多面的影響型 ATIII 欠乏症の分子機構解析

徳 永 文 稔*, 城 谷 裕 子*, 若 林 貞 夫*
小 出 武 比 古*Cellular Basis for the Pleiotropic Effects-Type Antithrombin
III DeficiencyFuminori TOKUNAGA*, Hiroko SHIROTANI*, Sadao WAKABAYASHI*,
and Takehiko KOIDE***Key words:** Antithrombin III, pleiotropic effects, secretion defect, pulse-chase analysis

はじめに

アンチトロンビン III (ATIII と略) は分子量 58,000 の 1 本鎖糖タンパク質で、血液凝固の制御機構において最も重要な機能を果たす血漿プロテアーゼインヒビターである。成熟ヒト ATIII は 432 アミノ酸から成り、N 末端側のヘパリン結合領域と C 末端側の Arg393-Ser394 を中心とするプロテアーゼとの反応領域の二つの機能ドメインから構成される¹⁾²⁾。ATIII の遺伝的欠乏症及び異常症は血栓塞栓症を主訴とし、分子レベルでは変異の起こる箇所により、異なる機能異常を示す特徴がある³⁾⁴⁾。現在、ATIII 欠乏症は、血中抗原量と機能活性が共に減少する I 型 (古典的欠乏症) と血中に機能不全分子が分泌される II 型に大別し、II 型はさらにヘパリン結合に異常が見られる HBS 型、反応部位が不全である RS 型と多面的影響 (Pleiotropic Effects) が認められる PE 型に分類することが提唱されている⁴⁾。PE 型とは、1 アミノ酸置換変異でありながら、機能異常と分泌異常の両方が認められるもので、図 1 に示すように、反応部

位よりやや C 末端側のストランド 1C 上における変異で、トロンビンとの相互作用やヘパリン結合能の低下などの機能不全とともに血中抗原量の減少が見られることから命名された⁵⁾。

これまで、ATIII 欠乏症の原因となる異常遺伝子の解析や、HBS 型や RS 型異常 ATIII のタンパク化学的解析は数多くあるが、血中抗原量減少のメカニズムの解明を試みた例はない。今回我々は、分泌異常を引き起こすと考えられる PE 型や I 型 ATIII 欠乏症の分子・細胞機構を解明する目的で、PE 型変異体の Oslo 型 (Ala404 → Thr)⁵⁾⁶⁾、Kyoto 型 (Arg406 → Met)⁷⁾、Utah 型 (Pro407 → Leu)⁵⁾⁸⁾ を、また I 型変異体の ΔGlu 型 (Glu313 の欠失)⁴⁾ をモデルとし、これらの変異 ATIII を BHK 細胞において発現させ、分泌様式と機能活性を正常型 (Wt) のそれと比較検討した。

1. PE 型、I 型変異 ATIII の分泌様式

まず、パルスチェイス法により⁹⁾、PE 型、I 型変異 ATIII の分泌様式を正常型と比較検討した。図 2 はその典型的な電気泳動パターンを、

* 姫路工業大学理学部生命科学科 [〒 678-12 兵庫県赤穂郡上郡町金出地 1479-1] : Department of Life Science, Faculty of Science, Himeji Institute of Technology, Harima Science Park City, Hyogo 678-12, Japan

図3はパルスラベルされた細胞内 ATIII 量を100%とした場合の, 各チェイス時における相対放射線量の解析結果を示す。その結果, 正常型 (Wt) では, 細胞内 ATIII 量がチェイスと共に減少するのに伴い, 培養液中に検出され, 2 時間後ではほぼ全分子の分泌が見られた。PE 型変異体のうち Oslo 型と Kyoto 型は, 正常型と同様

のパターンを示したが, Utah 型は, やや低分子に泳動されるとともに, 8 時間後でも約 50% しか分泌されず, 総放射線量も 8 時間で半減した。また, I 型欠乏症を呈する Δ Glu 型では, その分泌異常は Utah 型より顕著で, 細胞内 ATIII は Utah 型同様に減少するが, 培養液中への分泌を認めることはできず, 総放射線量も

Fig. 1 Mutation sites of pleiotropic effects-type ATIII deficiency. Reactive site (Arg 393-Ser 394) is boxed. Mutation sites, replaced amino acid, and antigen/activity percentages are shown⁴⁾.

Fig. 2 Pulse-chase analyses of the ATIII mutants in stable BHK cells. Stable BHK cells were pulse-labeled for 1 h with 50 μ Ci/ml [³⁵S] Met and [³⁵S] Cys and chased for 0, 0.5, 1, 2, and 4 h (for Wt and Oslo), or for 0, 1, 2, 4, and 8 h (for Utah and Δ Glu). The labeled ATIII in cell extracts and medium was immunoprecipitated and analyzed on 12.5% SDS-PAGE.

Fig. 3 Kinetic analyses of secretion. The amount of radioactivity in pulse-labeled cell extracts was taken as 100%, and relative radioactivities of intracellular and secreted fractions are shown by closed and open circles, respectively. The sum of the radioactivities of both fractions at each time is shown by closed squares.

著減した。以上の結果は、PE型に分類される変異体間には分泌様式に差があることを示しており、Oslo型とKyoto型は正常型と同様に分泌されるのに対して、Utah型は、 Δ Glu型ほどではないが、分泌異常が認められ、細胞内分解を受けることが示唆された。

2. PE型変異体の機能活性

次に、PE型変異 ATIII の機能活性を比較するため、ヘパリン結合能を交差免疫電気泳動法で調べた。図4に示すように、リコンビナントの正常型 ATIII は血漿由来 ATIII と同程度の移動度を示すことから、BHK細胞で発現した ATIII においてもヘパリン結合能が保持されていることが確認された。PE型変異 ATIII のうち Kyoto型と Utah型は、血漿 ATIII 及び正常型とほぼ同程度の移動度を示したが、Oslo型は移動度が低く、ヘパリン結合異常 (HBS) 型に属する Toyama型と同程度の移動度であった。これらの結果は、Kyoto型と Utah型は正常なヘパリン結合能を有するのに対し、Oslo型は

ヘパリン結合異常であることを示している。

さらに、PE型変異 ATIII の機能活性を比較するため、トロンビン-ATIII (TAT) 複合体の形成能を調べた。その結果、ヘパリン非存在下において、正常型は経時的に TAT 複合体が増加するが、Kyoto型は正常型の50%程度の速度で TAT が増加し、Utah型でもわずかながら TAT 複合体が見られた。しかし、Oslo型では TAT 形成は皆無であった (図5A)。一方、ヘパリン存在下では、正常型では2.5分後で即時性の TAT 形成が見られ、Kyoto型や Utah型でも少ないながらヘパリン依存性の TAT 形成が見られたが、Oslo型では全く TAT 形成は無かった (図5B)。

また、予備的データではあるが、純化リコンビナント ATIII を用い、トロンビンのアミダーゼ活性に対する阻害能を調べたところ、正常型 > Kyoto型 > Utah型 > Oslo型の順であり、TAT 形成能に対応していた。これらの結果は、PE型に分類される変異体間でも機能活性に差があることを示しており、Kyoto型は正常のヘ

Fig. 4 Heparin-binding properties of recombinant ATIII mutants. Ten μ l of normal plasma or 15 μ l of concentrated recombinant ATIIIs were electrophoresed on 1% agarose gel containing 20 U/ml heparin. Then, gels were transferred to the second gel plate containing 2% anti-human ATIII antiserum and electrophoresed at right angles. Immunoprecipitin-lines were detected by staining with Coomassie Brilliant Blue. A, plasma-derived ATIII; B, Wt; C, Kyoto; D, Utah; E, Oslo; and F, Toyama.

パリン結合能と正常ほどではないが抗トロンビン活性を有し, Utah 型も正常のヘパリン結合能と弱い抗トロンビン活性を有するのに対して, Oslo 型はヘパリン結合能も抗トロンビン活性も無い変異体であることが示唆された。

3. I 型変異 ATIII の分泌異常の細胞内機構

I 型 (古典的欠乏症) に分類される ATIII 欠乏症は, mRNA レベルの減少が疑われる遺伝子上での塩基の挿入・欠失によるフレームシフトの例が多い⁴⁾。しかし, Δ Glu 型は α_2 -plasmin

inhibitor Okinawa¹⁰⁾ 同様, 1 アミノ酸のインフレームでの欠失であり, mRNA 減少の可能性は低いと考えられる。前述のように Δ Glu 型は, PE 型変異体に比べ, 細胞内 ATIII が減少するものの分泌されず総量が著減するという顕著な細胞内分解のパターンを示した。また, α_1 -アンチトリプシンにおいて分泌に必要と報告された Pro429¹¹⁾ を停止コドンに置換した ATIII 変異体でも Δ Glu 型と同様の結果を得たことから¹²⁾, I 型 ATIII 欠乏症のうち幾つかは翻訳後に細胞内で分解される可能性がある。この細胞

Fig. 5 TAT complex formation ability of recombinant Wt and pleiotropic effects type mutants. ^{35}S -labeled ATIIIs of Wt, Oslo, Kyoto, and Utah were mixed with human α -thrombin in the absence and presence of 0.1 U/ml heparin. After incubating for indicated times at 37°C, samples were heat-inactivated followed by immunoprecipitation and subjected to SDS-PAGE analyses in the presence of 2-mercaptoethanol. The radioactivities of ATIII bands were quantified by the Bio-Imaging Analyzer. Taking the total radioactivity of ATIII at each incubation time as 100%, the complex formation of TAT in the absence (A) and presence (B) of heparin is shown. Wt, open circles; Kyoto, open squares; Utah, closed squares; and Oslo, closed circles.

内分解を明らかにするため、 ΔGlu 型をモデルに各種阻害剤の効果をパルスチェイス法で調べたところ、クロロキン、 NH_4Cl 、ロイペプチン、キモスタチンなどのリソソーム分解の阻害剤¹³⁾は、 ΔGlu 型の細胞内分解を全く阻害しなかったことから、非リソソーム領域での分解が示唆された。さらに、小胞体からゴルジ体への移行を遮断する brefeldin A¹⁴⁾によっても分解を抑制できないことから、 ΔGlu 型の大部分がゴルジ体以前で分解されることが示唆された。免疫蛍光染色においても ΔGlu 型は細胞一面に網目状に検出されることから小胞体に局在すると考えられる。さらに、正常型では生合成30分後から一部がエンドグリコシダーゼH耐性領域 (medial ゴルジ体以降) への移行が見られるのに対し、 ΔGlu 型 ATIII は全てエンドグリコシダーゼH感受性であることから、高マンノース型糖鎖をもち、小胞体から cis ゴルジ体に局在することが示唆された。次に、異常タンパク認

識に関わる分子シャペロンを同定するため、膜透過性架橋試薬である DSP [dithio bis (succinimidyl propionate)] を用い、細胞内 ATIII と近接するタンパクを調べたところ、 ΔGlu 型に特異的に 80kDa と 100kDa のタンパクが検出された。それぞれ、BiP, Grp94 と推定しているが、詳細を解析中である。

考 察

今回、血中抗原量の減少を伴う ATIII 欠乏症の細胞内分子機構を解析するため、変異体 cDNA を作製し、BHK 細胞を用いて異常 ATIII の分泌様式と機能を解析したが、その結果は、必ずしもすべてにおいて臨床報告とは一致しなかった。その原因については、例えば、ATIII-Kyoto 患者での血中抗原量減少との差異では、Kyoto 型は血中に分泌されるものの、血中で速やかに分解されるか、レセプターによるクリアランスが速いのではないかと推察して

いる。Oslo 型では同じ変異をもつ他家系においては 72%~100%の抗原量が報告されている⁴⁾ことから、Oslo 型は分泌正常・機能不全型に分類される変異体と考えている。また、Utah 型では、セルピンにおいて保存的な Pro407 の置換により立体構造に変化をもたらすため、部分的な細胞内分解が起こるものと考えられる。最近報告されたウサギ ATIII cDNA を用いた Utah 型変異体の解析もこれを支持している¹⁵⁾。つまり、PE 型 ATIII 欠乏症は、404-407 という近接したストランド 1C 上での 1 アミノ酸置換にもかかわらず、分泌機構と機能活性は個々において異なると結論される。一方、I 型欠乏症では顕著な小胞体内分解が見られたが、これは PIVKA-プロテイン C⁹⁾、 α_1 -アンチトリプシンの Z 変異体¹⁶⁾などの細胞内分解と多くの共通性がある。

このような細胞を用いた異常タンパクの分泌機構解析は端緒についたばかりであり、問題点も多い。例えば、多くの凝固系タンパクは肝臓で生合成されるが、肝細胞は遺伝子導入が難しいこと、そして内在的に肝細胞が分泌する因子と遺伝子導入した産物との区別が難しいことなどがある。また、初代肝細胞と HepG2 細胞などの株化肝細胞でも分泌に差異がある。従って、このような解析は他種他臓器由来細胞で行われることが多い。この場合、肝細胞と同じ分泌機構を保持しているのか、また適正な翻訳後修飾が施されているか疑問を抱くことが多いであろう。また、臨床検査結果と一致しない解析結果となることも少なくない。しかし、筆者らは、正常なりコンピナントタンパク質発現の研究によって翻訳後修飾の程度などがよく研究され、肝細胞からのものに近いものを分泌していると考えられる細胞系を用いることにより、分泌異常の細胞内機作の解析が可能であると考え。さらに、これらの基礎研究を通じ、これまで手が付けられていなかった遺伝的異常による血中抗原量減少のメカニズムについて多くの情報を得ることができ、病因の本質に迫ることができ、可能性が高いと考える。

謝 辞: 本シンポジウムに当たり会頭の岩永貞昭先生及びプログラム委員の諸先生に感謝し

ます。

文 献

- 1) 小出武比古: 制御因子の構造と機能「アンチトロンビン III」。In: 松田道生, 鈴木宏治, 編集, 止血・血栓・線溶。東京, 中外医学社, 1994, 192-199.
- 2) Potempa J, Korzus E, Travis J: The serpin superfamily of proteinase inhibitors: Structure, function, and regulation. *J Biol Chem* **269**: 15957-15960, 1994.
- 3) 小出武比古: 凝固制御異常「アンチトロンビン III」。In: 松田道生, 鈴木宏治, 編集, 止血・血栓・線溶。東京, 中外医学社, 1994, 374-381.
- 4) Lane DA, Olds RJ, Boisclair M, Chowdhury V, Thein SL, Cooper DN, Blajchman M, Perry D, Emmerich J, Aiach M: Antithrombin III mutation database: First update. *Thromb Haemostas* **70**: 361-369, 1993.
- 5) Lane DA, Olds RJ, Conard J, Boisclair M, Bock SC, Hultin M, Abildgaard U, Ireland H, Thompson E, Sas G, Horellou MH, Tamponi G, Thein SL: Pleiotropic effects of antithrombin strand 1C substitution mutations. *J Clin Invest* **90**: 2422-2433, 1992.
- 6) Bock SC, Silberman JA, Wikoff W, Abildgaard U, Hultin MB: Identification of a threonine for alanine substitution at residue 404 of antithrombin III Oslo suggests integrity of the 404-407 region is important for maintaining normal inhibitor levels. *Thromb Haemostas* **62**: 494, 1989.
- 7) Nakagawa M, Tanaka S, Tsuji H, Tanaka O, Ono T: Congenital antithrombin deficiency (ATIII Kyoto): Identification of a point mutation altering arginine-406 to methionine behind the reactive site. *Thromb Res* **64**: 101-108, 1991.
- 8) Bock SC, Marrinan JA, Radziejewska E: Antithrombin III Utah: Proline 407 to leucine mutation in a highly conserved region near the inhibitor reactive site. *Biochemistry* **27**: 6171-6178, 1988.
- 9) Tokunaga F, Wakabayashi S, Koide T: Warfarin causes a degradation of protein C precursor in the endoplasmic reticulum. *Biochemistry* **34**: 1163-1170, 1995.
- 10) Miura O, Sugahara Y, Aoiki N: Hereditary α_2 -plasmin inhibitor deficiency caused by a

- transport-deficient mutation (α_2 -PI-Okinawa) : Deletion of Glu137 by a trinucleotide deletion blocks intracellular transport. *J Biol Chem* **264** : 18213-18219, 1989.
- 11) Brodbeck RM, Brown JL : Study of the role of proline 391 and a highly conserved sequence in the carboxyl-terminal region of members of the serpin family in the secretion of α_1 -proteinase inhibitor. *J Biol Chem* **269** : 17252-17256, 1994.
- 12) 城谷裕子, 徳永文穂, 若林貞夫, 小出武比古 : 遺伝的 ATIII 欠乏症の哺乳類細胞を用いた分子病因解析. *血栓止血誌* **5** : 330, 1994.
- 13) Seglen PO, Grinde B, Solheim AE : Inhibition of lysosomal pathway of protein degradation in rat hepatocytes by ammonia, methylamine, chloroquine and leupeptin. *Eur J Biochem* **95** : 215-225, 1979.
- 14) Misumi Y, Misumi Y, Miki K, Takatsuki A, Tamura G, Ikehara Y : Novel blockade by brefeldin A of intracellular transport of secretory proteins in cultured rat hepatocytes. *J Biol Chem* **261** : 11398-11403, 1986.
- 15) Schefffield WP, Castillo JE, Blajchman MA : Intracellular events determine the fate of antithrombin. *Blood* **86** : 3461-3467, 1995.
- 16) McCracken AA, Kruse KB, Brown JL : Molecular basis for defective secretion of the Z variant of human α_1 -proteinase inhibitor : Secretion of variant having altered potential for salt bridge formation between amino acids 290 and 342. *Mol Cell Biol* **9** : 1406-1414, 1989.
-