九州大学学術情報リポジトリ
Kyushu University Institutional Repository

Studies on the Molecular Mechanism for Autocatalytic Activation of a Lipopolysaccharide-responsive Protease Zymogen

小林, 雄毅

https://doi.org/10.15017/1500524

出版情報：九州大学, 2014, 博士（理学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：全文ファイル公表済

（様式６－２）

氏　　名	小林　雄毅
論　文　名	Studies on the Molecular Mechanism for Autocatalytic Activation of a Lipopolysaccharide-responsive Protease Zymogen （リポ多糖反応性プロテアーゼ前駆体の自己触媒的活性化の分子機構の研究）
論文調査委員	主　査　　九州大学　教授　　川畑　俊一郎 副　査　　九州大学　教授　　石原　健 副　査　　九州大学　教授　　下東　康幸（理学府） 副　査　　九州大学　准教授　　小柴　琢己

論　文　審　査　の　結　果　の　要　旨

カブトガニの体液は、グラム陰性細菌の表層成分であるリポ多糖に敏感に反応して凝固する。この反応は顆粒細胞がリポ多糖を認識することにより脱顆粒し、体液凝固因子を体液中に放出することによって開始される。放出された体液凝固因子のうち、リポ多糖感受性セリンプロテアーゼ前駆体である factor C がリポ多糖を認識することで自己触媒的に活性化し、体液凝固カスケード反応を引き起こし、最終的にコアギュリンが産生され体液凝固へと至る。しかし、factor C のリポ多糖のミセル表面での自己触媒的活性化の分子機構は不明なままであった。本研究では、factor C の自己触媒的活性化の分子メカニズムを解明するため、哺乳細胞を用いて多くの組換え体を調製し、それらの機能解析を行うことで、自己触媒的活性化に factor C のアミノ末端残基が必須であること明らかにした。

HEK293S 細胞を用いて、約 10 mg/L の組換え factor C を得ることに成功した。しかし、得られた組換え体には、N 末端に発現プラスミド由来のアミノ酸配列 Glu-Thr-Gly が付加されており、リポ多糖認識によって自己触媒的に活性化しなかった。そこで、カブトガニ factor C の分泌シグナル配列を用いることにより、N 末端にアミノ酸配列が付加されていない野生型組換え体を調製した。その結果、野生型組換え体はリポ多糖によって自己触媒的に活性化した。さらに、N 末端の付加変異体、欠損変異体、および置換変異体を調製し、リポ多糖による自己触媒的活性化を解析した。その結果、N 末端 Arg を Lys に置換した変異体以外、リポ多糖による自己触媒的活性化は見られなかった。一方、表面プラズモン共鳴センサーを用いて、リポ多糖に対する結合親和性の解析をしたところ、自己触媒的活性化能力を失っている置換組換え体であっても、野生型組換え体と同等のリポ多糖結合親和性を示した。したがって、factor C のリポ多糖結合活性は、自己触媒的活性化には必要であるが十分ではないことが判明した。また、N 末端の Arg 残基とリポ多糖結合部位（36～38 残基目）との長さのことなる置換体を調製し、自己触媒的活性化を解析した結果、N 末端 Arg とリポ多糖結合部位の距離が自己触媒的活性化に重要であることも明らかとなった。

次に、化学架橋剤を用いた架橋実験を行ったところ、リポ多糖の濃度依存的に野生型 factor C の架橋体形成が確認された。このリポ多糖濃度依存的な架橋体の形成は、リポ多糖濃度依存的な最適ピークが存在し、factor C の活性化におけるリポ多糖濃度依存的な最適ピークと一致した。

一方、N 末端置換体は Lys 置換体を除いて、野生型組換え体にくらべて、架橋体形成の減少が確認された。さらに、界面活性剤 Triton X-100 が限界ミセル濃度以上において、野生型組換え factor C の自己触媒的活性化を著しく阻害することも判明した。

以上の結果は、セリンプロテアーゼ前駆体のリポ多糖による自己触媒的活性化の分子機構を初めて示した研究であり、生化学の分野において価値ある業績であると認められる。よって、本研究者は博士（理学）の学位を受ける資格があるものと認める。