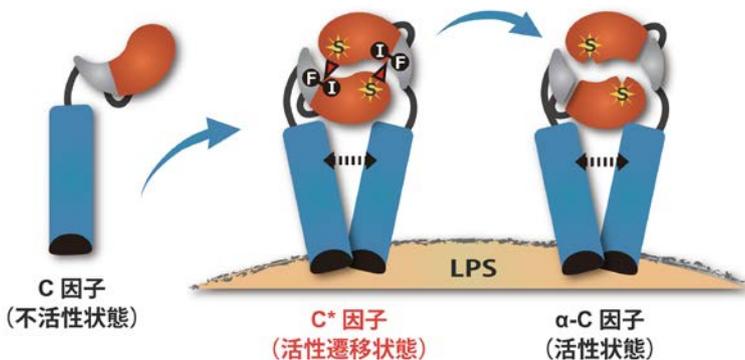




タンパク質分解酵素の前駆体から活性型への不安定な中間状態（遷移状態）を捕まえる
～感染細菌を高感度で検出するタンパク質分解酵素の初期反応を解明～

今回、理学研究院の柴田俊生助教、川畑俊一郎主幹教授らの研究グループは、タンパク質組換え体の技術で調製したカプトガニ凝固因子のひとつであるC因子（※1）の変異体を用いて、遷移状態（※2）のC*因子を捕らえることに成功しました。グラム陰性菌（※3）の細胞壁成分であるリポ多糖（LPS）（※4）は、過剰に感染すると発熱や多臓器不全、さらには致死性のショック症状を引き起こします。一方で、カプトガニ血球から分泌されるタンパク質分解酵素前駆体（※5）のC因子は、ごく微量のLPSに鋭敏に反応して活性型の α -C因子となるため、LPSの高感度検出試薬として利用されてきました。これまで、細菌表面のLPSに結合したC因子は、不安定な中間状態である遷移状態のC*因子となり、C*因子同士が接近して活性型の α -C因子に変換されると推定されてきました。この活性化の過程をタンパク質分解酵素前駆体の自己触媒的活性化（※6）といいます。しかし、自己触媒的活性化の重要なステージである遷移状態は不安定で寿命が短く、その実態を捕らえることはできませんでした。今回の遷移状態を捕らえる研究手法は、自己触媒的活性化を介して活性化される他のタンパク質分解酵素前駆体の研究に応用されることが期待されます。

本研究成果は、米国の国際学術誌『The Journal of Biological Chemistry』のオンライン速報版で2018年6月5日（火）（日本時間）(<http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.RA118.002311>)に掲載されました。近日中に確定版が掲載される予定です。



細菌表面におけるC因子の自己触媒的活性化モデル：C因子は、細菌表面のLPS上で複合体を形成すると遷移状態のC*因子となり、C*因子同士が互いを自己触媒的に切断することで活性型の α -Cに変換されます。

研究者からひとこと：

今回、私（川畑）の学生時代から約40年来の懸案であったC因子の遷移状態を捕まえることができました。それは、タンパク質組換え体の作成技術の進歩と若手研究者の精進の賜物です。ようやく、グラム陰性菌を高感度で検出できるC因子の初期反応の本質に近づくことができました。

- 活性化の際に切断される部位
- タンパク質の切断に必要な部位（活性中心）
- LPS結合部位
- 分子間相互作用

【お問い合わせ】大学院理学研究院 主幹教授 川畑 俊一郎
電話&Fax：092-802-4288 Mail：skawascb@kyudai.jp
大学院理学研究院 助教 柴田 俊生
電話：092-802-4290 Mail：t_shibata@kyudai.jp

■背景

グラム陰性菌の細胞壁成分である LPS は、宿主の免疫系がグラム陰性菌を認識する際に標的となる物質です。臨床的には注射液や透析液へ LPS が混入すると正常な免疫反応を誘導しますが、反応が過剰になると致死性のショック状態を引き起こすことがあります。LPS の医療用製品への混入検査には、リムルステストと呼ばれる検査試薬が世界中で利用されています。リムルスとは、米国産カブトガニの学名 (*Limulus polyphemus*) に由来しており、C 因子を含むカブトガニ血球の抽出液を材料にした検査試薬のことです。LPS で誘導されるカブトガニの体液凝固反応は、タンパク質分解酵素前駆体である C 因子と、B 因子、凝固酵素前駆体、および凝固タンパク質のコアギュロゲンから成っています。C 因子は、LPS に結合すると、活性型への遷移状態を介して自身を切断し、タンパク質分解活性を有する α -C 因子に変換されると推定されていました。カブトガニの凝固反応の分子機構研究は、先々代の研究室から始まる半世紀に渡る独創的で世界的に誇れる研究のひとつです。最近、当研究室の研究成果をもとに、カブトガニ凝固因子の組み換え体を用いた LPS 検査試薬が上市され、絶滅危惧種にあたるカブトガニの入手に頼ることのない製品化の道を開きました。

■研究成果と今後の展開

C 因子の Ser 触媒残基、F737 部位、LPS 結合領域などの種々のアミノ酸置換変異体を HEK293 変異株細胞を用いて調製し、LPS 存在下での α -C 因子への変換率をウェスタンブロットで比較定量するとともに、プロテアーゼ活性を測定しました。その結果のひとつは、F737 部位の Pro 置換体 (F737P) が LPS 存在下で切断を受けないままで、触媒 Ser 残基変異体 (S941A) の F737 部位を切断したことであり、LPS で誘導された活性型遷移状態 (F737P* = C*因子) の存在を明確に示すものです。プロテアーゼ前駆体同士がある特殊な環境下で近接することで、遷移状態を経て自己触媒に活性化されると推定される例が C 因子の他にも報告されており、今回の遷移状態を捕らえる研究手法は、自己触媒的活性化を介して活性化されると推定される他のタンパク質分解酵素前駆体の研究に応用されることが期待されます。

【用語解説】

※1：C 因子

カブトガニの体液凝固に関わるタンパク質分解酵素前駆体には、アルファベットで命名されたものが C 因子、B 因子、G 因子の3種類ありますが、アルファベット自体には特別の意味はなく、発見の順番だったり、結合する物質の頭文字に基づいて名付けられています。C 因子の活性型である α -C 因子は B 因子の特定の箇所を切断することで B 因子を活性化し、次いで活性型 B 因子が凝固酵素前駆体を活性化し、活性化型の凝固酵素がコアギュロゲンをコアギュリンに変換して不溶性のゲルとなります。このタンパク質分解酵素の一連の連鎖反応を体液凝固カスケードといいます。

※2：遷移状態

タンパク質酵素前駆体から活性化型への変換中に存在すると仮定される不安定な中間状態で、その寿命が非常に短く、エネルギー状態（化学ポテンシャルと表現されます）が極大となる状態のことです。

※3：グラム陰性菌

デンマークのグラム医師が開発した細菌の染色法で、濃い紫色に染色される細菌をグラム陽性菌、薄い赤色に染色される細菌をグラム陰性菌といいます。代表的なグラム陽性菌には、ブドウ球菌や破傷風菌、グラム陰性菌には、大腸菌やコレラ菌があります。

※4：リポ多糖 (LPS)

脂質、糖質、およびリン酸からなる構造物で、グラム陰性菌の細胞壁の主要な構成成分のひとつです。LPS が私たちの血液や組織内に侵入すると免疫系を活性化して正常な生体防御反応を引き起こしますが、その過剰反応はエンドトキシンショックとよばれる致命的なショックを起こすことがあります。

※5：タンパク質分解酵素前駆体

前駆体とは、まだ本来の機能を示さない不活性の状態のことで、タンパク質分解酵素前駆体とは、まだ活性を示さない眠った状態のタンパク質分解酵素のことです。

※6：自己触媒的活性化

通常のタンパク質分解酵素前駆体は、すでに活性型になっている別のタンパク質分解酵素により切断を受けて活性化されますが、タンパク質分解酵素前駆体が何らかの環境要因によって近接することによって、前駆体型のまま構造が微妙に変化してプロテアーゼ活性が誘導され、お互いに前駆体分子を切断して活性化することを自己触媒的活性化といいます。