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

KYUSHU UNIVERSITY

（様式３）

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)

区　　分　：甲

論　文　内　容　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、凝固することが分かっている。この反応は、カブトガニの血球の 99% 以上を占める顆粒細胞がリポ多糖を認識することにより脱顆粒し、体液凝固因子を含むさまざまな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 (参考図１)。また、当研究室の有木らにより、factor C は体液凝固カスケードの開始因子としてだけでなく、顆粒細胞のリポ多糖受容体として機能し、脱顆粒反応を開始させ、一方では、グラム陰性細菌に対する補体系の活性化において重要な役割を担っていることが判明している。しかし、factor C がリポ多糖を認識することでどのようにして自己触媒的に活性化しているか、その詳しい分子メカニズム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、哺乳細胞を用いた組換え factor C を作製し、その機能解析を行った。

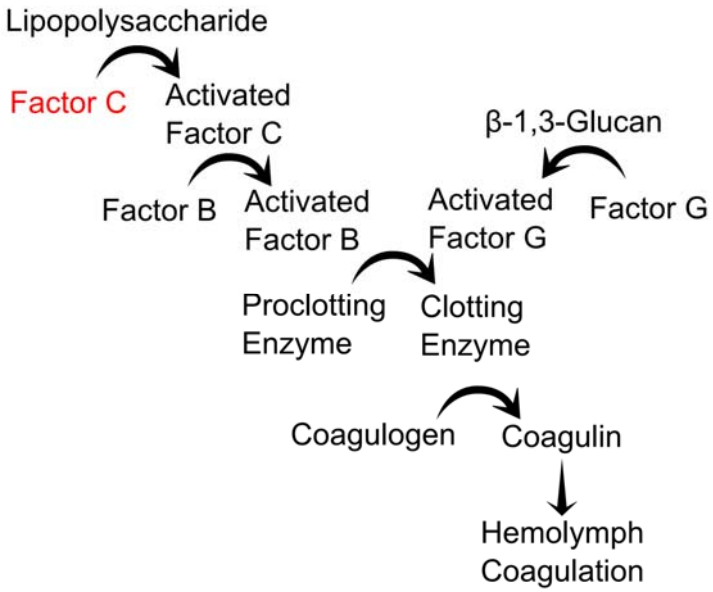
N-acetylgulcosaminyltransferase I 欠損株 HEK293S 細胞を用いて、組換え factor C の分泌発現を行ったところ、約 10 mg/L と十分な量の発現に成功した。しかし、得られた組換え factor C は、N 末端に発現プラスミド由来のアミノ酸配列 Glu-Thr-Gly が付加されており、リポ多糖認識によって自己触媒的に活性化しなかった。そこで、カブトガニ factor C の分泌シグナル配列を用いることにより、N 末端に余分なアミノ酸配列が付加されていない野生型組換え factor C を作製したところ、リポ多糖によって自己触媒的に活性化した。この活性化には、リポ多糖濃度依存的な最適ピークが存在し、天然の factor C においても同様の性質が確認されている。このことから、 factor C の自己触媒的活性化には、N 末端の配列構造が大きく影響することが示唆された。また、天然の factor C と同等の活性を示す哺乳細胞による組換え factor C の作製は、本研究が初となった。

N 末端の配列構造の重要性を調べるため、N 末端にアミノ酸を付加した変異体、N 末端のアミノ酸配列を欠損させた変異体、および一番目の Arg 残基を別のアミノ酸に置換した変異体をそれぞれ作製した。すると、一番目の Arg を Lys に置換した変異体以外、リポ多糖認識によって自己触媒的に活性化しなかった。しかし、表面プラズモン共鳴によるリポ多糖と一番目の Arg を置換した変異体の親和性の解析をしたところ、すべての変異体が野生型組換え factor C とほぼ同等の親和性を示した。したがって、リポ多糖結合活性は factor C の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明らかとなった。

次に、架橋剤を用いた架橋体形成実験を行ったところ、リポ多糖の濃度依存的に野生型組換え 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、一番目の Arg を置換した変異体では、野生型組換え factor C にくらべて、架橋剤による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。

以上のことから、factor C の N 末端の Arg 残基がリポ多糖を足場とした factor C 分子同士の相互作用において重要であることが明らかとなった。



参考図１：カブトガニ体液凝固カスケード