

学位論文題名

新しい血漿カリクレイン基質蛋白 PK-120の
精製と蛋白化学的性質に関する研究

学位論文内容の要旨

血漿カリクレインはセリンプロテアーゼに属し、キニノーゲンとよばれる血漿蛋白質を限定切断して、生理活性ペプチドのブラジギニンは血管透過性を亢進し、浮腫、疼痛などの炎症応答惹起をするところから、カリクレインは炎症反応を修飾するプロテアーゼとして注目されている。本研究で、キニノーゲン以外の新たな基質蛋白質がヒト血漿に存在することを発現し、PK-120と命名した。PK-120の精製法を確立すると共に、蛋白化学的な諸性質を明らかにした。また、ヒト以外にも、モルモット、ラットやマウスにPK-120が存在することを見いだすと共に、モルモットからPK-120を精製し、ヒトPK-120と蛋白化学的に相同性の高いことを明らかにした。

以下に、その主要な研究成果の概要を述べる。

1: ヒトPK-120の精製

ヒト血漿のQ-Sepharose溶出画分をカリクレインとインキュベートしたところ、カリクレイン感受性の120kDaの蛋白質が検出された。キニノーゲンは80kDaであるところから、これは未知のカリクレイン基質蛋白質であることがわかり、これをPK-120と命名した。このPK-120画分を種種のクロマトグラフィーを組み合わせることにより、精製PK-120を得た。PK-120に対する抗体を用いたELISA法から、血漿含量は80 μ g/ml、精製収率は8%と算出された。

2: PK-120のカリクレインによる限定分解様式

PK-120のカリクレイン処理により、100、70、30kDaの3フラグメントが生成した。その切断反応の経時的な解析から、PK-120が100kと30kの2フラグメントに切断され、ついで100kFから70kFが生成するという2段階の限定分解反応が進行することが明らかになった。100kFから70kFが生成する際に遊離すると思われる30kFは検出できなかったが、おそらくより低分子のフラグメントにまで切断されたものと考えられる。

3: PK-120の蛋白構造

アミノ酸組成分析では、紫外部に吸収極大を示すTrpとTyrの含量が極めて少ないこととCys残基が3モル/100アミノ酸残基と少ないことが明らかに

なった。PK-120は糖蛋白質であり、総含量は22%を占める。

エドマン分析法によるN-末端アミノ酸配列分析からPK-120は未知の蛋白質であることが構造的にも確認された。また、3フラグメントのN-末端配列分析から、100kと70kの2フラグメントはPK-120のN-末端側由来フラグメントであることがわかった。PK-120のプロテアーゼ消化物についてアミノ酸配列を解析し、それを元に作成した種種の合成ヌクレオチドをプライマーとして用いたPCR法により、ヒト肝臓のcDNAライブラリーからPK-120のcDNA遺伝子を分離した。その塩基配列から、PK-120は930アミノ酸残基からなるプレPK-120として生合成され、28アミノ酸残基のシグナル配列が切除され、902アミノ酸残基からなる成熟蛋白質として血液中に現れることがわかった。アミノ酸組成分析から予想されたように、システイン残基が3残基と最も少ないことが確認できた。

また、カリクレイン感受性部位(Phe-Arg-X)が3カ所存在することがわかり、カリクレインによる切断部位を確認することができた。すなわち、最初にArg(631)-Arg(632)結合が切断され、100kFと35kFが生成し、次いで100kFのArg(425)-Leu(426)結合が切断され、70kFが生成することが明らかになった。Leu(426)からC-末端のArg(630)までの200残基には塩基性アミノ酸が21残基と多い。おそらく、これら塩基性アミノ酸残基の数箇所がカリクレインにより切断され、多数の低分子フラグメントを生じるために、20-30kDa相当のフラグメントとして確認できなかったものと推定される。

その低分子フラグメントの一つと予想されるものに、ブラジキニンと同じC-末端アミノ酸配列(Pro-Phe-Arg)を示すものがあり、このペプチドがブラジキニンの様な生理活性を示す可能性が高いと考えられる。

PK-120構造についての相同性探索から(ITI)と呼ばれる血漿プロテアーゼインヒビターのH鎖と35%近い相同性を示すことがわかった。また、チオールプロテアーゼインヒビターの活性部位の配列も保存されていた。これらの結果はPK-120が生理活性ペプチドの前駆蛋白質とチオールプロテアーゼインヒビターとしても機能する多機能蛋白質である可能性を示唆する。

4: モルモットPK-120の精製と性質

他の動物種の血漿中にもPK-120が存在するかについて、ヒトPK-120に対する抗体を用いたwestern blot解析を行ったところ、モルモット、ラット、マウスにも120kの蛋白質が存在することが確認された。この免疫学的に交叉性の120k蛋白質がPK-120であることを証明するために、モルモット血漿から種種のクロマトグラフィーを組み合わせることにより120kDaの蛋白質を精製した。

この120k蛋白質のアミノ酸組成分析は芳香族アミノ酸に乏しいなど、特徴の性質はヒトPK-120と類似していた。さらに、N-末端アミノ酸配列も6残基中4残基が一致していた。これらの知見から、モルモットから精製した120k蛋白質がヒトPK-120に対応するものであることが確認できた。おそらく、ラットやマウスで観察された120k蛋白質もPK-120と予想され、

PK-120は種の進化の過程で保存された蛋白質であることが示唆される。

学位論文審査の要旨

主 査	教 授	長 澤 滋 治
副 査	教 授	横 澤 英 良
副 査	助教授	高 橋 和 彦
副 査	助教授	澤 田 均

学 位 論 文 題 名

新しい血漿カリクレイン基質蛋白 PK-120の 精製と蛋白化学的性質に関する研究

血漿カリクレインは蛋白分解酵素で、キニノゲンと呼ばれる血漿蛋白質からアミノ酸9残基からなる生理活性ペプチドのブラジキニンを遊離する。ブラジキニンは平滑筋収縮、血管透過性の亢進、疼痛などの生理活性を有することから、カリクレインは炎症を惹起するプロテアーゼとして注目されている。

申請者は、ヒト血漿にはキニノゲン以外にもカリクレインにより速やかに分解される蛋白質が存在することを見だし、その精製に成功した。この蛋白質の分子量が12万であることから、PK-120と命名するとともに、その蛋白質化学的な性質を解析した。さらに、PK-120に相当する蛋白質がマウス、モルモット、ラットにも存在することを明らかにし、モルモットからPK-120を精製するなど、価値ある研究成果を挙げた。

1) ヒト血漿からのPK-120の精製

ヒト血漿をポリエチレングリコールで分別沈殿し、カラムクロマトグラフィーを行ったとき、極めて不安定な分子量12万の蛋白質を見いだした。種々の阻害剤を用いた実験から、この不安定性は微量に混入しているカリクレインによる分解が原因と判明した。そこで、このカリクレイン感受性という特徴から、この蛋白質をPK-120と命名した。カリクレインとの

分離が困難なこともあってその精製が難航したが、種々のカラムクロマトグラフィーを組み合わせることにより、最終的に単一蛋白質として精製することに成功した。PK-120の血漿中の含量は80 $\mu\text{g/ml}$ であり、これはキニノゲンの血中含量とほぼ等しい。

2) カリクレインによるPK-120の限定分解様式

PK-120をカリクレイン消化すると、先ず分子量10万と3万の2フラグメントが生成し、ついで分子量10万のフラグメントから分子量7万のフラグメントが生成した。エドマン分解法によりN-末端アミノ酸配列を解析した結果、PK-120と分子量10万、7万のフラグメントのN-末端配列が同じことが分かった。これは、PK-120のカリクレインによる切断反応は、C-末端側の領域で起こっていることを意味している。また、このアミノ酸配列からPK-120は未知の蛋白質であることも分かった。

3) ヒトPK-120の蛋白質化学的性質

PK-120は重量比で約20%の糖を含む糖蛋白質である。そのアミノ酸組成での特徴は、チロシン、トリプトファン、システインが少ないことである。チロシン、トリプトファンが少ないことは、PK-120の紫外部での分子吸光係数が低いことを意味する。また、システイン含量は分子量12万当たりで3残基であり、PK-120には複数のS-S結合により架橋されたドメイン構造は存在しないことを示唆する。

部分ペプチドの配列をもとに合成したDNA断片をプライマーとして用いることにより、ヒト肝臓のcDNAライブラリーからPK-120のcDNAをクローニングし、その全塩基配列を解読した。その塩基配列から推定されたアミノ酸配列中には、カリクレイン感受性配列(Pro-Phe-Arg)が3カ所存在し、2)で推定されたカリクレインによる切断様式を支持した。

PK-120と相同性を示す唯一の蛋白質は、インター- α -トリプシンインヒビター(ITI)のH鎖で、PK-120のN-末端側と約40%の相同性を示した。

また、その配列中には、チオールプロテアーゼインヒビターの阻害活性部位の配列が存在しているが、インヒビター活性は示さなかった。

カリクレイン消化で生成するペプチド画分から、ブラジキンとC-末端

側3残基の配列が同じペプチド(アミノ酸27残基)が得られた。これは、PK-120からもカリクレインの作用で、ブラジキン様の生理活性を示すペプチドが遊離してくる可能性を示唆するものである。

4) 動物血漿中のPK-120の探索とモルモットPK-120の精製

ヒトPK-120に対する抗体を用いて、種々の動物の血漿についてPK-120を探索したところ、マウス、モルモット、ラット血漿にもPK-120様の蛋白質が存在することを見いだした。

ヒトPK-120の精製法を参考にしつつ、モルモット血漿からPK-120を精製した。そのアミノ酸組成、カリクレインによる切断様式、さらにはN-末端アミノ酸配列ではヒトPK-120と殆ど同じであり、PK-120は広く種を越えて存在する蛋白質であることが示された。

以上の研究成果は、新しい機能蛋白質を発見した点で価値あるばかりでなく、PK-120の生理機能に関する新しい研究を萌芽させたことでも価値あるものと言える。

以上、本研究の業績は博士(薬学)の学位に相応しい業績と評価できる。