

新規血液凝固第 Xa 因子 (FXa) 阻害剤 (R-020) およびその誘導体の単離と性質

新潟大学医学部生化学第一教室 (主任: 木南 凌教授)

新 居 淳

Isolation and Characterization of Novel Blood Coagulation Factor
Xa (FXa) Inhibitor (R-020) and its Variants

Atsushi NII

*Department of Biochemistry,
Niigata University School of Medicine*

Urinary trypsin inhibitor (UTI) isolated from human urine is an acidic glycoprotein with molecular weight of 67,000 and is known to inhibit trypsin, plasmin, leucocyte elastase, α -chymotrypsin and other enzymes. UTI is composed of two Kunitz-type domains and the second domain is responsible for its antitryptic activity. In order to determine the detailed inhibitory spectrum of the second Kunitz-type domain of UTI (R-020) against various proteases, I cloned two types of R-020 cDNAs: one encodes the 70-amino acid sequence from the 78th amino acid (Thr) to the C-terminal (R-020 TN70) and the other encodes the 68-amino acid sequence from the 80th (Ala) to the C-terminal (R-020, AN68). Their products are secreted into the cultured supernatant of *E. coli* JE5505 transformants. R-020 TN70 and R-020 AN68 purified from the cultured supernatant inhibited not only human trypsin, human plasmin, human leucocyte elastase and human α -chymotrypsin which were already known to be inhibited by UTI but also the human blood coagulation factor Xa and plasma kallikrein.

Furthermore, to increase the FXa inhibitory activity I constructed a model of the structure of the R-020 TN70-FXa complex with reference to that of bovine pancreatic trypsin inhibitor-bovine trypsin complex and investigated the binding state of R-020 TN70 and FXa. Based on this information, one amino acid of R-020 TN70 and AN68 was substituted with recombinant DNA technology. The inhibitory effect of the product on FXa was increased in four variants after single amino acid substitution. Four other variants with two amino

Reprint requests to: Atsushi NII,
Mochida Pharmaceutical Co., Ltd.
1-1-1, Kamiya Kitaku,
Tokyo 115, JAPAN.

別刷請求先: 〒115 東京都北区神谷1-1-1
持田製薬株式会社 新居 淳

acids substitution modified by combining the above mentioned single amino acid substitution showed an enhanced inhibitory effect on FXa in comparison with those with single amino acid substitution. Because the electrostatic interaction within these R-020 variants-FXa complexes seemed stronger, this increase in their inhibitory effect on FXa was speculated to be a consequence of more potent binding between the enzyme and the inhibitors.

Key words: coagulation factor Xa, plasma kallikrein, site-directed mutagenesis, urinary trypsin inhibitor

血液凝固第 Xa 因子, 血漿カリクレイン, 部位特異的突然変異, 尿由来トリプシンインヒビター

1. 緒 言

尿由来のトリプシンインヒビター (Urinary Trypsin Inhibitor, UTI) は, 血中のインター α -トリプシンインヒビター (I α T) を前駆体とする分子量 67,000 の糖蛋白質であり¹⁾, トリプシンを始めとし, α -キモトリプシン, 白血球エラスターゼ, プラスミンなど種々の酵素を阻害することが知られている²⁾. また, その構造はアミノ酸配列分析³⁾ および遺伝子クローニング⁴⁾⁻⁶⁾ により解明された. すなわち, cDNA の構造解析より UTI は α_1 -ミクログロブリン (α 1 M) の C 末端に 2 個のアルギニン残基を介して接続された融合蛋白質として翻訳され⁵⁾, post-translational processing によって α_1 -ミクログロブリンと分離された後 I α T の L 鎖として I α T の H1 および H2 鎖と結合することが明らかになった⁶⁾. 一方, アミノ酸配列の解析から, UTI は Kunitz 様インヒビタードメインが 5 アミノ酸を介して 2 個接続された構造をしており, 最初のドメインには糖鎖が, また, 2 番目のドメインにはトリプシン阻害活性が存在することが示された³⁾. Kunitz 様インヒビタードメインを有するプロテアーゼインヒビターは, 1 個のドメイン構造からなる牛膝由来トリプシンインヒビター (BPTI) やトリプスタチン, 3 個のドメイン構造からなる Tissue factor pathway inhibitor (TFPI) などが知られており, これらのドメインは高い相同性を有しているにもかかわらず, お互いに異なった酵素阻害スペクトルを示している⁷⁾⁻⁹⁾.

そこで, 著者は UTI の 2 個の Kunitz 様インヒビタードメインのそれぞれの役割を明らかにするために, まずトリプシン阻害作用を有する第 2 ドメイン (R-020) に注目し, この R-020 を遺伝子工学的手法を用いて大腸菌にて発現後精製し, 各種酵素に対する阻害スペクトルを測定した.

2. 材料と方法

2-1 材 料

組換え実験に用いた制限酵素および修飾酵素は, 宝酒造株式会社あるいは東洋紡績株式会社より購入した. 遺伝子発現実験の宿主として用いた JE5505 株は, 国立遺伝学研究所より譲渡された. ヒトトリプシン, ヒト α -キモトリプシンおよび顆粒球エラスターゼは Calbiochem Co., ヒト血液凝固第 Xa 因子 (FXa) は American Diagnostica Inc., またウシトリプシン, ヒトプラスミンおよびヒト血漿カリクレインは Sigma Co. より購入した. 顆粒球エラスターゼ阻害活性測定に用いた合成基質 STANA は株式会社ベプチド研究所より, その他の酵素の阻害活性測定に用いた合成基質 S-2444, S-2222, S-2302, S-2586 および S-2251 は第一化学薬品株式会社より購入した. cDNA クローニング用プライマー, 部位突然変異導入用リンカー, Hind III プライマー (5'-ACGCAAGTTCACGTA AAAAAGC-3'), Sca I プライマー (5'-ACTATATGCACTGGCACTCTTA-3') および pBR BamH I プライマー (5'-ACGATGCGTTCCGGCGTAGAG-3') は, DNA 合成機 (381A, Applied Biosystems Inc.) を用いて合成した. UTI (比活性 2,600 U/mg) は, 健常男子新鮮尿から精製した¹⁰⁾. なお, 各インヒビターのトリプシン阻害活性は Kassell の方法に準じて測定し, トリプシン (3,200 National Formulary Unit (NFU)/mg) 2 μ g を 50% 抑制する量を 1 単位とした⁷⁾.

2-2 方 法

2-2-1 R-020 発現プラスミドの構築

UTI の N 末端から 78 番目のアミノ酸 Thr から C 末端までの 70 個のアミノ酸からなる R-020 TN70 および N 末端から 80 番目のアミノ酸 Ala から C 末端までの 68 個のアミノ酸からなる R-020 AN68 をコードする cDNA

を含んだ発現プラスミド pM552 および pM594 を構築した。

まず、R-020 TN70 cDNA は、 λ gt11 human liver cDNA library (HL 1001, Clontech Laboratories Inc.) より polymerase chain reaction (PCR) にて得た。なお、センスプライマーとしては混合オリゴマー 5'-TTGGCCACCGTCGCCGCTGC/TAAC/TCTG/CCC-3' を、またアンチセンスプライマーとしては、オリゴマー 5'-TGGATCCAGTTGTCAGTTGGAGAAGC-3' を化学合成機 (Applied Biosystems Inc.) にて合成して用いた。PCR 後、増幅産物を Eae I で消化し、このフラグメントに E. coli アルカリフォスファターゼシグナルペプチド (Pho A S.P.) の N 末端から 5 番目の Thr 以下をコードする DNA 配列をリンカーとして接続した。一方、発現プラスミドとして pM469 を用いた。pM469 はヒト pancreatic secretory trypsin inhibitor (PSTI) 分泌発現用プラスミド pM463¹¹⁾ から作製した。すなわち、pM463 の Pho A S.P. 開始コドン ATG 近傍の塩基配列を置換し、Pho A S.P. の 4 番目と 5 番目のアミノ酸をコードする部位に Sea I 切断部位を導入し、さらにアンピシリン耐性遺伝子をカナマイシン耐性遺伝子に置換した。つぎに pM469 の Sea I/BamH I 部位に Pho A S.P.-R-020 TN70 融合遺伝子を組み込み、発現プラスミド pM552 を作製した。

R-020 TN70 の N 末端から 2 個のアミノ酸 (Thr, Val) が欠失した R-020 AN68 の発現プラスミド pM594 は、PCR によって部位特異的変異を導入することにより作製した。まず、pM552 を鎖型として Hind III site の上流に対応するセンスプライマー 5'-ACGCAAGTTCACGTAAAAAGC-3' と N 末端の 2 残基が欠失するように設計された変異導入プライマー 5'-CTATTGGTAGATTACAGGCCCGCGCCTTTGTCTACAGGGT-3' とで最初の PCR 反応を行い、つづいて増幅されたフラグメントと BamH I site の下流に対応するアンチセンスプライマー 5'-ACGATGCGTTCGGCGTAGAG-3' とで 2 度目の PCR 反応を行った。得られたフラグメントを BamH I/Hind III で消化し、pM463 の同じ切断部位に挿入した。なお、R-020 TN70 および R-020 AN68 の cDNA の塩基配列の確認は pM552 および pM594 の BamH I/Hind III フラグメントを取り出し、DNA シークエンサー (340A, Applied Biosystems Inc.) を用いて行った。

2-2-2 R-020 TN70 および R-020 AN68 の発現および精製

プラスミド pM552 または pM594 で大腸菌 JE5505 株を形質転換し、カナマイシンまたはアンピシリン耐性株を単離した。JE5505 (pM552) 株または JE5505 (pM594) 株は、50 μ g/ml カナマイシンまたは 50 μ g/ml アンピシリンを含む L-broth で培養したのち、50 μ g/ml カナマイシンまたは 50 μ g/ml アンピシリン含有 M9CA 培地¹²⁾ に、2% 植菌した。37°C にて約 1 時間培養後、終濃度 10 μ g/ml の 3 β -インドールアクリル酸を添加し、さらに 16 時間培養した。得られた培養上清を、80% 飽和硫酸アンモニウムで塩析し、4°C で一晚静置した。生じた沈殿物を遠心分離によって集め、蒸留水で溶解した後、分子量 1,000 カットの限外ろ過膜で濃縮し、ついで PBS⁻ で平衡化された Sephadex G50 (Pharmacia LKB Biotechnology AB) カラムに供した。続いてウントリプシン阻害活性を示した画分を 20 mM Tris-HCl バッファー (pH 8.5) で透析した後、同バッファー (pH 8.5) で平衡化された Mono Q カラム (Pharmacia LKB Biotechnology AB) に供し、0~0.4 M NaCl/20 mM Tris-HCl バッファー (pH 8.5) で溶出した。更に得られた活性画分を、0.04% トリフルオロ酢酸で平衡化された Vydac C18 カラム (The Separations Group) に供し、HPLC (Waters 625 LC システム, Millipore Co.) を用いて、0~100% アセトニトリル/0.04% トリフルオロ酢酸で溶出し、最終精製標品を得た。

2-2-3 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、アミノ酸配列、質量分析計による分子量分析および蛋白質濃度の測定

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動は Laemmli の方法¹³⁾ に従って、16% ポリアクリルアミドゲルにて行った。染色は、銀染色キット (2D-銀染色試薬・II 「第一」[®], 第一化学薬品株式会社) を用いてその指示書に従い実施した。

アミノ酸配列の決定は、自動エドマン分解システム (477A プロテインシークエンシングシステム-120A PTH アナライザー, Applied Biosystems Inc.) で行った。

分子量は、質量分析計 (ESI/MS systems, Quattro, Fisons Instruments, VG Bio Tech) を用いて測定した。

蛋白質濃度は、BSA をスタンダードとして Lowry らの方法¹⁴⁾ に従って測定した。

2-2-4 各種セリンプロテアーゼに対する R-020 TN70 および R-020 AN68 の阻害活性 (IC₅₀) の測定

ウントリプシン阻害活性は Kassell の方法⁷⁾ に従い、

以下のように行った。すなわち、0.6 BAEEU/ml ウシトリプシン (Type VIII) 100 μ l とサンプル 100 μ l とを混合し、37°Cにて10分間静置した。つぎに、2 mM S-2444 を 50 μ l 添加し、37°C、20分間反応後、50%酢酸 50 μ l で反応を停止し、OD 405 nm を測定した。

ヒトトリプシン阻害活性はウシトリプシン阻害活性と同様の方法で測定した。

ヒト FXa 阻害活性は Ohno らの方法¹⁵⁾ に従い、以下のように行った。すなわち、0.1 PEU/ml ヒト FXa 25 μ l、サンプル 25 μ l および 0.1% BSA/150 mM NaCl/5 mM CaCl₂/50 mM Tris-HCl バッファー (pH 8.3) 100 μ l を混合し、37°Cで10分間静置した。つぎに 2 mM S-2222 100 μ l を添加し、37°Cで30分間反応後、50%酢酸 50 μ l で反応を停止し、OD 405 nm を測定した。

ヒト顆粒球エラスターゼ阻害活性は Ogawa らの方法¹⁶⁾ に従い、以下のように行った。すなわち、4 μ g/ml ヒト顆粒球エラスターゼ 50 μ l、サンプル 50 μ l および 0.1% BSA/27 mM CaCl₂/133 mM Tris-HCl バッファー (pH 7.5) 50 μ l を混合し、37°Cで10分間静置した。つぎに 20 mM STANA を 50 μ l 添加し、37°C、20分間反応後、50%酢酸 50 μ l で反応を停止し、OD 405 nm を測定した。

ヒトプラスミン阻害活性は Friberger らの方法¹⁷⁾ に従い、以下のように行った。すなわち 0.1 U/ml ヒトプラスミン 50 μ l、サンプル 50 μ l および 0.11 M NaCl/50 mM Tris-HCl バッファー (pH 7.4) 100 μ l を混合し、37°Cにて10分間静置した。つぎに 3.5 mM S-2251 を 50 μ l 添加し、37°C、2分間反応後、50%酢酸 25 μ l で反応を停止し、OD 405 nm を測定した。

ヒト血漿カリクレイン阻害活性は Ohno らの方法¹⁵⁾ に従い、以下のように行った。すなわち、0.08 U/ml ヒト血漿カリクレイン 50 μ l、サンプル 25 μ l および 0.1% BSA/150 mM NaCl/50 mM Tris-HCl バッファー (pH 8.3) 75 μ l を混合し、37°Cにて10分間静置した。つぎに 2 mM S-2302 を 50 μ l 混合し、37°Cにて8分間反応後、50%酢酸 25 μ l で反応を停止し、OD 405 nm を測定した。

ヒト α -キモトリプシン阻害活性は、以下のように測定した。すなわち、0.3 μ g/ml ヒト α -キモトリプシン 50 μ l、サンプル 50 μ l および 0.1% BSA/3 mM CaCl₂/30 mM Tris-HCl バッファー (pH 8.3) 50 μ l を混合し、37°Cで10分間静置した。つぎに 1 mM S-2586 を 50 μ l 混合して37°Cにて20分間反応後、50%酢酸 50 μ l で反応を停止し、OD 405 nm を測定した。

2-2-5 酵素阻害定数 (K_i 値) の測定

R-020 AN68 のヒト FXa およびヒト血漿カリクレインに対する K_i 値 を以下のように測定した。すなわち、0.28~2.2 μ M の R-020 AN68 と 0.7 nM の FXa または 1.5 nM の血漿カリクレインとを混合し、37°C、10分間静置した後、0.4、0.8または 1.6 mM となるように基質溶液 (S-2222 または S-2302) を添加し、OD 405 nm を経時的に測定した。阻害剤と基質の各濃度において、酵素の初速度を求め、Dixon の方法¹⁸⁾ に従って K_i 値 を算出した。

2-2-6 R-020 TN70 およびヒト FXa のモデリング

BPTI とウシトリプシンの複合体のX線解析座標 (PDB ID-code, 2PTC)¹⁹⁾ を基本構造として用いて、R-020 TN70-ヒト FXa 複合体の立体構造モデルを構築した。すなわち、R-020 TN70 については、BPTI と 1 次配列のアライメントを行った後、R-020 TN70 の C 末端部分の BPTI より長いアミノ酸配列分析を削除した。また、ヒト FXa については、活性中心を含むH鎖についてモデリングを行った。まず、ヒト FXa 一次配列 (NBRF ID-code, EXHU)²⁰⁾ とウシトリプシン配列のアライメントを行った後、FXa の C 末端部分のトリプシンより長いアミノ酸配列部分を削除した (Fig. 1)。

なお、アライメント結果において挿入、欠失のある部分については以下のタンパク質の部分構造を用いて FXa モデルの構築を行った。すなわち、各セリンプロテアーゼの活性ドメインのN末端を1番としたとき、*Lysobacter enzymogenes* 由来 alpha-lytic protease (PDB ID-code, 2ALP)²¹⁾ の8~14番、*Streptomyces griseus* 由来 protease B (PDB ID-code, 3SGB)²²⁾ の34~42番、rat mast cell protease II (PDB ID-code 3RP2-B)²³⁾ の168~181番、porcine pancreas elastase (PDB ID-code 2EST)²⁴⁾ の193~203番の構造をそれぞれ、FXa の21~22番、46~47番、115~119番、194~197番の挿入部位に採用した。また、137番と138番の間の欠失部分については、*Streptomyces griseus* 由来 trypsin (PDB ID-code, 1SGT)²⁵⁾ の118~126番の構造を採用した。

初期構造の構築、及び構造最適化計算は、Miyata 等の方法²⁶⁾ に従って、BIOCES [E] system, version 1.4 (NEC Co.) を使用して行った。

2-2-7 部位特異的突然変異の導入

部位特異的突然変異体作製の鋳型としては、発現プラスミド pM552 または pM594 を用いた。アミノ酸置換に際しては、置換する塩基を中心として 5' 側および 3' 側にそれぞれ12~15塩基含んだ25~31塩基のオリゴマー



Fig. 1 Amino acid sequence alignment of the heavy chain of human FXa and bovine trypsin. Deletions are indicated by dashes. Identical residues are labelled (:).

を部位特異的突然変異導入用リンカーとして合成した。また、PCRのプライマーとして **Hind** III プライマー (5'-ACGCAAGTTCACGTAAAAAGC-3'), **Sca** I プライマー (5'-ACTATTGCACTGGCACTCTTA-3') および pBR **Bam**H I プライマー (5'-ACGATGCGTTCCGGCGTAGAG-3') を合成した。突然変異の導入は、Landtらの方法²⁷⁾ に従い以下のように行った。すなわち、TN70 type の 1 アミノ酸置換改変体を作製する場合は、変異導入用リンカーと **Sca** I プライマーとで 1st PCR を行い、得られた PCR 産物と pBR **Bam**H I プライマーとで 2nd PCR を行った。この遺伝子を **Bam**H I で切断し、pM552 の **Sca** I/**Bam**H I site に導入した。また、AN68 type の 1 アミノ酸置換改変体を作製する場合は、変異導入用リンカーと **Hind** III プライマーとで 1st PCR を行い、得られた PCR 産物と pBR

BamH I プライマーとで 2nd PCR を行った。この遺伝子を **Hind** III/**Bam**H I で切断して pM594 の **Hind** III/**Bam**H I site に導入した。また、2 アミノ酸置換改変体は、1 置換アミノ酸改変体を鋳型として同様の方法で改変した。

得られた改変体 cDNA の塩基配列は、2-2-1 と同じ方法で確認した。改変体の発現・発現産物の精製、物性の確認および各種プロテアーゼ阻害活性の測定は、それぞれ 2-2-2、2-2-3 および 2-2-4 と同様の方法で行った。

2-2-8 改変体の酵素阻害定数 (K_i 値) の測定

改変体のヒト FXa に対する K_i 値を以下のように測定した。すなわち、10~80 nM 改変体と 0.7 nM ヒト FXa とを混合し、37°C、30分間静置した後、0.4~1.6 mM となるように S-2222 を添加し、OD 405 nm を経時的に測定した。 K_i 値は Morrison の方法²⁸⁾ に従って算

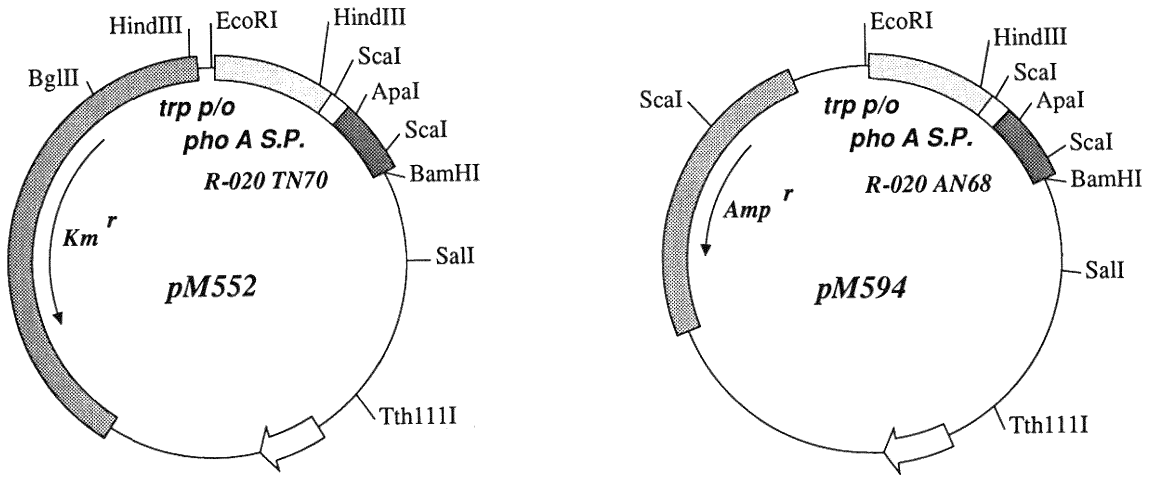


Fig. 3 Plasmid vector used for the expression of R-020 TN70 and R-020 AN68.

養後、培養混合物を遠心分離し、菌体を沈殿させた後、上清のトリプシン阻害活性を測定した。コントロールとしては、pM552 より R-020 TN70 の構造遺伝子部分のみを除去したプラスミド pM553 を同様に JE5505 で発現させた培養上清を用いた。測定の結果、JE5505 (pM552) 培養上清中にウシトリプシン阻害活性が濃度依存的に認められ (Fig. 5)、培養上清中にトリプシン阻害活性を有する物質が分泌されていることが確認された。また、R-020 AN68 も同様の方法で発現させ、培養上清中にトリプシン阻害活性が認められた (Data は示していない)。

3-3 培養上清からの精製

R-020 TN70 は JE5505 (pM552) の発現後の培養上清約 4l を出発物質として、以下のように精製を行った。すなわち、約 4l の培養上清に80%飽和となるように硫酸アンモニウムを添加したのち、遠心分離によって沈殿物を得た。この沈殿物を蒸留水に溶解したのち、限外ろ過で 3ml に濃縮した。これを Sephadex G50 カラムでゲルろ過した (Fig. 6-A)。その結果、低分子溶出画分にトリプシン阻害活性が認められ、その画分を 20 mM Tris-HCl バッファー (pH 8.5) で 4℃、一晚透析後、Mono Q カラムに供した。トリプシン阻害活性はメインピークに認められ (Fig. 6-B)、この画分を Vydac C18 カラムに供した。その結果、280 nm の吸光度で単一のピークと思われる活性画分が得られた (Fig. 6-C)。一方、R-020 AN68 も同様の方法で精製した。

3-4 SDS-PAGE, アミノ酸配列分析および質量分析

R-020 TN70 の精製における各ステップの活性画分の一部を、16%の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供した。泳動後銀染色を行ったところ、C18 カラム溶出活性画分において分子量約 8,000 の位置に単一のバンドが確認された (Fig. 7)。

次にこの R-020 TN70 の精製標品の一部をプロテインシーケンサーにより解析した結果、R-020 TN70 の成熟N末端である Thr をN末端として T-V-A-A-X-N-L-P-I-V-R-G-P-X-R の配列結果が得られ、予想されたアミノ酸配列と一致した。さらに質量分析計により分子量を算出した結果、7703.9 が得られ、理論分子量 7703.7 と一致した。以上の結果から、この標品は、目的とする R-020 TN70 であることが確認された。また、R-020 AN68 も同様の方法で同定された。そこで、これらの標品を精製標品として以下の実験に用いた。

3-5 ウシトリプシン阻害活性の測定

R-020 TN70 および R-020 AN68 のウシトリプシン阻害活性を測定したところ、R-020 TN70 および R-020 AN68 は UTI と同様に濃度依存的にトリプシンを阻害した。以後、R-020 TN70 および R-020 AN68 の活性単位として、UTI の 1U/ml と同等のウシトリプシン阻害活性を与える濃度を 1U/ml として表すこととした。その結果、この精製 R-020 TN70 および R-020 AN68 標品の比活性は、約 8,000 U/mg であった。

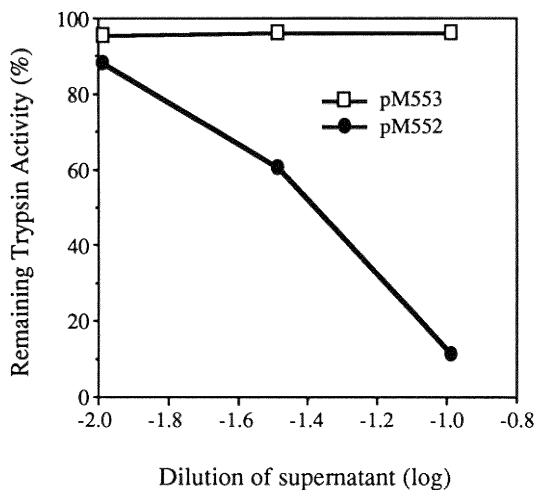


Fig. 5 Bovine trypsin inhibitory activity of the supernatant of JE5505 (pM552) and JE5505 (pM553).

3-6 ヒト FXa およびヒト血漿カリクレイン阻害活性の測定

R-020 TN70 および R-020 AN68 精製標品を各活性濃度に希釈し、ヒト FXa およびヒト血漿カリクレインの阻害活性を測定した。その結果、Fig. 8 に示したように、UTI では非常に弱かったヒト FXa およびヒト血漿カリクレイン阻害活性が R-020 TN70 および R-020 AN68 では濃度依存的に認められ、R-020 TN70 の IC₅₀ 値は、それぞれ 42 U/ml および 48 U/ml であり、R-020 AN68 の IC₅₀ 値は、それぞれ 38 U/ml および 42 U/ml であった (Table 1)。従って、R-020 TN70 および R-020 AN68 は、UTI の第 1 ドメインが除去され単独のドメイン構造で存在することによって、ヒト FXa および血漿カリクレインに対する阻害活性を示すことが新たに確認された。

3-7 ヒトトリプシン、ヒトプラスミン、ヒト顆粒球エラスターゼおよびヒトα-キモトリプシン阻害活性の測定

R-020 TN70 および R-020 AN68 精製標品のヒトトリプシン、ヒトプラスミン、ヒト顆粒球エラスターゼおよびヒトα-キモトリプシンに対する阻害活性を測定した結果、ヒトトリプシン、ヒトプラスミンおよびヒト顆粒球エラスターゼに対する R-020 TN70 および R-020 AN68 の阻害活性 (IC₅₀) は UTI とほぼ同等であったが、α-キモトリプシンに対する阻害活性は減少してい

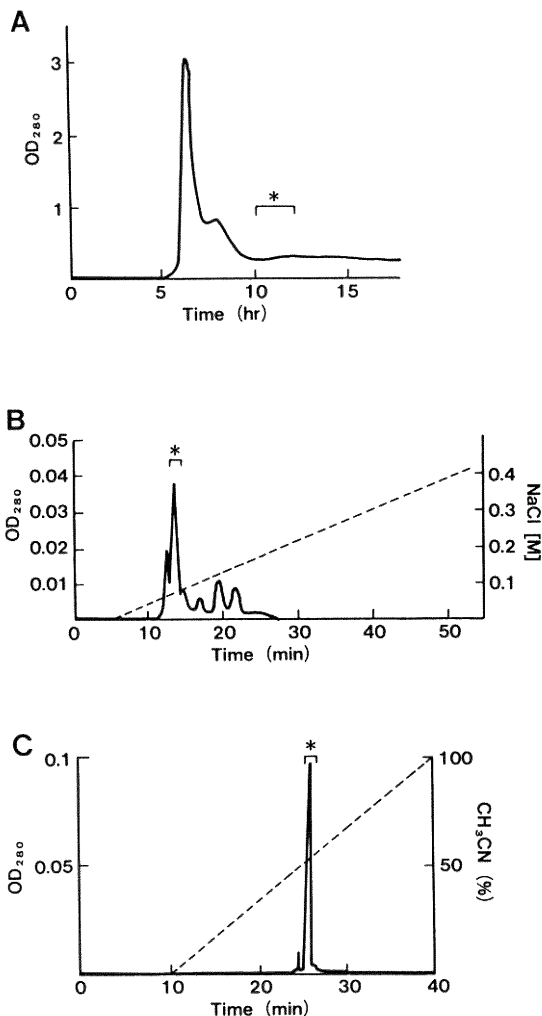


Fig. 6 Sephadex G50 (A), Mono Q (B) and C18 reverse phase (C) chromatography of R-020 TN70.

The fractions having trypsin inhibitory activities were indicated by the starred brackets.

た (Table 1)。

3-8 酵素阻害定数 (K_i) の測定

R-020 AN68 のヒト FXa およびヒト血漿カリクレインに対する阻害定数 K_i を測定した結果、Fig. 9 に示したように、R-020 AN68 は両酵素に対して拮抗阻害を示し、K_i 値はそれぞれ 4.0×10⁻⁷ M および 3.7×10⁻⁷ M であった。FXa に対するこの K_i 値は現在知られて

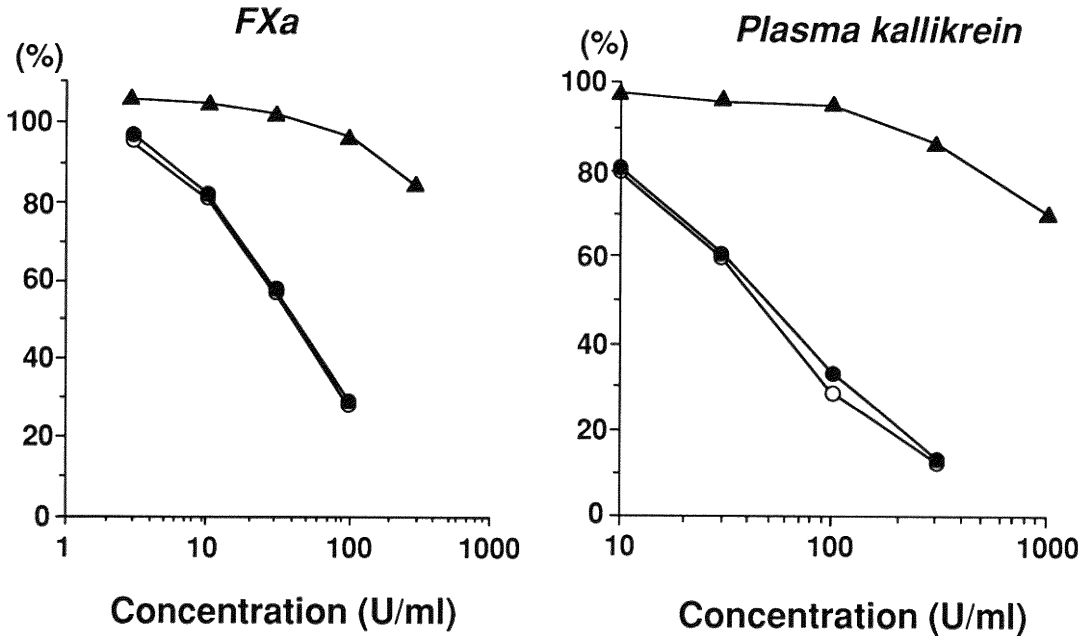


Fig. 8 Inhibitory activities of R-020 TN70, R-020 AN68 and UTI on FXa and plasma kallikrein

●, R-020 TN70; ○, R-020 AN68; ▲, UTI

Table 1 Inhibitory activities of R-020 TN70, R-020 AN68 and UTI on serine proteases

Enzymes	IC ₅₀ (U/ml)		
	UTI	R-020 TN70	R-020 AN68
FXa	>300	42	38
Plasma kallikrein	>1000	48	42
Trypsin	0.7	0.3	0.3
Plasmin	90	86	66
Leukocyte elastase	380	700	600
α-chymotrypsin	0.1	1.4	1.3

いる特異的な蛋白性の FXa 阻害剤の K_i 値²⁹⁾³⁰⁾ に比べて $10^2 \sim 10^3$ 大きいため、さらに強い阻害効果を得るために部位特異的な遺伝子改変を試みた。

3-9 R-020 TN70 およびヒト FXa のモデリング

改変部位を決定するために、R-020 TN70 とヒト FXa の複合体の立体構造のモデリングを行った。すなわち、BPTI とウシトリプシンとの複合体の X 線解析座標を使

用して BIOCES [E] system で R-020 TN70 とヒト FXa の複合体をモデリングした (Fig. 10)。その結果、R-020 TN70 の 19 番目の Gln および 46 番目の Tyr に近接するヒト FXa の残基は、それぞれ 24 番目の Glu および 48 番目の Lys であり、R-020 TN70 の 19 番目および 46 番目のアミノ酸をそれぞれ塩基性および酸性のアミノ酸に改変することで静電的な相互作用がさらに強固になることが推測された。そこで、19 番目の Gln を Lys または Arg に、46 番目の Tyr を Asp または Glu に置換することを試みた。

3-10 改変体の作製および FXa 阻害活性の測定

部位特異的な突然変異法を用いて、R-020 TN70 または R-020 AN68 を鋳型として 19 番目の Gln の Lys 置換体 Q19K および Arg 置換体 Q19R を、46 番目の Tyr の Asp 置換体 Y46D および Glu 置換体 Y46E を作製した。また、これらの一置換改変体を組み合わせた 4 種類の二置換改変体を作製した。これらを 2-2-2 の方法に従って発現させ、精製した。さらに、2-2-3 の方法に従って同定後、2-2-4 の方法に従って各種酵素に対す

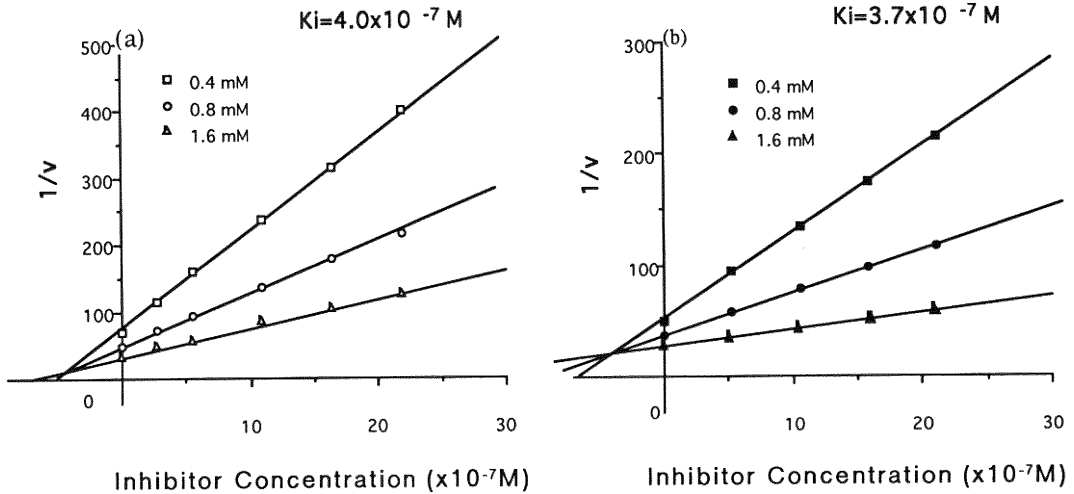


Fig. 9 Dixon plots of inhibition of FXa (a) and plasma kallikrein (b) by R-020 AN68.

る阻害活性を測定した (Table 2). ここで, R-020 TN70 および R-020 AN68 は比活性が同じであるが, 改変体はそれぞれ比活性が異なるため, IC₅₀ 値は nM で表わした. その結果, 一置換改変体では非改変体と比べて 3~6 倍, 二置換改変体では 13~23 倍阻害活性が上昇した.

3-11 改変体の阻害定数 (K_i 値) の測定

最も阻害活性が上昇した二置換改変体 Q19K/Y46D の FXa に対する K_i 値を測定した結果, K_i 値は 7.0 × 10⁻⁹ M であり, R-020 AN68 の K_i 値 4.0 × 10⁻⁷ M に比べて約 1/60 に阻害定数が減少した.

3-12 改変体の FXa 凝固時間

Q19K/Y46D の FXa 凝固時間を測定し, R-020 AN68 と比較した. Fig. 11 に示したように, 凝固時間を 50% 延長させるのに必要な R-020 AN68 および Q19K/Y46D の濃度はそれぞれ 6.4 μM および 0.44 μM であった.

4. 考 察

UTI は, Fig. 2-A に示したように, 143 個のアミノ酸からなる糖蛋白質であり Kunitz 様インヒビタードメインが 5 アミノ酸を介して 2 個接続されている. 著者は, 2 個の Kunitz 様インヒビタードメインのそれぞれが, UTI の各種酵素に対する阻害活性や種々の生理作用のいかなる部分を担っているのかを明らかにするために, まず, トリプシン阻害活性を有する 2 番目のドメインを単離し, その酵素阻害スペクトルの測定を試み

Table 2 IC₅₀ values of R-020 variants on human FXa

Variants	IC ₅₀ (nM)	Type of R-020
R-020	900	TN70, AN68
Q19K	240	TN70
Q19R	320	AN68
Y46E	150	TN70
Y46D	150	AN68
Q19K/Y46E	71	AN68
Q19R/Y46E	68	AN68
Q19K/Y46D	39	AN68
Q19R/Y46D	59	AN68

た.

UTI の cDNA は肝臓由来の cDNA library より既にクローニングされており, その構造は α 1M の C 末端に 2 個の Arg を介して連結されていることが報告されている⁵⁾. そこで, 著者は PCR 法で肝臓由来の cDNA library より, R-020 TN70 および R-020 AN68 cDNA を得た. 次に, R-020 TN70 および R-020 AN68 を大腸菌の菌体外へ分泌させるため, 著者らが以前に PSTI を大腸菌の菌体外へ分泌発現させたシステム¹¹⁾ を用いた. すなわち, まず R-020 TN70 および R-020 AN68 cDNA の上流に **Pho A S.P.** を接続し, トリプトファンプロモーターを有する発現ベクターへ挿入し, pM552 および pM594 を得た. つぎに, この pM552 および

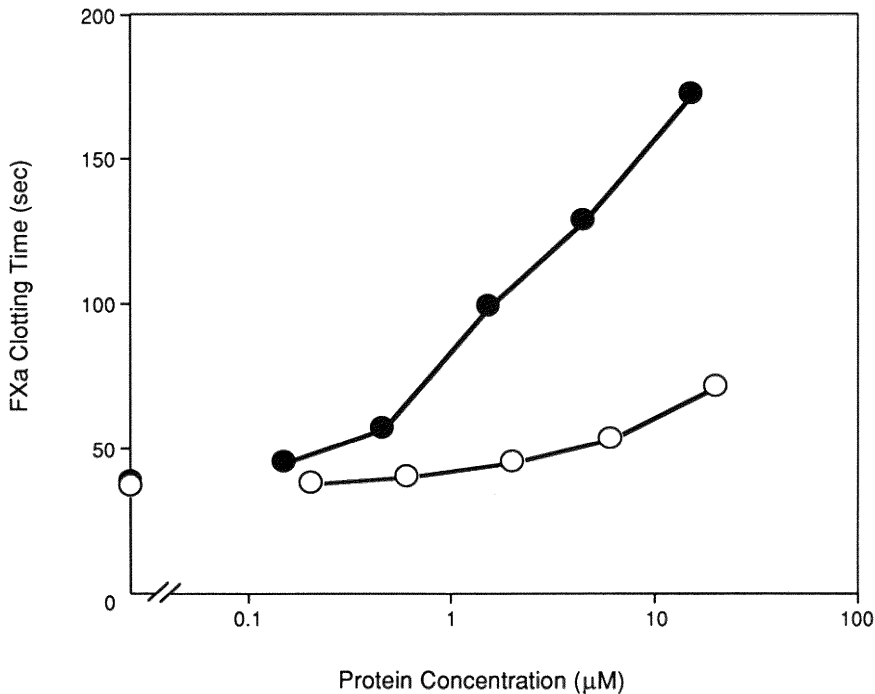


Fig. 11 Effects of R-020 AN68 and Q19K/Y46D on FXa clotting time.

○: R-020 AN68 and ●: Q19K/Y46D

pM594 で外膜リポ蛋白質が欠損した大腸菌 JE5505 を形質転換することによって、R-020 TN70 および R-020 AN68 を菌体外へ分泌させることに成功した。

この R-020 TN70 および R-020 AN68 を精製し、各種酵素に対する阻害スペクトルを UTI と比較した結果、UTI ではほとんど検出されなかった FXa および血漿カリクレインに対する阻害作用が認められた。また、UTI が有していたヒトトリプシン、ヒトプラスミンおよびヒト顆粒球エラスターゼに対する阻害活性はほとんど変化しなかった。なお、R-020 TN70 と R-020 AN68 において各種酵素に対する阻害活性はほぼ同等であった。これらの結果から、UTI の第 2 ドメインに存在する各種酵素に対する阻害活性の一部が第 1 ドメインの立体障害によって隠蔽されていた可能性が考えられた。この可能性は、UTI と同様に Kunitz 様インヒビタードメインを有するトリプスタチン⁸⁾ や TFPI⁹⁾ が FXa を阻害することからも示唆された。すなわち、トリプスタチンは、単一のドメインで構成されているため、立体障害は起こらない。また、TFPI は 3 個のドメインが接続され、2 番目のドメインに FXa 阻害活性が存在するが、1 番目および 3 番目のドメインの間に、それぞれ 20 および 41

個のアミノ酸が挿入され、立体障害が生じにくい構造になっていると思われた。

新たに阻害活性が検出された血漿カリクレインは、血液凝固カスケードの内因系の初期に働く酵素で、凝固因子である XII 因子を活性化し XII a とする。また、FXa は、内因系および外因系両凝固経路の共通部分に位置する酵素でプロトロンビンをトロンビンに活性化する。UTI の第 2 ドメインが、これらの酵素を阻害することは、血液凝固系に作用を示すことが考えられる。事実、最近、FXa の特異的な阻害剤として発見されたヒル由来の Antistatin (ATS)²⁹⁾ やダニ由来の Tick Anticoagulant Peptide (TAP)³⁰⁾ が、サルの播種性血管内凝固症候群 (Disseminated Intravascular Coagulation, DIC) モデルに対して有効性を示すことが報告されている^{31) 32)}。ATS および TAP の FXa に対する K_i 値は、それぞれ 3×10^{-10} M および 5×10^{-10} M であり^{30) 33)}、R-020 AN68 の FXa に対する K_i 値 4×10^{-7} に比べて著しく強い阻害作用を示す。そこで、著者は R-020 TN70 および R-020 AN68 の FXa 阻害活性を上昇させることを目的としてアミノ酸改変を試みた。すなわち、R-020 TN70 と FXa との立体構造モデルをもとに、両者の結

合が強固になるように改変する位置を決定した。酵素とその阻害物質の相互作用を立体構造モデルから推測するためには、それぞれの物質の X 線解析や、両者の複合体の X 線解析が必要であるが、R-020 TN70 およびヒト FXa はともに今だに三次元構造が決定されていない。そこで著者は、ヒト FXa の H 鎖とウシトリプシンとのアミノ酸配列のホモロジーが高いことおよび BPTI とウシトリプシンの複合体の X 線構造解析がすでになされていることに注目して BPTI とウシトリプシンとの複合体の構造をもとに BIOCES [E] system を用いて R-020 TN70-FXa 複合体のモデリングを行った。このようなアプローチは、用いた system は異なるものの、すでに Madison らによって改変 t-PA を作製するのに用いられており、彼らは t-PA とその阻害物質である PAI-1 の相互作用部位を推定し、その部位の相互作用を弱くするように改変を行うことにより PAI-1 による t-PA 分子の不活性化の回避を試みている³⁴⁾。著者は、モデリングした複合体の構造から R-020 TN70 および FXa の相互作用部位を推定し、静電的相互作用が強くなるように 19 位と 46 位を改変した。その結果、FXa 阻害活性が非改変体に比較して IC₅₀ 値で 3~6 倍強い改変体が得られた。さらに、これらを組み合わせた 2 アミノ酸置換改変体では、IC₅₀ 値で 13~23 倍強い改変体が得られた。また、阻害作用が最大となった Q19K/Y46D の K_i 値は R-020 AN68 の K_i 値に比べて約 1/60 となっており、明らかにアミノ酸改変によって阻害作用が強くなったことが確認された。この結果は、R-020 TN70-FXa 複合体のモデリングの精度が高かったことを示すものであり、またコンピューターを用いた分子設計の有用性を示した 1 つの例と言えよう。このように、分子全体の構造から酵素と阻害剤がより強固に結合するように改変することは、阻害物質の活性上昇のアプローチとして可能性があり、また強固に結合させるための相互作用として静電点相互作用が 1 つの factor として有用であることが示された。

最後に、FXa に対する阻害活性が最大に上昇した Q19K/Y46D の抗血栓作用を評価するために、FXa 凝固時間を R-020 AN68 と比較した。凝固時間を 50% 延長させるのに必要な Q19K/Y46D の濃度は、R-020 AN68 の約 1/15 であり、改変によってより抗血栓作用が強い物質が得られた。UTI は現在、そのトリプシン阻害活性やエラスターゼ阻害活性のために肺炎や急性循環不全治療薬として使用されている。R-020 改変体は、トリプシン、エラスターゼおよびプラスミンに対する阻害活

性を維持し、かつ新たに FXa に対する阻害作用が賦与されているので、DIC 等に対する抗凝固剤としての適用拡大が期待される。

稿を終えるに当たり、御指導、御校閲をいただきました木南 凌教授に心から感謝致します。また、立体構造のモデリングを御指導いただきました北里大学薬学部梅山秀明教授に深謝致します。

参 考 文 献

- 1) Tanaka, Y., Maehara, S., Sumi, H., Toki, N., Moriyama, S. and Sasaki, K.: Purification and partial characterization of two forms of urinary trypsin inhibitor, *Biochim. Biophys. Acta*, **705**: 192~199, 1982.
- 2) Gebhard, W. and Hochstrasser, K.: Inter- α -trypsin inhibitor and its close relatives, (Barrett, A.J. and Salvesen, G. eds: proteinase inhibitors) Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford, p 389~401, 1986.
- 3) Wachter, E. and Hochstrasser, K.: Kunitz-type proteinase inhibitors derived by limited proteolysis of the inter- α -trypsin inhibitor, IV. The amino acid sequence of the human urinary trypsin inhibitor isolated by affinity chromatography, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **362**: 1351~1355, 1981.
- 4) Bourguignon, J., Diarra-Mehrpour, M., Sesboué, R., Frain, M., Sara-Trepat, J.M., Martin, J.P. and Salier, J.P.: Human inter-alpha-trypsin-inhibitor: Characterization and partial nucleotide sequencing of a light chain-encoding cDNA, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **131**: 1146~1153, 1985.
- 5) Kaumeyer, J.F., Polazzi, J.O. and Kotick, M.P.: The mRNA for a proteinase inhibitor related to the HI-30 domain of inter- α -trypsin inhibitor also encodes α -1-microglobulin (protein HC), *Nucleic Acids Res.*, **14**: 7839~7850, 1986.
- 6) Enghild, J., Thøgersen, I., Pizzo, S. and Salvesen, G.: Analysis of inter- α -trypsin inhibitor and a novel trypsin inhibitor, pre- α -trypsin inhibitor, from human plasma. Polypeptide chain stoichiometry and assembly by glycan, J.

- Biol. Chem., **264**: 15975~15981, 1989.
- 7) **Kassell, B.**: Bovine trypsin-kallikrein inhibitor (Kunitz inhibitor, basic pancreatic trypsin inhibitor, polyvalent inhibitor from bovine organs). (Perlman, G.E. and Lorand, L. eds.: Methods in Enzymol.) Academic Press, NY and London, p 844~852, 1970.
 - 8) **Kido, H., Yokogoshi, Y. and Katunuma, N.**: Kunitz-type protease inhibitor found in rat mast cells. Purification, properties, and amino acid sequence. J. Biol. Chem., **263**: 18104~18107, 1988.
 - 9) **Wun, T-C., Kretzmer, K.K., Girard, T.J., Miletich, J.P. and Broze, G.J. Jr.**: Cloning and characterization of a cDNA coding for the lipoprotein-associated coagulation inhibitor shows that it consists of three tandem Kunitz-type inhibitory domains, J. Biol. Chem., **263**: 6001~6004, 1988.
 - 10) **Proksch, G.J. and Routh, J.I.**: The purification of the trypsin inhibitor from human pregnancy urine, J. Lab. Clin. Med., **79**: 491~499, 1972.
 - 11) **Kanamori, T., Mizushima, S., Shimizu, Y., Morishita, H., Kubota, H., Nii, A., Ogino, H., Nagase, Y., Kisaragi, M. and Nobuhara, M.**: Expression and excretion of human pancreatic secretory trypsin inhibitor in lipoprotein-deletion mutant of *Escherichia coli*, Gene, **66**: 259~300, 1988.
 - 12) **Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J.**: Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, p 69, 1982.
 - 13) **Laemmli, U.K.**: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, Nature, **227**: 680~685, 1970.
 - 14) **Lowry, O.H., Rosebrough N.J., Farr, A.L. and Randall R.J.**: Protein measurement with the Folin phenol reagent, J. Biol. Chem., **193**: 265~275, 1951.
 - 15) **Ohno, H., Kosaki, G., Kambayashi, J., Imaoka, S. and Hirata, F.**: FOY: [Ethyl p-(6-guanidino-hexanoyloxy) benzoate] methanesulfonate as a serine proteinase inhibitor. I. Inhibition of thrombin and factor Xa *in vitro*, Thromb. Res. **19**: 579~588, 1980.
 - 16) **Ogawa, M., Nishibe, S., Mori, T. and Neumann, S.**: Effect of human urinary trypsin inhibitor on granulocyte elastase activity, Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol, **55**: 271~274, 1987.
 - 17) **Friberger, P., Knos, M., Gustavsson, S., Aurell, L. and Claesson, G.**: Methods for determination of plasmin, antiplasmin and plasminogen by means of substrate S-2251, Haemostasis, **7**: 138~145, 1978.
 - 18) **Dixon, M.**: The graphical determination of Km and Ki, Biochem J, **129**: 197~202, 1972.
 - 19) **Marquart, M., Walter, J., Deisenhofer, J., Bode, W. and Huber, R.**: The geometry of the reactive site and of the peptide groups in trypsin, trypsinogen and its complexes with inhibitors, Acta Cryst., **B39**: 480~490, 1983.
 - 20) **Fung, M.R., Hay, C.W. and MacGillivray, R.T.A.**: Characterization of an almost full-length cDNA coding for human blood coagulation factor X, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **82**: 3591~3595, 1985.
 - 21) **Fujinaga, M., Delbaere, L.T.J., Brayer, G.D. and James, M.N.G.**: Refined structure of α -lytic protease at 1.7 Å resolution analysis of hydrogen bonding and solvent structure, J. Mol. Biol., **183**: 479~502, 1985.
 - 22) **Read, R.J., Fujinaga, M., Sielecki, A.R. and James, M.N.G.**: Structure of the complex of *Streptomyces griseus* protease B and the third domain of the turkey ovomucoid inhibitor at 1.8-Å resolution, Biochemistry, **22**: 4420~4433, 1983.
 - 23) **Remington, S.J., Woodbury, R.G., Reynolds, R.A., Matthews, B.W. and Neurath, H.**: The structure of rat mast cell protease II at 1.9-Å resolution, Biochemistry, **27**: 8097~8105, 1988.
 - 24) **Hughes, D.L., Sieker, L.C., Bieth, J. and Dimicoli, J.L.**: Crystallographic study of the binding of a trifluoroacetyl dipeptide anilide inhibitor with elastase, J. Mol. Biol., **162**: 645~658, 1982.
 - 25) **Read, R.J. and James, M.N.G.**: Refined crystal

- structure of *Streptomyces griseus* trypsin at 1.7 Å resolution, *J. Mol. Biol.*, **200**: 523~551, 1988.
- 26) **Miyata, T., Sakai, T., Sugimoto, M., Naka, H., Yamamoto, K., Yoshioka, A., Fukui, H., Mitsui, K., Kamiya, K., Umeyama, H. and Iwanaga, S.**: Factor IX Amagasaki: A new mutation in the catalytic domain resulting in the loss of both coagulant and esterase activities, *Biochemistry*, **30**: 11286~11291, 1991.
- 27) **Landt, O., Grunert, H. and Hahn, U.**: A general method for rapid site-directed mutagenesis using the polymerase chain reaction, *Gene*, **96**: 125~128, 1990.
- 28) **Morison, J.F.**: Kinetics of the reversible inhibition of enzyme-catalysed reactions by tight-binding inhibitors, *Biochim. Biophys. Acta*, **185**: 269~286, 1969.
- 29) **Tuszynski, G., Gasic, T. and Gasic, G.**: Isolation and characterization of antistasin. An inhibitor of metastasis and coagulation, *J. Biol. Chem.*, **262**: 9718~9723, 1987.
- 30) **Waxman, L., Smith, D., Arcuri, K. and Vlasuk, G.**: Tick anticoagulant peptid (TAP) is a novel inhibitor of blood coagulation factor Xa, *Science*, **248**: 593~596, 1990.
- 31) **Nutt, E., Jain, D., Lenny, A., Schaffer, L., Siegl, P. and Dunwiddie, C.**: Purification and characterization of recombinant antistasin: A leech-derived inhibitor of coagulation factor Xa. *Arch. Biochem. Biophys.*, **285**: 37~44, 1991.
- 32) **Neeper, M., Waxman, L., Smith, D., Schulman, C., Sardana, M., Ellis, R., Schaffer, L., Siegl, P. and Vlasuk, G.**: Characterization of recombinant tick anticoagulant peptide. A highly selective inhibitor of blood coagulation factor Xa, *J. Biol. Chem.*, **265**: 17746~17752, 1990.
- 33) **Dunwiddie, C., Thornberry, N.A., Bull, H.G., Sardana, M., Friedman, P.A., Jacobs, J.W. and Simpson, E.**: Antistasin, a leech-derived inhibitor of factor Xa, *J. Biol. Chem.*, **264**: 16694~16699, 1989.
- 34) **Madison, E.L., Goldsmith, E.J., Gerard, R.D., Gething, M.H. and Sambrook, J.F.**: Serpin-resistant mutants of human tissue-type plasminogen activator, *Nature*, **339**: 721~724, 1989.

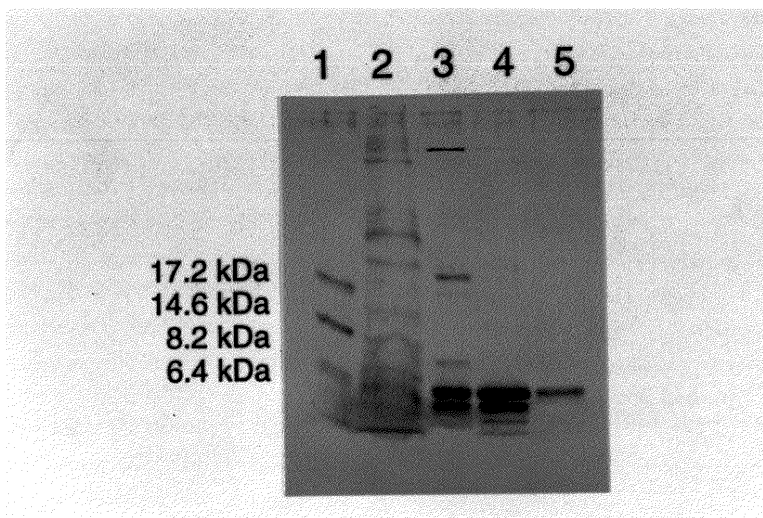


Fig. 7 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of R-020 TN70 purified from cultured supernatant of JE5505 (pM552). Lane 1, molecular weight marker (17.2 kD myoglobin, 14.6 kD myoglobin I and II, 8.2 kD myoglobin I, 6.4 kD myoglobin II); lane 2, cultured supernatant of JE5505 (pM552); lane 3, eluate from the sephadex G50 gel filtration column; lane 4, eluate from the Mono Q column; lane 5, R-020 TN70 purified by the Vydac C18 column. About 0.2 μ g protein was loaded on each lane of a 16% polyacrylamide gel, which was subsequently stained with silver.

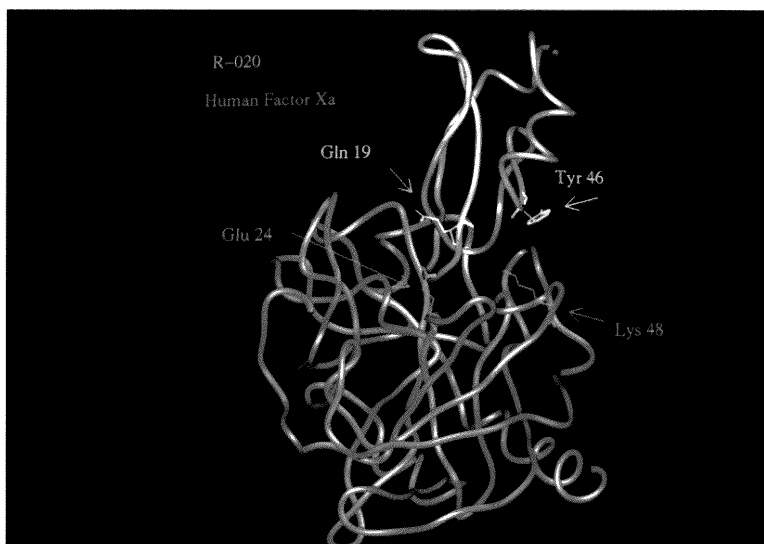


Fig. 10 A model of the interaction between R-020 TN70 and FXa based on the structure of the complex between bovine pancreatic trypsin and BPTI.