

氏 名	伊 葉 志 毅
学位(専攻分野)	博 士 (学 術)
学位記番号	博 甲 第 166 号
学位授与の日付	平成 10 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	工芸科学研究科 材料科学専攻
学位論文題目	ヒト外因系血液凝固阻害因子 TFPI とヘパリンとの相互作用に関する研究
審 査 委 員	(主査) 教 授 原 三 郎 教 授 梶 原 莞 爾 教 授 小 田 耕 平

論 文 内 容 の 要 旨

外因系血液凝固阻害因子 Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI) は、3つの Kunitz 型阻害ドメイン (K1, K2, K3) と直鎖状 C-末端塩基性領域 (CB) からなるプロテアーゼインヒビターである。血液凝固因子 Xa と VIIa はそれぞれ TFPI の K2 と K1 によって阻害され、Xa の TFPI による阻害はヘパリンの存在によって増強される。本研究は、ヘパリンと TFPI の相互作用の解析を通じて外因系血液凝固阻害の意義を明らかにすることを目的として行われた。

TFPI の cDNA を持つ組み換え体ウイルス、AcTFPI 及び HyTFPI を調製し、それぞれを Sf21 細胞とカイコに感染させ、両者において Xa 因子に対する阻害活性の発現を確認し、TFPI がバキュロウイルス発現系により生産できることを明らかにした。さらに、個々のドメインの役割解明のため、K1, K2, K3 の cDNA を挿入した組換え体バキュロウイルス、HyK1, HyK2, HyK3, を作成し、Sf21 細胞を用いて各ドメインを発現させた。

TFPI の塩基性クラスター (CB) とヘパリンの結合様式を明らかにするため、ヒト TFPI の Phe(243)-Glu(270)間のアミノ酸配列と相同で、長さの異なるペプチドを Fmoc 法で合成した。各ペプチドをヘパリンカラムにかけて、食塩濃度勾配法で溶出濃度を測定する方法により、CB を中心としてその前後のアミノ酸を欠くペプチドの溶出食塩濃度を比較し、Lys(254)-Lys(265)間に含まれる 9 個の塩基性アミノ酸がヘパリンとの結合に最も重要であることを明らかにした。また、ペプチド Lys(254)-Lys(265)に含まれる各塩基性アミノ酸残基を Ala に変換した 11 個の変異体ペプチドを用いた同様の実験から、ヘパリンとの結合への寄与は Arg(257)と Arg(259)が最も強く、Lys(265)が最も弱く、その他の Lys の寄与は同程度であることも明らかにしている。

TFPI とヘパリンとの結合に必要なヘパリン中の硫酸基の配置を確定するため、硫酸基の位置をアザインした 6 種類の修飾ヘパリン (2-脱硫酸化、6-脱硫酸化、N-脱硫酸化-N-アセチル化、2, N-脱硫酸化-N-アセチル化、6, N-脱硫酸化-N-アセチル化、2, 6-硫酸化ヘパリン) を調製し、これらを用いて修飾ヘパリンカラムを作成した。TFPI と合成ペプチドを修飾ヘパリンのアフィニティークロマトグラフィーに供し、その溶出食塩濃度から TFPI および合成ペプチドと各修飾ヘパリンの結合の強さを求めた。修飾ヘパリンカラムからの TFPI およびペプチドの溶出順序は、天然ヘパリン、2-脱硫酸化、N-脱硫酸化-N-アセチル化、6-脱硫酸化ヘパリンの順であった。また、2 種類の硫酸基を除去した場合は、6 位と N 位、2 位と 6 位、2 位と N 位の硫酸基を除去したヘパリンの順であった。以上の結果から、TFPI とヘパリンとの相互作用にはヘパリン中の 6, N, 2 位の順ですべての硫酸基が関与している

と結論している。また、TFPIによるXa因子の阻害におけるヘパリンの増強作用を上記の6種類のヘパリンを用いて行ったところ、アフィニティークロマトグラフィーで得られた結果とほぼ同じ結果を得、阻害作用の点からもヘパリンの3種類の硫酸基の重要性を指示する結果を得ている。

これらの研究の成果は、下記の通り学術雑誌に発表されている。

1. "Structural requirements of human tissue factor pathway inhibitor (TFPI) and heparin for TFPI-heparin interaction"
Zhiyi Ye, Ryo Takano, Kaeko Hayashi, Thanh-Van Ta, Hisao Kato, Yuichi Kamikubo, Yo Nakahara, Kosuke Kumeda, and Saburo Hara
Thrombosis Research (1998), 89, pp.263-270.
2. "Specific 6-O-desulfation of heparin"
Ryo Takano, Zhiyi Ye, Thanh-Van Ta, Kaeko Hayashi, Yutaka Kariya, and Saburo Hara
Carbohydrate Letters (1998), 3, pp.71-77.

論文審査の結果の要旨

外因系血液凝固阻害因子TFPIは発見されてから比較の日が浅く、その機能や役割の解析は十分に進んでいない。しかし、TFPIは血栓の防止のような医学的に非常に重要な問題に深い関わりを持っており、国際的な新薬開発競争の標的の一つとなっている。申請者はバキュロウイルス発現系が持つ大きな特色、すなわち発現したタンパク質が天然型の立体構造を持つ活性型であること、および糖鎖を結合した糖タンパク質を生産できること、を最大限に利用してTFPIを発現しようとしたことは評価できる。また、ドメイン構造を持つタンパク質の場合、各ドメインの機能解析にはドメインごとのタンパク質の確保は不可欠であり、この点についても一応の成果を上げている。発現させたタンパク質の利用にはまだ一定の努力の必要性が認められるが、発現系は完成しており今後の成果が期待できる。

TFPIの機能解析にはヘパリンを無視することはできないが、ペプチド合成により見事な結論を得ている。TFPIとヘパリンの相互作用の本体部分をペプチド合成により解明し、ヘパリンとの相互作用におけるTFPIの各アミノ酸残基の役割を明らかにしたことはTFPI研究に新たな知見をもたらすものである。さらに、ヘパリンの硫酸基とTFPIとの関連についても、巧みな硫酸基の配置方法を考案して各硫酸基の重要性を解明した。本論文は、タンパク質側と糖鎖側からの両面からの追求により、TFPIの分子レベルでの挙動を明らかにした意義ある論文である。