OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	内因系血液凝固の開始反応に要求される高分子キニノーゲンの機能
Author(s)	諏合, 輝子
Citation	大阪大学, 1981, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/32725
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

【3】

氏名・(本籍)	諏合輝子
学位の種類	理学博士
学位記番号	第5185号
学位授与の日付	昭和56年3月25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	内因系血液凝固の開始反応に要求される高分子キニノーゲンの機能
論文審査委員	(主査) 教授 藤井 節郎 (副査) 教授 倉橋 潔 教授 中川 八郎 助教授 崎山 文夫

論文内容の要旨

ほ乳動物の血中には生理活性ペプチド，キニンの前駆蛋白質が2種類存在し，そのうち高分子型（HMW）のみが内因系凝固の開始反応（XII因子活性化反応）に関与している。中でもウシHMWキニノーゲン（以下Kgnと略），(M. W. 76,000) については，化学構造が最も詳しく研究されており，その分子内にHis残基に富む領域（Fragment 1・2）が見い出され機能発現に重要な役割を果していることが示唆された。本研究ではHisに富む領域がウシ以外の動物のHMW-Kgn中にも存在するかどうか明らかにする目的で，ウマHMW-Kgnの精製を行い，また凝固の開始反応に補助因子として要求されるHMW-Kgnの役割及びその構造と機能相関を明らかにする目的で，XII因子活性化反応の再構成系を作り実験を行った。

〔I〕ウマHMW-Kgnの精製とその性質—— 従来のウシHMW-Kgn 精製法を改良しウマ血漿よりHMW-Kgnを高純度に精製した。ウマHMW-Kgnは免疫化学的にはウシHMW-Kgnと異なるが，その蛋白化学的性質，キニン周辺のアミノ酸配列はウシのものと似ており，かつHisに富む領域が血漿カリクレインの作用で遊離された。従ってHisに富む領域がほ乳動物一般のHMW-Kgnに存在することが示唆された。また新しいアミノ酸配列を持つキニン誘導体，Leu-Lys-bradykininをウマHMW-Kgn中に発見した。

〔II〕XII因子活性化におけるHMW-Kgnの役割——

1．HMW-Kgnの増幅効果：ウシ血漿より高純度に精製したXII因子，プレカリクレイン，HMW-Kgnを含む溶液に異種表面としてカオリンを加えるとXIIa，カリクレインが生じる。この反応を解析するために次のような反応系を組み，蛍光性ペプチド基質を用いて各因子の活性化速度を測定した。

1．XII＋Prekallikrein $\xrightarrow[\text{Kaolin, HMW-Kgn}]{}$ XIIa＋Prekallikrein

2．XII $\xrightarrow[\text{Kaolin, HMW-Kgn}]{\text{Kallikrein}}$ XIIa

3．Prekallikrein $\xrightarrow[\text{Kaolin, HMW-Kgn}]{\text{XIIa}}$ Kallikrein

(1), (3)では Z-Phe-Arg-MCA*, (2)では Boc-Glu(OBz_l)-Gly-Arg-MCA を基質に用いた。
（＊：4-methylcoumaryl-7-amide.）

上記に示した各因子はそれぞれの反応に必須であり，特にカオリンと HMW-Kgn にはその最大増幅効果を示す至適濃度が存在した。HMW-Kgnは(1)の系では180倍，(1)の系の素反応，(2), (3)の系でもそれぞれ20倍以上の増幅効果を示す。HMW-Kgn の効果は(3)の反応で見る限り，V_{max} には影響を与えずに，基質（この場合はプレカリクレイン）に対する見かけの Km値を1/25に減少させる作用に基づく。

2．HMW-Kgn の機能部位：HMW-Kgn を各種酵素で限定分解し，母分子のいろいろな領域から成る各種 Kgn断片を調整し，(1)の反応系に添加し，XII因子活性化に及ぼす影響を調べ，次のような結果を得た。①HMW-Kg n のC末端側の M. W. 28,000の領域（Fragment 1・2-Light cham）を含む断片は，すべて母分子と同程度の増幅効果を持つ。②Fragment 1・2 は母分子存在下でのXII因子活性化を完全に阻害する。③低分子型（LMW）Kgn には増幅効果は見られない。④キニン部のみを欠く断片は母分子より少ない量で同程度の効果を示す。

以上の結果より，HMW-Kgn の増幅効果をもたらす構造領域は，母分子のC末端側に局在することが明らかになった。また母分子より高い補助因子活性を持つ分子種が，XII因子活性化反応の過程で生成される可能性を示唆する現象を見出した。

論文の審査結果の要旨

高分子キニノーゲンは，内因系血液凝固の開始反応において，cofactorとして要求されることが遺伝的にこの因子を欠く人の血漿を用いた実験から明らかになっている。

本研究はウシ高分子キニノーゲン中に存在するヒスチジン(His)残基に富む領域と cofactor活性発現の関係を検討したものである。ウマ高分子キニノーゲンを精製し，血漿カリクレインを作用させると断片化がおこり，キニン以外に5種類のペプチドが遊離される。このうち4種のものを単離し，アミノ酸分析及びN末端アミノ酸分析から His 残基に富むペプチドがウマ高分子キニノーゲン中に存在することを見出した。またキニン周辺のアミノ酸配列を決定し，従来知られていなかったロイシル-リジル-ブラディキニンを見出した。ウマ血漿より高純度に単離した第XII因子，プレカリクレイン，高分子キニノーゲンを用いて，第XII因子活性化反応の再構成系を作り，ウシ高分子キニノーゲンが著し

い反応増幅効果を示すことを明らかにした。またウシ高分子キニノーゲンの機能発現に必要な領域はキニン部以降の His 残基に富む領域を含むC末側に局在することを再構成系を用いて明らかにした。

再構成系を2つの素反応に分けた場合でも，高分子キニノーゲンは両方の系で増幅効果を持ち，かつ活性型XII因子によるプレカリクレインの活性化反応においては，高分子キニノーゲンは活性型XII因子のプレカリクレインに対する親和性を高めていることを明らかにした。

以上の論文は理学博士の学位論文として十分価値あるものと認める。