



カプトガニのリポ多糖反応性タンパク質の組換えタンパク質調製に初めて成功 ー自己触媒的活性化の分子機構を解明、感染菌混入の臨床試験において実用化に期待ー

概要

感染菌由来のリポ多糖 (LPS) (※1) の医薬品への混入は、過剰な免疫反応を引き起こす原因となり、臨床でも重要な問題です。この LPS 混入をチェックするために、カプトガニの血球抽出液を材料とするリムルス試験 (※2) が広く利用されています。

九州大学大学院理学研究院の川畑俊一郎主幹教授と大学院システム生命科学府の小林雄毅氏 (5 年一貫制博士課程 5 年) らの研究グループは、カプトガニの凝固カスケード反応の開始因子である C 因子の高機能組換えタンパク質の調製に初めて成功しました。この報告は、カプトガニ個体数の減少による血球抽出液の不足に対応するための凝固カスケード再構築に向けた一里塚となりました。

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 2014 年 7 月 30 日 (水) に掲載され、2014 年 9 月 12 日 (金) に確定版が掲載される予定です。

背景

赤痢菌やサルモネラ菌といった感染菌の細胞壁を構成するリポ多糖 (LPS) は、私たちの免疫系が感染菌を認識する際に標的とする重要な物質です。臨床的には注射液や透析液へ LPS が混入すると、過剰な免疫反応を引き起こす原因となり、重篤な場合はショック状態を引き起こします。医薬品への LPS 混入検査には、リムルス試薬が広く世界中で利用されています。リムルス試薬は、カプトガニの血球抽出液が LPS に鋭敏に反応して凝固する反応を応用したものです。カプトガニの血液凝固反応の研究は、当研究室の 30 年以上にわたる独創的で世界的に誇れる研究のひとつです。

カプトガニ血球抽出液の凝固に関わる因子は、タンパク質分解酵素前駆体 (※3) である C 因子、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 に結合するだけでタンパク質を切断する酵素活性を示すようになります。これを自己触媒的活性化といいます。活性型 C 因子は B 因子の特定の箇所を切断することで活性化し、次いで活性型 B 因子が凝固酵素前駆体を活性化し、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 (図)。このタンパク質分解酵素による連鎖反応を凝固カスケード反応といいます。

一方では、カプトガニ個体数の減少による血球抽出液の不足に対応するために、当研究室では凝固カスケードの再構築を目指して、1998 年より C 因子の組換えタンパク質の調製を開始しました。しかし、大腸菌、酵母、および昆虫細胞を用いた発現実験は不成功に終わりました。2002 年には、タンパク質中のアミノ酸 (アスパラギン) 残基に結合する N 型糖鎖の種類によって、組換え C 因子の機能発現が大きく影響されることが分かりました。そこで、短い均一な N 型糖鎖を結合したタンパク質を分泌する哺乳類細胞変異株 (HEK293S GnTI⁻) を用いた組換え C 因子の調製に取り組んできました。

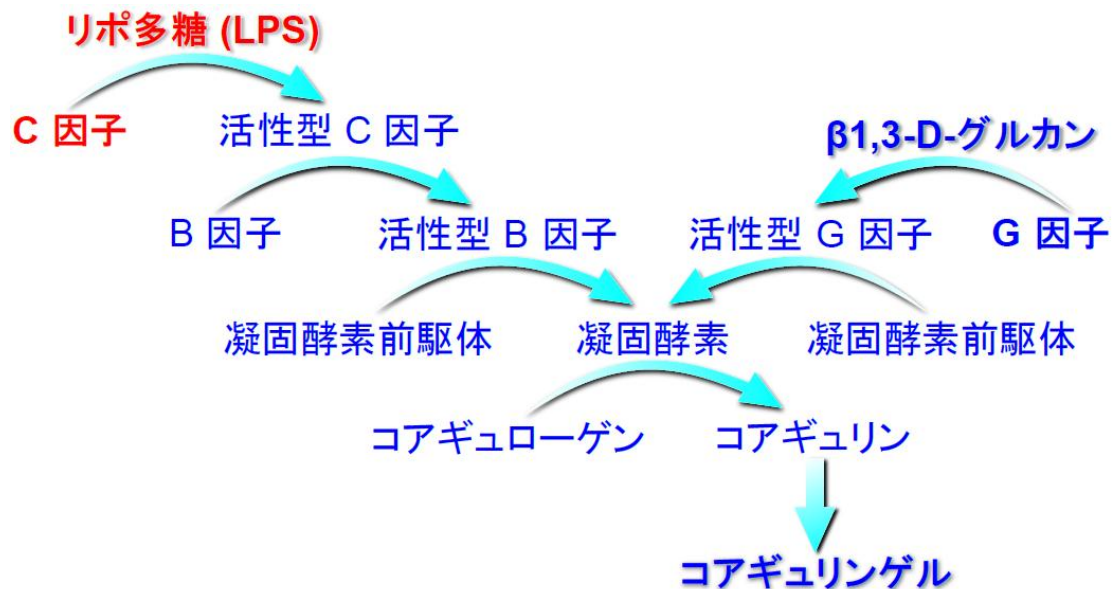
内容

この哺乳類細胞変異株を用いた発現実験の結果、組換え C 因子の収量が格段に向上しました。しかし、組換え C 因子の N 末端に発現ベクター (※4) 由来の余分なアミノ酸が付加されており、LPS による活性化を阻害することが判明しました。そこで、ベクターのプロ配列 (※5) の部分を C 因子のプロ配列と置換することで、天然 C 因子に匹敵する活性を有する組換え C 因子の調製に初めて成功しました。

また、今回調製した組換え C 因子の変異タンパク質を用いることで、C 因子の重要な機能が判明しました。そのひとつに、LPS と結合して自己触媒的に活性化する際に、アミノ末端のアルギニン残基が重要な役割を果たすことが明らかとなりました。

■効果・今後の展開

今回、研究開始から16年を経て、凝固カスケードを構成するC因子の組換えタンパク質の調製に成功し、組換えC因子の大量調製も軌道に乗っています。今後は、B因子、凝固酵素前駆体の組換え体の調製も可能であることが、予備実験で判明しています。これらの組換えタンパク質により、安定で活性の高い高機能因子を用いた凝固カスケードを再構築することで、高感度のLPS検査試薬の実用化が期待されます。また、将来的なカプトガニ個体数の減少による血球抽出液の不足に対しても十分に対応できると期待されます。



図：カプトガニ凝固カスケード

凝固カスケードは、LPS だけでなく、真菌（カビ類）の成分である β1,3-グルカンにより活性化する G 因子の経路も存在する。

【用語解説】

※1：リポ多糖（LPS）

細菌の細胞膜の外側を取り囲んでいる皮膜状の構造物で、グラム陰性菌とよばれる大腸菌、赤痢菌、サルモネラ菌など細胞壁の主要な構成成分のひとつがリポ多糖とよばれる、脂質と糖鎖とリン酸からなる特有の物質である。

※2：リムルス試験

カプトガニ試験ともよばれ、カプトガニ血球抽出液に検査サンプルを加えてゲル化の形成を分光光度計で分光学的に定量し、サンプル中の LPS 濃度を決定する。また、凝固カスケードにより活性化された凝固酵素の活性に対して、発色性ペプチド基質を用いて分光光度計で定量する方法もある。

※3：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、タンパク質分解酵素の活性を示さない眠った状態の酵素のことである。

※4：発現ベクター

組換えタンパク質の遺伝子を含み、それを発現する細胞に運ぶために作られた DNA のこと。

※5：プロ配列

組換えタンパク質の本来の成熟タンパク質の N 末端側に付加的についでいるアミノ酸配列で、生合成された前駆体タンパク質が分泌される際に細胞内で切り離される。

【お問い合わせ】

大学院理学研究院 主幹教授

川畑 俊一郎（かわばた しゅんいちろう）

電話：092-642-2632

FAX：092-642-2632

Mail：skawascb@kyudai.jp

Web：<http://www.biology.kyushu-u.ac.jp/~biopoly/>