 D-9 および D-11 をそれぞれウサギに免疫し抗血清を得た. それぞれの抗血清はニワトリ血清を Sepharose 4B に結合させたカラムを通し, 吸収後, IgG, IgA, IgM より得られた各 L 鎖分画との沈降反応性を検討した. Fig. 3 (A と B) に示したが, D-9 抗原は IgM および IgA より得られた L 鎖分画に認められたが, IgG の L 鎖分画には認められなかった. 一方, D-11 抗原は IgM の L 鎖分画にのみ認められ, 他のいずれの Ig より得られる L 鎖分画にも存在しなかった. この事実より, D-9 は IgA, IgM の多量体免疫グロブリン (前回の報告に示したが IgA は trimer, IgM は pentamer または tetramer よりなる) に共通に存在する抗原であり, また Fig. 2 (B) に示したように分子量が L 鎖より小さなことより, 哺乳類の J-chain に相当すると思われる. Fig. 3 (C と D) は D-9 と D-11 の抗原性を比較したものであるが, 抗 D-9 は D-11 とは反応せず, また抗 D-11 は D-9 とは反応しなかった. すなわち, 両抗原はまったく異なる抗原であることを示す. Fig. 3 (C と D) に示したがこの両抗原は IgM 中では hidden の状態にあると思われる. すなわち, IgM を還元し, S-S 結合の解離をおこさせなければ, 抗血清と反応しない. ところで S-S 結合の解離に関していうと, D-9 および D-11 はともに IgM と比較的強固な S-S 結合で結合されていると思われる. 図には示さないが, IgM の部分的還元 (partial reduction) では両抗原とそれぞれの抗血清との間の沈

Fig. 2. Some electrophoretic properties of the purified preparations of D-9 and D-11.

A: Alkaline-urea-PAGE of D-9 and D-11.

B: SDS-PAGE of D-9 and D-11.

D9 and D11 represent D-9 and D-11 respectively. GL indicates light-chains of chicken IgG. Acrylamide concentration of SDS-PAGE is 15%.

Fig. 3. Precipitin reactions of the antiserum to D-9 and D-11.

a-D9 and a-D11 represent, respectively, anti-serum to D-9 and D-11. AL, ML and GL are light-chains from chicken IgA, IgM and IgG, respectively. Sm and M represent chicken whole serum and purified IgM. rM is the purified IgM after complete reduction and alkylation.

Fig. 4. Differences in the release of fast anode moving bands (D-9 and D-11) between the IgM after partial reduction and after complete reduction.

CM and CML represent respectively μ -chain fraction and light-chain fraction from completely reduced IgM.

PM and PML indicate, respectively, μ -chain fraction and light-chain fraction from IgM after partial reduction.

CG and CGL represent, respectively, γ -chain fraction and light-chain fraction from IgG after complete reduction.

降反応は非常に弱く、5M グアニジン中で行う完全還元 (complete reduction) で、はじめて精製 D-9 または D-11 と抗血清間の反応に近い状態となる。このことは IgM の部分還元と完全還元で D-9 および D-11 物質の遊離を比較したアルカリ尿素 PAGE の結果 (Fig. 4) で示される。Fig. 4に見られる如く、部分還元で得られた IgM の L 鎖分画 (PML) には D-9 や D-11 より構成される速い移動度の band (矢印) がほとんど認められない。しかし、完全還元 IgM より得られる L 鎖分画 (CML) ではこの band が明瞭に認められる。

4. 分子量測定

D-9 が哺乳類の J-chain に相当することから、ヒト J-chain との分子量比較を試みた。Fig. 5(B) に SDS-PAGE を示したが、D-9 とヒト J-chain は非常に似た移動度を示し、分子量 19,000 と算出された。一方、D-11 の分子量は 30,000 であった (Fig. 5(A))。

5. NH_2 末端アミノ酸の検索

ダンシル法による解析で D-9, IgG の L 鎖, γ , α お

Fig. 5. A: Standard curve for molecular weight determination by 12.5% acrylamide SDS-PAGE.

BSA, OV, CHY, hGL and CYT represent marker proteins of bovine serum albumin, ovalbumin, chymotrypsinogen, human light chain of IgG and cytochrome C, respectively. D9, D11 and hJ correspond to D-9, D-11 and human J-chain.

B: SDS-PAGE of D-9 and human J-chain.

D-9 and human J-chain (hJ) show the same mobility which is faster than light-chain of human IgG (hGL) or chicken IgG (GL). Acrylamide concentration of SDS-PAGE is 12.5%.

よび μ 鎖の NH_2 末端アミノ酸の決定を試みた。L, γ , α , μ 鎖のいずれにも NH_2 末端アミノ酸としてアラニンが同定されたが、D-9 ではまったくダンシル化アミノ酸の spot が得られなかった。

6. アミノ酸組成

Table 1 に D-9 のアミノ酸分析値を示した。同時にヒトおよびブタの J-chain のアミノ酸組成も比較のため示した。

7. ヒト J-chain と D-9 の交差反応性

抗ヒト J-chain 血清および抗 D-9 血清を用いてオクタローニ法により、交差反応性を検索した。しかし、通常の agarose 中でのオクタローニ法では抗ヒト J-chain 血清と D-9 間および抗 D-9 血清とヒト J-chain 間にはまったく沈降反応は証明されなかった。しかし、非沈降性の交差反応の存在も考えられたので、可溶性免疫複合物 (soluble immune complex) を沈降性にさせる polyethylene glycol (Precipiplex)⁸¹⁾ を agarose に混合 (3.5% w/v) し、オクタローニ法を行ったところ Fig. 6 に示す如く、抗ヒト J-chain と D-9 間に沈降線の出現がみられ、しかもヒト J-chain の沈降線と spur を形成した。しかし、抗 D-9 とヒト J-chain 間では沈降線の出現は認められなかった。

Table 1. Amino acid composition of D-9.^{a)}

Amino acid	D-9	Pig J-chain ^{b)}	Human J-chain ^{c)}
Lysine	56.2	56.9	48.2
Histidine	18.1	18.2	10.2
Arginine	48.1	49.4	74.2
Asparatic acid	103.1	168.8	149.4
Threonine ^{d)}	98.1	83.2	81.2
Serine ^{d)}	64.0	64.7	52.1
Glutamic acid	141.2	127.2	112.9
Proline	69.7	40.9	72.3
Glycine	48.1	19.7	21.8
Alanine	40.3	45.4	48.4
Valine	70.6	61.3	75.7
Methionine	10.6	8.4	9.6
Isoleucine ^{e)}	40.6	62.4	67.4
Leucine	55.6	80.9	68.0
Tyrosine	48.7	36.3	46.1
Phenylalanine	30.9	22.1	11.8
CM-Cysteine ^{f)}	55.9	53.6	50.7

a) expressed as residues per thousand

b) values reported by Zikan⁵⁾c) values reported by Mestecky et al.¹⁶⁾

d) corrected for losses during hydrolysis

e) value of 72 h-hydrolysis was adopted

f) S-carboxymethylcysteine

考 察

J-chain の criteria として次のようなものがあげられる: ① IgA, IgM の多量体 Ig に共通に存在する subunit である.^{1,2)} ② アルカリ尿素 PAGE で, H鎖やL鎖に比べ最も速い移動度を示す. ③分子量はL鎖より小さい.^{6,12,17,27,28)} ④アミノ酸組成でシステイン含量が高く, 一方, アスパラギン酸やグルタミン酸のような酸性アミノ酸に富む.^{4-6,12,16,18)} ⑤免疫グロブリンの種類にかかわらず, プラズマ細胞で形成される.^{29,30)} 今回ニワトリ IgM より精製された D-9 は上記の5項のうち4項をすでに満足している. Fig.1(B) に示したが D-9 は明らかに L鎖とは移動度が異なり polymorphic な band を示し, ヒト J-chain に近似している. 抗 D-9 血清は共通抗原を IgM および IgA の L鎖分画に認めるが, 単量体の IgG の L鎖分画には認めない (Fig.3).

D-9 の分子量はヒト J-chain とほぼ同じである (Fig.5). D-9 のアミノ酸組成ではシステイン含量が高く, その値もヒト,¹⁶⁾ イヌ,⁴⁾ ウサギ,⁶⁾ ブタ⁵⁾ と非常に一致する. しかも, アスパラギン酸およびグルタミン酸含量が

Fig. 6. Precipitin cross-reaction of the antiserum to human J-chain with chicken J-chain (D-9), observed in the agarose gel containing polyethyleneglycol (Precipiplex). a-D9: antiserum to D-9

a-hJ: antiserum to human J-chain

D9 and hJ represent purified D-9 and human J-chain, respectively. Arrow indicates a cross-reactive precipitin line of chicken J-chain (D-9) developed by antiserum to human J-chain. No precipitin reaction is observed between human J-chain and antiserum to D-9.

高いことも哺乳類の J-chain に似るが, 大きく異なることは哺乳類ではアスパラギン酸が最も高値を示すのに対し D-9 はグルタミン酸が最も高い値を示したことである (Table 1). ヒト J-chain では NH₂ 末端アミノ酸は pyrrolidone-carboxylic acid (PCA) で block されていることが知られるが,¹⁹⁾ D-9 はダンシル法で NH₂ 末端アミノ酸が検出されず, したがって, D-9 の NH₂ 末端アミノ酸は block されていると考えられる. 以上のことから D-9 はニワトリの J-chain と同定しても良いと思われる. Fig.6 に示したが, 抗ヒト J-chain が D-9 と交差反応を示したことから裏付けられよう.

さて D-11 について考察を加えると、これは確かにアルカリ尿素 PAGE では J-chain に類似した性格を有する。しかし D-11 は IgM にのみ検出されること、分子量が30,000と大きいことから J-chain の特徴と大きく異なる。D-11 は精製 IgM 中に存在する contamination に起因するとする考え方は、IgM の精製には Sephadex G-200 および Sepharose 6B の2回のゲル濾過がなされていること、また IgM と D-11 の分子量には非常に大きな差があること (860,000 と 30,000) より十分否定されよう。次いで、D-11 は IgM と non-covalent に結合した血清成分ではないかとする疑問が生ずるが、Fig. 3(D) に示したように抗 D-11 血清は native な IgM とは沈降反応を示さず、IgM を還元してはじめて反応性を生ずること、および Fig. 4 に示されるように D-11 は IgM を完全還元しなければ IgM より遊離しないことから否定できる。Fig. 4 でみられる実験から明らかなように、ニワトリの J-chain (D-9) も D-11 もともに部分的な S-S 結合解離 (partial reduction) で得られる IgM の L 鎖分画にはほとんど認められない。このことは J-chain も D-11 も、ともにこのような S-S 結合解離では μ 鎖の方にまだ結合していることを示す。つまりこの実験から、ニワトリの J-chain は (D-11 も同様に) IgM 分子中で μ 鎖に結合していることが明らかとなる。

D-11 のような物質がもし他の動物の IgM 中に存在しているとすると、J-chain の同定をアルカリ尿素 PAGE のみで行うことは危険である。なぜならば D-11 様物質は容易に J-chain と混同される恐れがあるからである。これまで魚類などの IgM 中に J-chain の同定をアルカリ尿素 PAGE のみで検討し、硬骨魚類のある種には J-chain 様物質を認め、またある種には存在を認めないという報告²¹⁾もあるが、以上の意味からも十分その同定に注意する必要があると考えられる。

本論文の一部は第29回電気泳動学会春季大会にて発表した。

文 献

- 1) Halpern, M. S. and Koshland, M. E. : Nature (London), **228** : 1276, 1970.
- 2) Mestecky, J. et al. : Science, **171** : 1163, 1971.
- 3) Parkhouse, R. E. M. : Nature New Biol., **236** : 9, 1972.
- 4) Kehoe, J. M. et al. : J. Immunol., **109** : 59, 1972.
- 5) Zikan, J. : Immunochemistry, **10** : 351, 1973.
- 6) O'Daly, J. A. and Cebra, J. J. : Biochemistry, **10** : 3843, 1971.
- 7) Weinheimer, P. F. et al. : J. Immunol., **107** : 1211, 1971.
- 8) Klaus, G. G. B. et al. : J. Immunol., **107** : 1785, 1971.
- 9) Tomasi, T. B. Jr. and Hauptman, S. : Adv. Exp. Med. Biol., **64** : 111, 1973.
- 10) Kobayashi, K. et al. : J. Immunol., **111** : 1590, 1973.
- 11) Meinke, G. C. and Spiegelberg, H. L. : J. Immunol., **112** : 1401, 1974.
- 12) Koshland, M. E. : Adv. Immunol., **20** : 41, 1975.
- 13) Hadji-Azimi, I. and Michea-Hamzehpour, M. : Immunology, **30** : 587, 1976.
- 14) Kobayashi, K. et al. : Biochim. Biophys. Acta, **303** : 105, 1973.
- 15) Kobayashi, K. et al. : Immunochemistry, **11** : 169, 1974.
- 16) Mestecky, J. et al. : Immunochemistry, **9** : 883, 1972.
- 17) Kang, Y. S. et al. : J. Immunol., **112** : 162, 1974.
- 18) Morrison, S. L. and Koshland, M. E. : Pro. Nat. Acad. Sci. U.S.A., **69** : 124, 1972.
- 19) Meinke, G. C. and Spiegelborg, H. L. : J. Immunol., **109** : 903, 1972.
- 20) Ricardo, M. Jr. and Inman, F. P. : Biochem. J., **131** : 677, 1973.
- 21) Mendez, E. et al. : Biochem. Biophys. Res. Commun., **55** : 1291, 1973.
- 22) Mole, J. E. et al. : Biochemistry, **16** : 3507, 1977.
- 23) 小林邦彦, 平井秀松 : 生物物理化学, **23** : 1, 1979.
- 24) Goudie, R. B. et al. : Lancet, **ii** : 1224, 1966.
- 25) Kobayashi, K. et al. : Eur. J. Immunol., **3** : 185, 1973.
- 26) Kobayashi, K. and Kochakian, C. D. : J. Biol. Chem., **253** : 3635, 1978.
- 27) Schroenloher, R. E. et al. : Biochim. Biophys. Acta, **295** : 576, 1973.
- 28) Ricardo, M. J. Jr. et al. : Biochem. J., **137** : 71, 1974.
- 29) Kazi, H. and Parkhouse, R. M. E. : Nature, **249** : 45, 1974.
- 30) Brandtzaeg, P. : Nature, **252** : 418, 1974.
- 31) Harrington, J. C. et al. : Immunochemistry, **8** : 413, 1971.