カルシウムリン脂質結合蛋白 (Calphobindins) の構造と機能

真木 正博* 設楽 芳宏* 高橋 道*
成田 昌裕* 久米 浩太* 佐藤 宏和*

Structures and functions of placental calcium phospholipid binding proteins (Calphobindins)

Masahiro MAKI*, Yoshihiro SHIDARA*, Osamu TAKAHASHI*,
Masahiro NARITA*, Kota KUME* and Hirokazu SATOH*

Key words : Calphobindin, Lipocortin, Placenta, Anticoagulant, Tissue factor

はじめに

私たちは胎盤の絨毛間腔における抗血栓機構を調べているうちに、新しいタイプの抗凝固物質 (placental coagulation inhibitor, PCI) を発見した¹⁾²⁾. この物質は Ca^{2+} およびリン脂質の関与する凝固反応を抑制する³⁾. また, Ca^{2+} を介してリン脂質に結合する機能を持っているので, Calcium-phospholipid binding protein という意味から, Calphobindin (以下, CPB と略) と名付けた⁴⁾.

アミノ酸配列の解析の結果はリポコルチン I, II と約 50% のホモロジーが認められた. リポコルチンの有するホスホリパーゼ A₂ 阻止作用を CPB も持っており, CPB の有する抗凝固作用をリポコルチンも持っていた. その後類縁のカルシウムーリン脂質結合蛋白は種々の

臓器や細胞に広く分布しており、かつ何組かのグループにより全く異った観点からの研究がそれぞれ個別的に進められていることがわかってきた。

本稿では、胎盤から分離した抗凝固物質について概説し、次いで、この抗凝固物質の属するカルシウムーリン脂質結合蛋白（以下、カリ蛋と略す）について、その現況を述べる。

I. CPBの分離・精製

この抗凝固物質の研究を始めた頃は、本物質がカリ蛋に属することを知らなかったために、次のような非能率的な方法をとっていた。

すなわち、胎盤 homogenate から microsome 分画を得、これを Triton×100 で可溶化、エタノール・エーテルで脱脂、Con A Sepharose を通して、組織トロンボプラスチン

* 秋田大学医学部産科婦人科 (〒010 秋田市本通1-1-1); Department of Obstetrics and Gynecology, Akita University School of Medicine, Akita, Japan

を除き、各種クロマトグラフィー、ゲルろ過などを行い、単一精製物質を得ることができた。しかし、本法では胎盤5個から約1mgしか得られず、その収量はきわめて不良であった。その後、本物質はカリ蛋に属するものであることがわかり、図1のようにカルシウムキレート剤を使用することにより、1個の胎盤から約20mgの収量を得ることができるようになった。

II. CPBの性状

今までの研究でわかったことの主な点を述べると次のとおりである⁴⁾⁵⁾⁶⁾⁷⁾。

1) 分子量約34,000 (アミノ酸配列からの計算では、35,731)

2) 等電点は4.8で、類縁物質中もっとも酸性側にある。

3) アミノ酸は319個からなり、N末端はアラニンでアセチル化されている。

システインはC末端側から5番目の315位に1個のみしか存在しないので、分子内S-S結合はないといえる。

4) 糖鎖はない。

5) 構造等については後述するが、リポコリンIおよびIIとは約50%のホモロジーが認められた。

III. 遺伝子のクローニングと大腸菌における発現

ヒト胎盤から精製したCPBを免疫して作製したマウスモノクローナル抗体をプローブとして用い、ヒト胎盤cDNAライブラリー(λ gt11)のスクリーニングを行った⁶⁾⁷⁾。

得られた5個の陽性クローンは共通の制限酵素切断部位を有した。これらのうち、最長の挿入cDNA断片の塩基配列を常法により決定した。次いで、cDNAを大腸菌発現ベクターpKK233-2に組み込み、大腸菌JM105株を形質転換した。培養した菌体の抽出液を調整し、ウェスタンブロッティングにより検討したところ、胎盤由来CPBと同じ易動度を示す組換え蛋白質(rCPB)のバンドが認められた。rCPBの生産量は培養条件を種々検討の結果、90mg/lに

Fig. 1 Preparation procedure of CPB

達した。これは胎盤1個(約500g)当りのCPBの収量(20mg)を凌駕するものであった。

モノクローナル抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーにより精製したrCPBの抗凝固活性およびフォスホリパーゼA₂阻害活性は胎盤由来CPBと同一であった。また、血液中での安定性も胎盤由来CPBとほぼ同様であり、rCPBは十分にCPBに代わり得るものと考えられる。

しかしながら、rCPBのアミノ酸配列を検討したところ、そのN末端付近の配列は、“Ala-Gln-Val-Leu-Arg-Gly-Thr-Val-Thr-Asp-”となっており、胎盤由来の天然CPBのような末端のアラニンのアセチル化は認められなかった。このため、rCPBの等電点は5.0と胎盤由来CPBよりわずかに塩基性を示した。

IV. 抗凝固活性

CPBは活性部分トロンボプラスチン時間(aPTT)やプロトロンビン時間(PT)を延長させる。したがって、CPBは内因系および外因系の接点である第X因子の活性化からトロンビンの生成までの過程を制御しているものと考えられる³⁾⁴⁾⁷⁾。

Fig. 2 Effect of CPB on Factor X activation by intrinsic pathway

A reaction mixture of 200 μ l of factor IXa and X mixture from a kit of factor VIII assay (Kabi, Sweden), 100 μ l of 1.2 % factor VIII 100 μ l of 100mM CaCl_2 , 20 μ l of 31.8 $\mu\text{g/ml}$ phospholipid, and 20 μ l of various concentrations of CPB (0-60 $\mu\text{g/ml}$) was incubated at 37 $^\circ\text{C}$ for 5 min. To the reaction mixture, 200 μ l of 2.7m mol/l S-2222 (kabi), a synthetic substrate for factor X a, was added and further incubated for 5 min. The reaction was stopped by adding 100 μ l of 50% acetic acid, and OD for liberation of p-nitroaniline was read at 405 nm.

Fig. 3 Effect of CPB on Factor X activation by extrinsic pathway or Russel's viper venom (RVV)

Factor X (200 μ l of 0.75 u/ml) was activated by incubating with reaction mixture of 10 μ l 120u/ml factor VII and 100 μ l of tissue thromboplastin- CaCl_2 (Lyoplastin®), or by incubating with 110 μ l of 0.066mg/ml RVV-100mM CaCl_2 mixture at 37 $^\circ\text{C}$ for 3 minutes in the presence or absence of 100 μ l of various concentrations of CPB. To the reaction mixture, 200 μ l of 0.15 μM S-2337 (kabi), a synthetic substrate for factor Xa, was added and further incubated for 3 min. The reaction was stopped by 200 μ l of 50% acetic acid, and OD for p-nitroaniline was read at 405 nm.

Fig. 4 Effect of CPB on prothrombin activation by Xa or Echis carinatus venom

Prothrombin ($50 \mu\text{l}$ of 0.5 u/ml) was activated by incubating with $100 \mu\text{l}$ of $0.4 \mu\text{g/ml}$ factor Xa, $50 \mu\text{l}$ of $31.8 \mu\text{g/ml}$ phospholipid, and $50 \mu\text{l}$ of 100 mM CaCl_2 , or by incubating with $100 \mu\text{l}$ of 1 mu/ml Echis carinatus venom in the presence or absence of CPB at 37°C for 3 min. To each reaction mixture, $50 \mu\text{l}$ of 1.37 mg/ml RM-601-2® (Yatron), a synthetic substrate for thrombin, was further incubated for 15 min. The reaction was stopped by adding $550 \mu\text{l}$ of 50% acetic acid, and OD at 405 nm was read.

1. PT への影響

血漿に CPB 液と PT 試薬との混液を加えて、PT を測定してみると、CPB の濃度依存性に凝固時間は延長する。

2. aPTT への影響

前の PT の場合と同要領で、aPTT を測定してみると、やはり CPB の濃度依存性に凝固時間の延長が認められた。

3. トロンビン時間への影響

CPB はトロンビン時間に全く影響を及ぼさなかった。

4. 既知の抗凝固性物質との異同

CPB はアンチトロンビンⅢを初めとする諸種のセリンプロテアーゼインヒビター、ヘパリンやヘパリノイド、線溶因子などではなく、また蛋白分解酵素作用やリパーゼ作用も持っていなかった。

5. 内因系による第 X 因子活性化への影響

第Ⅷ因子、活性第Ⅸ因子、リン脂質、 Ca^{2+} の存在化で、第 X 因子の活性化をみてみると、図 2 のとおりで、Xa への活性化は CPB の濃度依存性に抑制された。

6. 外因系による第 X 因子活性化への影響

組織因子、 Ca^{2+} および第Ⅶ因子による第 X 因子の活性化は 図 3 のとおりで、CPB の濃度依存性に抑制された。

しかし、リン脂質の存在を必要としない、Russell's viper venom による第 X 因子の活性化は CPB の影響を受けなかった。

7. プロトロンビンの活性化に及ぼす影響

Xa、リン脂質および Ca^{2+} によるプロトロンビンの活性化は CPB の濃度依存性に抑制された (図 4)。しかし、 Ca^{2+} やリン脂質を必要としないエカリンによる活性化は抑制されなかった。

8. CPB のカルシウム結合性

Hummel-Dreyer 法⁹⁾によって測定した。その結果は 図 5 に示すように、void volume $[\text{Vo}]$ に一致して放射活性のピークを認め、次に elution volume $[\text{Ve}]$ に一致して、くぼみを認めた。これは、CPB- Ca^{2+} complex が Vo に一致して溶出され、また CPB との結合により消費された Ca^{2+} が Ve に一致したくぼみを形成したものといえる。

Fig. 5 Chromatography for binding of Ca^{2+} to CPB by Hummel and Dryer⁸⁾

Ca^{2+} -free CPB $200\mu\text{l}$ ($500\mu\text{g}$) was applied on Sephadex G25 column ($1\times 30\text{ cm}$) equilibrated preliminarily with 100 mM Tris-HCl ($\text{pH } 7.4$), $5450\text{ cpm}/0.1\text{ ml}$ $^{45}\text{CaCl}_2$, 2 mM CaCl_2 , 100 mM NaCl, and then eluted with the same solution, subfractionating each 0.5 ml under the speed of 25 ml/h . The ^{45}Ca concentration was measured by liquid scintillation system LSC-671 (Aloka).

Fig. 6 Effect of CPB on binding of factor X to phospholipid vesicle

A reaction mixture of $50\mu\text{l}$ of $28\mu\text{g/ml}$ factor X, $50\mu\text{l}$ of 100 mM CaCl_2 , $50\mu\text{l}$ of 1% BSA, and $50\mu\text{l}$ of various concentrations of CPB in the presence or absence of $100\mu\text{l}$ of liposome prepared by method of Goto et al. (Tohoku J. exp. Med., **131**, 399-407, 1980) was incubated at 37°C for 5 min . The mixture was centrifuged at $100,000\times g$. Unbound factor X in the supernatant was measured by chromogenic substrate S-2337 after activation of factor X with Russel's viper venom.

Fig. 7 Effect of CPB on binding of prothrombin to phospholipid vesicle

Reaction mixture was same as in Fig. 6, except for 0.5 u/ml prothrombin was used instead of factor X. Unbound prothrombin in the supernatant was measured by RM 601-2 after activation with Ecarin.

この事実から CPB はカルシウム結合能を持っていることを確認した。しかしながら、1 分子の CPB に何モルの Ca^{2+} が結合するのか、2 ~ 4 モルとみているが、定量的に再現性のある値が得られていない。

9. リン脂質結合性

組織トロンボプラスチン製剤の一種である Thromborel® のヘプタン・ブタノール [2: 1] 抽出液や個々のリン脂質成分, phosphatidyl ethanolamine(PE), phosphatidyl serine(PS), phosphatidyl inositol (PI), phosphatidyl choline (PC) および sphingomyelin (SM) 溶液と試験管壁に乾固させ、そこへ一定濃度の CPB と種々の濃度の Ca^{2+} とを加えてみると、 Ca^{2+} 濃度依存性に CPB は試験管壁のリン脂質に吸着され溶液中から消失してしまうことが示された⁴⁾。なお、吸着は PE, PS, PI などの酸性リン脂質に強く、PC や SM などの塩基性リン脂質には弱かった。

10. リン脂質への第 X 因子やプロトロンビンに対する結合に対する CPB の影響

図 6 および 図 7 は CPB は Ca^{2+} の存在下で、第 X 因子やプロトロンビンのリン脂質への結合を抑制することを示している。

11. CPB の凝固阻止作用は競合阻害か非競合阻害か

図 8 は組織因子, VIIa, Ca^{2+} による種々の

濃度の第 X 因子基質の活性化に及ぼす CPB の影響をみたもので、CPB はこの活性化を抑制していることを示している。また、double reciprocal plot (Lineweaver Burk plot) からは、阻害形成は非競合性であるといえる。

図 9 は factor Xa (13 nM), Ca^{2+} , リン脂質による種々の濃度のプロトロンビン基質のトロンビンへの活性化に対する CPB の影響をみたものである。CPB はトロンビン生成を抑制しているが、その阻害形式は Lineweaver Burk plot からみると、非競合型といえる。

すなわち、 $k_m = 2.5 \times 10^{-7} \text{M}$ と CPB の有無に限らず一定であるが、 $V_{\max}$ は CPB の存在により低下した。さらに $K_i = 5.3 \times 10^{-8} \text{M}$ であり、factor Xa: CPB が 1 : 4 モル比で 50 % 阻害が得られる。

これらの成績は、リン脂質が十分にある条件下での実験で、一応は非競合性阻害という結果にはなっているが、CPB II で行った成績などからみると、一概に競合性とか非競合性阻害ということだけでは片づけられないような点もある。カリ蛋のホスホリパーゼ A₂ 抑制は基質であるリン脂質の利用阻害にあるともいわれているが、抗凝固作用も酵素の活性中心の直接阻害ではなく、組織因子 (アポ蛋白も含めてリン脂質) と Ca^{2+} , 凝固因子, CPB 間の複雑なからみ合い中で阻害がかかるものと思われる。

Fig. 8 Effect of CPB Factor X activation by tissue factor-VIIa- Ca^{2+} complex

100 μl of various concentrations of factor X, 50 μl 100 mM CaCl_2 , 50 μl CPB (0, 70 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and 100 μl of tissue factor-VIIa complex (a mixture of 1 ml Lyoplastin®, as tissue factor 5 mg/ml, 1 ml 10 mM CaCl_2 , 250 μl 1 unit/ml, Sigma human factor VII) was incubated for 10 min. at 37°C. To the reaction mixture 200 μl of S-2337 (1.2 mg/ml) was added and incubate further for 10 min. The reaction was stopped by adding 300 μl 50% acetic acid. Liberated pNA by Xa was measured at 405 nm.

12. CPB の多様性

胎盤には、リポコルチン I, II を含めると、少なくとも 5 つ、ひょっとしたら 6 つの CPB が存在する。量的にもっとも多いのは CPB I で、単位重量あたりの抗凝固活性としては CPB II がもっとも強く、次に CPB I, III でリポコルチン I, II の抗凝固作用は弱い。

以上が今までわかった CPB の抗凝固活性についての研究の概要である。まとめてみると次のようになる。

- 1) CPB は Ca^{2+} を介して主としてリン脂質に結合する。
- 2) CPB は Ca^{2+} リン脂質の関与する凝固反応のみを阻害する。
- 3) CPB は Ca^{2+} 存在下でリン脂質への第 X 因子やプロトロンビンの結合を抑制する。

Fig. 9 Effect of CPB on prothrombin activation by factor Xa- Ca^{2+} -phospholipid

A reaction mixture of 100 μl of various concentrations of prothrombin (0~200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in 50 mM Tris-HCl, pH 7.4), 50 μl 100 mM CaCl_2 , 50 μl 50 mM Tris-HCl, pH 7.4), 25 μl phospholipid (Cephotest®), 100 μl CPB (0.7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 50 mM Tris-HCl), and 50 μl factor Xa (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) was incubated for 5 min. at 37°C, then further incubated for 3 min. with 100 ml 2 mM RM 601-2 (Yatron). After reaction was stopped by adding 500 μl 50% acetic acid, OD was read at 405 nm.

4) リン脂質, Ca^{2+} 存在下での VIIa による第 X 因子の活性化や Xa によるプロトロンビンの活性化は非競合的なものという成績であった。

5) Tissue factor のアポ蛋白がこの反応系にどのように関与するのか、未だ不明である。

6) 胎盤には分子量や等電点の異なる少なくとも 5 つのカリ蛋が存在する。

V. カリ蛋に対する種々の名称とその異同

CPB も含めて、カリ蛋は多くの研究者によってそれぞれ異った観点から研究が進められてきた。これらのなかには異名同質のものもいくつか存在することがわかってきた。

以下、それらについて略述する。

1. クロモバインディン (chromobindins)

ウシ副腎髄質サイトゾールより分離されたもので、 Ca^{2+} 依存性に好色素性顆粒膜 chromaffine granule membrane に結合する性質を持っている。二次元泳動による分子量や等電点の違いから、少なくとも 23 種類のクロモバインディンを検出しているが⁹⁾、そのなかにはカルモジュリンやアクチンなども含まれており、すべてがカリ蛋というわけではない。また、この系の物質については、アミノ酸配列の解析はまだなされていない。

2. エンドネクシン (endonexins)

肝およびヒト胎盤から分離されたカリ蛋で、それぞれエンドネクシン I および II という。前者については、部分構造が、後者については全アミノ酸配列が決められている¹⁰⁾¹¹⁾。

3. アネクシン (annexins)

Geisow¹²⁾の提唱によるもので、 Ca^{2+} やリン脂質を附加 (annex) する蛋白という意味である。

分子量 35kDa 近辺のカリ蛋の総称で、エンドネクシン、リポコルチン、カルパクチン、キャリレクトリンなどが含まれる。

4. シネクシン (synexins)

Creutz ら¹³⁾によってウシの副腎髄質から抽出されたカリ蛋で、 Ca^{2+} 依存性に細胞骨格や膜成分と結合する。副腎髄質の好色素性顆粒を Ca^{2+} 依存性に凝集させる性質を持ち、細胞における分泌機能に関係する作用を持っていると考えられている。クロモバインディン II はシネクシン I (47 KDa) と同一物質と考えられている。他のシネクシン II (56 KDa) が知られているが¹⁴⁾、これらのアミノ酸配列は未定である。なお、シネクシンはギリシャ語 Synexis (meeting) に由来する。

5. キャリレクトリン (calelectrins)

電気ナマズやシビレエイなどのコリン支配性シナプスに沢山含まれている。その後、哺乳動物の肝、脳、副腎髄質、網膜などに広く分布していることが知られた。

本物質は Ca^{2+} の存在下で、神経節の vesicle membrane や副腎髄質の好色素性顆粒膜を凝集させる作用を持っており、分泌細胞の細胞骨

格を形成し、分泌現象に関係していると考えられている¹⁵⁾¹⁶⁾。

6. カルシメディン (calcimedins)

Moore によって横紋筋、心筋、骨格筋などから fluphenazine-sepharose affinity column を用いて分離されたもので、カルシウム結合蛋白である¹⁷⁾。その分子量は 67, 35, 33 および 30 KDa など 4 種類が知られているが、これらは 67 KDa calelectrin や p35, p36 などのカリ蛋とは免疫学的に異なるものであるとしている¹⁸⁾¹⁹⁾。カルモジュリンの分離に用いる fluphenazine カラムを用いて精製している点から考えて、カリ蛋とは別族のものも含まれている可能性がある。

7. カルパクチン (calpactins)

Ca^{2+} -phospholipid-actin binding protein, カルシウム、リン脂質、アクチン結合蛋白という意味である。

カルパクチン I²⁰⁾ はリポコルチン II 2 分子、p10 2 分子の計 4 分子のテトラマーからなる。

カルパクチン II は小腸から分離されたもので、リポコルチンや p35 と同一物質と考えられる²¹⁾。

8. プロテイン I・II・III (protein I, II, III)

プロテイン I, II は小腸から、III は肝臓から分離されたカリ蛋である²²⁾。プロテイン I の重鎖は恐らくリポコルチン II と同じものと思われる。プロテイン II 以外はアミノ酸配列の決定はなされていない。

9. P

p68, p36, p35 などのように p の次に分子量 (KDa) を附して呼ぶ方法

10. リポコルチン (lipocortins)

以前、マクロコルチン (Flower, 1984), リポモジュリン (Hirata, 1984) などと呼ばれていたが、現在はリポコルチンの名称で統合されている。細胞蛋白の約 0.2% も占め、量的には多い蛋白質である。グルココルチコイドによって誘導されるカリ蛋の一種で、ホスホリパーゼ A_2 の阻止作用を持つ。その結果、アラキドン酸の遊離が抑制され、プロスタグランディンやロイコトリエンなどの起炎物質の生成も抑えられ、抗炎症的に作用すると考えられている。

Table 1 Classification of Ca^{2+} -phospholipid binding proteins

Group	I	II	III	IV	V
class	mass 68	38	38	35	35
name	PI 6.4	7.9	8.1	4.8	5.4—6.1
Protein	Protein III ²²⁾		Protein I ²²⁾		Protein II ^{22),37)}
Ps	p68 ²⁶⁾	p35 ^{27),35)}	p36 ^{20),27),36)}		
Endonexins				Endonexin II ¹¹⁾	Endonexin I ¹⁰⁾
Calpactins		Calpactin II ²¹⁾	Calpactin I heavy chain ²⁰⁾		
Chromobindins ⁹⁾	Chromobindin 20	Chromobindin 6	Chromobindin 8	Chromobindin 5	Chromobindin 4
Calelectrin ^{15),16)}	67kDa Calelectrin ¹⁶⁾		36kDa Calelectrin ¹⁵⁾	35kDa Calelectrin ¹⁵⁾	32.5kDa Calelectrin ¹⁵⁾
Lipocortins ⁹⁾	Lipocortin VI	Lipocortin I	Lipocortin II	Lipocortin V	Lipocortin IV Lipocortin III
Calphobindins	Calphobindin II			Calphobindin I	Calphobindin III
PAP ²⁸⁾			PAP IV	PAP I	PAP II PAP III
PP and VAC				PP ₄ ³¹⁾ , VAC ³²⁾	PP ₄ -X ³¹⁾

胎盤から二種のリポコルチンが分離されアミノ酸配列も決められている。詳細については、松本²³⁾、徳田ら²⁴⁾の総説を参照せられたい。最近になって、さらに後述のようにリポコルチン I から VI まで分類されている²⁵⁾。

11. 抗凝固物質として研究されてきたカリ蛋 これには次のようなものがある。

- (1) カルホバインディン (calphobindins, CPB)
- (2) 胎盤性抗凝固蛋白 (placental anticoagulant protein, PAP)
- (3) 胎盤蛋白₄ (placental protein₄, PP₄)
- (4) 血管性抗凝固物質 (vascular anticoagulant, VAC)

私たちは胎盤から抗凝固物質を世界で初めて精製し、これを発表した (1983, 1984)^{1),2)}。

それよりやや遅れて、Reutelingspergerら²⁹⁾が同一系物質と思われる抗凝固物質 (VAC) を臍帯動脈から分離した。

1987年になって、筆者らは全アミノ酸の配列を決定し、大腸菌での発現に成功した。また、計 3 種の抗凝固物質が存在することも指摘し、かつ解析も進んでいる。筆者らにやや遅れて、Funakoshi ら³⁰⁾は placental-anticoagulant protein (PAP) の全アミノ酸構造を発表したが、全く同一物質であることがわかった。

最近、Tait ら²⁸⁾は、PAP には PAP I から

PAP IV まであることを指摘しているが、68 KDa カリ蛋には触れていない。

最近になって、Grundmann ら³¹⁾が、PP₄ の全構造と PP₄-X の部分構造を決定したが、PP₄ は CPB I と同一のものと考えられる。また、Maurer-Fogy ら³²⁾の VAC の構造決定により、これも CPB I とほぼ同一物質と考えられる。

12. その他

Hayashi ら³³⁾は胎盤からホスホリパーゼ A₂ 阻止作用を持つ物質として、32K I-II、36K I-II、68K I-II を分離しているが、リポコルチン、CPB や PAP などと同列のものと考えられる。

軟骨細胞膜から分離されたコラーゲン結合蛋白である anchorin C II 構造もカルパクチン、リポコルチン類縁で、やはりカリ蛋の一種といえる³⁴⁾。

以上のように、カリ蛋に属する蛋白質は、異なる観点から別個の研究者によって、それぞれに追求されてきたために、10 を越す異名と約 6 種の亜群とに大別される。これらを分子量 (apparent mass)、等電点などから分類してみると 表 1 のとおりとなる。

アンダーラインを引いてあるものは、アミノ酸配列の決定済みのものである。従って、異名であっても、それぞれの亜群のなかでアンダー

1	
CPB I	MAQVLRGTVTDFPPGFD
Lip o I	MAMVSEFLKQAWFIENEEQYVQTVKSSKGGPGSAVSPYPTFN
Lip o II	MSTVHEILCKLSLEGDSHTPFSAYGSVKAYTNFD
Lip o III	MA · SIWVGHRGTVROYPPDFS
CPB IIa	AKPAQGAKEYRGSIHDFPGFD
CPB IIb	DAAGQFFPEAAQVAIQMWELSAVARVELKGTVRPANDFN
20 40 60 80	
CPB I	ERADAETLRKAMKGLGTDEESILTLTTSRSNAQRQEIISAAPKTLFGRDLLDLKSELTGKFEKLI VALMKPS
Lip o I	PSSDVAALHKAIMVKGVD EATIIDILTKRNNARQQIKAAYLQETGKPLDETILKKALTGHLEEVVALLKTP
Lip o II	AERDALNIEATIKTIGVDEKTIIVNLTNRSNAQRQIDIAFYQRTKKELASALKSALSGHLEEVVALLKTP
Lip o III	PSVDAEAIQKAIKRGIGTDEKMLISILTERSNAQRQLIVKEYQHAYGKELKDDLKGDLSGHFEHLMVALVTPP
CPB IIa	PNQDAEALYTAMKGFSGDKEAIIIDITTSRSNRQRQEVCSYKSLYGYKDLIADLKYELTGKFERLIVGLMRPP
CPB IIb	PDADAKALRKAMKGLGTDEDTIIIDITTSRSNVQRQQIRQTPKSHFGRDLMTDLKSEISGDLARLILGLMMPP
100 120 140 160	
CPB I	RLYDAVELKHALKGAGTNEKVLTEIIASRTPEELRAIKQVVEEYGGSSLEDDVVGDTSYVQRMVLVLLQANRDPDAG-IDEAQV
Lip o I	AQPDADDELRAAMKGLGTDEDTLIEILASRTNKEIRDINRVREELKRDLEKDIITSDTSGDFRNALLSLAKGDRSEDFGVN-EDLA
Lip o II	AQYDASELKAAMKGLGTDEDSLIEIICSRTNQELQEIINRVYKEMKYTDLEKDIISDTSGDFRKLMLVALAKGRRAEDGSGVIDYELI
Lip o III	AVFDAKQLKSKMGAGTNE DALIEILTTTRTSRQMKDISQAYVTVYKKSGLGDDIISSETSGDFRKLMLTADGRDES LKV DEHLA
CPB IIa	AYCDAKEIKDAISGIGTDEKCLIEILASRTNEQMHQLVAAYKDAYERDLEADIIGDTSGHFQKLMVLL QGTREEDDVVSEDLV
CPB IIb	AHYDAKQLKAMEGAGIDEKALIEILATRTNAEIRAIN EAYKEDYHKLSLEDALSDTSGHFRRLIISLATGHREEGGENLDQAREDAQV
180 200 220 240	
CPB I	EQDAQALFQAGELKWGTDEEKFITIFGTRSVSHLRKVFDKYM TISGFQIEETIDRETSGNLEQLLAVVKSIRS I
Lip o I	DSRARALYEA GERRKGT DVNFNTILTTRSYPQLRRVFQKYTKYSKDHMNKVL DLELKGDI EKCLTAIVKCAISK
Lip o II	DQDARDLYDAGVKKRGTDVPKWSIMYERSVPHLQKVFDRYKSPYDMLESIRKEVKGDLLENAFNLVQC IQNK
Lip o III	KQDAQILYKAGENRWGTDEDKFTIELCLRSFPQKLTFDEYRNISQKDIVDSIKGELSGHFEDLLAI VNCVRNT
CPB IIa	QQDVQDLYEAGELKWGTDEAQFIYILGNRSKQHLRLVFDEYLKTTGKPIEASIRGELSGDFEKLMLAVVKCIRST
CPB IIb	AAEILEIADTPSGDKTSLETRFMTILCTRSYPHLRRVFQFEFIKMTNYDVEHTIKKEMSGDVRDAFVAIVQSVKNK
260 280 300	
CPB I	PAYLAETLYAMKGAGTDDHTLIRVMVSRSEIDL FNIRKEFRKNFATSLYSMIKGDTS GDYKKALLLCGEDD
Lip o I	PAPFAEKLHQAMKGAGTGRHKALIRIMVSRSEIDMNDIKAFYQKMYGISLCAIILDET KGDYKILVALCGG-N
Lip o II	PLYFADRLYDSMKGKGTGRKVLIRIMVSRSEVDMDKIRSEFRKKYKGSLLYYIIQDITKGDYKQALLYLCGGDD
Lip o III	PAFLAERLHRALKIGITDEFTLNIRIMVSRSEIDLLDIRTEFKKHGYGSLYSAIKSDTSGDYETLLKICGGDD
CPB IIa	PEYFAERLFAKMGKGLGTDRDNTLIRIMVSRSELDMLDIRIFRTYKESLYSMIKNDTSGEYKKTLKLSGGDD
CPB IIb	PLFFADKLYKSMKGAGIDDKTLTRIMVSRSEIDLLNIRREFIEKYDKSLHQAIEGDTSGDFLKALLALCGGED

Fig. 10 Amino acid sequences of lipocortins (I, II, III) and calphobindins (I, II).

ラインを引いてあるものは異名同質のものといえる。

第V群の mass 35, PI 5.4~6.1 の系のものは多分2群にわかれそうであるが、まだ不詳なものが多い。

VI. カリ蛋の構造と機能

1. アミノ酸配列とカルシウム結合能

構造が決定されているカリ蛋のうち、リポコルチン I, II, III, CPB I (リポコルチン V 相当), CPB II (リポコルチン VI 相当) のアミノ酸配列を示す (図 10)。

カリ蛋は共通した特異な構造を持っている。すなわち、N 末側約数個から約 50 個のペプチドドメインで、この部分には各カリ蛋間の相同性は余りなく (variable tail), 蛋白分解を受け易く、かつリン酸化を受ける部位とされている。

これに続く約 300 個のアミノ酸配列には、各カリ蛋間に 50% のホモロジーがあり、また約 70 個のアミノ酸群からなる 4 個の繰返し部分がある。この部は蛋白分解は受け難い。この繰返し部分には、アンダーラインを引いてある 17 個のアミノ酸からなる相同性の高い consensus sequence (KGh GTDE xxLI pILA pR, h: hydrophobic, p: polar, x: variable) がある。

CPB II (p68, リポコルチン VI, 67KDa キャリレクトリン) は 4 個ではなく、8 個の繰返し部分を持つ 1 本鎖の蛋白質である。従って、consensus sequence も 8 個ということになる。この consensus sequence はカルシウムの結合部位とされている。カルモジュリンやトロポニンのカルシウム結合部位である EF ハンドとは全く異なる構造である³⁸⁾³⁹⁾⁴⁰⁾。

リポコルチンは 2 分子の Ca^{2+} と結合し、立体構造の変化を起こすといわれる。CPB II についていえば、1 分子につき 1 分子のカルシウムと結合するが、リン脂質の存在下では 8 分子のカルシウムに結合するというデータを持っている。

2. リン脂質や膜成分との結合能

カリ蛋は Ca^{2+} 依存性にリン脂質や膜成分と結合する。カリ蛋族であるクロモバインディン

は副腎の好色素性顆粒を凝集させることで知られている。恐らく顆粒の膜をカリ蛋と Ca^{2+} を惹いて引き付け、凝集させるのであろう。

3. 細胞骨格成分との結合

カルパクチンに代表されるように、カリ蛋のあるものは細胞骨格であるアクチンやスペクトリンとの結合性もある。いろいろの分泌細胞に多く含まれているために、分泌機構 (exocytosis) に関係あるのではないかとされる³⁹⁾。

なお、CPB I はコラーゲンに対しても親和性を持っている⁴⁰⁾。

4. チロシンリン酸化酵素の基質

p36 および p35 はレトロウィルスの PP60v-src というチロシンリン酸化酵素や epidermal growth factor receptor/kinase によってリン酸化されることが知られ、発癌などとの関連において注目されている³⁵⁾⁴¹⁾⁴²⁾。しかし、p36 のリン酸化は形態学的変化を起させるには十分でないという報告もある⁴³⁾。リン酸化されるのは N 末端側の variable tail 部分にあり、P36 では tyrosine [23], p35 では tyrosine [20] がこれに相当する³⁷⁾。CPB-I (PAP-I, Lipocortin V) や PAP II (Lipocortin III) には N 末の variable tail 部分に tyrosine がないので、そのリン酸化は受けない。CPB II (p68) には N 末側 9 番目に tyrosine を持っているのでリン酸化されるかもしれない。

ただし、セリン、スレオニン残基は N 末側にあるので、カゼインなどにみられるようなふつうのリン酸化は起り得る。

5. ホスホリパーゼ A_2 阻止作用

既にリポコルチンの所で述べたように、リポコルチンの抗炎症作用はホスホリパーゼ A_2 の阻止にあるといわれている。その作用機転はカリ蛋が Ca^{2+} を介してリン脂質と結合してしまうので、基質としてのリン脂質の利用をブロックするためではないかと考えられている。少なくとも酵素の活性中心に作用するものではない。従って、酵素対インヒビターとの量的関係よりも、インヒビター対基質の関係の方が重要な意味がある。Crompton ら⁴⁴⁾は、この反応阻害形式は単純に競合または非競合阻害ということでは律せられないのではないかとしている。

6. 自己免疫疾患との関連性

ロイマチス患者において、リポコルチンに対する自己抗体が認められるという Hirata ら⁴⁵⁾の報告がある。私たちも、自己免疫疾患について、抗 CPB 抗体を調べてみたところ、SLE の活動期に著明な高値を示すものを認め、協同研究者の三浦亮ら（秋田大）、および根来茂ら（大阪大）が第 16 回臨床免疫学会において発表した。このような抗体の存在のために、ホスホリパーゼ A₂ 活性の動態に乱れを生じ、自己免疫疾患の病態を修飾するものと考えられた。

たとえば、SLE の時に血栓好発的であるとされるが、それは抗 CPB 抗体のために CPB の抗凝固作用がマスクされるためではないかとも考えられる。また、lupus anticoagulant 活性は CPB、抗 CPB 抗体複合体が凝固に必要なリン脂質を固定化し、非活性型とするためではないかと考えられるが、その証明に手こずっている。

7. その他

カリ蛋にはシグナルペプチドがなく、細胞内に存在し、細胞内で膜一膜、膜一細胞骨格結合に与っているとされている。しかし、少なくとも CPB I は合胞細胞表面や血管内皮表面にも存在しており、他のカリ蛋とやや趣を異にする。Andcorin C II も分泌されて外に出てくるといわれる。分子量の比較的多い p68 を除けば分子量はほとんど 35 KDa 前後である。

それにもかかわらず、等電点が 4.8~8.1 と大きな幅がある。それぞれに応じた特殊機能を営んでいるのであろう。細胞内の情報伝達機構に密接に関与していることが考えられる。

おわりに

私たちが胎盤における抗血栓物質として発見した CPB はリポコルチン様の種々の作用があることが知られ、はげしい研究競争のなかにある。

なにが主な機能なのかかわからないことのみであるが、少なくともリン脂質、Ca²⁺ の関与する凝固機転の解明に役立つ物質と考えて精進している。

文 献

- 1) 設楽芳宏, 村田 誠, 真木正博: 抗凝固活性を有する胎盤蛋白の精製. 血液と脈管, **14**; 498~500, 1983.
- 2) Maki, M., Murata, M. and Shidara, Y.: Inhibitors of platelet aggregation and blood coagulation isolated from the human placenta. Europ. J. Obstet. Gynec. reprod. Biol., **17**; 149~154, 1984.
- 3) 設楽芳宏: 胎盤性凝固阻止物質の作用機序. 日産婦誌, **37**; 1~8, 1985.
- 4) 真木正博, 設楽芳宏, 村田 誠, 高橋 道, 成田昌裕, 久米浩太, 才野佑之, 名古屋隆生, 吉崎栄男, 岩崎昭夫, 中尾裕貴: 胎盤における抗血栓機序; 新しいタイプの胎盤性抗凝固物質 (Calphobindin, リポコルチン同族蛋白). 産婦人科・新生児血液, **12**; 41~48, 1988.
- 5) 設楽芳宏: 胎盤性血液凝固阻止物質の分離と精製. 日産婦誌, **36**; 2583~2592, 1984.
- 6) Iwasaki, A., Suda, M., Nakao, H., Nagoya, T., Saino, Y., Arai, K., Mizoguchi, T., Sato, F., Yoshizaki, H., Hirata, M., Miyata, T., Shidara, Y., Murata, M. and Maki, M.: Structure and expression of cDNA for an inhibitor of blood coagulation isolated from human placenta: A new lipocortin like protein. J. Biochem., **102**: 1261~1273, 1987.
- 7) Shidara, Y. and Iwasaki, A.: Structure and expression of cDNA for Calphobindin. Acta Haematol. Jpn., **51**; 1670~1679, 1988.
- 8) Hummel J.P. and Dreyer, W.J.: Measurement of protein-binding phenomena by gel filtration. Biochem. Biophys. Acta, **63**; 530~532, 1962.
- 9) Creutz, C.E., Zaks, W.J., Hamman, H.C., Crane, S., Martin, W.H., Gould, K.L., Oddie, K.M. and Parsons, S.J.: Identification of chromaffin granule-binding proteins. J. Biol. Chem., **262**; 1860~1868, 1987.
- 10) Geisow, M.J., Fritache, U., Hexham, J.M., Dash, B. and Johnson, T.: A consensus amino-acid sequence repeat in Torpedo and mammalian Ca²⁺-dependent membrane binding proteins. Nature, **320**; 636~638, 1986.
- 11) Kaplan, R., Jaye, M., Burger, W.H., Schlae-

- pfer, D.D. and Haigler, T.: Cloning and expression of cDNA for human-endonexin II, a Ca^{2+} and phospholipid binding protein. *J. Biol. Chem.*, **263**; 3037~3043, 1988.
- 12) Geisow, M.J.: Common domain structure of Ca^{2+} and lipid-binding proteins. *FEBS Lett.*, **203**; 99~103, 1986.
- 13) Creutz, C.E., Pazoles, C.J. and Pollard, H.B.: Identification and purification of adrenal medullary protein(Synexin)that causes calcium-dependent aggregation of isolated chromaffin granules. *J. Biol. Chem.*, **253**; 2858~2866, 1978.
- 14) Odenwald, H.F. and Morris, S.J.: Identification of a second synexin-like adrenal medullary and liver protein that enhances calcium-induced membrane aggregation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **112**; 147~154, 1983.
- 15) Sudhof, T.C., Ebbecke, M., Walker, J.H., Fritsche, U. and Boustead, C.: Isolation of mammalian calelectrins: A new class of ubiquitous Ca^{2+} -regulated proteins. *Biochemistry*, **23**; 1103~1109, 1984.
- 16) Sudhof, T.C., Dlaughter, C.A., Leznicki, I., Barjon, P. and Reynolds, G.A.: Human 67-kDa calelectrin containing a duplication of four repeats found in 35-kDa lipocortins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **85**; 664~668, 1988.
- 17) Moore, P.B.: 67kDa calcimedin, a new Ca^{2+} -binding protein. *Biochem. J.*, **238**; 49~54, 1986.
- 18) Dedman, J.R. and Smith, U.L.: Calcimedin: In: *Calcium-Binding Proteins in Health and Disease* (eds. Norman, A.W., Vanaman, T.C., and Means, A.R.) p.146~126, Academic Press, 1986.
- 19) Morse, S.S. and Moore, P.B.: 67k Calcimedin(67 kDa) is distinct from p.67 calelectrin and lymphocyte 68 kDa Ca^{2+} -binding protein. *Biochem. J.*, **251**; 171~147, 1988.
- 20) Glenney, J.R.: Two related but distinct forms of the Mr36,000 tyrosine kinase substrate (calpactin) that interact with phospholipid and actin in a Ca^{2+} -dependent manner. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **83**; 4258~4262, 1986.
- 21) Pepinski, R.B. and Sinclair, L.K.: Epidermal growth factor-dependent phosphorylation of lipocortin. *Nature*, **321**; 81~84, 1986.
- 22) Shadle, P.J., Gerke, V. and Weber, K.: Three Ca^{2+} -binding proteins from porcine liver and intestine differ immunologically and physiologically and one distinct in Ca^{2+} affinities. *J. Biol. Chem.*, **260**; 16354~16360, 1985.
- 23) 松本 正: リポコルチン-ホスホリパーゼ阻害蛋白. 代謝, **24**; 249~255, 1988.
- 24) 徳田雅明, David, M. Waisman, 畠瀬 修: リポコルチン-ホスホリパーゼ A_2 抑制活性を持つ Ca^{2+} 結合蛋白. 生化学, **60**; 26~31, 1987.
- 25) Pepinsky, R.B., Tizard, R., Mattaliano, R.J., Sinclair, L.K., Miller, G.T., Browning, J.L., Chow, E.P., Burne, C., Huang, K.S., Pratt, D., Wachter, L., Hession, C., Frey, A.Z. and Wallner, P.: Five distinct calcium and phospholipid binding proteins share homology with lipocortin I. *J. Biol. Chem.*, **263**; 10799~10811, 1988.
- 26) Crompton, M.R., Owens, R.J., Toffy, N.F., Moss, S.E., Waterfield, M.D. and Crumpton, M.J.: Primary structure of the human, membrane-associated Ca^{2+} -binding protein p.68: a novel member of a protein family. *EMBO J.*, **7**; 21~27, 1988.
- 27) Brugge, J.S.: The p35/p36 substrates of protein-tyrosine kinases as inhibitors of phospholipase A_2 . *Cell*, **46**; 149~150, 1986.
- 28) Tait, J.F., Sakata, M., McMullen, B.A., Miao, C.H., Funakoshi, T., Hendrickson, L.E. and Fujikawa, K.: Placental anticoagulant proteins: Isolation and comparative characterization of four members of the lipocortin family. *Biochemistry*, **27**; 6268~6276, 1988.
- 29) Reutelingsperger, C.P.M., Hornstra, G. and Hemker, H.C.: Isolation and partial purification of a novel anticoagulant from arteries of human umbilical cord. *Eur. J. Biochem.*, **151**; 625~629, 1985.
- 30) Funakoshi, T., Hendrickson, L.E., McMullen, B.A. and Fujikawa, K.: Primary structure of human placental anticoagulant protein.

- Biochemistry, **26**; 8087~8092, 1987.
- 31) Grundmann, U., Abel, K.J., Bohn, H., Lobermann, H., Lottspeich, F. and Kupper, H.: Characterization of cDNA encoding human placental anticoagulant protein (PP4): Homology with the lipocortin family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **85**; 3708~3712, 1988.
 - 32) Fogy, I. M., Reutelingsperger, C. P. M., Pieters, J., Bodo, G., Stratowa, C. and Hauptman, R.: Cloning and expression of cDNA for human vascular anticoagulant, a Ca^{2+} -dependent phospholipid-binding protein. *Eur. J. Biochem.* **174**; 585~592, 1988.
 - 33) Hayashi, H., Owada, M. K., Sonobe, S., Kakunaga, T., Kawakatsu, H. and Yano, J.: A 32-kDa protein associated with phospholipase A_2 -inhibitory activity from human placenta. *FEBS Lett.*, **223**; 267~272, 1987.
 - 34) Pfaffle, M., Ruggiero, F., Hofmann, H., Fernandez, M.P., Selmin, O., Yamada, Y., Garrone, R. and von der Mark, K.: Biosynthesis, secretion and extracellular localization of anchorin CII, a collagen-binding protein of the calpactin family. *EMBO J.*, **7**; 2335~2342, 1988.
 - 35) Huang, K-S., Wallner, B.P., Mattaliano, R.J., Tizard, R., Burne, C., Frey, A., Hession, C., McGray, P., Sinclair, L. K., Chow, E. P., Browning, J.L., Ramachandran, K.L., Tang, J., Smart, J. E. and Pepinsky, R. B.: Two human 35kd inhibitors phospholipase A_2 are related to substrates of pp60 v-src and of the epidermal growth factor receptor/kinase. *Cell*, **46**; 191~199, 1986.
 - 36) Kristensen, T., Saris, C. J. M., Hunter, T., Hicks, L.J., Noonan, D.J., Glenney, J.R. and Tack, B.F.: Primary structure of bovine calpactin I heavy chain (p.36), a major cellular substrate for retroviral protein-tyrosine kinase: Homology with the human phospholipase A_2 inhibitor lipocortin. *Biochemistry*, **25**; 4497~4503, 1986.
 - 37) Weber, K., Johnsson, N., Plessmann, U., Van, P. N., Söling, H.-D., Ampe, C. and Vandezerckhove, J.: The amino acid sequence of protein II and its phosphorylation site for protein kinase C; the domain structure Ca^{2+} -modulated lipid binding proteins. *EMBO J.*, **6**; 1599~1604, 1987.
 - 38) Kretsinger, R.H. and Barry, C.D.: The predicted structure of the calcium binding component of troponin. *Biochem. Biophys. Acta*, **405**; 40~52, 1975.
 - 39) Kretsinger, R.H. and Creutz, C.E.: Consensus in exocytosis. *Nature*, **320**; 573, 1986.
 - 40) Iwasaki, A., Suda, M., Nakao, H., Saino, Y., Arai, K., Mizoguchi, T., Yoshizaki, H., Shidara, Y., Murata, M. and Maki, M.: Placental coagulation inhibitors, calphobindins I and II are members of calcium-phospholipid-binding protein family. Sixth Int. Symp. on Calcium-Binding Proteins in Health and Disease. Nagoya. July 24~28, 1988.
 - 41) Gerke, V. and Weber, K.: Calcium dependent conformational changes in the 36-kDa subunit of intestinal protein I related to the cellular 36-kDa target of rous sarcoma virus tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.*, **260**; 1688~1695, 1985.
 - 42) De Barun, K., Misono, K. S., Lukas, T. J., Mroczkowski, B. and Cohen, S.: A calcium-dependent 35-kilodalton substrate for epidermal growth factor receptor/kinase isolated from normal tissue. *J. Biol. Chem.*, **261**; 13784~13792, 1986.
 - 43) Kamps, M. P., Buss, J. E. and Sefton, B. M.: Rous sarcoma virus transforming protein lacking myristic acid phosphorylates known polypeptide substrates without inducing transformation. *Cell*, **45**; 105, 1986.
 - 44) Crompton, M. R., Moss, S. E. and Crompton, M. J.: Diversity in the lipocortin/calpactin family. *Cell*, **55**; 1~3, 1988.
 - 45) Hirata, F., Del Carmine, R., Nelson, C. A., Axelrod, J., Schiffmann, E., Warabi, A., De Blas, A. L., Nirenberg, M., Manganiello, V., Vaughan, M., Kumagai, S., Green, I., Decker, J. L. and Steinberg, A. D.: Presence of autoantibody for phospholipase inhibitory protein, lipomodulin, in patients with rheumatic diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **78**; 3190~3194, 1981.