

補体古典経路 C1 複合体の立体構造と抗体による活性化機序

武田 壮一¹⁾、植田 康敬²⁾、宮田 敏行^{3), 4)}

¹⁾国立循環器病研究センター 先端医療技術開発部、²⁾大阪大学大学院 医学系研究科 血液・腫瘍内科、

³⁾国立循環器病研究センター 脳血管内科部、⁴⁾大阪工業大学 工学部 生命工学科

Structures of the complement C1 complex and its mechanism of activation by antibodies

Soichi Takeda¹⁾, Yasutaka Ueda²⁾, and Toshiyuki Miyata^{3), 4)}

¹⁾ Department of Advanced Medical Technologies, National Cerebral and Cardiovascular Center,

²⁾ Department of Hematology and Oncology, Osaka University Graduate School of Medicine,

³⁾ Department of Cerebrovascular Medicine, National Cerebral and Cardiovascular Center,

⁴⁾ Department of Biomedical Engineering, Osaka Institute of Technology

[抄録]

近年めざましい発展を遂げているクライオ電子顕微鏡技術を用いて、超巨大タンパク質複合体である抗体・C1 複合体・C4b の立体構造が相次いで報告された。補体古典経路の活性化において、抗原に結合した IgG 抗体が Fc 部分を介して 6 量体として会合し Fc プラットフォームを形成し、それに C1 複合体が多価で結合することが分かり、膜上での抗原抗体反応から C4 活性化に繋がる仕組みの分子基盤が明らかになってきた。これら立体構造解析から得られた新しい知見に加え、IgG 抗体の多量体化により発症する疾患や補体依存性の細胞障害を抑制する構造的知見などについても紹介する。

[Abstract]

The structures of antibody-C1-C4b complexes have been solved using cryo-electron microscopy, a powerful technique for determining the three-dimensional structures of biological macromolecules. In activating the classical complement pathway, immunoglobulin (Ig)G antibodies bound to antigen undergo a conformational change and polymerize via Fc fragments to form a hexameric Fc platform. IgM antibodies also undergo conformational change upon binding to antigen to form an Fc platform. The C1 complex then binds multivalently to this platform, initiating C1 activation. This review addresses the molecular basis of classical complement pathway activation and autoantibody diseases caused by IgG multimerization.

[キーワード] クライオ電子顕微鏡、抗原抗体複合体、プロテアーゼ、補体、立体構造

[はじめに]

補体古典経路は C1 複合体の活性化で始まる¹⁻⁴⁾。C1 複合体は 1 分子の C1q とそれぞれ 2 分子のセリンプロテアーゼ前駆体 C1r と C1s から構成され、C1qr2s₂ と表記される。C1q が抗原抗体複合体、病原体、アポトーシス細胞、多価陰電荷構造などに結合すると、C1r と C1s が順次活性化される (図 1)。こうして形成された活性型 C1s は C4 を切断し、生

成した C4b は大きなコンフォメーション変化を起こし、内部に隠れていたチオエステル結合が露出し、自発的に水解するか、ごく近傍のアミノ基 (例えば Lys 残基の側鎖) もしくは水酸基 (例えば糖鎖や Ser/Thr 残基の側鎖) に反応し、固相表面 (病原菌などの表面やタンパク質など) に結合する。固相化された C4b に Mg²⁺依存性に結合したプロテアーゼ前駆体 C2 は、活性型 C1s により切断活性化されて

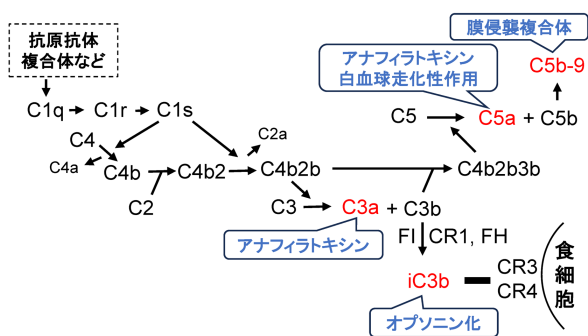


図 1. 補体古典経路と下流のイベント

C2a と C2b に変換される。C2a は遊離し、プロテアーゼ C2b は C4b に結合したまま残り、C3 転換酵素 C4b2b を形成する。C4b2b は C3 を C3a と C3b に変換し、C3b が C4b2b に結合して C5 転換酵素 C4b2b3b を形成する。C5 転換酵素は C5 を C5a と C5b に切断し、最終的に膜侵襲複合体 C5b-9 を形成し病原体を殺傷する (図 1)。

C5a と C3a はアナフィラトキシンとして働き、C5a は白血球の走化性因子としての作用も持つ。病原体表面に結合した C3b は、補体制御因子 CR1 や H 因子に結合すると、プロテアーゼ I 因子で切断され iC3b に変換される (図 1)。iC3b は転換酵素形成能を持たないもののオプソニンとして働き、iC3b や C3b が結合した病原体は補体受容体 (CR3, CR4) を有するマクロファージや好中球といった食細胞により貪食される。このオプソニン化は極めて重要な補体の機能である。

C1 複合体の立体構造の解析は今世紀に入り大きな進展を遂げた。電子顕微鏡での観察より、プロテアーゼ前駆体 C1r と C1s は C1r₂s₂ の 4 量体で複合体を形成することが報告され⁵⁾、2000 年代初頭には、C1r と C1s のプロテアーゼドメインを含む複数のドメイン、および C1q の球状ドメインの立体構造が X 線結晶構造解析法により決定された⁶⁻¹³⁾。その後、C1r と C1s の N 末端領域ドメインの会合状態の立体構造の解明もなされ、分子全体のモデルが提出された^{14, 15)}。2018 年以降は、抗原に結合し 6 量体化した IgG1 (IgG1₆) および IgG3 (IgG3₆) と C1 との複合体の立体構造、並びに抗原に結合した 6 量体 IgM と C1 との複合体の立体構造がクライオ電子顕

微鏡を用いて明らかにされた¹⁶⁻¹⁹⁾。C1-抗原抗体複合体に C4b が結合した複合体の構造も解明され、補体古典経路の活性化機序は新しい展開を見せている。

本稿では、C1 の立体構造を軸にその進展と抗体による活性化機構について解説する。本稿ではアミノ酸の残基番号は開始 Met を 1 とする。成熟タンパク質の残基番号が必要である場合は括弧内に示した。

1. C1q の構造

C1q は分子量約 450 kDa の糖タンパク質で、相同性の高い A 鎖 (223 残基)、B 鎖 (226 残基)、C 鎖 (217 残基) の 3 本のポリペプチド鎖からなるヘテロ 3 量体を基本構成単位としている (図 2A)。3 本のポリペプチド鎖の主な産生部位は単球やマクロファージなどの骨髄系細胞である。C1q の N 末端領域にはジスルフィド結合があり、3 本鎖の安定化に寄与している。C1q の特徴は、N 末端領域の 6 本のコラーゲン様 3 重らせん構造と、C 末端領域のパターン認識分子として働く 6 個の球状ドメイン (globular C1q, gC1q) である (図 2B)。

1-1. C1q のコラーゲン様らせん構造：束と茎

3 本のポリペプチド鎖からなる C1q は、N 末端領域にコラーゲンに見られる 3 残基 (Gly-Xaa-Yaa) の繰り返し配列の 3 重らせん構造をもつ。この繰り返し配列の領域内で、A 鎖と C 鎖にはこの配列を取らない部位が 1 つずつあり (kink 部位)²⁰⁾、この部位でらせん構造は約 60°折れ曲がる (図 2A, B)。すなわち、N 末端から kink 部位までは 18 本のポリペプチド鎖が 1 本のらせん構造を取り、これを束構造とよぶ (図 2B)。次いで、kink 部位から C 末端の球状ドメイン gC1q の手前までの 3 本のポリペプチド鎖のらせん構造を茎構造とよぶ。茎は 6 本ある。C 末端領域には 3 本鎖からなる球状ドメイン gC1q が位置している (図 2B)。

1-2. C1q の球状ドメイン gC1q の立体構造

C1q の 6 個の球状ドメイン gC1q (図 2B) はパターン認識分子として機能し、多様な分子構造を認識・結合して補体古典経路を活性化する。C1q の多くの標的因子の中で、最も重要な因子は IgG 抗体や

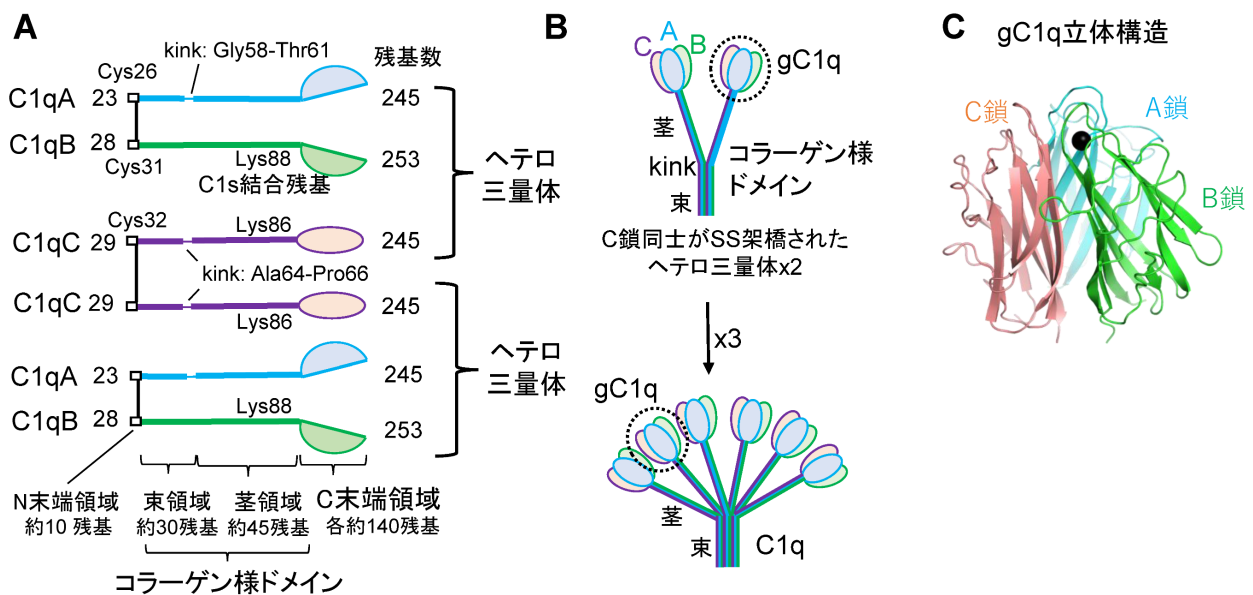


図 2. C1q の構造と球状ドメインの立体構造

(A) C1q を構成する各鎖の構造。(B) C1q の束構造、茎構造および球状ドメイン (gC1q)。(C) gC1q の立体構造 (PDB 番号 1PK6) ⁹⁾。黒丸: Ca^{2+} 。

IgM 抗体が抗原に結合した抗原抗体複合体である。また、標的分子として、C-reactive protein、ペントラキシン 3、リポ多糖、ポリリンなども知られている ⁴⁾。

gC1q の立体構造が X 線結晶構造解析法で決定されている (図 2C) ⁹⁾。gC1q は 3 本のポリペプチド鎖で構成され、1 分子の Ca^{2+} が結合しており、ほぼ球状のコンパクトな構造を取る。gC1q は荷電性残基と疎水性残基からなる表面パターンを示し、これが多様なパターン認識分子の特性を与えている ⁹⁾。

2. セリンプロテアーゼ C1r, C1s と C1 インヒビター

C1 複合体を構成する C1r と C1s は、それぞれ 688 残基 (分子量約 86.5 kDa) と 673 残基 (分子量約 79.8 kDa) からなる肝細胞で合成される 1 本鎖のタンパク質で、極めて相同性が高いセリンプロテアーゼ前駆体である (図 3A)。両分子はともに N 末端より CUB1 ドメイン、EGF ドメイン、CUB2 ドメイン、CCP1 ドメイン、CCP2 ドメインが並び、C 末端領域にセリンプロテアーゼ (serine protease, SP)

ドメインが位置している。C1r および C1s の分子全体の立体構造は決定されていないが、構成するドメインの立体構造は決定されている。C1r では CUB2-CCP1 ドメインの折れ曲がり構造は不確定であるものの ^{7, 15)} (図 3B)、C1s では CUB2 ドメインで L 型に曲がった全体の構造モデルが発表されている (図 3C) ^{12, 15)}。

C1r と C1s はそれぞれ Arg463-Ile464 結合および Arg437-Ile438 結合が切断され活性化する (図 3A)。C1r の活性化は補体古典経路の開始に繋がるので、たいへん重要な反応である。前駆体 C1r がどのようにして初発の活性を示すのかは明らかになっていない。組織プラスミノゲン活性化因子 (tissue plasminogen activator, tPA) では、1 本鎖の状態の高い酵素活性 (2 本鎖 tPA の 15% の活性) を示し、基質であるプラスミノゲンを活性化できることが立体構造から明らかになっている ²¹⁾。また、内因系凝固反応の開始因子である 1 本鎖 FXII は、ポリリン酸などの陰性荷電物質の存在下で活性を示し、FXII とプレカリクレインを活性化し内因系凝固反応を開始する能力を示す ²²⁾。このように、最近の研究から幾つかのセリンプロテアーゼ前駆体は、1 本

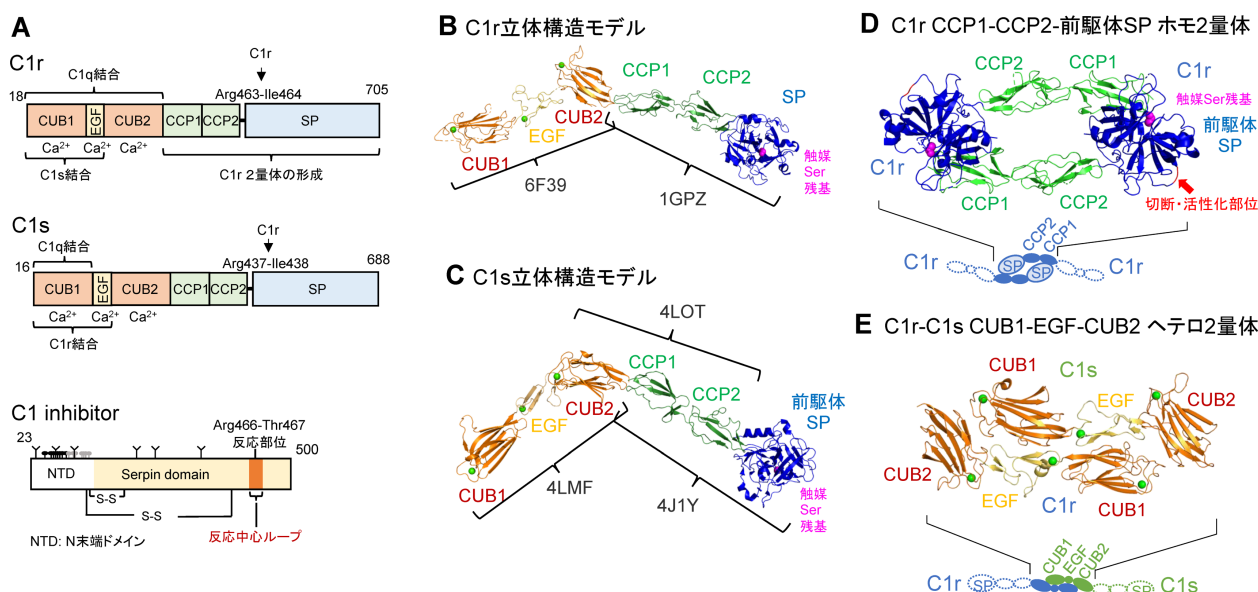


図 3. C1r、C1s および C1 インヒビターのドメイン構造と C1r と C1s の立体構造モデル

(A) C1r、C1s および C1 インヒビターのドメイン構造。相互作用領域および Ca^{2+} 結合部位を示した。C1 インヒビターの糖鎖結合部位（N 型を Y 字、O 型を黒丸棒、推定 O 型を灰色丸棒）を示した。(B) C1r 立体構造モデル。C1r の CUB1-EGF-CUB2 の立体構造（PDB 番号 6F39）¹⁵⁾ と CCP1-CCP2-前駆体 SP の立体構造（PDB 番号 1GPZ）⁷⁾ より作成したモデル。(C) C1s 立体構造モデル。C1s の CUB1-EGF-CUB2 の立体構造（PDB 番号 4LMF）¹²⁾、CUB2-CCP1-CCP2 の立体構造（PDB 番号 4LOT）¹²⁾ および CCP1-CCP2-SP の立体構造（PDB 番号 4J1Y）¹³⁾ より作成したモデル。(D) C1r の C 末端領域 CCP1-CCP2-SP ドメインのホモ 2 量体の立体構造（PDB 番号 1GPZ）^{7, 45)}。C1r ホモ 2 量体構造のドメインのモデルも示した。(E) C1r と C1s の N 末端領域 CUB1-EGF-CUB2 ドメインのヘテロ 2 量体の立体構造（PDB 番号 6F1C）¹⁵⁾。C1rs ヘテロ 2 量体構造のドメインのモデルも示した。緑丸： Ca^{2+} 、赤丸：活性触媒 Ser 残基。

鎖でもプロテアーゼ活性を示すことが明らかになっている。

C1r では、C1 複合体が抗体の Fc 部分に結合すると、1 本鎖前駆体 C1r がコンフォメーション変化を起こして初発の活性を示すと考えられる（後述）。この活性を有した C1r が隣接する C1r 分子を切断し活性化し、こうして生成した 2 本鎖活性型 C1r が前駆体 C1r と C1s を切断・活性化し、補体古典経路が始まるのであろう。こうして生成した活性型 C1s は C4 と C2 を切断し補体経路の活性化に導く。

活性化した C1r と C1s の血中の阻害タンパク質として C1 インヒビター（C1 inhibitor [C1-INH]、遺伝子名：*SERPINC1*）が知られている（図 3A）。C1 インヒビターは、機能未知の N 末端ドメインと C 末端領域のセルピンドメインから構成される²³⁾。

N 末端ドメインには多くの糖鎖が結合している。標的となるプロテアーゼが C1 インヒビターの反応部位である Arg466-Thr467 結合を切断すると、プロテアーゼとインヒビターはモル比 1:1 で不可逆的に安定な複合体を形成し、プロテアーゼは失活する。C1 インヒビターの標的酵素は、C1r と C1s に加え、補体系プロテアーゼの Mannose-binding lectin-associated serine protease (MASP)-1、MASP-2、凝固系プロテアーゼの XIIa、XIa、トロンビン、カリクレイン-キニン系の血漿カリクレイン、線溶系酵素のプラスミンが知られている²³⁾。C1 インヒビターが C1r と C1s のそれぞれに結合すると、C1rs-(C1 インヒビター)₂ 複合体を形成し、C1 複合体より解離する。C1r と C1s が解離した後の C1q は、IgG1 と IgG3 の抗原抗体複合体には結合した状

態を保つが、IgG2 の抗原抗体複合体では C1q の結合が弱いので解離する²⁴⁾。IgG4 の抗原抗体複合体は C1q を結合しない。

2-1. C1r と C1s のドメインの立体構造と C1q 結合部位

セリンプロテアーゼ前駆体 C1r と C1s は C1r₂s₂ ヘテロ 4 量体 (分子量約 330 kDa) の形を取り⁵⁾、C1 複合体である C1qr₂s₂ (分子量約 766 kDa) に組み込まれている。C1r₂s₂ は超遠心法で得られた沈降係数や電子顕微鏡による観察から、伸びた円筒状の構造 (直径 3.3 nm、長さ 51-64 nm) を取る²⁵⁾ことが明らかになっている。C1r と C1s については複数のドメインの結晶構造が決定されている^{6-8, 10-15)}。

C1r のプロテアーゼドメインを含む C 末端領域の 3 つのドメイン (CCP1-CCP2-前駆体 SP) のホモ 2 量体の立体構造が決定された (図 3D) ⁷⁾。この結晶中では 2 分子の CCP1-CCP2-SP ドメインが対称的に向き合い、1 つの SP ドメインが別分子の CCP1 ドメインと相互作用していた。

次いで、C1r と C1s の N 末端領域の CUB1-EGF-CUB2 ドメインのヘテロ 2 量体の立体構造が決定された (図 3E) ¹⁵⁾。C1r と C1s の N 末端ドメインは逆並行にならんで会合していた。ヘテロ 2 量体の接触面は C1r¹⁵⁾ と C1s¹²⁾ それぞれの N 末端領域 3 ドメインのホモ 2 量体よりも広範囲に及んでいた¹⁶⁾ので、C1rs ヘテロ 2 量体 (図 4A) が C1r₂ や C1s₂ のホモ 2 量体より形成されやすいことを示唆していた。N 末端の 3 ドメインにはそれぞれ 1 分子の Ca²⁺ が結合していた (図 3E) ¹⁵⁾。すなわち、C1r₂s₂ では 12 分子の Ca²⁺ が結合することになる。なかでも、EGF ドメインは Ca²⁺ を極めて強く結合しており¹⁾、C1r₂s₂ ヘテロ 4 量体の形成に必須である²⁵⁾。

C1r₂s₂ は CUB ドメインを介して C1q の 6 本の茎に結合している (図 3A、図 4B、4D)。C1r の CUB1 ドメインと CUB2 ドメインは 1 個ずつ高親和性の C1q 結合部位をもち、C1s の CUB1 ドメインには 1 個の低親和性 C1q 結合部位がある。したがって、C1r₂s₂ ヘテロ 4 量体はこれら 6 個の結合部位で C1q の 6 本の茎に結合している (図 4B、4D) ²⁶⁾。

2-2. ヘテロ 4 量体セリンプロテアーゼ C1r₂s₂ の 2 つの異なる立体構造モデル

2-2-1. C1r₂s₂ の立体構造モデル 1 (伸長型モデル)

C1r の C 末端領域を介したホモ 2 量体 (図 3D) と C1r と C1s の N 末端領域を介したヘテロ 2 量体 (図 3E) という 2 つの構造モデルを基にして、伸長型 C1r₂s₂ モデルが作成された (図 4B)。このモデルでは、N 末端領域で相互作用する 2 つの C1rs ヘテロ 2 量体が、C1r の C 末端領域での相互作用を中心として会合し、ヘテロ 4 量体を形成するというものである (図 4B)。伸長型モデルでは、C1r の C 末端領域の相互作用 (図 3D) および C1r と C1s の N 末端領域の相互作用 (図 3E) を維持したまま N 末端部分を分子中心部へ折り畳み、コンパクト型 (図 4B) として C1q の茎に結合することが可能である¹⁵⁾。C1q とコンパクト型 C1r₂s₂ で形成される伸長型 C1 複合体モデルを例示した (図 4C)。この状態では C1r の SP ドメインともう一方の C1r 分子の切断・活性化部位とが互いに離れて固定され、不活性な状態が保たれる。

伸長型 C1 複合体モデルでの C1r の自己活性化は、Almitairi らの考え¹⁵⁾を取り入れて、次のように考えられるだろう (図 4C)。すなわち、C1 複合体が標的分子に結合すると機械的ストレスが生じ、C1q の茎に結合する C1r の CUB1-EGF-CUB2 領域に構造変化が起こる。これに連動して C1r の C 末端領域の CCP1 と SP ドメイン間の結合が乖離し、1 本鎖前駆体 C1r にコンフォメーション変化が生じ、初発の活性を示すことになる。この C1r の活性が C1 複合体内のもう 1 分子の C1r を切断し活性化することで、分子内での自己活性化 (intramolecular C1 activation) が生じる。

伸長型 C1 複合体モデルでは C1s の SP ドメインは C1q の 6 本の茎の外に位置し、N 末端領域と C 末端領域の間の柔軟性により C4 や C2 の活性化を可能であるとした (図 4C) ¹⁵⁾。

2-2-2. C1r₂s₂ の立体構造モデル 2 (積層型モデル)

次に C1r と C1s の分子全体を使った研究を紹介する。C1r と C1s の活性触媒 Ser 残基の変異体の

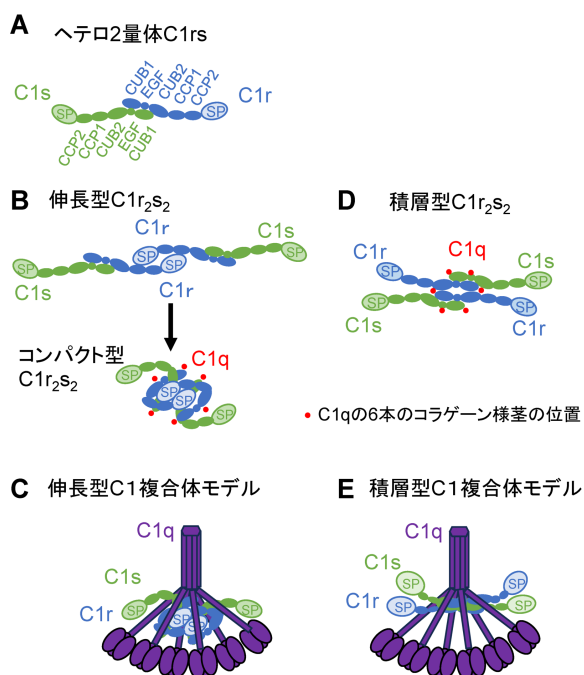


図 4. C1r₂S₂4 量体の 2 つのモデル（伸長型と積層型）とそれに基づく C1 複合体モデル

(A) C1rs ヘテロ 2 量体モデル。(B) 伸長型 C1r₂S₂ 4 量体モデルとコンフォメーション変化により生じるコンパクト型 C1r₂S₂ 4 量体モデル。(C) 伸長型 C1 複合体モデル^{15, 26, 45}。(D) 積層型 C1r₂S₂ 4 量体モデル: プロテアーゼ 4 分子が N 末端領域で積み重なっている¹⁴。(E) 積層型 C1 複合体モデル¹⁴。C1q の 6 本の茎の位置を赤点で示した。

C1r₂S₂ ヘテロ 4 量体を用いて、X 線小角散乱 (small angle X-ray scattering, SAXS) と電子顕微鏡解析を行い、積層型 C1r₂S₂ モデルが発表された (図 4D)¹⁴。このモデルでは、C1r₂S₂ あるいは C1 複合体中でも、C1r および C1s のそれぞれ 2 分子ずつが N 末端領域の主に CUB1-EGF ドメイン間の相互作用で平面上に交互に向きを変えて重なる (積層型 C1r₂S₂) (図 4D、4E)。後述するクライオ電子顕微鏡による解析で C1 複合体中に C1r₂S₂ の積層構造が観察され¹⁷⁻¹⁹、結合する C4b への密度マップの連続性から C1s の配置が特定された^{18, 19}。これらの結果を考慮して、図 4D では 2 つの C1rs ヘテロ 2 量体が C1r どうしで接触するモデルを示した。

積層型モデルでは、積層した N 末端ドメインは C1q の 6 本の茎の円錐形の内側に位置するが、4 量体分子全体としては伸びた構造 (長さ: 電子顕微鏡で 43 nm、SAXS で 45 nm) を取るので、4 つの C 末端領域の SP ドメインは C1q の茎の外に位置する (積層型 C1 複合体モデル) (図 4E)¹⁴。この構造モデルでは、C1r の 2 つの SP ドメインの触媒部位および C1s の 2 つの触媒部位は、それぞれ 39 nm および 28 nm 離れていた。したがって、この積層型 C1 複合体モデルでは自己活性化は起こらない。そこで、C1r の活性化は隣接する C1 複合体の C1r が活性化を触媒すると考え、C1 複合体の分子間での C1r のタンパク質切断による活性化 (intermolecular C1 activation) を考えた。

ここに述べた 2 つの C1 複合体の立体構造推定モデル (図 4C、4E)、すなわち 2 つの C1r の SP ドメインが C1q の 6 本の茎の内側にあるのか、C1r と C1s の 4 つすべての SP ドメインが茎の外に突き出しているのかは、C1 の活性化機序 (intramolecular vs intermolecular) に影響する大きな課題である。この両モデルの妥当性は Proc Natl Acad Sci 誌で議論された^{27, 28}。

2-3. C1s 抗体薬

寒冷凝集素症 (cold agglutinin disease, CAD) はまれな自己免疫性溶血性貧血で、体温以下で赤血球膜の自己抗原に結合する寒冷凝集素によって引き起こされる。CAD では IgM 自己抗体が寒冷凝集素で、32°C 以下で赤血球の I/i 抗原に結合し凝集を引き起こす²⁹。IgM 自己抗体に起因した補体古典経路の活性化により生成した C3b が赤血球に結合すると、膜侵襲複合体による血管内溶血につながり、C3b/iC3b/C3d でオプソニン化した赤血球が肝臓のクッパー細胞に貪食されると血管外溶血になる。

スチムリマブ (sutimlimab) は C1s を選択的に阻害するヒト化モノクローナル IgG4 抗体である²⁹。輸血を受けた CAD 患者を対象にしたスチムリマブのシングルアーム CARDINAL 試験では、溶血が急速に抑制され、ヘモグロビン濃度が上昇し、疲労が軽減したと報告された³⁰。6 ヶ月以内に輸血歴のない CAD 患者を対象にしたスチムリマブの無作為化

プラセボ対照第3相試験（CADENZA試験）では、有害事象は高齢で医療的に複雑な患者集団に一致して見られたが、スチムリマブ群は溶血、貧血、疲労を軽減し、治療の忍容性は概して良好であったと報告された³¹⁾。

3. 免疫グロブリンによる補体古典経路の活性化

補体古典経路は抗原抗体複合体により活性化する。最近、抗原に結合した IgG1₆-C1 複合体、IgG3₆-C1 複合体、および6量体 IgM-C1 複合体の立体構造がクライオ電子顕微鏡を用いて明らかにされた。

3-1. 免疫グロブリン IgG と IgM

免疫グロブリンは軽鎖と重鎖の定常部にアミノ酸配列の異なるアイソタイプ（クラス）がある。軽鎖のアイソタイプはκもしくはλで、重鎖のアイソタイプはγ、μ、α、δ、εであり、これらは IgG、IgM、IgA、IgD、IgE のクラスを決定付けている（図5）。IgG はさらに4つのサブクラスに分かれている^{32,33)}。IgG1、IgG3、IgM の模式図を図5に示す。

IgG は2本の重鎖（V_Hは重鎖の可変部ドメイン、C_H1、C_H2、C_H3は重鎖の定常部ドメイン）と2本の軽鎖（V_Lは軽鎖の可変部ドメイン、C_Lは軽鎖の定常部ドメイン）からなり、Fabフラグメント、ヒンジ部、Fc部分で構成されている（図5A、B）。IgG1とIgG3はヒンジ部の長さに違いがある。IgG1の重鎖（γ1鎖）のヒンジ部（15残基程度）に比べ（図5A）、IgG3の重鎖（γ3鎖）のヒンジ部は長く（62

残基程度）、プロリン21残基、15残基の3回繰り返し配列、11個のジスルフィド結合、3個のO型糖鎖結合を含んでいる（図5B）³³⁾。このようにIgG3は、抗原が結合するFabフラグメントとエフェクター機能をもつFc部分が他のサブクラスより距離が離れているので、Fab-FcおよびFab-Fabの間の柔軟性が最も高く、これがIgG3の補体活性化能など高いエフェクター機能を与える1つの理由と考えられている。

IgM プロトマーの構造を図5Cに示す。IgM重鎖のアイソタイプはμなので、重鎖のFabフラグメントはV_μとC_μ1であり、Fc部分はC_μ2、C_μ3、C_μ4である。C_μ2はIgM特有のドメインであり、IgGにはこれに相当するドメインはない。IgMの重鎖であるμ鎖のC末端領域には18アミノ酸残基からなる短い尾部（C_μ尾部）が存在する（図5C）。IgMプロトマーはC_μ3ドメイン間およびC_μ尾部間にジスルフィド結合がある（図5C）。全てのC_μ尾部はIgM構造の中央に集まり1つのβシート構造を形成している。これらの構造的な特徴により、IgMは放射状の5量体もしくは6量体の多量体構造をとることができる（図5D、E）³²⁾³⁴⁾。

5量体IgMには1つの大きな「割れ目」があり、ここにJ鎖（Joining chain、分子量15 kDa）が結合し両隣のプロトマーの橋渡しを行っている（図5D）。最近、5量体IgM-J鎖にさらにCD5L（別名apoptosis inhibitor of macrophage, AIM、分子量38 kDa）が共有結合していることが立体構造解析で

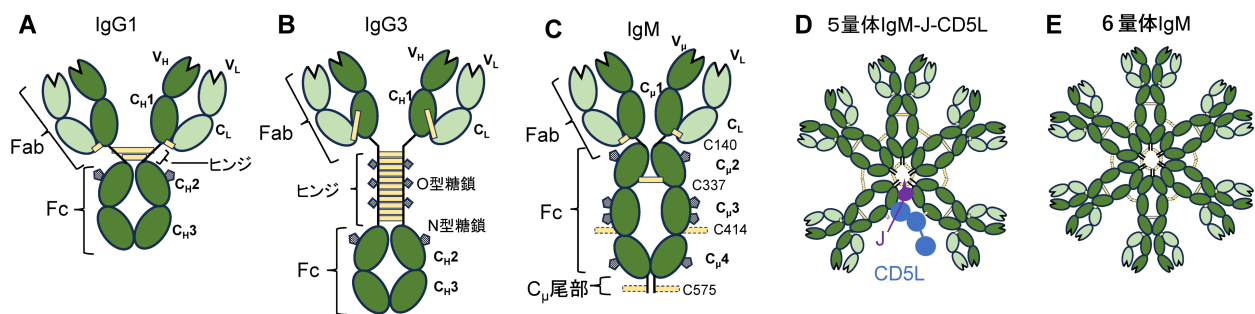


図5. IgG1、IgG3、IgM プロトマー、5量体IgMおよび6量体IgMのドメイン構造

(A) IgG1：重鎖はγ1鎖。(B) IgG3：重鎖はγ3鎖。(C) IgM プロトマー：重鎖はμ鎖。(D) 5量体IgM。ジスルフィド結合したJ鎖とCD5Lをもつ。(E) 6量体IgM。N型糖鎖およびO型糖鎖の結合位置を五角形と4角形で示す。ジスルフィド結合は黄色線で示す。濃緑：重鎖、淡緑：軽鎖

明らかにされた^{35,36)}。CD5Lは血中のほとんど全ての5量体IgMに結合している。5量体IgMはJ鎖とCD5Lが結合しているので対称性ではない。

6量体IgMは5量体IgMより効率的に補体を活性化する³²⁾。これはIgMとC1qとの結合が5価であるか6価であるかの違いに加え、J鎖とCD5Lの結合が5量体IgMのC1qへの結合に影響する可能性も考えられる。血中循環型の主要なIgMは5量体であり、6量体は全IgMのうちの5%以下である。5量体と6量体を構成するそれぞれのプロトマーの位置は構造的に同じである³⁴⁾。

3-2. 6量体化IgG (IgG₆) とIgMのFcプラットフォーム形成とC1複合体の結合

免疫グロブリンIgG1, IgG3, IgMが病原体などの抗原に結合すると、C1複合体が免疫グロブリンのFc部分に結合し補体古典経路を活性化する。IgG2の補体活性化能は弱い。IgG4, IgA, IgD, IgEは補体を活性化しない³²⁾。C1複合体はパターン認識分子であるgC1qドメインを6個もつ(図2B)が、C1qの1つのIgG Fc部分に対する親和性は非常に弱い(解離定数*K_d*約0.1 mM)¹⁶⁾。したがって、補体経路を活性化するためC1複合体がIgGに結合するには、IgGが多量体を形成しFc部分とC1qが複数で結合する必要がある。

IgG1とIgG3は次のような機序で補体C1複合体を活性化する(図6A-C, G-I)。IgG1とIgG3は固相化表面の抗原に結合する(図6A, G)と構造変化

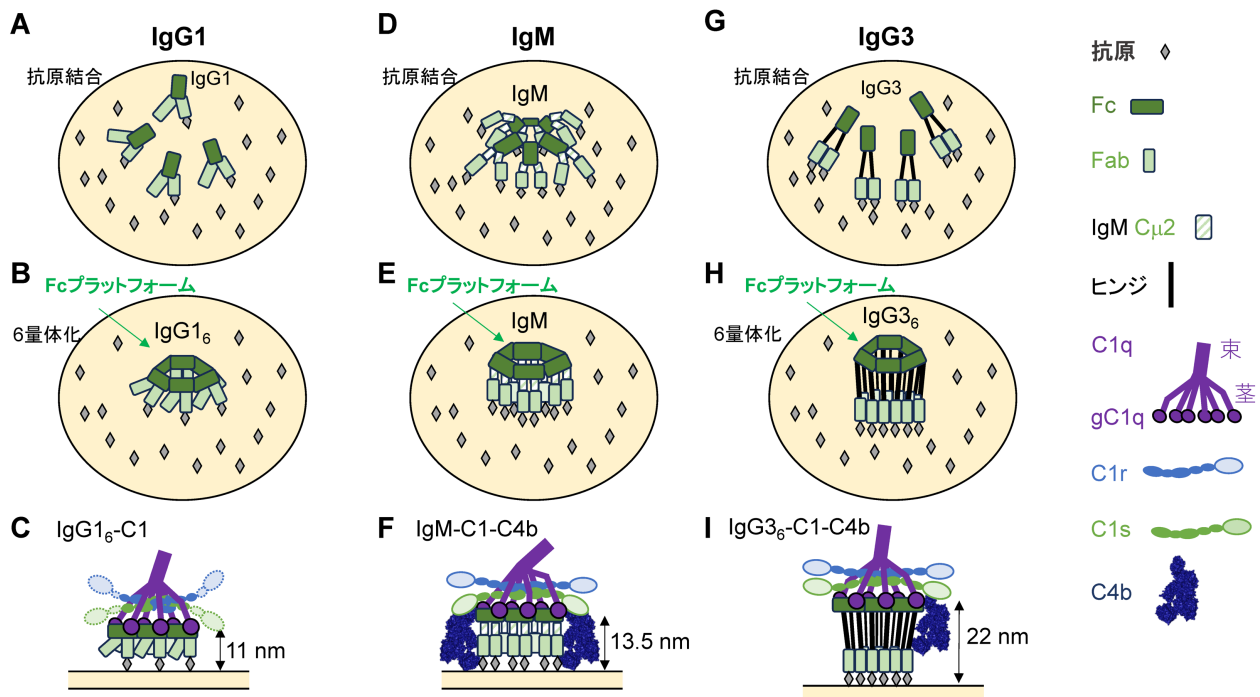


図6. 3種の免疫グロブリンの抗原抗体複合体とC1およびC4bの結合

(A) IgG1のリポソーム上抗原への結合。1つのFabフラグメントが抗原に結合する(1価の結合)。(B) 抗原に結合したIgG1の6量体化。IgG1₆はFabフラグメントとFc部分の間のヒンジ部で折れ曲がる。(C) IgG1₆-C1複合体¹⁷⁾。C1rとC1sのC末端領域CCP2-SPドメインは点線で示す。(D) 6量体IgMの構造。Fabフラグメントが放射状に周辺にあり、Fc部分がリング状に中央に位置する。(E) 6量体IgMのリポソーム上抗原への結合。固相表面の抗原に結合するとFabフラグメントとFc部分の間で折れ曲がる。2つのFabフラグメントがそれぞれ抗原に結合する(2価の結合)。(F) IgM-C1-C4b₂複合体¹⁸⁾。(G) IgG3のリポソーム上抗原への結合。2つのFabフラグメントが抗原に結合する(2価の結合)。(H) 抗原に結合したIgG3の6量体化。IgG3₆は長いヒンジ部で折れ曲がる。(I) IgG3₆-C1-C4b複合体¹⁹⁾。C4bはDNPをハプテンとしたリポソーム膜に結合できないので、膜から離れた位置でFabに結合している。

を起こし、Fab フラグメントと Fc 部分のつなぎ部分であるヒンジ部でホチキスの針のように折れ曲がり、Fc 部分を介して 6 量体 (IgG₆) を形成する (図 6B、H)。この 6 個の Fc 部分で構成される平面構造を Fc プラットフォームという。この構造変化により、Fc プラットフォームの C_H2 ドメイン上に C1 複合体の qC1q ドメインへの結合部位が露出する。これにより 1 つの Fc 部分に 1 つの gC1q ドメインが結合する。すなわち、1 つの Fc プラットフォームに 6 個の C1q ドメインが結合するようになる (図 6C、I)。また、5 量体もしくは 6 量体の IgM も固相化表面の抗原に結合すると IgG と同じように折れ曲がり、Fc プラットフォームを形成するとともに、Fc 部分の C_μ3 ドメイン上に gC1q ドメインへの結合部

位が露出し C1 複合体が結合できるようになる (図 6D-F)。C1 複合体中の C1q ドメインが Fc プラットフォームに結合すると、前述のような機序で C1r が活性化され補体古典経路が活性化される。

このように、免疫グロブリンは抗原に結合すると折れ曲がり C1 結合部位が露出し、結合した C1 により補体が活性化するが、この補体活性化の機序は立体構造から得られたものである。抗 HIV-1 gp120 抗体 IgG1-b12 は結晶中でヒンジ部で折れ曲がっており、Fc 部分は Fc プラットフォームを形成し 6 量体を形成していた (図 7A)¹⁶⁾。この Fc プラットフォームの C_H2 ドメインに C1 複合体の qC1q ドメインが結合した立体構造が明らかになっている (図 7B)^{16, 17)}。

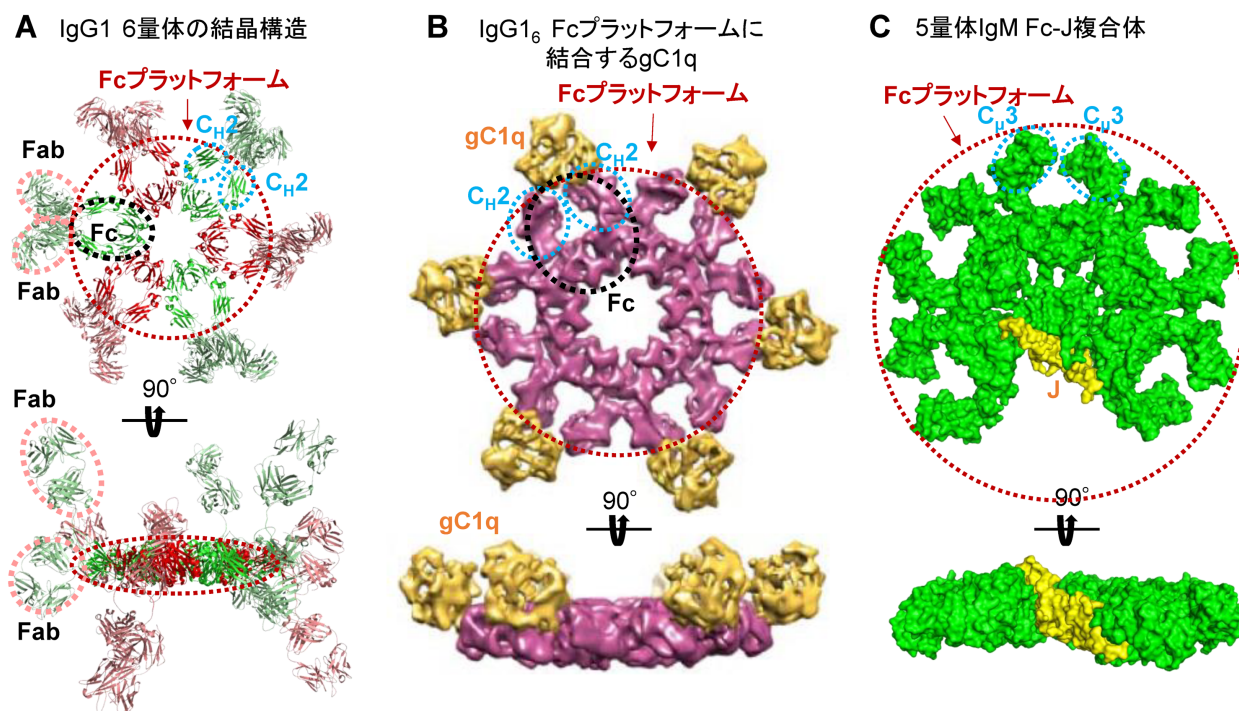


図 7. IgG と IgM の Fc プラットフォームの構造

(A) IgG の 6 量体の立体構造 (PDB 番号 1HZH)。抗 HIV-1 gp120 抗体 IgG1-b12 は結晶中で Fc 部分を介して 6 量体化し、Fc 部分が平面的な Fc プラットフォームを形成していた¹⁶⁾。Fab フラグメントは溶液中では比較的自由的な方位を取りえると考えられる。(B) IgG1₆ Fc プラットフォーム-gC1q 複合体の立体構造¹⁷⁾。クライオ電子顕微鏡単粒子解析による。ピンク色 : Fc プラットフォーム、黄色 : gC1q。文献 17 (Ugurlar D et al., Science 359, 794-797 (2018)) より Fig.2D を著者と AAAS から許可を得て改変して転載。(C) 5 量体 IgM Fc-J 複合体の立体構造 (PDB 番号 7K0C)³⁴⁾。クライオ電子顕微鏡単粒子解析法による。5 量体 IgM Fc: C_μ3-C_μ4-C_μ 尾部の 5 量体。黄緑色 : Fc 部分、黄色 : J 鎖。赤色点線 : Fc プラットフォーム、黒色点線 : プロトマーの 1 つの Fc 部分、水色点線 : IgG C_H2 ドメインと IgM C_μ3 ドメイン。

5 量体 IgM の C_μ3-C_μ4 ドメインと J 鎖の複合体の立体構造 (図 7C)³⁴⁾と、5 量体 IgM 全長と J 鎖の複合体の立体構造³⁷⁾から、IgM は膜上の抗原に結合すると C_μ2 と C_μ3 のドメインの境界がヒンジとして折れ曲がり、Fc 部分の C_μ3-C_μ4 ドメインから成る Fc プラットフォームを形成することが明らかになった (図 6E、図 7C)。IgM の全体の構造で重要なことは、中心部から放射状周辺部にかけて柔軟性が増している点である³⁷⁾。具体的には、C_μ3 ドメインは C_μ4 ドメインより自由度が高く、C_μ2 はより自由度が高く、2 本の Fab フラグメントは極めて自由度が高い。したがって、クライオ電子顕微鏡で得られた像の密度レベルを下げると C_μ2 ドメインや 2 本の Fab フラグメントが確認された。

ここで述べたように、補体の活性化は抗体が病原体などの固相化表面に結合し構造変化を起こし gC1q 結合部位が露出した場合だけに観察される。溶液中では IgG と IgM の構造変化が起こらないので qC1q 結合部位は露出せず、液相では補体古典経路は活性化されない。

3-3. IgG の多量体化と疾患

視神経脊髄炎 (Neuromyelitis optica, NMO) は中枢神経系の炎症性疾患である³⁸⁾。NMO はアストロサイトの水チャネルである 4 量体膜タンパク質アควポリン-4 (aquaporin-4, AQP4) に対する自己抗体 (AQP4-IgG) により、補体依存性および補体非依存性の細胞傷害が生じ神経傷害を起こす^{38, 39)}。AQP4 は 2 つのアイソフォームがあり、N 末端の 22 残基を欠損する M23 アイソフォームと、22 残基を有する M1 アイソフォームがある。いずれも 4 量体を形成するが、M1 アイソフォームは細胞膜上で小さなクラスターを形成し、M23 アイソフォームは膜上で巨大なクラスター構造 OAPs (orthogonal arrays of tetrameric AQP4 particles) を形成する。AQP4 抗体は M23 OAP に対して、M1 アイソフォーム四量体より約 50 倍高い親和性を示し、強い補体活性化を惹起する。一方、血清の AQP4-IgG タイターと補体活性化は相関しない。そこで患者由来の組換え AQP4-IgG を用いた研究が行われ、AQP4 の細胞外領域を標的とする一群の AQP4 自己抗体が膜

上で多量体を形成することで補体古典経路を活性化し、補体依存性の細胞傷害を惹起することが明らかになった³⁸⁾。AQP4 自己抗体に変異を導入し細胞傷害能に対する影響を調べたところ、C1q の結合、もしくは IgG の C_H3 ドメインにおける Fc-Fc 相互作用 (Fc プラットフォームの形成) を増強させる変異体は C1q 結合とそれによる細胞傷害能を増強し、これらの作用を減弱させる変異は細胞傷害能を低下させた。また抗体の Fc-Fc 相互作用を阻害するペプチドは細胞傷害能を阻害した。これらの結果から、AQP4-IgG どうしが OAPs 上で Fc 部分を介して多量体を形成し、C1 複合体が結合するプラットフォームとなることで補体古典経路を効率良く活性化し、強い細胞傷害能を発揮すると考えられた³⁸⁾。

M1 アイソフォーム 4 量体の立体構造がクライオ電子顕微鏡法で決定され、さらに 2 種の自己抗体の Fab フラグメントとの複合体の立体構造も決定された³⁹⁾。これらの構造を用いて、M23 アイソフォーム 4 量体の立体構造モデルを作成し、AQP4 抗体の結合による M23 の構造変化を推定した。この知見は AQP4 への自己抗体の結合を阻害する低分子化合物やペプチド阻害剤の設計に繋がり、細胞傷害を最小限に抑える薬剤の開発に繋がると考えられる。

抗体を介した肺傷害は、輸血関連急性肺傷害、自己免疫性肺疾患、肺移植後の一次移植片機能不全で観察されるが、抗原抗体複合体が補体を活性化して肺傷害を誘導する機序は不明であった。Cleary らは肺微小血管におけるアロ抗体の沈着によって引き起こされる急性肺傷害のマウスモデルを用いて、MHC-クラス I 抗原に対するアロ抗体が 6 量体を形成し補体依存性の急性肺傷害を惹起することを示した⁴⁰⁾。すなわち、抗体のカルバミル化や Fc 部分の p.Lys439Glu 変異導入などで IgG の 6 量体化を阻害すると、アロ抗体による急性肺傷害が減少し、6 量体化を促進する Fc 部分の変異体は急性肺傷害が増大することを示した。C1q ノックアウトマウスでは急性肺傷害は軽減した。Fc 部分の 6 量体化阻害デコイ治療薬 (IgM 尾部と p.Leu309Cys 変異をもつヒト IgG1 Fc 部分の 6 量体) である CSL777、および Fc-Fc 相互作用部位近傍に結合して IgG 6 量体形成阻害能を有する *S. aureus* protein A 由来の SpA-B

のマウスへの投与は、いずれも急性肺傷害を軽減し肺傷害より保護した。このように、生体内で抗原に結合した IgG 抗体が多量体化し補体 C1 を活性化させ、血管内皮細胞傷害を惹起し組織傷害を引き起こすことが示された。これらの結果より、アロ抗体によって引き起こされる補体依存性臓器傷害に対する新しい治療法として、IgG の 6 量体化を阻害し補体活性化を低減する機序が考えられるだろう。

3-4. 立体構造から見る抗原抗体複合体による補体古典経路の活性化

3-4-1. 巨大タンパク質複合体の立体構造解析法：クライオ電子顕微鏡

これまでタンパク質の立体構造の多くは X 線結晶構造解析法により決定されてきたが、膜タンパク質や複雑な分子の解析は難しかった。近年、クライオ電子顕微鏡を用いた構造解析法が飛躍的に進歩を遂げ、2017 年にはノーベル化学賞が「クライオ電子顕微鏡法の開発」に与えられた。タンパク質の立体構造データベースの登録数全体に占めるクライオ電子顕微鏡解析法での解析数の割合は年々増加している。

クライオ電子顕微鏡解析は、水溶液試料を「グリッド」上に薄い層として急速凍結して電子線をあてて拡大像を取得し、これを多数平均化して S/N をあげて 3 次元像を再構成する方法で、試料が少なくすみ、結晶化の必要がなく、大きい分子も解析できるなどの利点がある。電子線検出器の感度と画像処理技術が飛躍的に進んだ。クライオ電子顕微鏡の単粒子解析法では、ランダムな方位にある二次元の粒子像のなかから似たものを探してクラス分けして平均化し、それらから三次元像を再現する⁴¹⁾。特にこの方法では、X 線結晶構造解析と同じ程度の原子分解能の構造が得られることも珍しくなくなった。クライオ電子線トモグラフィ法では、急速凍結した試料を連続的に傾斜して多数の撮影像を取得することで、単一の対象物から三次元構造を得ることができる。単粒子解析法ほどの高い分解能は得られないことが多いが、均一でないタンパク質の超巨大複合体や細胞内のさまざまな構造をタンパク質のドメインが識別できる程度の分解能で観察でき、X 線結晶構造解析などで決定された立体構造を当てはめて議

論することが可能となった⁴²⁾。これらの手法を用いることにより、これまでの X 線結晶構造解析法では困難だった巨大タンパク質複合体の立体構造が次々と明らかになっている。

最近、本法を用いて分子量がメガダルトン級の補体の超巨大タンパク質複合体である IgG1₆-C1 複合体、IgG3₆-C1-C4b 複合体、IgM-C1-C4b₂ 複合体の立体構造解析が相次いで報告された¹⁷⁻¹⁹⁾。

3-4-2. 6 量体化 IgG1-C1 複合体の立体構造

IgG1₆ に C1 が結合した複合体 (IgG1₆-C1 複合体：分子量約 1.7 MDa) の構造が、クライオ電子顕微鏡を用いて解明された (図 8A)¹⁷⁾。本研究ではハプテンとしてジニトロフェノール (DNP、分子量 184 Da) をもつリポソームに anti-DNP IgG1 抗体と C1 を加え、リポソーム表面の全体に IgG1₆-C1 複合体を形成させ、電子線トモグラフィ法で立体構造を解析した (図 8A 左)。また、6 量体を形成しやすい変異を導入した IgG1 を用いて、溶液中の IgG1₆-C1 複合体を単粒子解析法で解析した (図 8A 右)¹⁷⁾。得られたクライオ電子顕微鏡データはそれ自体で分子構造モデルを構築する分解能を持たなかったが、既知の結晶構造を当てはめることにより C1q と C1r₂s₂ および IgG1₆ との相互作用が明らかにされた (図 8A 右)。決定された IgG1₆-C1 複合体の立体構造の模式化した図も示した (図 6C)。以下、模式図を用いて彼らの実験結果を紹介する。

IgG1₆-C1 複合体と C1 単独の構造を比べると、C1 が抗体に結合すると、C1q の腕が凝縮し、C1r₂s₂ の再配置が起こり、C1q の束構造が傾くことが判明した¹⁷⁾。IgG1₆-C1 複合体では、C1q の束構造は垂直軸から 15°傾いて上部に突き出し、この束構造から 6 本のコラーゲン様の茎が円錐形で下方に伸び、その先に球状の gC1q が位置し、抗体 Fc 部分の C_H2 ドメインに結合していた (図 8A 右)¹⁷⁾。6 本の茎はそれぞれ C1r と C1s と接触しており、2 本は顕著に曲がっていた。C1r₂s₂ は N 末端の 3 つのドメイン (CUB1-EGF-CUB2) が図 4D に示すような積層型構造を取ることが示された^{18,19)}。C 末端の CCP2-SP ドメインの密度は観察されなかった。C1r と C1s の CCP2-SP ドメインは C1q の 6 本の茎の円錐形の外

に突き出していたので、C1r は隣の C1 複合体の C1r で活性化することを示唆した (図 6C)¹⁷⁾。活性化した C1r は近傍の C1s を活性化し、C1s は C4 を切断する。後のクライオ電子顕微鏡による解析では、IgG1₆-C1 複合体には 1 分子の C4b が結合していた¹⁹⁾。

IgG1 は Fc 部分の CH2 ドメイン内の C1q 結合部位 (Ala327-Leu-Pro-Ala-Pro331 配列) を介して qC1q に結合する。この C1q 結合配列は IgG 抗体で露出しているが、前述のように単独では親和性が低いため十分に C1 を結合できない。クライオ電子顕微鏡による解析により Fc プラットフォームと C1q の詳細な結合様式が明らかになった (図 7B)¹⁷⁾。これまで C1 との結合に関わるとされていた CH2 ドメインの Lys322 は C1q の C 鎖 Asp195 に結合していた。これらの結合に関わる残基に変異を導入すると

C5b-9 による補体依存性細胞傷害能が大きく低下した。IgG が補体古典経路を活性化するには、IgG がクラスター化し多価で C1 と結合し複合体を形成することの重要性が改めて示された。

3-4-3. 抗原結合 IgM-C1 複合体の立体構造

3-4-3-1. リポソーム上の IgM-C1 複合体の構造

CD52 の抗原決定基アナログペプチド (ミモトープ) をコレステロールに結合させた CD52-コレステロールハプテンを持つリポソームに、ラット抗 CD52 IgM 抗体とヒト血清を添加し、クライオ電子顕微鏡電子線トモグラフィ法を用いて像を取得したところ、IgG1₆-C1 複合体の場合より構造的に均質な IgM-C1 複合体像を得ることができた (図 8B)¹⁸⁾。リポソーム表面に結合した 5 量体および 6 量体の IgM-C1 複合体は、IgM、C1q、C1r₂S₂ だけでなく

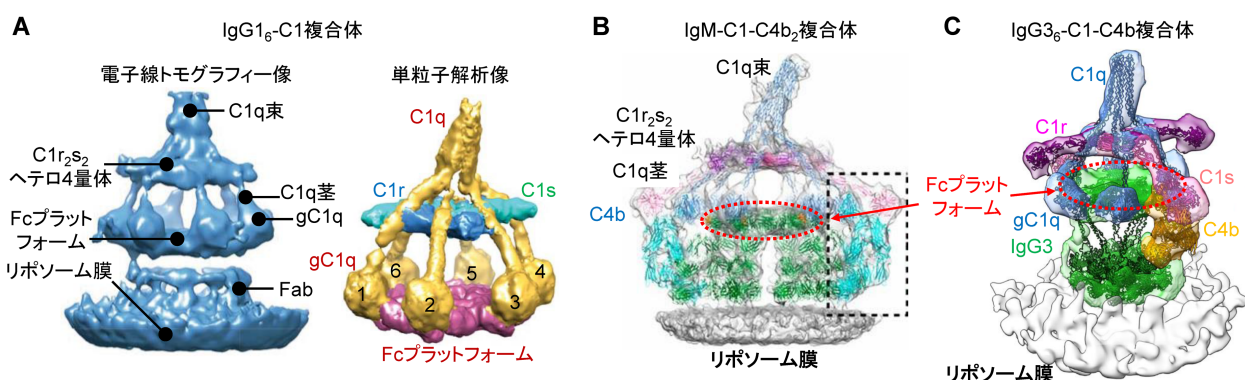


図 8. クライオ電子顕微鏡による抗原抗体-C1 複合体の立体構造

(A) 膜上の抗原に結合した IgG1₆-C1 複合体のクライオ電子線トモグラフィ像 (左) と単粒子解析法により得られた像 (右)¹⁷⁾。3 層構造 (C1r₂S₂、gC1q が結合した Fc プラットフォーム、リポソーム膜) が確認できる。図は文献 17 (Ugurlar D et al., Science 359, 794-797 (2018)) より Fig.1C および Fig.2C を著者と AAAS から許可を得て改変して転載。(B) 膜上の抗原に結合した 6 量体 IgM-C1-C4b₂ 複合体のクライオ電子線トモグラフィ像¹⁸⁾。得られたマップ (薄いグレー) に各構成分子の既知の結晶構造を組み込み、複合体全体の構造モデルが構築されている。四角点線内は結合した C4b を示し、チオエステルドメインがリポソーム膜に結合する様子が観察される。図は文献 18 (Sharp TH et al., Proc Natl Acad Sci 116(24), 11900-11905 (2018)) より Fig.5A を許可を得て改変して転載。(C) 膜上の抗原に結合した IgG3₆-C1 複合体のクライオ電子線トモグラフィ像¹⁹⁾。得られた密度マップに IgG3 と C1 および C4b の既知の結晶構造を当てはめている。IgG3 の 2 つの Fab フラグメントはそれぞれリポソーム膜上の抗原に結合し密に秩序だてて整列していた。図は文献 19 (Abendstein L et al. Nat Commun 14:4027 (2023)) より Fig.3e を Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.) に従い改変して転載。

C4b も結合していた。彼らが密度マップ上に構築した構造モデル (図 8B) を分かりやすく模式化した図を示す (図 6F)。以下、模式図を用いてクライオ電子顕微鏡解析より明らかになった IgM、C1 および C4b の相互作用の詳細を紹介する。

溶液中の 6 量体 IgM は 6 個のプロトマーが放射状に位置する。IgM は 10 個または 12 個の自由度の高い Fab フラグメントを持ち、IgM-C1 複合体ではすべての Fab フラグメントが表面抗原に結合していた (図 6D)。抗原に結合した IgM は階層構造を示し、最上段は Fc プラットフォーム ($C_{\mu}3$ - $C_{\mu}4$ ドメイン) で、その下に $C_{\mu}2$ ドメインと Fab フラグメントが続く、表面抗原に結合していた (図 6E)¹⁸⁾。IgM の Fc プラットフォームは IgG1₆ と同様の構造であった。IgM Fc 部分の $C_{\mu}3$ ドメインには C1q の結合部位 (Asp432-Leu-Pro-Ser-Pro436 配列) がある。IgM が抗原に結合するとこの部位が Fc プラットフォームの端に露出し¹⁸⁾、C1 が Fc プラットフォームに結合できるようになり補体経路が活性化する (図 6F)。

3-4-3-2. C1 の IgM への結合と C1 活性化

6 量体 IgM-C1 複合体の密度マップから、C1 複合体のすべての構成要素である C1qr₂s₂ の密度が明らかになった (図 8B)¹⁸⁾。C1 の 6 個の gC1q は Fc プラットフォームを構成する各プロトマーの $C_{\mu}3$ ドメインペアに 1:1 で結合していた。C1r₂s₂ は前述の積層型構造モデル (図 4D)¹⁴⁾ とよく一致した構造を取っていた。C1r と C1s の SP ドメインは C1q の 6 本の茎から突き出しており、C1s の SP ドメインは C4b に向かって屈曲し、C1s による C4 の切断をうまく説明した (図 8B)。さらに C1s の SP ドメインは Fab フラグメントおよび gC1q と相互作用していた。C1 の頭頂部の束構造は IgG1₆-C1 複合体や IgG3₆-C1 複合体と比べ最も斜めになっていた (図 8)。

3-4-3-3. IgM-C1 複合体に結合した C4b

C4 と C4b は単独の結晶構造が報告されており⁴³⁾、それぞれ C3 および C3b とよく似た立体構造を取ることが分かっている。C3 と C3b の立体構造は本誌で解説した⁴⁴⁾。C4 は C1s で切断されて C4b に転換

する際に、チオエステルドメイン内の反応性の高いチオエステル結合を露出する。このチオエステル結合は自発的に水解するか、ごく近傍のアミノ基もしくは水酸基に反応して共有結合する (図 1)。

粒子像の分類の結果、5 量体 IgM-C1 複合体には 1 分子または 2 分子の C4b がリポソーム膜上の抗原ペプチドに垂直に結合し、6 量体 IgM-C1 複合体には 2 分子の C4b が結合する構造が得られた (図 8B)¹⁸⁾。いずれの場合でも、C1q の 1 本の束構造は C4b が結合する側に傾いており、2 分子の C4b が結合している場合は強い密度を持つ C4b の側に傾いていた。C4b が結合していない IgM-C1 複合体には突き出している C1s の CCP1-CCP2-SP ドメインは見られなかった。したがって、C1s のこれらのドメインは C4b と相互作用しない場合は柔軟であることを示しており、これは IgG1₆-C1 複合体で観察された知見と一致していた¹⁷⁾。IgM-C1-C4b 複合体では、C4b は gC1q ドメイン、C1s の CCP1-CCP2 ドメインと SP ドメイン、IgM の Fab フラグメントと相互作用していた (図 8B)。しかし、C1r との相互作用は見られなかった。

3-4-4. IgG3₆-C1 複合体の立体構造

3-4-4-1. 抗原結合 IgG3 Fab フラグメントの秩序化された整列

IgG3₆-C1 複合体の立体構造が IgG1₆-C1 複合体と比較しながら報告された (図 8C)¹⁹⁾。抗原抗体複合体の解析のため、ハプテンとして DNP をもつリポソームに anti-DNP IgG1 抗体もしくは anti-DNP IgG3 抗体を結合させ、これらの抗原抗体複合体をクライオ電子線トモグラフィ法で解析した¹⁹⁾。得られた密度マップ上に構築した構造モデル (図 8C) に基づいて模式化した図を示す (図 6I)。IgG3 抗体と IgG1 抗体では、リポソーム DNP への結合の違いが観察された。

IgG3 抗体はリポソーム抗原に結合すると 6 量体化し、IgG3₆ の 12 個の Fab フラグメントは密に秩序だてて整列し、すべての Fab フラグメントが抗原に結合していた (2 価の結合) (図 6H、図 8C)¹⁹⁾。一方、IgG1 抗体はリポソーム表面の抗原に多数結合し凝集塊も見られ、6 量体化した IgG1 も観察され

た。しかし、IgG1 の Fab フラグメントには秩序化した構造は見られず、2 つの Fab フラグメントのうちの 1 つを使って抗原表面に結合し、残りの 1 つの Fab フラグメントは抗原に結合しなかった (1 価の結合) (図 6B)。このように、抗原に結合した IgG3 と IgG1 の Fab フラグメントの様子は大きく異なっていた。IgG3 と IgG1 の Fab フラグメントのアミノ酸配列はわずか 3 残基しか異なっておらず、これらはいずれも Fab フラグメントの整列に影響を与える部位ではなかった。したがって、IgG3 の Fab フラグメントの秩序だった整列は、長いヒンジ部により 2 つの Fab フラグメントに抗原結合への自由度が与えられた結果であろう。IgG3 の Fab フラグメントは IgG1 より密に秩序だって抗原上に整列するので、IgG3 は IgG1 より病原体をより効率的に覆い囲み中和できると考えられる。

3-4-4-2. IgG3₆ の高い位置にある Fc プラットフォームによる補体活性化

IgG1₆ と IgM の 6 角形の Fc プラットフォームは、リポソーム表面からそれぞれ 11 nm と 13.5 nm の位置にある (図 6C、F) ^{16, 18)}。一方、IgG3₆ の Fc プラットフォームも 6 角形であり、今回の解析でリポソーム表面から 22 nm の位置にあることが判明した (図 6I) ¹⁹⁾。高い位置にある IgG3₆ Fc プラットフォームは病原体の細胞膜上などで IgG1₆ Fc プラットフォームより露出度が高い。補体成分のオプソニン化は C3b とその分解産物の iC3b が病原体などに共有結合することで行われるが (図 1)、IgG3₆ の Fc プラットフォームは C3b/iC3b より高い。したがって、オプソニン化された膜上でも、IgG3₆ Fc プラットフォームは C1 複合体や食細胞に発現している Fcγ レセプターへ結合能を示す。一方、IgG1₆ の Fc プラットフォームはオプソニン化補体成分 C3b/iC3b の高さと同程度である。

3-4-4-3. IgG3₆-C1 複合体中の C1 の構造

IgG3₆-C1 複合体の C1 と Fc プラットフォームとの結合構造は IgG1₆-C1 複合体や IgM-C1 複合体と非常によく似ていた (図 8)。IgG3 は IgG1 より C1q が結合しやすく、C4 沈着および膜侵襲複合体の形成

もより効率的であった。IgG3₆-C1 複合体の C1q の頂上の 1 本の束は IgG1₆ や IgM の場合より直立していた (図 8)。C1r₂s₂ の N 末端ドメインは積層構造を成し、C1q の 6 本の茎の内側に位置していた。2 つの C1r 分子の C 末端 SP ドメインは C1q の茎の外側にあり、リポソーム膜に平行に配向していた。1 つの C1s 分子の SP ドメインは Fc プラットフォームに向かって下向きに配向して C4b と相互作用し、もう 1 本は C1r SP ドメインに近い位置に配置していた (図 8C)。

3-4-4-4. C4b の IgG3₆-C1 複合体への結合

IgG3 で被われた抗原リポソームに血清を添加したところ、抗原抗体複合体に結合する C1 複合体と C4b の結合が観察された (図 6I、図 8C) ¹⁹⁾。IgG3₆-C1-C4b 複合体では、C4b はリポソーム膜から離れて、IgG3 のヒンジ部と Fab フラグメントにある複数の Ser/Thr 残基の水酸基、および Fc 部分の Lys 残基のアミノ基に共有結合していた (図 8C) ¹⁹⁾。IgG1-C1-C4b 複合体においても、C4b は Fc 部分の同位置にある Lys 残基に共有結合していた。一方で C4b が共有結合していた Ser/Thr 残基のうちの 2 残基は IgG3 に特有のヒンジ部に位置し IgG1 にはない。これらの C4b が結合する残基を考えると、IgG3 を基にした免疫治療薬の設計や開発では、ヒンジ部の長さや水酸基をもつアミノ酸残基を考慮する必要があるかもしれない。本研究では抗原として水酸基やアミノ基を持たない DNP をハプテンとして用いたので、C4b は抗原に結合することができない。こういった制限があったため C4b は IgG に共有結合したのかもしれない

4. おわりに

抗体による補体 C1 複合体の活性化の機序を立体構造から解説した。ここで述べたクライオ電子顕微鏡の解析は、リポソーム膜上に人工的な抗原 (DNP やミモトープ) を密に提示させた実験系を用いている。この固相化した抗原に、IgG や IgM が結合し構造変化を起こして Fc プラットフォームを形成し、それに C1 複合体が結合して補体系が活性化される。こういった抗体の構造変化は、細菌の細胞壁上の多

糖体などでも起こると思われる。最近になり、IgGの多量体形成は自己免疫疾患において疾患発症に関わることが示された³⁸⁻⁴⁰⁾。抗体の多量体化の阻害は病態を軽減し、促進は病態を誘発すると発表された⁴⁰⁾。このように、ある種の病態下では抗原に結合したIgG抗体が多量体化し補体古典経路を活性化させ、細胞や組織の傷害を引き起こすことが示された。抗体の多量体化を阻害する低分子化合物などの薬剤は補体依存性の細胞傷害を抑制し疾患の治療に役立つ可能性を示している。

[利益相反]

本稿に関わる著者のCOI開示を以下に行う。植田康敬 講演謝礼(サノフィ株式会社)、研究費(中外製薬)。

[文献]

- 1) Gaboriaud C, Ling WL, Thielens NM, Bally I, Rossi V. Deciphering the fine details of C1 assembly and activation mechanisms: "mission impossible"? *Front Immunol.* 2014; 5: 565.
- 2) Thielens NM, Tedesco F, Bohlson SS, Gaboriaud C, Tenner AJ. C1q: A fresh look upon an old molecule. *Mol Immunol.* 2017; 89: 73-83.
- 3) Lu J, Kishore U. C1 complex: an adaptable proteolytic module for complement and non-complement functions. *Front Immunol.* 2017; 8: 592.
- 4) Reid KBM. Complement component C1q: historical perspective of a functionally versatile, and structurally unusual, serum protein. *Front Immunol.* 2018; 9: 764.
- 5) Villiers CL, Arlaud GJ, Colomb MG. Domain structure and associated functions of subcomponents C1r and C1s of the first component of human complement. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985; 82(13): 4477-81.
- 6) Gaboriaud C, Rossi V, Bally I, Arlaud GJ, Fontecilla-Camps JC. Crystal structure of the catalytic domain of human complement c1s: a serine protease with a handle. *EMBO J.* 2000; 19(8): 1755-65.
- 7) Budayova-Spano M, Lacroix M, Thielens NM, Arlaud GJ, Fontecilla-Camps JC, Gaboriaud C. The crystal structure of the zymogen catalytic domain of complement protease C1r reveals that a disruptive mechanical stress is required to trigger activation of the C1 complex. *EMBO J.* 2002; 21(3): 231-9.
- 8) Budayova-Spano M, Grabarse W, Thielens NM, Hillen H, Lacroix M, Schmidt M, et al. Monomeric structures of the zymogen and active catalytic domain of complement protease C1r: further insights into the C1 activation mechanism. *Structure.* 2002; 10(11): 1509-19.
- 9) Gaboriaud C, Juanhuix J, Gruez A, Lacroix M, Darnault C, Pignol D, et al. The crystal structure of the globular head of complement protein C1q provides a basis for its versatile recognition properties. *J Biol Chem.* 2003; 278(47): 46974-82.
- 10) Gregory LA, Thielens NM, Arlaud GJ, Fontecilla-Camps JC, Gaboriaud C. X-ray structure of the Ca²⁺-binding interaction domain of C1s. Insights into the assembly of the C1 complex of complement. *J Biol Chem.* 2003; 278(34): 32157-64.
- 11) Kardos J, Harmat V, Pallo A, Barabas O, Szilagyi K, Graf L, et al. Revisiting the mechanism of the autoactivation of the complement protease C1r in the C1 complex: structure of the active catalytic region of C1r.

- Mol Immunol. 2008; 45(6): 1752-60.
- 12) Venkatraman Girija U, Gingras AR, Marshall JE, Panchal R, Sheikh MA, Harper JA, et al. Structural basis of the C1q/C1s interaction and its central role in assembly of the C1 complex of complement activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013; 110(34): 13916-20.
 - 13) Perry AJ, Wijeyewickrema LC, Wilmann PG, Gunzburg MJ, D'Andrea L, Irving JA, et al. A molecular switch governs the interaction between the human complement protease C1s and its substrate, complement C4. *J Biol Chem*. 2013; 288(22): 15821-9.
 - 14) Mortensen SA, Sander B, Jensen RK, Pedersen JS, Golas MM, Jensenius JC, et al. Structure and activation of C1, the complex initiating the classical pathway of the complement cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017; 114(5): 986-91.
 - 15) Almitairi JOM, Venkatraman Girija U, Furze CM, Simpson-Gray X, Badakshi F, Marshall JE, et al. Structure of the C1r-C1s interaction of the C1 complex of complement activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018; 115(4): 768-73.
 - 16) Diebolder CA, Beurskens FJ, de Jong RN, Koning RI, Strumane K, Lindorfer MA, et al. Complement is activated by IgG hexamers assembled at the cell surface. *Science*. 2014; 343(6176): 1260-3.
 - 17) Ugurlar D, Howes SC, de Kreuk BJ, Koning RI, de Jong RN, Beurskens FJ, et al. Structures of C1-IgG1 provide insights into how danger pattern recognition activates complement. *Science*. 2018; 359(6377): 794-7.
 - 18) Sharp TH, Boyle AL, Diebolder CA, Kros A, Koster AJ, Gros P. Insights into IgM-mediated complement activation based on in situ structures of IgM-C1-C4b. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019; 116(24): 11900-5.
 - 19) Abendstein L, Dijkstra DJ, Tjokrodirjo RTN, van Veelen PA, Trouw LA, Hensbergen PJ, et al. Complement is activated by elevated IgG3 hexameric platforms and deposits C4b onto distinct antibody domains. *Nat Commun*. 2023; 14(1): 4027.
 - 20) Kilchherr E, Hofmann H, Steigemann W, Engel J. Structural model of the collagen-like region of C1q comprising the kink region and the fibre-like packing of the six triple helices. *J Mol Biol*. 1985; 186(2): 403-15.
 - 21) Madison EL, Kobe A, Gething MJ, Sambrook JF, Goldsmith EJ. Converting tissue plasminogen activator to a zymogen: a regulatory triad of Asp-His-Ser. *Science*. 1993; 262(5132): 419-21.
 - 22) Ivanov I, Matafonov A, Sun MF, Cheng Q, Dickeson SK, Verhamme IM, et al. Proteolytic properties of single-chain factor XII: a mechanism for triggering contact activation. *Blood*. 2017; 129(11): 1527-37.
 - 23) Miyata T, Horiuchi T. Biochemistry, molecular genetics, and clinical aspects of hereditary angioedema with and without C1 inhibitor deficiency. *Allergol Int*. 2023; 72(3): 375-84.
 - 24) Zwarthoff SA, Widmer K, Kuipers A, Strasser J, Ruyken M, Aerts PC, et al. C1q binding to surface-bound IgG is stabilized by C1r(2)s(2) proteases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2021; 118(26): e2102787118.
 - 25) Tschopp J, Villiger W, Fuchs H, Kilchherr E, Engel J. Assembly of subcomponents C1r and

- C1s of first component of complement: electron microscopic and ultracentrifugal studies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1980; 77(12): 7014-8.
- 26) Bally I, Rossi V, Lunardi T, Thielens NM, Gaboriaud C, Arlaud GJ. Identification of the C1q-binding sites of human C1r and C1s: a refined three-dimensional model of the C1 complex of complement. *J Biol Chem*. 2009; 284(29): 19340-8.
 - 27) Mortensen SA, Sander B, Jensen RK, Pedersen JS, Golas MM, Thiel S, et al. Models of the complement C1 complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018; 115(17): E3866.
 - 28) Almitairi JOM, Venkatraman Girija U, Furze CM, Simpson-Gray X, Badakshi F, Marshall JE, et al. Reply to Mortensen et al.: The zymogen form of complement component C1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018; 115(17): E3867-E8.
 - 29) West EE, Woodruff T, Fremeaux-Bacchi V, Kemper C. Complement in human disease: approved and up-and-coming therapeutics. *Lancet*. 2024; 403(10424): 392-405.
 - 30) Roth A, Barcellini W, D'Sa S, Miyakawa Y, Broome CM, Michel M, et al. Sutimlimab in cold agglutinin disease. *N Engl J Med*. 2021; 384(14): 1323-34.
 - 31) Roth A, Berentsen S, Barcellini W, D'Sa S, Jilma B, Michel M, et al. Sutimlimab in patients with cold agglutinin disease: results of the randomized placebo-controlled phase 3 CADENZA trial. *Blood*. 2022; 140(9): 980-91.
 - 32) Janeway's 免疫生物学 原書第 9 版: 南江堂; 2019.
 - 33) Damelang T, Brinkhaus M, van Osch TLJ, Schuurman J, Labrijn AF, Rispen T, et al. Impact of structural modifications of IgG antibodies on effector functions. *Front Immunol*. 2023; 14: 1304365.
 - 34) Li Y, Wang G, Li N, Wang Y, Zhu Q, Chu H, et al. Structural insights into immunoglobulin M. *Science*. 2020; 367(6481): 1014-7.
 - 35) Hiramoto E, Tsutsumi A, Suzuki R, Matsuoka S, Arai S, Kikkawa M, et al. The IgM pentamer is an asymmetric pentagon with an open groove that binds the AIM protein. *Sci Adv*. 2018; 4(10): eaau1199.
 - 36) Oskam N, den Boer MA, Lukassen MV, Ooijevaar-de Heer P, Veth TS, van Mierlo G, et al. CD5L is a canonical component of circulatory IgM. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2023; 120(50): e2311265120.
 - 37) Chen Q, Menon R, Calder LJ, Tolar P, Rosenthal PB. Cryomicroscopy reveals the structural basis for a flexible hinge motion in the immunoglobulin M pentamer. *Nat Commun*. 2022; 13(1): 6314.
 - 38) Soltys J, Liu Y, Ritchie A, Wemlinger S, Schaller K, Schumann H, et al. Membrane assembly of aquaporin-4 autoantibodies regulates classical complement activation in neuromyelitis optica. *J Clin Invest*. 2019; 129(5): 2000-13.
 - 39) Gupta M, Khandelwal NK, Nelson A, Hwang P, Pourmal S, Bennett JL, et al. Structural basis of aquaporin-4 autoantibody binding in neuromyelitis optica. *bioRxiv*. 2024.
 - 40) Cleary SJ, Seo Y, Tian JJ, Kwaan N, Bulkley DP, Bentlage AE, et al. IgG hexamers initiate complement-dependent acute lung injury. *J Clin Invest*. 2024; 134(11): e178351.
 - 41) 橋本翼, 横山武司, 田中良和. クライオ電子顕微鏡単粒子解析の実際、試料調製から画像解析

- まで. 日本結晶学会誌. 2021; 63: 89-96.
- 42) 柳澤春明, 吉川雅英. クライオ電子線トモグラフィ法の実際. 日本結晶学会誌. 2021; 63: 184-8.
- 43) Mortensen S, Kidmose RT, Petersen SV, Szilagyi A, Prohaszka Z, Andersen GR. Structural basis for the function of complement component C4 within the classical and lectin pathways of complement. *J Immunol.* 2015; 194(11): 5488-96.
- 44) 武田壮一, 宮田敏行. 立体構造から見る補体因子 C3、その活性化と制御機構. 補体. 2023; 60(2): 132-52.
- 45) Gaboriaud C, Frachet P, Thielens NM, Arlaud GJ. The human C1q globular domain: structure and recognition of non-immune self ligands. *Front Immunol.* 2012; 2: 92.