
ミユタジェネシスによるキニノーゲン重鎖の
生理機能ドメイン解析

研究課題番号 (05670118)

平成6年度科学研究費補助金 (一般研究C) 研究成果報告書

平成7年3月

研究代表者 大久保 岩男
(滋賀医科大学教授)



はじめに

ヒト血漿中に存在する高分子及び低分子キニノーゲンは、システインプロテアーゼであるカテプシン B・H・L やカルパイン I・II、パパイン、フィシンに対する特異的インヒビター（シスタチン）である。両キニノーゲンのこれらのプロテアーゼに対する阻害機構は非共有結合・非競合阻害であることが知られている。また両キニノーゲンに共通の重鎖上に占めるドメイン 2 と 3 にプロテアーゼ活性に対する反応部位が存在する。その反応部位のアミノ酸配列は Gln-Val-Val-Ala-Gly (QVVAG) で表わされ、もう一つはこの配列より 4 残基アミノ末端側に存在する Glycine (Gly) を含む 2～3 残基のアミノ酸であると考えられている。また重鎖のアミノ末端側のドメイン 1 には EF-hand 様構造が有り、 Ca^{2+} や Mg^{2+} を結合する機能も有している。

本研究ではヒト低分子キニノーゲンの cDNA を用い、これに site directed mutagenesis の技法を使って、キニノーゲン重鎖上の各ドメイン、さらには EF-hand 様構造、QVVAG 配列や Glycine とその近傍のアミノ酸残基等に変異を加え、これらの変異低分子キニノーゲンを動物由来の培養細胞（BHK）や昆虫細胞（SF9 や 21）に発現させることを試みた。また、その培養メディウムに分泌されてくる変異低分子キニノーゲンを精製し、それらの有するシステインプロテアーゼインヒビター活性をパパインやカルパインを用いて解析し、眞の反応部位が何処にあるのかを明らかにすると共に、ドメイン 1 上の EF-hand 様構造の果たす役割を、特にカルパインとの関わりに於て明らかにしようとしたものである。

研究組織

研究代表者：大久保岩男（滋賀医科大学教授）

研究協力者：上山久雄（滋賀医科大学助教授）

” 高垣勝（滋賀医科大学助手）

” 落合由紀子（滋賀医科大学助手）

” 黄凱（滋賀医科大学大学院生）

研究経費

平成5年度	1,300千円
平成6年度	800千円
計	2,100千円

研究発表

(1) 学会誌等

A. 原書

1. Osamu Yasuhara, Kazumitsu Hanai, Iwao Ohkubo, Makoto Sasaki, Patrick L. McGeer, and Hiroshi Kimura.
"Expression of cystatin C in rat, monkey and human brains"
Brain Res 628, 85-92 (1993)
2. Keishi Maruo, Takaaki Akaike, Yuji Inada, Iwao Ohkubo, Tomomichi Ono, and Hiroshi Maeda.
"Effect of microbial and mite proteases on low and high molecular weight kininogens:
Generation of kinin and inactivation of thiol protease inhibitory activity"
J. Biol. Chem. 268, 17711-17715 (1993)
3. Hisao Ueyama, Deng Han-Xiang, and Iwao Ohkubo.
"Molecular cloning and chromosomal assignment of the gene for human Zn- α_2 -glycoprotein"
Biochemistry 32, 12968-12976 (1993)
4. Masaru Takagaki, Kouichi Honke, Taiji Tsukamoto, Shigeki Higashiyama, Naoyuki Taniguchi, Akira Makita and Iwao Ohkubo.
"Zn- α_2 -glycoprotein is a novel adhesive protein"
Biochem. Biophys. Res. Commun. 201(3):1339-1347 (1994)

5. Hisao Ueyama, Hiroyuki Naitoh, and Iwao Ohkubo.
"Structure and expression of rat and mouse mRNAs for
Zn- α_2 -glycoprotein"
J. Biochem. (Tokyo) 116:677-681 (1994)
6. Iwao Ohkubo, Kai Huang, Yukiko Ochiai, Masaru Takagaki,
and Kazutaka Kani.
"Dipeptidyl peptidase IV from porcine seminal plasma:
Purification, characterization and N-terminal amino acid sequence"
J. Biochem. (Tokyo) 116(5):1182-1186 (1994)
7. Yukiko Ochiai, Johji Inazawa, Hisao Ueyama and Iwao Ohkubo.
"Human gene for β -microseminoprotein: Its promoter structure and
chromosomal localization"
J. Biochem. (Tokyo) 117:346-352 (1995)
8. Ueyama, H., Inazawa, J., Nishino, H., Deng, H-X., Ochiai, Y., and
Ohkubo I.
"Chromosomal mapping of human smooth muscle actin gene
(enteric type, ACTTSG) to 2p13.1 and molecular nature of HindIII
polymorphism"
Genomics in press (1995)
9. Ohkubo, I., Tada, T., Ochiai, Y., Ueyama, H., Eimoto, T., and
Sasaki, M.,
"Human seminal plasma β -microseminoprotein: Its purification,
characterization, and immunohistochemical localization"
Int. J. Biochem. & Cell Biol. in press (1995)

10. Hisao Ueyama, Johji Inazawa, Takeshi Ariyama, Hoyoku Nishino, Yukiko Ochiai, Iwao Ohkubo, and Takeshi Miwa.
“Reexamination of chromosomal loci of human muscle actin genes by fluorescence in situ hybridization”
Jpn. J. Human Genet., in press (1995)

B. 総説・その他

1. 大久保 岩男

キーワード（用語解説）

- | | |
|--------------------|--------------------------------------|
| ① タンパク質 (Protein), | ② プロセッシング (Processing) |
| ③ タンパク質の構造 | ④ 分子量の測定 |
| ⑤ リソソーム (Lysosome) | ⑥ 筋ジストロフィー症
(Myotonic dystorophy) |
| ⑦ 20S | ⑧ タンパク質分解酵素
(プロテアーゼ; Protease) |
| ⑨ 細胞間マトリックス | ⑩ 細胞接着因子 |
| ⑪ 癌遺伝子 | ⑫ 糖鎖抗原 |

”タンパク質は変化する—癌・老化・糖尿病に挑戦する生命科学—”
クバプロ（東京） pp 22-28 (1993)

2. 大久保 岩男

”基礎医学とのダイアログ”

プロテアーゼ（タンパク分解酵素）

The lung perspectives 1, pp 64-68 (1993)

3. 佐々木 實, 国松 巳歳, 大久保 岩男.
”プロテアーゼと生体機能 —分子から病態まで—”
炎症とプロテアーゼ
現代化学 増刊22 pp257-264 (1993)
4. 大久保 岩男, 上山 久雄, 高垣 勝.
”Zn- α_2 -glycoprotein の分子構造と新規生理機能”
Minophagen Medical Review 39(6) 印刷中(1994)

(2) 口頭発表

1. 大久保岩男, 上山 久雄
”現代医学のトピックス —遺伝子に迫る医学—”
第5回滋賀医科大学公開講座 (1993.7.17)
2. 大久保岩男, 黄凱, 落合由紀子.
”ブタ精漿の dipeptidyl aminopeptidase IV”
第66回日本生化学会大会(東京) (1993)10.1~4
3. 上山久雄, 大久保岩男.
”ヒト, ラット, マウス Zn- α_2 -glycoprotein cDNA の単離とその比較”
第66回日本生化学会大会(東京) (1993)10.1~4
4. 丹羽保晴, 奥村祐司, 二木史朗, 黄 凱, 大久保岩男, 木戸博.
”Tryptase TL₂ と CD26 による HIV-1 gp120 の V₃ 領域の開裂部位
の解析”
第67回日本生化学会大会(大阪) (1994)9.7~10

5. 高垣勝, 大久保岩男.
”細胞接着性タンパク質としての Zn- α_2 -glycoprotein の機能”
第67回日本生化学会大会 (大阪) (1994)9.7~10
6. 上山久雄, 内藤弘之, 落合由紀子, 大久保岩男.
”Zn- α_2 -glycoprotein 遺伝子の発現と転写調節”
第67回日本生化学会大会 (大阪) (1994)9.7~10
7. 落合由紀子, 上山久雄, 大久保岩男
”ヒト β -microseminoprotein 遺伝子の構造と転写調節”
第67回日本生化学会大会 (大阪) (1994)9.7~10
8. 黄 凱, 高垣勝, 大久保岩男.
”ブタ精漿の dipeptidyl peptidase II”
第67回日本生化学会大会 (大阪) (1994)9.7~10
9. Niwa Y, Ohkubo I, and Kido H.
”Possible cooperativity of tryptase TL₂ and CD26 on proteolytic cleavage of V3 loop of HIV-1 gp120”
Tenth International Conference on AIDS (Yokohama) (1994)8.7~12
10. Oka S, Ida S, Hirabayashi Y, Nokiara K, Shioda T, Nagai Y, Kimura S, Shimada K, Ohkubo I, Niwa Y, and Kido H.
”Different action of tryptase TL₂ on two varieties of HIV-1 V3 loop which was naturally occurred on one amino acid substitution”
Tenth International Conference on AIDS (Yokohama) (1994)8.7~12
11. 高垣勝, 上山久雄, 大久保岩男.
”Zn- α_2 glycoprotein の生理機能
—腎癌細胞との接着機能について—
第11回滋賀医大シンポジウム (1994)10.25

12. Ohkubo I, Huang K, Takagaki M.
"Dipeptidyl peptidases II and IV (DPP II and IV) in porcine seminal plasma"
The 10th International Conference Intracellular Protein Catabolism (Tokyo) (1994)10.30~11.3

13. Niwa Y, Ohkubo I, Yano M, and Kido H.
"Proteolytic cleavage sites of the V3 loop of HIV-1 gp120 by tryptase TL₂ and/or CD26"
The 10th International Conference Intracellular Protein Catabolism (Tokyo) (1994)10.30~11.3

(3) 出版物

1. 大久保岩男.
" システインプロテアーゼインヒビター"
プロテアーゼとそのインヒビター
—生理的意義および病態との関連—
早石修監修, Medical view 社, 東京 pp 104-116 (1993)

2. Makoto Sasaki, and Iwao Ohkubo.
"Molecular recognition of proteases associated with cascade reactions"
(eds by Nobuhiko Katunuma, Kouichi Suzuki, James Travis, and Hans Fritz)
Biological Functions of Proteases and Inhibitors pp61-71 (1994)

3. 大久保岩男, 上山久雄.

” Zn- α_2 -glycoprotein”

5 卷 血漿タンパク質,

タンパク質化学

長澤滋治編集 (印刷中), 広川書店 (東京)

4. 山田光子, 池原議, 種子島章男, 牛山郁子, 山本好男, 西克治, 上山久雄,
落合由紀子, 大久保岩男, 兼正晃.

“DNA 試料を用いての種差識別

— ABO 式血液型関連糖転移酵素遺伝子について —

DNA 多型 vol.3 東洋書店 DNA 多型研究会編 (1995)

研究成果

平成5年度と6年度の研究において、以下の研究成果が得られた。

【1】低分子キニノーゲン重鎖上の QVVAG 配列が欠損したタンパク質をコードする cDNA の作製:

ドメイン2およびドメイン3に存在する QVVAG 配列が欠損した cDNA を作製するために ① 合成ミスマッチプライマー (mismatch primer) による site-directed mutagenesis および ② PCR mutagenesis で、変異を導入することを試みた。① では導入する変異に応じたオリゴヌクレオチドを合成し、これをプライマー (mismatch primer) として、一本鎖に調製した鋳型 DNA とアニーリングさせ、DNA ポリメラーゼで修復合成させた。② では①と同様にして合成したオリゴヌクレオチドを PCR プライマーとして用い、PCR による増幅機構により、目的の変異を含む DNA フラグメントを得ようと考えた。しかしながら、変異を導入する隣接部位のヌクレオチド配列に AT 含量が多いこともあり、DNA シークエンスで確認すると完全に QVVAG 配列が欠損したタンパク質をコードする cDNA は得られていないが、現在プライマーを新しいものに変えて検討しているところである。

【2】Wild type 及び変異低分子キニノーゲンの昆虫細胞での発現:

平成2～3年度の研究において、私共は BHK 細胞で低分子キニノーゲンの発現を試みたが、培養上清に分泌されてくる量が非常に少なく、約50ng/mlであった。そこで、平成5年度から、目的遺伝子産物を大量にしかも生物学的特性を保持したままで発現できることで、近年富に注目されているバキュロウイルス発現系の利用を試みた。まず組み換えウイルスを作製するために、①～③の順に実験を行った。① 開始コドンを含んだ低分子キニノーゲン遺伝子をプロモーターと同方向にトランスファーベクター (pVL1392/1393) の EcoRI 制限酵素切断部位に挿入する。② 作製されたトランスファーベクターをウイルス DNA とともに夜蛾の幼虫由来株化細胞 (Spodoptera frugiperda cell; Sf 細胞) ヘリン酸カルシウム法にて co-transfect する。

③ 顕微鏡下で細胞核内多角体の存在の有無を確かめ、培養上清からプラークアッセイにより組み換えウイルスを選択する。この③の段階で、いくつかの組み換えウイルスのプラークが確認されたので、さらにプラークアッセイを繰り返した後、しだいにスケールアップして、ウイルスを増やし、高い感染価のストックウイルスを調製した。この組み換えウイルスを Sf 細胞に感染させタンパク質の発現を試みた。しかし、遺伝子産物発現の確認はウエスタンブロット法にてウサギ抗ヒト低分子キニノーゲン抗体で検出したが、目的のタンパク質の発現は確認できなかった。本実験系でのトランスファベクターへの遺伝子導入は、ベクターの制限酵素処理等により確実に行われていることは確認されているので、co-transfect 以降の過程、つまり Transfection の効率、昆虫細胞の維持継代やプラークアッセイに問題があったと考えており、さらにこれらについて検討を加えているところである。

【3】野生型 (Wild type) 及び変異低分子キニノーゲンの大腸菌での発現:

私共はバキュロウイルス系以外でのタンパク質発現法として大腸菌も利用した。大腸菌は増殖が早く手軽に扱え、大量培養が容易でしかも増産の程度が高いため、迅速でなおかつ安価に目的の遺伝子産物を発現・精製することができるなどの理由により頻繁に使用されている遺伝子産物発現系である。平成6年度はマルチクロニング部位の上流に強力なプロモーター (trc)、を持つ pTrc99 A Expression Vector の Nco I 制限酵素切断部位に遺伝子を挿入し、直接発現させることを試みた。現在、発現の誘導条件を変えて、大量発現の条件を求めているところである。