
ミュータジェネシスによるキニノーゲンのシステインプロテアーゼ
に対する反応部位の解析

研究課題番号 (02670114)

平成2年度科学研究費補助金 一般研究 (C)
研究成果報告書

平成4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

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、フィシン等に対する非常に強いインヒビターである。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・非競合阻害である事が知られている。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に反応部位が存在すると考えられている。その反応部位のアミノ酸配列はGln-Val-Val-Ala-Gly(QVVAG)で表され、もう一つはこの配列より約44残基N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推定されている。

本研究ではヒト低分子キニノーゲンに対する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ドメイン2や3、更にQVVAG領域の欠損した、またこのQVVAGやGlyとその近傍のアミノ酸残基を他のアミノ酸残基に置換した低分子キニノーゲンを真核細胞に発現させる。その培養メディウムに分泌されてくる新たな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(シスタチン)としての活性が如何に変化するかを明らかにし、キニノーゲンのシスタチンとしての真の反応部位がどこにあるのかの解析を試みた。

滋賀医科大学附属図書館



1990026970

研究組織

研究代表者：大久保岩男（滋賀医科大学教授）

研究経費

平成2年度	1,300千円
平成3年度	1,000千円
計	2,300千円

研究発表

(1) 学会雑誌等

1. Ohkubo, I., Niwa, M., Takashima, A., Nishikimi, N., Gasa, S. and Sasaki, M.: Human seminal plasma Zn- α_2 -glycoprotein. Its purification and properties as compared with human plasma Zn- α_2 -glycoprotein. *Biochim. Biophys. Acta* 1034:152-156 (1990).
2. Ohkubo, I., Namikawa, C. and Sasaki, M.: Purification and characterization of multicatalytic proteinase from human erythrocytes. *Nagoya Medical J.* 34: 199-213 (1990).
3. Ohkubo, I., Gasa, S., Namikawa, C., Makita, A. and Sasaki, M.: Human erythrocyte multicatalytic proteinase: Activation and binding to sulfated galacto- and lactosylceramides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 174: 1133-1140 (1991).
4. Ueyama, H., Niwa, M., Tada, T., Sasaki, M. and Ohkubo, I.: Cloning and nucleotide sequence of a human Zn- α_2 -glycoprotein cDNA and chromosomal assignment of its gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 177: 696-703 (1991).
5. Tada, T., Ohkubo, I., Niwa, M., Sasaki, M., Tateyama, H. and Eimoto, T.: Immunohistochemical localization of Zn- α_2 -glycoprotein in normal human tissues. *J. Histochem. Cytochem.* 39:1221-1226 (1991).
6. Sasaki, M., Kunimatsu, M. and Ohkubo, I.: Calpain and kininogen mediated inflammation. *Biomed. Biochem. Acta* 50: 499-508 (1991)
7. Asakura, S., Hurly, R.W., Skorstengaard, K., Ohkubo, I. and Mosher D.F.: Inhibition of cell adhesion by high molecular weight kininogen. *J. Cell Biol.* 116: 465-476 (1992).
8. 丹羽正明、大久保岩男、錦見直子、草田潤一、三山隆司、溝上雅史、佐々木實：各種体液中のZn- α_2 -glycoprotein. *医学のあゆみ* 152: 117-118 (1990).

9. 溝上雅史、大久保岩男：各種肝疾患におけるcystatin Cの臨床的意義. *Minophagen Medical Review* 35:431-437(1990).
10. 佐々木實、大久保岩男：血漿蛋白質の構造と機能 カスケード系蛋白質の分子認識(1). *病態生理* 9: 756-763 (1990).
11. 佐々木實、大久保岩男：血漿蛋白質の構造と機能 カスケード系蛋白質の分子認識(2). *病態生理* 9: 833-840 (1990).

(2) 口頭発表

1. 大久保岩男、並河千里、佐藤起代江、佐々木實、賀佐伸省、牧田章 Sulfated glycolipidによる高分子量多機能プロテアーゼの活性化 第63回日本生化学会大会、1990.
2. 並河千里、大久保岩男、呉蓉蓉、村瀬紀代美、佐藤起代江、多田豊曠、佐々木實、千谷晃一 ヒト精漿中の β -inhibinについて 第63回 日本生化学会大会、1990.
3. 錦見直子、青木耕治、中谷剛琳、八神喜昭、多田豊曠、大久保岩男、佐々木實 Calphobindin-Iの精製と免疫組織学的局在の検討 第13回日本血栓止血学会、1990.
4. 多田豊曠、立山 尚、大久保岩男、丹羽正昭、佐々木實、栄本忠昭 Zn- α_2 -glycoproteinの人体組織における免疫組織化学的分布 第80回日本病理学会総会、1991.
5. 佐藤起代江、大久保岩男、呉蓉蓉、国松巳歳、佐々木實 ブタ精漿中alkaline phosphataseの精製とその諸性質 第64回日本生化学会大会、1991.
6. 並河千里、大久保岩男、佐藤起代江、佐々木實 シスタチンスーパーファミリー蛋白質によるmulticatalytic proteinaseの制御 第64回日本生化学会大会、1991.
7. 大久保岩男、佐藤起代江、加藤郁之進、村地孝、佐々木實 カルパスタチンによるmulticatalytic proteinase活性の制御 第64回日本生化学会大会、1991.
8. 呉蓉蓉、大久保岩男、佐藤起代江、並河千里、佐々木實 ヒト精漿中の β -inhibinの精製とそのモノクローナル抗体の作製 第64回日本生化学会大会、1991.

9. 丸尾圭志、赤地孝章、小野友道、上西秀則、河本尚一、稲田祐二、大久保岩男、前田 浩 微生物および家ダニによる低分子キニノーゲンからのキニンの生成について 第64回日本生化学会大会、1991.
10. 上山久雄、佐々木實、大久保岩男 Zn- α_2 -glycoprotein遺伝子の単離とその構造 第64回日本生化学会大会、1991.
11. 大久保岩男、並河千里、佐藤起代江、佐々木實、賀佐伸省、牧田章 第33回日本脂質生化学会研究会、1991.
12. 大久保岩男、丹羽正明、多田豊曠、佐々木實 ヒト血漿および精漿のZn α_2 -glycoproteinの生化学的特性 ” タンパク質の翻訳後修飾と細胞生化学的意義” 大阪大学蛋白質研究所セミナー、1990.
13. 大久保岩男、錦見直子、小笠原真弓、青木耕治、中谷剛琳、多田豊曠、佐々木實、八神喜昭 Calphobindin-Iの精製と免疫組織学的局在 第5回東海凝固線溶セミナー、1991.
14. Ohno, H., Kayashima, S., Nagata, N., Kawaguchi, T., Ishikawa, M., Sato, U., Ohkubo, I., Iwabuchi, A., Kondo, Y., Yamashita, H., Segawa, M. and Taniguchi, N. Changes in manganese-superoxide dismutase concentration in human serum/plasma after physical exercise as judged by ELISA The 8th International Biochemistry of Exercise Conference , Nagoya, Japan, 1991.
15. Nishikimi, N., Hayashi, Y., Aoki, K., Ohkubo, I. and Yagami, Y. Anti-calphobindin-I auto-antibody in patients with recurrent abortions The 11th Annual Meeting of American Society for the Immunology of Reproduction, 1991.

(3) 出版物

1. Ohkubo, I., Ueyama, H., Niwa, M., Tada, T., Eimoto, T. and Sasaki, M.: Post-translational modification of Zn- α_2 -glycoprotein from human seminal plasma. "The post-translational modification of proteins". pp 139-153, Japan Scientific Societies Press, Tokyo, 1992.
2. 大久保岩男 17章 血液凝固・線溶系のマーカー "バイオサイエンス戦略マニュアル、新しい素材とマーカー・プローブ" pp 411-412, 共立出版、1990.

研究成果

平成2年度及び3年度の研究において、得られた研究成果は以下の通りである。

【1】低分子キニノーゲン重鎖上のドメイン2,3及びQVVAG領域の欠損蛋白質の作製: ドメイン2,3及びQVVAG領域を欠損させる為に必要なアミノ酸配列から、それぞれ20 mer のオリゴヌクレオチドを合成し、two-primer 法で欠損蛋白質の作製を試みた。その結果、QVVAG領域欠損蛋白質をコードするcDNAの作製は成功しなかったが、以後の発現実験の結果からドメイン2と3の欠損するcDNAの作製は完了することが出来た。出来上がったこれらの変異cDNAと欠損のないwild type cDNAを発現ベクターであるPMSGに組み込み、リン酸カルシウム法で真核細胞であるCHO, Hela及びBHK細胞へのトランスフェクションを行つたが、BHK細胞へのトランスフェクションのみが有効であつた。

【2】Wild type及び変異低分子キニノーゲンの発現: 低分子キニノーゲンに対するポリクローナル及びモノクローナル抗体を用いるELISA法で、これらの低分子キニノーゲンの単位メディウム当たりの発現量を測定すると、それらの発現量は極く微量(～50 ng/ml)であつた。また、発現したこれらの蛋白質はシステインプロテアーゼインヒビターとしての活性を全て有していた。

【3】Wild type及び変異低分子キニノーゲンの精製: 発現ベクターを移入したBHK細胞の培養には、FCSの含有されていないバイオリッチ1を用いた。この培養メディウムを集める際にはデキサメサゾンで発現蛋白質の誘導を行なつた。その結果、それぞれ約5Lの培養メディウムを集めることが出来た。次いで、これらの蛋白質を、硫酸分画、Red-Sepharose, Mono Q 等のカラムクロマトグラフィーを用いて精製した。Wild type及びドメイン2と3の欠損した変異低分子キニノーゲンは、最終的にそれぞれ約3 μ g精製された。精製されたこれらの蛋白質のシステインプロテアーゼインヒビターとしての活性は、ヒトの血漿から精製された低分子キニノーゲンと比較すると、ほぼ理論的な値であつた。また、これらの発現蛋白質の分子量等も予測されていたものに、ほぼ一致していた。現在、培養メディウムを大量に集めると共に、より効果的な精製法を工夫しているところであり、更にキネティクスを含む生化学的な諸性質の解析を行なう予定である。