

氏 名	おくむらこうじ 奥村幸治
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学 位 記 番 号	論 薬 博 第 627 号
学位授与の日付	平成 12 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	ヘビ血液由来ホスホリパーゼ A ₂ 阻害タンパク質に関する研究

論文調査委員	(主 査) 教 授 川 崎 敏 祐	教 授 市 川 厚	教 授 伊 藤 信 行
--------	----------------------	-----------	-------------

論 文 内 容 の 要 旨

ホスホリパーゼ A₂ (PLA₂) は、グリセロリン脂質の *sn*-2 位のアシル鎖を加水分解する酵素である。この酵素は食餌中のリン脂質の消化あるいは生体膜中のリン脂質の代謝に関わるとともに、プロスタグランジンなどの脂質メディエーターの産生に至るアラキドン酸カスケードの開始酵素として重要な働きをもっている。クサリヘビ科に属する中国マムシの血液は、PLA₂ と直接結合して活性を阻害する 3 種類のタンパク質 (PLI α , PLI β , PLI γ) を含んでいる。PLI α は、Ca²⁺ 依存性 CRD (Carbohydrate Recognition Domain) 様ドメインと糖鎖をもつ分子量 20 kDa のサブユニットのホモ三量体であり、1 分子の II 型酸性 PLA₂ と結合して活性を阻害する。PLI β は、PLI α や PLI γ とは異なる構造の PLI であり、糖鎖をもつ分子量 50 kDa のサブユニットから成り、3 分子の II 型塩基性 PLA₂ と結合して活性を阻害する。また、PLI γ は分子量 25 kDa と 20 kDa の 2 種類のサブユニットから成る糖タンパク質である。PLI γ は 1 分子のヘビ毒由来 I 型 PLA₂、ヘビ毒由来 II 型 PLA₂ およびハチ毒 III 型 PLA₂ と結合して活性を阻害する。このように、タンパク質としての基本的性質は明らかとなっているが、分子生物学的解析はほとんど行われておらず、また、PLI β や PLI γ についてはその一次構造やサブユニット構造も明らかにされていない。

申請者は、中国マムシ血液由来 PLI β と PLI γ の全一次構造を明らかにするとともに PLI α の発現系を確立し、PLI α と PLA₂ との相互作用の機構の解析を行った。さらに、毒をもたないシマヘビからも 3 種類の PLI と相同性を示すタンパク質を精製し、生化学的および分子生物学的解析を行い、以下の成果を得た。

第 1 章 ヘビ由来 PLA₂ 阻害タンパク質の生化学的および分子生物学的解析

既に明らかにされている中国マムシ血液由来の PLI α (*Abs*PLI α) のアミノ酸配列に基づき、RT-PCR を行い、これをプローブとして中国マムシ肝臓由来 cDNA ライブラリーより cDNA を単離した。これから予想されるアミノ酸配列を既に明らかにされているものと比較したところ、5 残基のアミノ酸置換が見られた。今回解析した中国マムシから新たに PLI α を精製してそのアミノ酸配列を確認し、さらに、RT-PCR 産物のダイレクトシーケンスを行ったところ、今回得られた cDNA に相当する配列のみが得られた。中国マムシの分類については議論の余地があり、ここに見られたアミノ酸配列の違いは、亜種による違いであると考えられる。

次に、中国マムシ PLI β (*Abs*PLI β) を精製し、その内部アミノ酸配列に基づいて cDNA をクローニングし、その全一次構造を決定した。その結果、*Abs*PLI β はヒト血漿由来 leucine-rich α_2 -glycoprotein (*h*LRG) と 33% の相同性をもつことがわかった。このタンパク質には *h*LRG と同様に 24 残基から成る LRR (leucine-rich repeat) 構造の 9 回繰り返し構造があり、C 末端付近には LRR 構造をもつタンパク質に特有の Cys 残基パターンが存在するが、N 末端付近にはそのような配列は存在せず、Pro 残基に富む特徴的な配列がみられた。また、架橋実験より *Abs*PLI β はホモ三量体であることがわかった。*Abs*PLI β は 3 分子の PLA₂ と結合することから、各々のサブユニットが 1 分子の PLA₂ と結合すると考えられた。LRR 構造をもつ RNase インヒビターが馬蹄型構造をもつので、*Abs*PLI β のサブユニットも同様な高次構造をもつと推定される。このように *Abs*PLI β は既に構造が明らかにされている PLI α や PLI γ 、さらに、アネキシンファミリーに属するリポコルチン類とは異なる新規な PLA₂ 阻害タンパク質であることが明らかとなった。

次に、中国マムシ PLI γ (*AbsPLI γ*) を精製し、得られた各サブユニットの内部アミノ酸配列に基づいて 25 kDa と 20 kDa サブユニットに相当する cDNA をクローニングした。その結果、各サブユニットは互いに高い相同性を示すが異なるアミノ酸配列をもつことがわかった。各サブユニットにはウロキナーゼ受容体やヘビ毒由来サイトトキシン/ニューロトキシンファミリーが属する Ly-6 スーパーファミリーのタンパク質に特徴的な三指構造の 2 回繰り返し構造がみられ、すでに明らかにされているタイコブラ由来 PLI γ やエラブウミヘビ由来 PLI γ などと高い相同性があることから、*AbsPLI γ* はこれらと同様にヘテロ三量体であることが推定される。

PLI は自らの毒液に対する防御機構の一つの因子として機能していると考えられていたが、サザンハイブリダイゼーションの結果から、毒のないシマヘビにも PLI と類似のタンパク質が存在することが示唆されたので、PLA $_2$ に対する阻害活性を指標としてシマヘビ血液より 2 種類のタンパク質を精製した。これらのタンパク質の特異性を調べたところ、II 型塩基性 PLA $_2$ に特異的なタンパク質と、I 型、II 型、III 型 PLA $_2$ を阻害するタンパク質であった。精製標品の内部アミノ酸配列をもとに RT-PCR を行い、シマヘビ肝臓由来 cDNA ライブラリーを用いて cDNA クローニングと塩基配列の解析を行った。その結果、II 型塩基性 PLA $_2$ を特異的に阻害するタンパク質は *AbsPLI β* と、I 型、II 型、III 型 PLA $_2$ を阻害するタンパク質は *AbsPLI γ* と各々相同性を示すタンパク質であることがわかった。また、シマヘビ血液には *AbsPLI α* と免疫交差性を示すタンパク質の存在が示されたので、次に本タンパク質を精製しその阻害活性を調べたが、種々の毒由来 PLA $_2$ とは結合せず阻害活性を示さなかった。また、cDNA クローニングを行ったところ、このタンパク質は *AbsPLI α* と高い相同性を示した。さらに、ノーザンハイブリダイゼーションの結果、これらの 3 種類の PLI は肝臓で発現し、他の組織では発現していないことがわかった。PLI α 様タンパク質の生理的機能は不明であるが、毒腺や種々の酵素を含む Duvernoy 腺さえもないシマヘビにも PLI やその類似タンパク質が存在することから、これらのタンパク質は、単に毒液に対する自己防御機構の因子として機能するだけでなく、他の重要な生理的役割をも果たしているのではないかと考えられる。

第 2 章 中国マムシ由来 PLA $_2$ 阻害タンパク質と PLA $_2$ の相互作用の解析

PLI α と PLA $_2$ の相互作用の機構を明らかにするために、II 型酸性 PLA $_2$ をほぼ特異的に阻害する *AbsPLI α* の大腸菌を用いる発現系を確立し、His-tag を N 末端に付加した *AbsPLI α* (rPLI α fp) と天然型のアミノ酸配列をもつ組換え型 *AbsPLI α* (rPLI α) を得た。次に、rPLI α fp のアミノ酸配列内に PLA $_2$ 阻害活性のないシマヘビ由来 PLI α 様タンパク質に特徴的なアミノ酸残基を導入した変異型 PLI α を作製し、II 型酸性 PLA $_2$ に対する阻害活性を解析した結果、PLI α の可変領域の Asn-26 と、CRD 様ドメインの C 末端近傍の Tyr-146 を中心とする複数のアミノ酸残基が結合に関与することがわかった。

以上の研究は、毒ヘビの血液由来 PLA $_2$ 阻害タンパク質の基本的性質に加え、無毒ヘビの血液由来 PLA $_2$ 阻害タンパク質やその類似タンパク質の基本的性質を比較検討し、さらに組換え技術を用いて PLI α と PLA $_2$ の作用機構を解析したものであり、PLA $_2$ が関連する病態の解析やその治療薬としての応用の可能性を示したものである。

論文審査の結果の要旨

ホスホリパーゼ A $_2$ (PLA $_2$) はグリセロリン脂質の sn-2 位の脂肪酸エステルを加水分解して遊離脂肪酸とリゾリン脂質を産生する酵素の総称である。PLA $_2$ はその局在性、分子量、Ca $^{2+}$ 要求性、基質特異性などに基づいて、分泌型、細胞質型、Ca $^{2+}$ 非依存型および PAF-アセチルヒドロラーゼの 4 群に分類される。分泌型 PLA $_2$ は動物脾臓のほかヘビ毒に多く含まれる。一方、毒ヘビの血液には、PLA $_2$ と結合してその活性を阻害する 3 種類の PLA $_2$ 阻害タンパク質 (PLA $_2$ inhibitor, PLI), PLI α , PLI β , PLI γ が含まれている。これらの PLI は毒液中の PLA $_2$ に対する自己防御機構の一つの因子と考えられている。

本研究では、中国マムシ肝臓由来の cDNA ライブラリーから、PLI α , PLI β および PLI γ の cDNA のクローニングに成功し、それらの塩基配列を決定することによりタンパク質の全一次構造を決定した。PLI α は 166 個のアミノ酸よりなり、Ca $^{2+}$ 依存性糖結合ドメイン (CRD) と類似のドメイン構造をもつ 20 kDa の糖タンパク質であった。PLI β は 301 個のアミノ酸残基よりなる 35 kDa のタンパク質であった。本分子はヒト血清由来の leucine-rich α 2-glycoprotein (hLRG) と 33% の相同性を示し、hLRG と同様に、24 残基より成る LRR (leucine-rich repeat) 構造の 9 回繰り返し構造をもち、また、C-末端付近には LRR 構造をもつタンパク質に特有の Cys 残基パターンが、N-末端付近には Pro 残基に富む特徴的な配列がみられた。RNase インヒビターなど LRR 構造をもつ他のタンパク質は馬蹄型の高次構造を持つことが知られているの

で、PLI β も同様な立体構造を持つものと推定された。PLI γ は25 kDaと20 kDaの2種のサブユニットから構成されるヘテロ3量体であることが示された。両サブユニットはアミノ酸レベルで26.5%の相同性を持ち、いずれも200個のアミノ酸残基より成る。これらのサブユニットはLy-6スーパーファミリーに特徴的なCys残基パターンの2回繰り返し配列を持ち、特徴的な β -シートから成るthree finger構造を持つことが示された。なお、ノーザン分析の結果から、これらのPLIはいずれも、肝臓で生合成され、血中に移行することが示された。

また、本研究では毒を持たないシマヘビの血液中でも、PLI β とPLI γ に相当するPLA₂阻害タンパク質が存在すること、また、PLI α と一次構造上の高い相同性を持ちながら、PLA₂阻害活性を持たないPLI α 様タンパク質の存在も明らかとなった。これらの結果は、PLIがこれまで知られていない新しい生理的機能を果たしている可能性を示している。

以上の研究は、ヘビ毒血液由来のPLA₂阻害タンパク質のタンパク質化学的諸性質を明らかにするとともに、その機能に関していくつかの新しい知見を得たものである。よって本論分は博士（薬学）の論文として価値あるものと認める。更に、平成12年1月18日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。