

Studies on the molecular mechanism of the
cascade reaction of the three protease zymogens
proC, proB, and proCE in the hemolymph
coagulation system of horseshoe crabs using
their recombinant proteins

山下, 啓介

<https://hdl.handle.net/2324/6787440>

出版情報 : Kyushu University, 2022, 博士 (理学) , 課程博士
バージョン :
権利関係 :



氏 名	山下 啓介			
論 文 名	Studies on the molecular mechanism of the cascade reaction of the three protease zymogens proC, proB, and proCE in the hemolymph coagulation system of horseshoe crabs using their recombinant proteins (カブトガニ体液凝固系における 3 種のプロテアーゼ前駆体 ProC, ProB, ProCE の組換えタンパク質を用いたカスケード反応の分子機構に関する研究)			
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	高橋 達郎

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

カブトガニ体液凝固カスケードは、セリンプロテアーゼ前駆体である Prochelicrase C (ProC)、Prochelicrase B (proB)、Proclotting enzyme (ProCE)、Prochelicrase G (ProG) で構成されている。ProC は リポ多糖(lipopolysaccharide; LPS) を認識することで自己触媒的に活性化し、 α -Chelicrase C となり、ProB を chelicrase B へと活性化する。Chelicrase B は、さらに、ProCE を Clotting enzyme (CE) へと活性化し、最終的に、CE が、凝固タンパク質であるコアギュローゲン (Coagulogen) をコアギュリン (Coagulin) に変換することで不溶性のポリマーゲルが形成される。一方で、ProG は、 β -1,3-D-グルカンを経験することで自己触媒的に活性化し、Chelicrase G となり、ProCE を CE へと活性化する(図参照)。本研究では、ProC、ProB、ProCE の野生型や変異体の組換えタンパク質を哺乳類細胞 (HEK293 GnT1⁻細胞) により調製し、プロテアーゼカスケードを再構築して、各因子が担う役割について Part 1、Part 2、Part 3 の 3 章に分けて機能解析を行った。

【Part 1: ProB と ProCE に存在する Clip ドメインの役割の解明】

ProB と ProCE は、それぞれ N 末端に Clip ドメインを有している。Clip ドメインは 3 個の特徴的なジスルフィド結合を有するドメインとして ProCE に初めて見出されたドメインである。ProC と同様に LPS と結合する ProB においては、その Clip ドメインが LPS 結合能を有していることが先行研究により示されていた。そこで、ProB、および ProCE の Clip ドメインのアミノ酸残基の置換体を用いた解析を行った。その結果、ProB においては、Clip ドメインに含まれる 5 個の塩基性アミノ酸が LPS との相互作用や α -Chelicrase C による ProB の活性化に重要であることが判明した。さらに、ProB の Clip ドメインの疎水性ポケットに存在するアミノ酸残基の置換変異体 (V55A-ProB) の LPS 結合能は失われ、 α -Chelicrase C による活性化の効率も野生型と比較して大きく減少した。一方、ProCE には LPS 結合能はないが、その Clip ドメインの置換変異体 (V53A-ProCE) は、Chelicrase B による活性化の効率が野生型と比較して大きく減少した。また、野生型 Chelicrase B (酵素) と V53A-ProCE (基質) 間の k_{cat}/K_m 値を算出したところ、野生型 Chelicrase B (酵素) と野生型 ProCE (基質) 間の k_{cat}/K_m 値と比較して約 7 倍減少した。一方では、活性型の V55A-Chelicrase B と V53A-CE のそれぞれ特異的な合成ペプチド基質に対するアミダーゼ活性は野生型の Chelicrase B と CE の活性と比較して差は見られなかった。

【Part 2: ProB の進化的に失われたヒスチジンループの意義の解明】

セリンプロテアーゼの触媒ポケット周辺には、ヒスチジンループ (His-loop disulfide bridge; HLDS)、メチオニンループ、セリンループが保存されている。ProB においては、HLDS を構成する Cys が Ala に置換され、HLDS が進化的に欠損している。失われた HLDS の意義を解明する目的で、ProB の HLDS を復元した変異体 (ProB-murasame と命名) を調製し、反応速度論解析を行った。活性化型の Chelicerase B-murasame は、野生型 Chelicerase B と比較して、天然のタンパク質基質である ProCE に対して k_{cat}/K_m 値が約 8.5 倍上昇し、熱安定性も格段に向上した。凝固カスケードのスクランベジャーである 3 種のセルピン (serine protease inhibitor; Serpin) (Serpins-1, -2, -3) に対して、野生型 Chelicerase B は阻害されなかったが、Chelicerase B-murasame は Serpin-2 により阻害された。

【Part 3: Ca^{2+} のカプトガニ体液凝固カスケードに与える影響の解明】

Ca^{2+} は哺乳類の血液凝固カスケード反応においては必須の因子であるが、カプトガニの凝固系における Ca^{2+} の影響はこれまで解析されていなかった。野生型の ProC、ProB、ProCE の組換えタンパク質からなる再構成系を調べたところ、 Ca^{2+} の添加によってカスケード反応が促進されることが判明した。さらに、凝固カスケードの各反応ステージに対して、 Ca^{2+} が影響するかを調べるために、ProC が自己触媒的に活性化する反応 (Stage 1)、 α -Chelicerase C が ProB を活性化する反応 (Stage 2)、Chelicerase B が ProCE を活性化する反応 (Stage 3) に分割して解析した (図 1 参照)。その結果、Stage 2 において、活性化が促進することが判明した。一方、 Ca^{2+} は、3 種の活性化型凝固因子の合成ペプチド基質に対するアミダーゼ活性には影響しなかった。さらに、 Ca^{2+} が凝固因子や LPS と直接に相互作用するかを調べるために、等温滴定型カロリメトリー (isothermal titration calorimetry; ITC) を行った。その結果、 Ca^{2+} は、LPS と発熱反応を伴い結合したが、3 種の凝固因子前駆体の組換えタンパク質に対しては結合しなかった。以上の結果から、LPS は Ca^{2+} と結合することで、さらに効果的な反応の足場として ProC と ProB の相互作用、及び凝固カスケードの連鎖反応を促進していることが示唆された。

以上の結果は、比較免疫学の分野において、プロテアーゼカスケード反応について重要な知見を得たものとして価値ある業績であり、博士 (理学) の学位に値するものと認める。

