



Title	ウシ血漿プレカリクレインの研究 : その精製、性質及び活性化機構について
Author(s)	高橋, 英喜
Citation	大阪大学, 1973, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/30694
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【11】

氏名・（本籍）	たか 高	はし 橋	ひで 英	のぶ 喜
学位の種類	理	学	博	士
学位記番号	第	2733	号	
学位授与の日付	昭和48年3月24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			
学位論文題目	ウシ血漿プレカリクレインの研究；その精製、性質及び活性化機構について			
論文審査委員	(主査) 教授 鈴木 友二			
	(副査) 教授 成田 耕造 教授 倉橋 潔			

論文内容の要旨

血圧降下作用をもつカリクレインははじめ尿中で、ついで膵や多くの腺組織（唾液腺、汗腺等）や血漿でみつけられた。血漿中のカリクレインは、不活性前駆体のプレカリクレインとして存在し、血漿をガラス、アセトン、カゼインや酸処理すると活性化されることが知られていた。近年長沢らにより、血液凝固系の引き金役であるハーゲマン因子が直接プレカリクレインの活性化にあずかる因子の1つであるとされたが、これについての確認が精製プレカリクレインで行なわれる必要があり、プレカリクレインが活性型に変わる機構についても明らかにしたいと考えた。血漿中のプレカリクレイン量が少ない上に、分離中に容易に活性なカリクレインに変換されるので従来プレカリクレインの精製は困難であったが、今回ウシ血漿からプレカリクレインを精製する方法を案出し、プレカリクレイン→カリクレイン変換にともなう分子変化を調べる量の精製標品を得た。すなわちウシの血漿のプロイドグロブリン画分を1st DEAE-Sephadex A-50カラムクロマトグラフィー、2nd DEAE-Sephadex A-50カラムクロマトグラフィー、CM-Sephadex C-50カラムクロマトグラフィー、アルギニン-Sepharose 4 Bを用いる吸着クロマトグラフィー、Sephadex G-150を用いてのゲル濾過にかけ、ディスク電気泳動や超遠心分析法でほぼ単一なプレカリクレインを得た。ウシ血漿 7.5リットルからの収量は 4.6mgである。1st DEAE-Sephadex A-50のクロマトグラフィーより算出して約 1,300倍精製しえた。精製標品中にはプラスミノゲン、プラスミン、スロンビンの夾雑はなかった。精製プレカリクレインの分子量は SDS-gel 電気泳動法や Archibald 法で 9 万、Sephadex G-150 のゲル濾過法で 10 万と算出され、等電点は 6.98 であった。この精製プレカリクレインを用いて、精製ハーゲマン因子による活性化について調べ、ハーゲマン因子はプレカリクレインを触媒的に直接活性化し、ハーゲマン因子によるプレカリクレインの活性化にともなう分子量変化は認められなかった。また活性になったカリクレインを β -mercaptoethanol で還元後、SDS-gel 電気泳動を行なうと、プレ

カリクレインのときと異なり2つの画分に分れた。また活性カリクレインとなるとともに新たにC末端アミノ酸としてアルギニンのあらわれることをトリチウム法で確かめ、プレカリクレイン、カリクレインともロイシン（イソロイシン）をC末端アミノ酸とすることもトリチウム法で確めた。これらの結果から、プレカリクレイン分子中の-S-S-で囲まれているペプチド鎖上のアルギニルペプチド結合が限定的に分解されるだけで活性化が起ることを明らかにした。またハーゲマン因子で活性化したカリクレインの各種阻害剤に対する親和性、基質特異性、分子量などは、血清にカゼインを加えて生成したいわゆるカゼインカリクレインと著しい差は認められなかったののでいずれの場合も同一プレカリクレイン分子からカリクレインが生成されると考えた。

一方多くの研究者により市販のプロテアーゼ類を血漿に加えてキニン遊離が調べられているが、その機構についての考えは研究者により異なるものがあった。精製したプレカリクレインを用い、これらの酵素がプレカリクレインを活性化してのちキニンを遊離するのか、直接母体蛋白キニノーゲンに働いてキニンを遊離するのかを調べた。トリプシン、パパン、ファイン、クロストリパインや*Streptomyces griseus*のプロテアーゼはプレカリクレインを直接活性化したのち、キニンを遊離し、またプラスミンやナガーゼは直接キニノーゲンに働いてキニンを遊離した。また血液凝固因子であるスロンビン、Factor Xa、Factor IXaについてプレカリクレインを活性化するかどうかについて調べたが、活性化は起らなかった。

論文の審査結果の要旨

キニン遊離酵素のカリクレインは、臍や血漿中でプレカリクレインとして存在するとされてきたが、プレカリクレインを分離、精製した研究はなかった。臍、血漿のいずれの場合も精製中に活性なカリクレインへの変換がおきやすく、またプレカリクレイン含量も低いことによる。本論文ではウシの血漿を用いて、精製の初期段階でプレカリクレイン活性化因子をのぞく方法を考え、プレカリクレインをはじめて純粋な蛋白として分離している。また近年発達してきた吸着クロマトグラフィーを活用してプレカリクレインを収量よく分離することにも成功した。こうしてプレカリクレインから活性なカリクレインに変化するときの分子内変化や、血中のどのような因子がその変化に際して作用するかが調べられるようになった。また従来各種のプロテアーゼ類を血漿に加えて、プロテアーゼ類のキニン遊離能が議論されていた。本論文ではプレカリクレインやキニノーゲンにプロテアーゼを直接作用させ、プレカリクレインをカリクレインに活性化することによってキニンの母体蛋白キニノーゲンからキニン遊離をおこすものと、キニノーゲンに直接作用してキニンを遊離するものとに分け、従来その解釈が不十分であった。プロテアーゼ類による血漿からのキニン遊離の機構をはっきりさせた。本論文で重要と思われる成果は次のとおりである。

(1) 血液凝固系の第Ⅻ因子であるハーゲマン因子にはプレカリクレインをカリクレインにする作用がある。このことから血液凝固の反応系とキニン遊離の反応系が血中で連動しえるものであることが示された。

(2) 精製プレカリクレインにハーゲマン因子を働かせて得た活性カリクレインは従来分離されたカリクレインのうちもっとも純度の高いもので、その性質を調べることにより、プレカリクレイン分子中のジスルフィド結合で囲まれているペプチド鎖上のアルギニルペプチド結合1つが切れるだけで活性なカリクレインになることが明らかになった。

(3) 上にのべた活性化機構はウシのプラスミノーゲンが活性なプラスミンに変わるときの変化に非常によく似ている。またプラスミノーゲンの活性化にともなって新たにN末端アミノ酸部として Ile-Val-Gly-Gly が生成し、これはトリプシンの時と同じ配列であり、さらに最近血液凝固系第X因子が活性な Factor Xa になる時と同じ配列をもつN末端部があらわれることが明らかになった。カリクレインの場合、本論文では活性化にともなって生ずるN末アミノ酸部分を調べるまでになっていないが、論文中のプレカリクレイン精製法を孝案したことは、上のような相似性をカリクレインについても調べる道を開いたことになる。

(4) 従来ショック時などにおいてキニン活性とプラスミン活性の亢進がみられることから、プラスミンは血中でプレカリクレインを活性化するとの考えがもたれていた。今回プレカリクレインはプラスミンで活性化されにくいことが明らかにされたので、血中においてもプラスミンが直接プレカリクレインを活性化する可能性はないと結論した。以上のように高橋英喜君の研究は血中でのキニン遊離やカリクレインの活性化反応の研究に関して重要な寄与をしたものと考えられ、理学博士の論文として十分価値あるものと認める。