血液中のメイゾプロテアーゼ

— その特色, 構造, 機能 —

岩 永 貞 昭 Sadaaki IWANAGA

加 藤 久 雄 Hisao KATO

森 田 隆 司 Takashi MORITA

大阪大学蛋白質研究所

生体に広く分布するプロテアーゼは、酵素一般の中でも今日もっとも研究の進んだ生体触媒の一つであろう。その研究の流れをみると、いわゆる酵素の分子構造および反応機作、さらに分子進化などの基礎研究において、プロテアーゼの果たしてきた役割が如何に大きいかを知ることができる。プロテアーゼで直ちに思いおこすのは、食物の消化に役立つトリプシンやペプシンなどであり、また従来から肉食品の軟化やミルクカゼインのチーズ化など食品加工上活用されてきたパパイン、レンニンであろうが、一方生体には本来こうした消化酵素とは生理的意義の異なるプロテアーゼが体液、組織などに広く含まれている。細胞内プロテアーゼのカテプシンや血液中のプロテアーゼが、そうした一群に包括されるものである。とくに、血中プロテアーゼの多くは、血液凝固-線溶系はもとより、補体系やキニン生成系において、重要な役割を果たしつつ生体の防禦機構に関与する点で注目されるものである⁽¹⁻⁶⁾。近年になって、こうしたプロテアーゼの精製、分離が進み、その構造と機能との関連が分子レベルで明らかになるにつれて、いわゆる消化プロテアーゼにはない新しい特色が見いだされてきている。

本稿では、主として血中のプロテアーゼ群に焦点をあわせ、それらの特性、構造などに関する研究の現状を解説する。

1. メイゾプロテアーゼとは

生体におけるプロテアーゼの起源的広がり、ほかの酵素に類をみないほど多種多様であることは言うまでも

ない。プロテアーゼである限り、ペプチド結合(-NHCO-)を水解する作用をもつことは当然であるが、その作用様式は種類によって非常に異なっている。周知のごとく、プロテアーゼはエンドペプチダーゼとエキソペプチダーゼに大別され、さらに酵素起源や細胞内外の局在性、基質特異性などから細かく類別されてきた。また、近年、数多くのプロテアーゼの全1次構造や触媒活性基、反応機作が解明されるに及んで、今日ではセリンプロテアーゼ(トリプシン、キモトリプシンなど)、チオールプロテアーゼ(パパイン、プロメラニンなど)、金属プロテアーゼ(サーモライシン、エキソペプチダーゼなど)、酸性プロテアーゼ(ペプシン、レンニンなど)など、酵素分子のもつ触媒基の種類によって分類する方法が一般に用いられている。

さて、ここで述べるメイゾプロテアーゼとはどのような酵素であろうか。

メイゾとはギリシャ語で“大きな”という意味をもつ。したがって、分子量の大きいプロテアーゼの総称と考えてほしい*。一般に、プロテアーゼの分子量は小さく、かつ単純蛋白である場合が多い。たとえば、トリプシンやエラスターゼの分子量は 25,000 であり、またペプシンやパパイン、カルボキシンペプチダーゼAなどでも 40,000 以下である。また、これまで構造の明らかにされた多数の細菌プロテアーゼの分子量も 30,000 前後である。それに対して、血中プロテアーゼのほとんどは分子量 50,000 以上で、かつ糖蛋白質からなっている。また、その基質特異性が厳密であるばかりか、固有の蛋

図 1 血液凝固系および線溶系、キニン生成系、補体系に含まれる各成分の相互関係

ここで示した凝固系は内因系の過程であって、外因系の場合はⅦ因子と組織因子が相互作用してⅩ因子を活性化する。

白質に作用する著しい特徴がある。血中ではすべて不活性型(チモゲンないしプロ酵素)の状態が存在し、多くはプロテアーゼによる限定分解をとまって活性化され、活性セリン酵素に変換する。ある種のプロ酵素は、異種表面にふれたり、異種蛋白と複合体を形成するだけで活性型になるものもある。さらに、プロ酵素から活性酵素への変換がリン脂質ミセル中で起こることもあり、またある補酵素的な機能をもつ蛋白質と Ca^{2+} の存在下で活性化の反応速度が増幅されるなど、ほかのプロテアーゼにみられない特異的な性質をもつ。

こうしたことは、一方でメイズプロテアーゼの機能と

密接に関連しており、それが血中の複合プロテアーゼ系を形成する要素となっている。血液凝固-線溶系や補体系、キニン生成系などに含まれるプロテアーゼの多くが、有機的に相互に連鎖反応するのも、こうした性質をもつことによるのであろう。図 1 は、血中の複合プロテアーゼ系に含まれる蛋白因子相互の連関を概略的にまとめたものである。このうち、メイズプロテアーゼと見なせるのは、血液凝固系ではⅫ**因子とⅪ因子、Ⅹ因子、Ⅹ因子、プロスロンビン、Ⅶ因子、Protein C が、また線溶系ではプラスミノゲン活性化因子とプラスミノゲンが、キニン系ではプレカリクレインが、一方補体系では

* 1976年、京都での国際血液学会の際、血液凝固因子の命名委員会において Jackson 博士(ワシントン大学)より、ある種のプラスミンおよびプロスロンビン誘導体に対してメイズプラスミンおよびメイズスロンビンなどと命名したいと提唱され

たが、ここでは分子量の大きいプロテアーゼ一般に用いる。

** 1959年以来、血液凝固因子は統一的にローマ数字で呼ぶことが決められている。なお、プロスロンビン(Ⅱ因子)とフィブリノーゲン(Ⅰ因子)は一般に慣用名が用いられている。

C1s と C1r, C2, C3, C5 などが相当する。なお、補体系には alternative pathway を構成する系があって、そこにも幾つかのメイズプロテアーゼが存在するが、それらの酵素化学的性質はまだほとんど明らかでない⁽⁷⁾。いずれにしても、血中には分子量の大きい 15 種以上のプロテアーゼがすべて不活性の状態に含まれており、これらプロテアーゼ前駆体の活性化の機作も、脾臓由来のチモーゲンとは著しく異なっている。

2. 血中の複合プロテアーゼ系の活性化

2-1. 固相活性化反応

血液凝固がガラスやカオリンなど異種表面にふれると惹起されることは、かなり以前から知られていた。こうした固相での反応が、ある種の蛋白因子を介することがはっきりしたのは、Ratnoff (1956 年) らがハゲマン氏素質を発見して以後のことである。彼らは、たまたまハゲマン氏の血液のカオリンによる凝固反応が異常に遅れることを見だし、それが新しい因子の欠損症であることを明らかにした。以来、その欠損因子はⅫ因子と呼ばれ、多くの研究者によってこの因子が異種表面で活性化される本体であることが実証された⁽⁸⁾。今日では、図 1 に示すように、血液凝固系のⅫ因子やキニン生成系のプレカリクレイン、さらに線溶系のプラスミノゲンプロアクチペーターの活性化に働くことが知られている。

さて、Ⅻ因子は固相で活性化される奇妙な性質をもつので、不活性型のままで分離することは永らく困難をきわめていたが、最近になって漸く高純度標品の調製が可能となった*。Ⅻ因子は分子量約 80,000 の糖蛋白質で、1 本のポリペプチド鎖からなる(図 2)⁽⁹⁾。その活性化は、コラーゲンやリポ多糖、セルローズ硫酸、カラゲニン、カオリンなど、主に負電荷をもつ固相表面で起こるとされ、ポリリジンやプロタミンなど強塩基性の物質で活性化が阻害される⁽⁹⁾。Ⅻ因子の活性型のⅫ_aは、TAME*-エステラーゼ活性を示すが、血中の蛋白基質はⅫ因子とプレカリクレインなどで、それらの活性化にはⅫ_aによる限定分解がともなう。ここでは、もっともよく使われ

図 2 Ⅻ 因子のポリペプチド鎖構成と水解位置
ブロック内の数値は各断片の分子量を表わし、また *Ser は活性セリン残基を示す。

るカオリン ($\text{H}_2\text{Al}_2\text{Si}_2\text{O}_8 \cdot \text{H}_2\text{O}$) によるⅫ因子の活性化機構について述べる。

Ⅻ因子とカオリンとを混合すると吸着され、それに正常血漿やハゲマン欠損血漿を加えると凝固時間が短縮する。この場合、カオリン表面でⅫ因子がⅫ_aに変化したのか、あるいは血漿を加えたために活性化が起こったのか明らかでないが、精製Ⅻ因子は異種表面にふれると、その CD スペクトルが変化するとともに、TAME-エステラーゼ活性を示すようになる^(9,12)。この酵素活性は、カオリン吸着後、Ⅻ因子の断片化とともに遊離される分子量約 28,000 の活性断片(Ⅻ_a-fragment)によるもので、それには強いプレカリクレイン活性化作用が見いだされている⁽¹¹⁾。Ⅻ因子のカオリン表面での断片化では、少なくとも 3 個所のペプチド水解がポリペプチド鎖上で起こると言われる。すなわち、図 2 に示すごとく、最初 site 2 の水解により分子量 28,000 の断片が遊離され、さらに site 3 が切断されてⅫ_a-fragment になる⁽¹⁰⁾。カオリン表面には分子量約 50,000 の断片が残るが、反応が進むに従って site 1 の水解が起こり、分子量 40,000 と 12,000 の断片に分解される。こうしたⅫ因子の断片化が、カオリン表面での高次構造変化による自己分解なのか、あるいはⅫ因子以外のものによるのかはなお未解決であるが、Ⅻ因子のⅫ_aへの変換にカリクレインが関与することは確からしい。

1965 年にその凝固異常から発見されたフレッチャー氏素質は、1973 年になってプレカリクレイン欠損症であることが明らかにされた⁽¹³⁾。このことは、プレカリクレインが正常の血液凝固に要求されることを示すもので、事実 Cochrane らは、カリクレインにⅫ因子活性化作用のあることを見だし、プレカリクレインの凝固系への役割は、その活性型によるⅫ因子の positive feedback activation であるとした⁽¹⁴⁾。彼らによれば、Ⅻ因子にカリクレインを作用させると、溶液中でも分子量 28,000 と 40,000, 12,000 の 3 種の断片が生成され、そのうち 28,000 の断片に著しいプレカリクレイン活性化能がある。

* 最近の私信によると、米国の Davie らとデンマークの Magnusson らのグループによって 1 次構造の研究が開始されたと聞く。

** α -N-toluenesulfonyl-L-arginine methylester

という。また、カオリンにⅫ因子を吸着させたままカリクレインないしプレカリクレインを加えると、Ⅻ_a-fragment の溶液中への遊離が著しく促進される。

こうして、カリクレインによるⅫ因子の固相表面での positive feedback activation が確認されるにいたったが、ごく最近、この反応に、さらにもう1つの蛋白因子が必要であることがわかった。その端緒になったのは、キヌノーゲン欠損症の発見である^(15,16)。この欠損症は、1974年に米国で見いだされて以来相次いで報告され、現在までに6例知られている。いずれの血漿もカオリンを介しての凝固時間が遅れており、また血中キニンの生成もほとんどみられない。キヌノーゲンは、もともと生理活性ペプチドのブラディキニン (Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg) の前駆蛋白質として見いだされたもので、現在分子量の異なる2種類——高分子および低分子キヌノーゲン——が同定されている⁽⁶⁾。キヌノーゲン欠損血漿には高分子型のものは含まれないが、低分子型のものは正常の50%に達するものもあり、常に少量存在する⁽⁸⁾。このことは、高分子型のキヌノーゲンのみが血液凝固に関与することを示唆するもので、事実、ヒトとウシ血漿から分離した高分子型と低分子型とでは、前者だけがキヌノーゲン欠損血漿のカオリン凝固時間を回復させる⁽¹⁷⁻²⁰⁾。

ところで、Ⅻ因子の固相活性化反応に果たすキヌノーゲンの役割はどのように考えられるのであろうか。キヌノーゲンはカリクレインのような酵素活性を有しない。したがって、Ⅻ因子の断片化には働きえないが、少なくとも次の3つの反応に関与することがCochraneのグループによって報告されている⁽²¹⁾。

- $$\begin{aligned} (1) \quad & \text{Ⅻ因子-カオリン} \xrightarrow[\text{カリクレイン}]{\text{高分子キヌノーゲン}} \text{Ⅻ}_a\text{-カオリン} \\ (2) \quad & \text{プレカリクレイン} \xrightarrow[\text{Ⅻ}_a\text{-カオリン}]{\text{高分子キヌノーゲン}} \text{カリクレイン} \\ (3) \quad & \text{Ⅻ因子} \xrightarrow[\text{Ⅻ}_a\text{-カオリン}]{\text{高分子キヌノーゲン}} \text{Ⅻ}_a \end{aligned}$$

いずれも固相表面での活性化反応に要求されるが、(1)と(2)の反応は、先に述べたカリクレインによるⅫ因子の positive feedback activation を一層充める作用として機能する。注目されるのは、(3)の反応で、カオリン活性化後のⅫ_aによるⅫ因子のⅫ_aへの変換速度を高分子キヌノーゲンが著しく亢進する点である。これより

先、Schiffman らも、精製Ⅻ因子の活性化に血漿中の補助因子が必要で、それが高分子キヌノーゲンにほかならないことを明らかにした⁽²²⁾。したがって、Ⅻ因子の活性化に、高分子キヌノーゲンが補酵素的に作用することはほとんど疑いないが、これら蛋白因子の固相表面での相互作用についてはなお不明な点が多い。図1に示したごとく、Ⅻ因子はさらにプラスミノノーゲンの活性化反応にも関与するが、そこでも高分子キヌノーゲンが要求されるらしい。なぜなら、キヌノーゲン欠損血漿のカオリンを介しての線溶系の活性化はきわめて遅く、高分子キヌノーゲンの添加で正常に回復するからである。

以上のように、血液凝固-線溶系およびキニン生成系の開始反応は、いずれもⅫ因子の異種表面での活性化が発端になるが、これと似たような現象は、抗原抗体複合体による補体第1成分(C1)の活性化においても見いだされる。

補体系は、11種類の蛋白成分から構成され、凝固系の場合と同様にプロテアーゼ前駆体の活性酵素への変換による連鎖反応で成立しており、最終的には細胞膜の破綻を招く⁽⁷⁾(図1)。補体系の最初の活性化は、抗原抗体複合体に補体成分が吸着することによって惹起される。補体系には、このほかにイヌリンなど、ある種の多糖体で活性化される経路があり、これは alternative pathway と呼ばれる⁽⁷⁾。抗原抗体複合体と反応するのはC1成分で、それは3種の蛋白成分のC1qとC1r、C1sが会合した複合体からなっている。このうち、C1qがIgGやIgM抗体のFc領域に結合すると、補体系の活性化を誘起することになる(図1)。

C1qは、6つのサブユニットで構成される分子量約400,000の巨大分子で、ヒドロキシプロリンやヒドロキシリジンなどコラーゲンに見いだされるアミノ酸を含み、かつそのアミノ酸配列上には部分的にコラーゲン類似の構造が存在する⁽⁷⁾。一方、C1rは、Cooperら⁽²³⁾によると、分子量90,000の2本鎖ポリペプチドがS-S結合で連結したもので、各鎖が限定分解されると活性型のC1rに変換するという(図4)。C1rはTAME-エステラーゼ活性を示し、C1sを限定分解してC1sに活性化する。活性型のC1rとC1sはともにセリンプロテアーゼの一種で、C1sについては、その酵素分子のN末端側や活性セリン残基周辺のアミノ酸配列がトリプシンの場合と酷似することがすでに証明されている^(24,25)。

このように、C1r と C1s はいずれもプロテアーゼ前駆体であるが、C1q には酵素活性はまったく見いだされていない。したがって、C1r の活性化は、C1q が抗原抗体複合体に結合することによって C1r の高次構造を変化させるとともに触媒活性基の形成をうながし、その自己分解によって C1r に変換するものと考えられている。また、C1r は 2 つの酵素分子が S-S 橋で結ばれた形なので、一方の高次構造変化によって活性基が露出し、それが他方の分子に作用して活性型になるとも考えられよう。しかし、この C1r の活性化機作については異論も多く、C1r は本来活性型で、ある種のプロテアーゼインヒビターと複合体を形成しており、それが C1q の抗体への結合によって解離され C1r になるという考えもある⁽²⁶⁾。

いずれにしても、C1q と C1r、C1s の相互作用は、先に述べた高分子キノーゲンとⅧ因子、プレカリクレイン（またはⅩ因子）の場合とよく似た関係にあり、両者とも不溶性物質の表面で活性化されることに変わりない。今後、さらに各蛋白成分の構造レベルでの解析が進むにつれて、異種表面での分子間相互作用の問題が一層明白になるものと考ええる。

2-2. リン脂質ミセル中での活性化反応

血液凝固因子のうち、プロスロンビンとⅩ因子、Ⅸ因子、Ⅶ因子などのプロテアーゼ前駆体は、リン脂質ミセル内で活性化される(図1)⁽²⁷⁾。これら4因子は、BaSO₄ に特異的に吸着される点や、肝での生合成にビタミンK

が要求されるなど、相互によく似た性質をもち、プロスロンビン一族とも呼ばれている⁽⁸⁻⁹⁾。また、この一族の活性化にはⅤ因子とⅧ因子(抗血友病因子)も関与するが、両者とも酵素ではなく、前者はプロスロンビンの、後者はⅩ因子の活性化に要求される。これらはすべての哺乳動物の血中に含まれており、ごく最近プロスロンビンとⅩ因子については全1次構造がほぼ決定された^(28,29)。また、Ⅸ因子とⅦ因子についても構造研究が進みつつあり、4種のアミノ酸配列に相同性のあることが指摘されている⁽³⁰⁾。これは、豚のトリプシンやキモトリプシン、エラスターゼ、カリクレインの1次構造が相互に酷似することと一致する。

プロスロンビンは分子量 72,000 で、582 残基のアミノ酸からなる糖蛋白質である。このプロ酵素は1本のポリペプチド鎖からなるが、図3に示すように、X_aによる活性化の際、site 2 と site 3 が切断されてα-スロンビンに変換する。site 1 の限定分解はスロンビン自身によるものであって、活性が出現するためには site 3 の Arg-Ile 結合が切断されることが必須である。一方、ある種の蛇毒(*Echis carinatus*) から分離した activator を用いると、site 3 のみが切断され、TAME-エステラーゼ活性をもつメイゾプロテアーゼになる。このもの自身には、α-スロンビンのようなフィブリンクロットを生成する活性はないが、自己触媒反応で site 1 と site 2 を水解しつつ、α-スロンビンに移行する⁽³²⁾。プロスロンビン分子は、X_aによる限定分解から推定して3つの

図3 プロスロンビンおよびプラスミノーゲンのポリペプチド構成と活性化される際に水解される位置
 ■: セリンプロテアーゼ領域, CHO: 糖鎖, プレスロンビン: site 3 が切断されていない α-スロンビン前駆体。

表 1 血液中のプロテアーゼの諸性質

	プロテアーゼ前駆体			活性酵素のポリペプチド鎖				活性化の際に遊離される ペプチドの分子量
	分子量	アミノ酸 残 基 数	糖含量 (%)	N 末 側		C 末 側		
				分子量	アミノ酸 残 基 数	分子量	アミノ酸 残 基 数	
ヒトプラスミノーゲン	92,000	810		59,000	510	25,000	230	8,000
ウシプロスロンビン	72,000	582	13.7	5,721	49	29,683	259	{17,533 (profragment 1) 12,775 (profragment 2)}
ウシX因子	55,000	447	9.6	17,000	140	27,000	307	9,490
ウシIX因子	55,400	*370	25.8	16,600	*130	27,300	*220	8,900
ウシVII因子	53,000	*430	9.1	23,500	*170	29,500	*230	
ウシ Protein C	56,000	*443	14.9	21,000	*163	35,000	*266	

* これらの数値は、全アミノ酸配列が明らかにされていないので正確ではない。

ドメイン、すなわち profragment 1, profragment 2, α -スロンビンから構成されると考えられる。分子のN末側に相当する profragment 1 と 2 には、アミノ酸配列上の相同部分が見いだされ、さらに3つのS-S橋に囲まれたループ状の領域 (Kringle region) が1個所ずつ存在する⁽²⁸⁾ (図3)。この Kringle region の機能については現在まったく不明であるが、後述するごとくプラスミノーゲンのN末領域にも含まれている。

一方、X因子およびIX因子、VII因子はいずれも分子量約 55,000 の糖蛋白質 (表1) で、三者とも活性化され

るとL鎖とH鎖からなる2本鎖構造をとり、H鎖内に活性セリン残基が存在する⁽³¹⁾。また、活性化の際、X因子とIX因子からは分子量約 10,000 の内部鎖ポリペプチドが遊離される。したがって、これらのセリンプロテアーゼは、活性化後2つのドメインを構成することになるが、プロスロンビンの場合と異なり、C末側 (H鎖) の酵素分子はS-S結合によってN末側のドメインに結ばれている (図4)。なお、X因子だけは前駆体のままでも2本鎖構造を示すが、もともとは1本鎖で精製操作中に変化したものと推定されている。また、最近これら4種のプロ

図 4 血液中の各種のメイソプロテアーゼのポリペプチド鎖構成

図 6 ウシ血液から分離された凝固因子および Protein C の N 末端構造
 Gla : γ-カルボキシグルタミル残基

スロンビン一族と同類と考えられるもう 1 つの蛋白質が見いだされたが、これも 2 本鎖からなり、かつ C 末側のドメインに DEP のとり込まれる活性セリン残基が含まれる (表 1)。この蛋白質は、いまのところ凝固因子のもつ酵素活性を示さないため Protein C と呼ばれている⁽³³⁾が、その蛋白化学的性状は X 因子や VII 因子と似ており、生合成もビタミン K 依存性のものと言われる⁽³⁴⁾。

こうしたプロスロンビン一族に属するメイゾプロテアーゼでもっとも興味深い点は、いずれの蛋白分子の N 末領域にも天然では新しいアミノ酸の γ-カルボキシグルタミン酸 (Gla) が含まれることである⁽³⁵⁾ (図 5, 6)。VII

図 5 γ-カルボキシグルタミル残基

因子についてはまだ実証されていないが、他の 4 つの因子には N 末端から 40 残基以内に 10~11 個の Gla があり、その周辺構造の相同性も高い (図 6)。この Gla は、クマリン系薬剤の投与でビタミン K 欠乏にした動物の血中に、通常の条件下では活性化されない異常プロスロンビンが蓄積することが見いだされ、その後正常および異常プロスロンビンに対する構造上の比較から発見されたものである⁽²⁷⁾。異常のものの N 末側に Gla が存在しないことは言うまでもない⁽³⁶⁾。したがって、正常プロスロ

表 2 補助因子によるプロスロンビン活性化速度の増幅効果⁽³⁸⁾

基 質	補助因子	活性化の速度比
1. プロスロンビン	X _a , Ca ²⁺	1
2. プロスロンビン	X _a , Ca ²⁺ , PL	50
3. プロスロンビン	X _a , Ca ²⁺ , V _a	350
4. プロスロンビン	X _a , Ca ²⁺ , V _a , PL	19,000

プロスロンビン 2 については図 3 を参照。PL : リン脂質, V_a : V 因子の活性型, X_a : X 因子の活性型。

ビンは肝で生合成される過程には、Glu 残基を Gla に変換するビタミン K 依存性の新しい炭酸固定の酵素系があり、目下その反応機構が多数の研究者によって追求されている⁽³⁷⁾。

さて、X_a によるプロスロンビンの活性化の速度は、Ca²⁺、リン脂質、および V 因子の存在下で著しく促進される。たとえば、X_a およびプロスロンビン、Ca²⁺ からなる反応液の活性化速度を 1 としたとき、リン脂質を加えると速度は 50 倍上昇する。一方、V 因子 (活性型, V_a) を加えた場合は約 350 倍となり、さらに両者を混合した完全系では相乗的に作用し、約 20,000 倍も活性化速度が充まる (表 2)。こうした増幅効果は、リン脂質ミセル内での活性化反応の著しい特徴で、この反応の素過程には Ca²⁺ を介してのプロスロンビンとリン脂質の相互作用が考えられている。すなわち、Barton ら⁽³⁹⁾および Hanahan ら⁽⁴⁰⁾は、Ca²⁺ の存在下でプロスロンビンとリン脂質が高分子複合体を形成し、それが EDTA によって可逆的に解離することを認めた。その後、Mann らは Ca²⁺ の結合部位を調べ、それがプロスロンビンの N 末領域に集中して存在することを見いだした⁽⁴¹⁾。また、Jackson らも、リン脂質ミセルとプロスロンビン由

* その後、Gla はヒト、ウシ、トリ、メカジキなどの脛骨や歯の象牙質に存在する蛋白質にも見いだされている⁽⁴⁰⁾。

来の各ドメインとの相互作用の研究から, profragment 1 のみがリン脂質との複合体形成に関与していることを明らかにした⁽⁴²⁾. したがって, この複合体形成は, プロスロンビンのN末端側に局在する10残基のGlaにCa²⁺がキレート結合し, その部位を介してリン脂質と静電的に作用する機構が推定される. ビタミンK欠乏食で生産される異常プロスロンビンに, リン脂質との複合体形成能がないのはそのためである.

一方, プロスロンビンの活性化において, リン脂質と同様な増幅効果をもたらすV因子の果たす役割についてはまだ曖昧な点が多い. V因子は分子量約400,000の糖蛋白質といわれるが, その精製はきわめて困難で, 物質レベルの研究がもっとも遅れている凝固因子の1つである. しかし, V因子もリン脂質との間に複合体を形成することは実証されており⁽⁴¹⁾, またプロスロンビンとは内部鎖領域(profragment 2)でCa²⁺を介して相互作用する^(41,43). 図7の実験が示すように, profragment 1を除いたプレスロンビン1でも, α-スロンビンへの活性化に際してV因子やCa²⁺, リン脂質の顕著な増幅効果がみられるからである. V因子とリン脂質との複合体形成はCa²⁺不在下でも起こるが, 最近 Colman らは, V因子をあらかじめガラクトース酸化酵素で処理すると, リン脂質との相互作用が消失することを見だした⁽⁴⁴⁾. したがって, この複合体形成にはV因子の糖鎖が関与することになるが, 同じような現象はコラーゲンによる血小板凝集⁽⁴⁵⁾や von Willebrand 因子 (Ⅷ因子のサブユニットの1つ)⁽⁴⁶⁾の機能発現の際にもみられるので, 糖鎖を

図7 V因子存在下でのX_aによるプレスロンビン1の活性化⁽⁴¹⁾

反応条件: プレスロンビン1(4nmole)およびX_a(0.5単位/ml), V_a(0.01単位/ml)の反応液に, Ca²⁺(6mM)とリン脂質(40μM)を加えた場合(○), Ca²⁺(6mM)のみの場合(△), リン脂質(40μM)のみの場合(●).

介してのリン脂質との相互作用も充分考えられることである.

なお, プロスロンビンの活性化に要求されるリン脂質成分についてはこれまでまったくふれなかったが, その組成がいろいろなミセル構造の形成に重要であり, かつミセルの性質如何が増幅効果に影響を及ぼすことは言うまでもない. Barton ら⁽⁴⁰⁾の実験によると, ホスファチ

図8 リン脂質ミセル内でのプロスロンビン複合体の模式図⁽⁴⁹⁾

ジルコリン (PC) 単独のミセルや PC とホスファチジルエタノールアミン (PE) の混合ミセルでは、プロスロンビンと複合体を形成しないが、ホスファチジルセリン (PS) と PC の等モル混合ミセルはプロスロンビンをもっとも多量に結合すると言う。ホスファチジン酸 (PA) のみでも、また PA と PS の混合物でも増幅効果はみられる。さらに、Hanahan ら⁽⁴⁷⁾ は、各種の合成リン脂質を用いて、 Ca^{2+} 存在下でのプロスロンビンおよび X 因子、V 因子の複合体形成を検討し、Barton ら⁽⁴⁸⁾ の結論を再確認するとともに、脂肪鎖の短いリン脂質には複合体形成能力がなく、長鎖の PS と PE に相当するものに最大結合能力のあることを明らかにした。このことは、複合体形成には単にリン脂質ミセル表面の負電荷のみならず脂肪鎖のもつ疎水結合が重要であることを示唆する。血中では実際どのようなリン脂質ミセルが関与しているのか明らかでないが、少なくとも血小板由来のリン脂質がプロスロンビン族の活性化に役立っており、血小板減少症の凝固異常はそれで説明されている。

以上のごとく、プロスロンビン族のリン脂質ミセル中での活性化反応は、いずれも各因子の N 末端領域にある $\text{Gla}-\text{Ca}^{2+}$ を介しての複合体形成がその素反応になるもので、それが血中での複合プロテアーゼ系の組織化と濃縮、連鎖反応しやすい場に役立つものと考えられる (図 8)。また、V 因子と VIII 因子の機能についてはなお判然としない面が多いが、それぞれの相互作用を通じて X 因子やプロスロンビンの高次構造を変化させ、限定分解の速度を増大しているのであろう。次項のストレプトキナーゼによるプラスミノゲンの活性化機作がそれに当るものと思われる。

2-3. 非酵素的な活性化反応

本項では、プロテアーゼ前駆体の活性化にペプチド切断をとまなわない例について述べる。線溶系の主要蛋白質であるプラスミノゲンは、1 本のポリペプチド鎖からなる分子量約 90,000 の糖蛋白質で、ウロキナーゼまたはストレプトキナーゼ (SK) によって活性化され^(50,51)、プラスミンに変換する (図 3)。プラスミンは H 鎖と L 鎖のポリペプチドからなるので、この活性化はいずれも前駆体の C 末端側にある Arg-Val 結合の切断をとまなうことになるが、SK による活性化の過程はウロキナーゼの場合と本質的に異なっている。ウロキナーゼは、合成

基質の TAME や acetylGly-Lys EE を水解するものの、SK にはこうしたプロテアーゼ活性がまったくないからである。したがって、SK によるプラスミノゲンの活性化は、SK-プラスミノゲン複合体の形成を介して起こると考えられており、事実、1:1 のモル比にある複合体の存在が実証されている⁽⁵¹⁾。注目される点は、この複合体が活性セリン残基を特異的に修飾する DFP や NPGb* をとり込み、また上述の合成基質を水解するにもかかわらず、プラスミノゲン分子内の Arg-Val 結合は切断されてないことである⁽⁵²⁾。このことは、複合体形成によってプラスミノゲン分子中の活性セリン残基周辺の構造が変化し、その結果として酵素活性が現われたと考えざるをえない⁽⁵³⁾。これと同じ現象が、Staphylocoagulase によるプロスロンビンの活性化においてもみられる⁽⁵⁴⁾。

前述したごとく、プロスロンビンは X_a によって断片化されつつ α -スロンビンを放出するが、Staphylocoagulase では単に複合体を形成するだけで、スロンビン活性を示すようになる。この複合体の分子量は約 130,000 で、両者の分子量を加算した値に一致し、また複合体のアミノ酸組成や免疫化学的性質、さらにその N 末端分析の結果からも、プロスロンビンの断片化がまったく起こっていないことが証明された。臍のチモゲンの活性化においては、その母体蛋白の N 末端側の Arg-Ile (Val) 結合が切断され、新たに出現した N 末端 Ile (Val) の α - NH_2 基が活性セリン残基の近くにある Asp の β -COOH 基と塩類様結合をつくり、それがセリンプロテアーゼの触媒活性基の形成に重要であることはよく知られている⁽¹⁾。上記の例は、いずれもこうした機作によらないので、異種蛋白との複合体形成によって酵素分子側にどのような高次構造上の変化をもたらしただか興味深い。

3. メイゾプロテアーゼの特色

これまで述べてきたように、血中プロテアーゼのほとんどは、分子量が大きく、かつ活性化されたあと 1 個の S-S 橋で結ばれた 2 本鎖ポリペプチド構造をとる (図 3, 4)。また、活性セリン残基をもつ酵素領域は、いずれも母体蛋白の C 末端側に位置するポリペプチド鎖上にあり、それらの全アミノ酸配列も構造の決定された α -スロンビン、X 因子、あるいはプラスミンをみる限り、ト

* *p*-Nitrophenyl-*p*'-guanidinobenzoate

リブシンの構造と酷似する。したがって、メイゾプロテアーゼはトリブシンに余分のポリペプチド鎖をS-S結合で連結したものと考えられよう。

図3と図4は、これまで明らかにされた血中プロテアーゼのそれぞれのポリペプチド鎖構成をまとめたものである。注目したいのは、各プロテアーゼのN末端側を占める余分のポリペプチド鎖で、この領域に Ca^{2+} やリン脂質はもとより、V因子、Ⅷ因子、あるいは異種表面、抗原抗体複合体などと相互作用する構造ドメインが内蔵されていることである。また、最近全構造の決定されたプロスロンビン⁽²⁸⁾やプラスミノゲン^{*(55-57)}のN末端領域には、Kringle regionが前者では2箇所、後者では5箇所あって、それらにアミノ酸配列上の相同性が多数見いだされており、さらに目下構造の明らかにされつつあるX因子とⅩ因子にもそれらしいregionがN末端側に示唆される(図3)。こうした結果は、Kringle regionの重要な機能を予測させるもので、そうした構造ドメインをもつことがメイゾプロテアーゼの顕著な特質の1つでもあり、またトリブシンと異なってそれぞれが固有の蛋白基質に作用する要素なのかもしれない。それを裏づける一つの例を示そう。

プラスミンは、トリブシンと同じようにほとんどの蛋白質を小断片化する血中唯一の消化プロテアーゼであり、なかでもフィブリンに対して著しい親和性をもっている。一方、tranexamic acid (*trans*-4-aminoethylcyclohexane-1-carboxylic acid) は、プラスミンインヒビターとして広く利用されている抗出血剤の1つで、このインヒビターはフィブリンを基質としたときのみプラスミンを完全に阻害し、カゼインやTAMEではまったく阻害がみられない。この阻害機作については安孫子ら^(58,59)によって明らかにされつつあり、それによると、このインヒビターとプラスミンの結合部位は酵素の触媒基周辺ではなく、別の領域にあるという。インヒビターの結合部位の詳細がまだ明らかでないので確かなことは言えないが、仮にN末端領域だとすると、そこはフィブリン分子を認識する部位ともなる。したがって、プラスミンのN末端側の大きなポリペプチド鎖には、フィブリンと相互作用する機能があるのではなかろうか。

* この1次構造については、3つのグループによって調べられたが、それらの全アミノ酸配列はまだ完全に一致するにいたっていない⁽⁵⁵⁻⁵⁷⁾。

最後に、糖鎖についてふれておきたい。表1にまとめたように、すべての血中プロテアーゼは多かれ少なかれ糖鎖を含んでおり、Asn 残基を介してのN-グリコシル結合と、Ser(Thr)残基を介してのO-グリコシル結合の両者が見いだされている。これらの糖鎖の役割についてはまだはっきりしてないが、プロテアーゼの肝での分泌と代謝に関係するほか、特定領域の立体構造の形成や、ある領域を分子表面に露出させる機能をもつものかもしれない。いずれにしても、血中プロテアーゼのもつ糖鎖の数は無視できないほど多い。

*

以上述べたように、血液中には特色あるプロテアーゼが意外に多く含まれている。その一つひとつの含量はわずかであるものの、分子集合のもとに形成された複合プロテアーゼ系は、血液の機能に深く関連しつつ重要な役割を果たしている。ここでは、主に血漿成分に含まれるプロテアーゼをとり上げたが、いうまでもなく赤血球や白血球、血小板にもいろいろなプロテアーゼが存在し、白血球のエラスターゼやコラーゲナーゼはその食食機能に、また血小板の膜に局在するプロテアーゼもその粘着や凝集に密接に関係したものである。さらに、血液以外にも、細胞の生理機能や病態に関連したプロテアーゼ群が最近数多く発見されたが、これらの酵素にも従来のプロテアーゼにはみられない性質が秘められているようにみえる。新しい視点からのプロテアーゼの研究がますます発展することは疑いないであろう。

文 献

- 1) 村地 孝, 浅田敏雄, 藤井節郎: “蛋白分解酵素と生体制御”, 東京大学出版会, 1973.
- 2) 鈴木友二, 鹿取 信: “キニンとその周辺”, 中外医学社, 1972.
- 3) 藤川和雄, 加藤久雄: 化学と生物, 12, 364 (1974).
- 4) 岩永貞昭: 代謝, 11, 1258 (1974).
- 5) 岩永貞昭: 化学, 30, 205 (1975).
- 6) 加藤久雄, 韓 龍男, 岩永貞昭: 医用酵素, 2, 20(1976).
- 7) H. J. Müller-Eberhard: *Ann. Rev. Biochem.*, 44, 697 (1975).
- 8) A. P. Kaplan, H. L. Meier & R. Mandle: “Seminars in Thrombosis and Hemostasis”, ed. by E. F. Mammen, III, Stratton Intercontinental Medical Book Corp., 1976, p. 1.
- 9) C. R. McMillin, H. Saito, O. D. Ratnoff & A. G. Walton: *J. Clin. Invest.*, 54, 1312 (1974).
- 10) S. D. Revak & C. G. Cochrane: *J. Clin. Invest.*, 57, 852 (1976).
- 11) A. P. Kaplan & K. F. Austen: *J. Clin. Invest.*, 54,

- 619 (1974).
- 12) S. D. Revak, C. G. Cochrane, A. R. Johnston & T. E. Hugli : *J. Clin. Invest.*, **54**, 619 (1974).
- 13) K. D. Wuepper : *J. Exp. Med.*, **132**, 1345 (1973).
- 14) C. G. Cochrane, S. D. Revak & K. D. Wuepper : *J. Exp. Med.*, **138**, 1564 (1973).
- 15) K. D. Wuepper, D. R. Miller & M. J. LaComb : *J. Clin. Invest.*, **56**, 1663 (1975).
- 16) H. Saito, O. D. Ratnoff, R. Waldmann & J. P. Abraham : *J. Clin. Invest.*, **55**, 1082 (1975).
- 17) R. W. Colman, A. Bagdasarian, R. C. Talamo, C. F. Scott, M. Seavey, J. A. Guimaraes, J. V. Pierce & A. P. Kaplan : *J. Clin. Invest.*, **56**, 1650 (1975).
- 18) V. H. Donaldson, H. I. Glueck, M. A. Miller, H. Z. Movat & F. Habal : *J. Lab. Clin. Med.*, **85**, 327 (1976).
- 19) R. Waldmann, A. G. Scicli, R. K. McGregor, O. A. Carretero, J. P. Abraham, H. Kato, Y. N. Han & S. Iwanaga : *Thrombosis Res.*, **8**, 785 (1976).
- 20) R. T. Matheson, D. R. Miller, M. L. LaCombe, Y. N. Han, S. Iwanaga, H. Kato & K. D. Wuepper : *J. Clin. Invest.*, in press.
- 21) J. H. Griffin & C. G. Cochrane : *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **73**, 2554 (1976).
- 22) S. Schiffman & P. Lee : *J. Clin. Invest.*, **56**, 1082 (1975).
- 23) R. J. Ziccardi & N. R. Cooper : *J. Immunol.*, **116**, 504 (1976).
- 24) K. Takahashi, S. Nagasawa & J. Koyama : *FEBS Letters*, **55**, 156 (1975).
- 25) H. J. Müller-Eberhard : "The Plasma Proteins", ed. by F. W. Putnam, Academic Press, 1975, p. 394.
- 26) Y. Tamura, K. Okamura, A. Otsuka & S. Fujii : *J. Biochem.*, **79**, 313 (1976).
- 27) 森田隆司, 岩永貞昭 : 化学, **29**, 654 (1974).
- 28) S. Magnusson, L. Sottrup-Jensen, T. E. Petersen & H. Claeys : "Prothrombin and Related Coagulation Factors", ed. by H. C. Hemker and J. J. Veltekamp, Leiden University Press, 1975, p. 25.
- 29) K. Titani, K. Fujikawa, D. L. Enfield, L. H. Ericsson, K. A. Walsh & H. Neurath : *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **72**, 3082 (1975).
- 30) D. L. Enfield, L. H. Ericsson, K. Fujikawa, K. Titani, K. A. Walsh & H. Neurath : *FEBS Letters*, **47**, 132 (1974).
- 31) E. W. Davie & K. Fujikawa : *Ann. Rev. Biochem.*, **44**, 799 (1975).
- 32) T. Morita, S. Iwanaga & T. Suzuki : *J. Biochem.*, **79**, 1089 (1976).
- 33) J. Stenflo : *J. Biol. Chem.*, **251**, 355 (1976).
- 34) C. T. Esmon, J. Stenflo, J. W. Suttie & C. M. Jackson : *J. Biol. Chem.*, **251**, 3052 (1976).
- 35) D. Bucher, E. Nebelin, J. Thomsen & J. Stenflo : *FEBS Letters*, **68**, 293 (1976).
- 36) 森田隆司 : 臨床科学, **11**, 1142 (1975).
- 37) J. A. Sadowski, C. T. Esmon & J. W. Suttie : *J. Biol. Chem.*, **251**, 2770 (1976).
- 38) C. T. Esmon, W. G. Owen & C. M. Jackson : *J. Biol. Chem.*, **249**, 8045 (1974).
- 39) P. G. Barton & D. J. Hanahan : *Biochim. Biophys. Acta*, **187**, 319 (1969).
- 40) R. K. Bull, S. Jevons & P. G. Barton : *J. Biol. Chem.*, **247**, 2747 (1972).
- 41) S. P. Bajaj, R. J. Butkowski & K. G. Mann : *J. Biol. Chem.*, **250**, 2150 (1975).
- 42) S. N. Gital, W. G. Owen, C. T. Esmon & C. M. Jackson : *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **70**, 1344 (1973).
- 43) C. T. Esmon & C. M. Jackson : *J. Biol. Chem.*, **249**, 779 (1974).
- 44) S. Saraswatti & R. W. Colman : *J. Biol. Chem.*, **250**, 8111 (1975).
- 45) D. Puett, B. K. Wasserman, J. D. Ford & L. W. Cunningham : *J. Clin. Invest.*, **52**, 2495 (1973).
- 46) J. Vermeylen, M. B. Donati, G. de Gaetano & M. Verstraete : *Nature*, **244**, 167 (1973).
- 47) P. V. Subbiah, S. S. Bajwa, C. M. Smith & D. J. Hanahan : *Biochim. Biophys. Acta*, **444**, 131 (1976).
- 48) S. S. Bajwa & D. J. Hanahan : *Biochim. Biophys. Acta*, **444**, 118 (1976).
- 49) C. M. Jackson : "Heparin", ed. by V. V. Kakkar and D. P. Thomas, Academic Press, 1976, p. 61.
- 50) B. N. Violand & F. J. Castellino : *J. Biol. Chem.*, **251**, 3906 (1976).
- 51) K. N. N. Reddy & G. Markus : *J. Biol. Chem.*, **257**, 1683 (1972).
- 52) K. N. N. Reddy & G. Markus : *J. Biol. Chem.*, **249**, 4851 (1974).
- 53) L. A. Schick & F. J. Castellino : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **57**, 47 (1974).
- 54) H. C. Hemker, B. M. Bas & A. D. Muller : *Biochim. Biophys. Acta*, **379**, 180 (1975).
- 55) H. Claeys, L. Sottrup-Jensen, M. Zajdel, T. E. Petersen & S. Magnusson : *FEBS Letters*, **61**, 20 (1976).
- 56) H-M. Lee & R. A. Laursen : *FEBS Letters*, **67**, 113 (1976).
- 57) B. Wiman & P. Wallén : *Eur. J. Biochem.*, **58**, 539 (1975).
- 58) Y. Abiko, M. Iwamoto & M. Tomikawa : *Biochim. Biophys. Acta*, **214**, 411 (1970).
- 59) M. Iwamoto : *Thrombos. Diathes. Haemorrh. (Stuttgart.)*, **33**, 573 (1975).
- 60) P. A. Price, J. W. Poser & N. Raman : *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **73**, 3374 (1976).

用語解説欄についてのお願い

本誌では、以前、専門外の方のための用語解説の欄を設けておりましたが、このたびそれを復活して、第一線の研究者の方に解説をお願いすることになりました。

最先端の専門用語に限らず、当然のように使われていながらつきつめて考えてみると漠然としてしか理解できない用語など、解説・説明してほしい言葉を、葉書でお寄せいただければ幸いです（採否につきましては当方で判断させていただきます）。

連絡先：東京都文京区弥生 2-4-16 〒113

学会センタービル内

「化学と生物」編集部 Tel 03 (815) 0426