

Title	ウシのキニノーゲン- II の構造と活性
Author(s)	加藤, 久雄
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/29625
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

【 7 】

氏名・(本籍)	加 藤 久 雄 か とう ひさ お
学位の種類	理 学 博 士
学位記番号	第 1 3 4 9 号
学位授与の日付	昭 和 4 3 年 3 月 2 8 日
学位授与の要件	理学研究科生物化学専攻 学位規則第5条第1項該当
学位論文名	ウシのキニノーゲンⅡの構造と活性
論文審査委員	(主査) 教授 鈴木 友二 (副査) 教授 須田 正巳 教授 成田 耕造

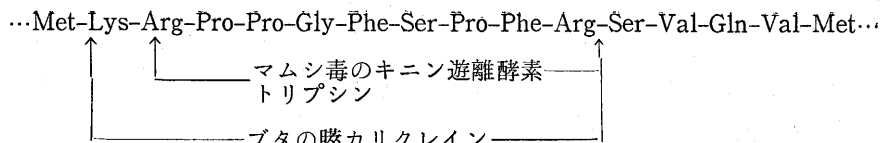
論 文 内 容 の 要 旨

ブラディキニンやカリジンなどの生理活性ペプチドは、血中では、その前駆体であるキニノーゲンとして存在し、キニン遊離酵素の作用により、キニノーゲンから遊離される。鈴木らは、ウシ血漿より、キニノーゲンⅡを精製し、それが分子量約50,000の酸性糖蛋白質であることを明らかにしてきたが、著者はウシ血中でのキニン遊離機構の研究のひとつとして、キニノーゲンⅡの構造を明らかにしつつ、キニン遊離酵素によるキニノーゲンⅡの特異的水解の機構について研究を行なった。

キニノーゲンⅡの gross-structure

キニノーゲンⅡ中には遊離の-SH基はなく、 β -メルカプトエタノールで還元したキニノーゲンⅡ中には12~14個の-SH基が定量された。また還元後カルボキシメチル化したキニノーゲンⅡ(RCM-Kininogen-II)の沈降係数はもとのキニノーゲンと変わらず、キニノーゲンⅡは一本鎖のポリペプチドからなっていることがわかった。一方 RCM-Kininogen-II にキニン遊離酵素を作用させた、キニンを遊離した残りの蛋白質は、ゲル滲過、イオン交換クロマトグラフィー、超遠心分析などの結果から、ほとんど同じ大きさではあるが、糖含量の異なる2つのフラグメントからなっていることが明らかになった。これらの結果ならびに、長沢らによる末端基分析などの研究から、キニノーゲンⅡはセリンをN末端、ロイシンをC末端とし、6~7個の-S-S-結合で架橋された一本鎖のポリペプチドからなり、キニン部分はそのほぼ中央に位置していることが明らかとなった。

つぎにキニノーゲンⅡ中のキニン周辺の構造を明らかにする目的で、ブロムシアンでキニノーゲンⅡ中のメチオニン残基を特異的に水解し、キニン部分を含むペプチドを分離した。その構造は、カリジンのC末端側に Ser-Val-Gln-Val-Homoser の附加した15のアミノ酸残基からなるペプチドであった。これらの結果から、キニノーゲンⅡ中のキニン周辺の構造および、キニン遊離酵素の水分解箇所はつぎのように推定した。



一方キノーゲン-Ⅱの高次構造については、紫外部旋光分散や円偏光二色性などの結果から、 α -ヘリックス含量が少なく、恐らく β -構造からなっているものと思われた。また、その物理化学的性質は、既知の血中の糖蛋白質とかなり類似し、粘度、偏比容、摩擦比が大きく、また低い等電点をもっていた。

キニン遊離酵素の基質特異性とキノーゲンの構造との関係

上述したように、トリプシンと蛇毒のキニン遊離酵素は、キノーゲン-Ⅱ中の Lys-Arg 結合と Arg-Ser 結合を水解してブラディキニンを遊離する。またブタの腓カリクレインは Met-Lys 結合と Arg-Ser 結合を水解してカリジンを遊離する。従来からキニン遊離酵素の基質特異性については、アルギニンのエステルを水解する活性しか知られていず、キノーゲン-Ⅱ中の2つのペプチド結合がなぜ特異的に水解されるかについては、説明がなされていない。著者は精製した酵素を用い、合成基質に対する作用を調べ、キノーゲン-Ⅱの構造とキニン遊離の関係について研究した。トリプシンは、TLMe*、TAMe* と Poly-lysine を水解したので、トリプシンがキノーゲンからブラディキニンを遊離するのは当然と考えられる。マムシ毒のキニン遊離酵素は、同様に TLMe と TAMe を水解したが、Poly-lysine を水解しなかった。またブロムシアン処理によって得られたペプチドからはカリジンを遊離したので、Arg-Ser 結合が水解されるのは一応説明できるが、Poly-lysine を水解しないということは、Lys-Arg 結合の周辺の一次構造が必要であることを示している。一方ブタの腓カリクレインは TLMe、TAMe、Poly-lysine を水解したが、TMEe* を水解しなかった。またトリプシンとマムシ毒のキニン遊離酵素は RCM-Kininogen-II からキニンを遊離したのに対して、ブタの腓カリクレインは RCM-Kininogen-II からキニンを遊離しなかった。しかし、還元したキノーゲンを徐々に空気酸化させると、腓カリクレインはキニンを遊離するようになった。また腓カリクレインは、ブロムシアン処理で得たペプチドからはカリジンを遊離したので、キノーゲン-Ⅱ中の Met-Lys 結合が水解されるには、キノーゲン-Ⅱの高次構造が必要であると結論した。

* TAMe ; tosyl arginine methylester, TLMe ; tosyl lysine methylester, TMMe ; tosyl methionine ethylester.

論文の審査結果の要旨

ブラディキニンやカリジンなどの生理活性ペプチドは、血中ではその前駆体であるキノーゲンとして存在し、キニン遊離酵素の作用によって遊離される。

鈴木らは、ウシ血漿よりキノーゲン-Ⅱを精製し、分子量約 49,500 の酸性蛋白質であることを明らかにしてきたが、加藤はキノーゲン-Ⅱの構造を明らかにしつつ、キノーゲン-Ⅱの特異的水解の機構について研究を行なった。

キニノーゲン-II の gross-structure : キニノーゲン-II 中には-SH 基はなく, ^{14}C -モノヨード酢酸で処理しても放射能は蛋白中にとり入れられない。この還元キニノーゲン中には12~14個の-SH 基が定量された。還元後カルボキシメチル化したキニノーゲン-II (RCM-Kininogen-II) の沈降係数はもとのキニノーゲンのそれと殆んど変わらず, N末, C末アミノ酸の分析結果をも考え合わせてキニノーゲン-II は一本鎖のポリペプチドからなることがわかった。一方, RCM-Kininogen-II からキニンを遊離させた残りの蛋白質は, 殆んど同じ大きさの, しかも糖含量の異なる2成分からなっていた。そしてキニノーゲン-II はセリンをN末端, ロイシンをC末端とし, 6~7個の-S-S-結合で架橋された一本鎖のポリペプチドからなり, キニン部分は-S-S-でかこまれた内部のペプチド鎖上のほぼ中央に位置していることがわかった。一方キニノーゲン-II のアミノ酸分析の結果からメチオニンはわずかに2~3個で, この部分をシアノゲンブロマイドで特異的に切断し, キニン部分をN末側にもつペプチドを分離した。その構造はカリジンのC末端側に Ser-Val-Gln-Val-Homoser の附加した15のアミノ酸残基からなるペプチドであった。この研究からトリプシンと蛇毒のキニン遊離酵素は, キニノーゲン-II 中の Lys-Arg 結合と Arg-Ser 結合を, ブタの膀胱カリクレインは Arg-Ser と Met-Lys の結合を水解することが確かになった。従来, キニン遊離酵素の基質特異性については, 一般にN置換されたアルギニンエステルのエステル結合を水解する活性しか知られておらず, キニノーゲン-II 中の2つのペプチド結合がなぜ特異的に水解されるのかについて説明がなされていない。加藤は, いろいろの遊離酵素を用いて研究し, とくに膀胱カリクレインが Met-Lys 結合を水解するには, その周辺におけるキニノーゲン-II の高次構造が関係していることを, RCM-キニノーゲン-II, ブロムシアンペプチドを用いた研究から明らかにした。従来特定の酵素が働くのには, 数個のアミノ酸の一定の配列が必要である例は多いが, アミノ酸配列に変化がなくとも立体構造が変化すると基質となりえない例を加藤君は示した点注目に値し, 理学博士の学位論文として十分価値あるものと認める。