

4. α_2 -マクログロブリンの機能について*

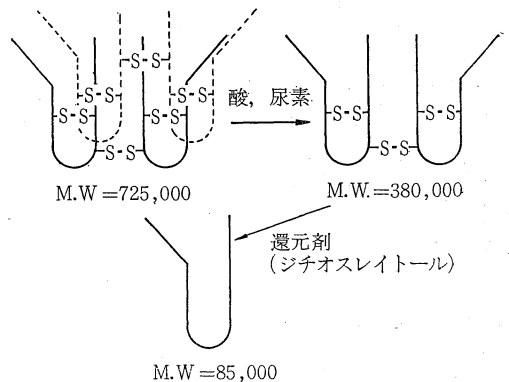
高田 明和・高田由美子**

α_2 -マクログロブリン (α_2 -M) は、分子量 725,000 の血漿糖蛋白である。 α_2 -M はほとんどいかなる endopeptidase とも反応する。 Table 1 に α_2 -M と結合する蛋白分解酵素のスペクトラムを示す。ここに示すように非常に多くの異なった機能をもつ蛋白分解酵素が α_2 -M と反応する。特に血漿の凝固、線溶、キニン系の酵素である serine protease はほとんどすべて α_2 -M と反応するが、補体系の Cl_s , Cl_r は反応しない。

本稿ではまず α_2 -M の構造を述べ、次に血漿プロテアーゼとの反応について述べる。

1. α_2 -M の構造

α_2 -M は pH 2~4 の酸処理、尿素などの変性剤により分子量 380,000 の低分子フラグメントに解離する。¹⁾ さらにジチオスレイトールで還元すると分子量 185,000~190,000 のポリペプチド鎖に解離する。²⁾ これらの結果から α_2 -M は分子量がほぼ同じ 4 つの polypeptide からなり、各 2 本が S-S 結合で架橋され、分子量 380,000 の subunit を形成し、各々の subunit が非共有結合でつながっていることが示唆される (Fig. 1)。最近この 4 本の polypeptide 鎖が同じらしいことが示されている。³⁾ α_2 -M は 8~10% の糖を含み、各糖鎖はアスパラギンとグリコシルアミン型の結合をしている。また、ヘリックス構造

Fig. 1. α_2 -M の構造.

はほとんどなく、約 40% の β 構造の部分がある。⁴⁾

最近 Salvesen and Barrett⁵⁾ は α_2 -M と種々の protease との反応をしらべ、protease は Fig. 2 に示す α_2 -M の bait region を切断すること、その protease は IVa region で共有結合することを示した。

2. α_2 -M と protease の反応

1962 年 Haverback ら⁶⁾ は人血清にトリプシンを加えると、そのエステラーゼ活性が α_2 -グロブリンに結合し

Table 1.

I Endopeptidases	
1. Serine proteinases :	trypsin, kallikrein, plasmin, thrombin, acrosin
2. Thiol proteinases :	cathepsin B1, papain, bromelain, ficin
3. Carboxyl proteinases :	cathepsin D
4. Metal proteinases :	thermolysin, clostridiopeptidase A, collagenase
II Exopeptidases	
1. Carboxypeptidase	
III Non-peptidases	
1. Aspartate aminotransferase	
2. Phytohemagglutinins	

* Function of α_2 -macroglobulin

** Akikazu Takada, Yumiko Takada, 浜松医科大学第 2 生理学教室.

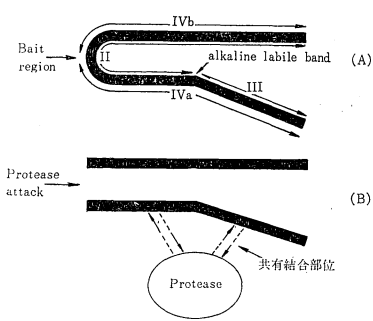


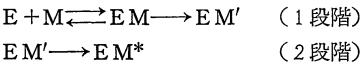
Fig. 2. α_2 -M のポリペプチド鎖とその分画.

Bait region で protease の水解をうけ、2 本鎖になる. protease は IVa 部分で共有結合する. 1 本の IVa は 1 つの結合部位をもつ.

ていること、さらにここに大豆のトリプシンインヒビター (soy bean trypsin inhibitor : SBTI) を加えても、この活性は失われないことを見出した. Barrett and Starkey⁷⁾ は α_2 -M の protease との反応には次のような特徴があることを示した.

- (a) 活性ある endopeptidase のみ α_2 -M と反応する. すなわち, zymogen や不活化された protease は反応しない.
- (b) Protease は非可逆的に α_2 -M と反応する.
- (c) 1 分子の α_2 -M に 1 分子の protease が結合する.
- (d) 結合した protease はカゼインのような高分子基質はよく抑制するが、低分子基質の抑制は少ない.
- (e) 結合した protease に高分子の protease inhibitor は働かない.

以上の現象を説明するために彼らは次のような仮説を提出した. それによると酵素 (E) は α_2 -M (M) と 2 段階で反応する.



第 1 段階では E は α_2 -M の一部を水解する. 水解をうけた α_2 -M は立体構造に変化をおこし M^* となり、この際に E は M^* にとりこまれる (trap) ようになる. これが "trap hypothesis" とよばれるものである. Salvesen and Barrett⁵⁾ によれば α_2 -M の 4 つの polypeptide の IVa region と共有結合することを示した. したがって、 α_2 -M は protease と結合する 4 つの site を有し、各 site は 1 つの polypeptide 鎖に 1 つずつしかないことが判かる (Fig. 3).

α_2 -M と protease の反応のもう 1 つの特徴はとり込まれた protease が抗体と反応することが出来るという点

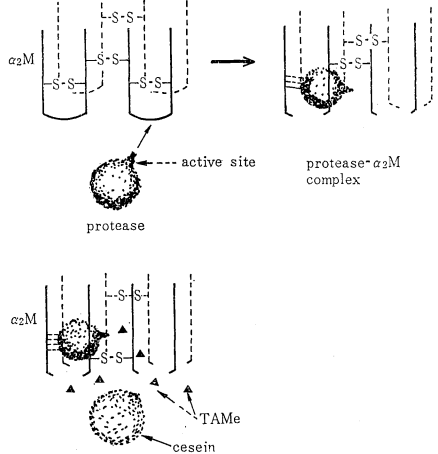


Fig. 3. α_2 -M と protease の反応.

上図は α_2 -M の bait region が protease により水解され protease がとり込まれるところを示す. 下図は α_2 -M にとり込まれた protease が TAME のような小分子基質は水解するが、casein のごとき高分子基質を水解しないことを示す.

Table 2. 血漿 protease inhibitor.

	分子 量	血漿中濃度 (μ M)
α_2 -macroglobulin	725, 000	2.0~5.8
Inter α -trypsin inhibitor	160, 000	1.2~4.4
C1 inactivator	105, 000	1.4~3.3
Antichymotrypsin	69, 000	4.4~8.7
Antithrombin III	62, 000	3.5~6.3
α_2 -antiplasmin	65, 000	1.5~1.8
α_1 -antitrypsin	56, 000	35~71

である. Fig. 4 に示すように plasmin と α_2 -M との混合液を 10 分, 30 分反応させ 2 次元の免疫電気泳動を行った. 抗体としては antiplasminogen (anti-plg) を用いている. Free の plasmin との line が β -region にあり、 α_2 -M との complex に対する反応が α_2 -region に見られる. このことは α_2 -M と complex を作った plasmin は anti-plg と反応することが出来ることを示す. すなわち protease の全部が α_2 -M の molecule の中にとり込まれるのではなく、分子のかなりの部分が外に出ていることが示唆される.

3. α_2 -M と他の血漿プロテアーゼインヒビター

血漿中には Table 2 に示すように 7 種の protease inhibitor が確立している. この内 α_2 -M は trypsin, thrombin, plasmin などと反応するが、これらはいずれ

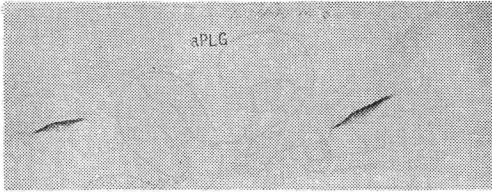


Fig. 4. α_2 -M と plasmin の complex の 2 次元電気泳動.

血漿 0.9 ml に urokinase 0.1 ml (100 unit) を加え, 10 分 (左), 30 分 (右) インキュベートし, 抗 plasminogen 抗体で 2 次元電気泳動をした. α_2 領域に α_2 -M-plasmin complex が見られる.

も α_1 -antitrypsin (α_1 -AT), antithrombin-III (AT-III), α_2 -antiplasmin (α_2 -AP) と特異的に反応する. したがって, α_2 -M の作用はこれらの inhibitor に対して 2 次的なものかどうかしらべる必要がある.

(a) α_2 -M と trypsin の反応

Trypsin を血漿に加えて, その TAME 水解能と casein 分解能を見たものが Fig. 5 である.^{8,9)} 血漿に加えられた 2 μ g の trypsin は TAME を水解することが出来るが, カゼイン(この場合は蛍光カゼインを用いている)の水解は全く抑制されている. 血漿を次第に稀釈するとカゼイン水解能は次第に増加するが, TAME 水解能はかえって減少する.

さらに血漿を稀釈すると TAME 水解も casein 分解

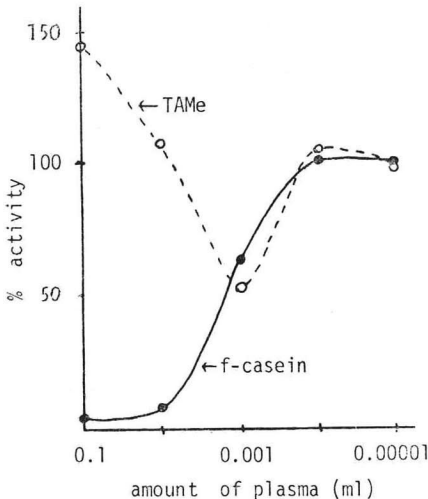


Fig. 5.

血漿 0.1 ml に 10 μ M の TAME または 1 % の蛍光カゼイン 0.5 ml を加え, これに trypsin を 2 μ g 加え, TAME 水解は 30 分, casein 分解の場合は 60 分 インキュベートし, 水解量を測定した.

も抑制されなくなる. α_1 -AT を稀釈してゆくと, Fig. 6 に示すように α_1 -AT の濃度の高いところでは trypsin は完全に抑制される. この α_1 -AT に α_2 -M を加えると血漿に見られるように trypsin の TAME 水解能は抑制されなくなる (Fig. 7). 血漿中には α_1 -AT は α_2 -M の

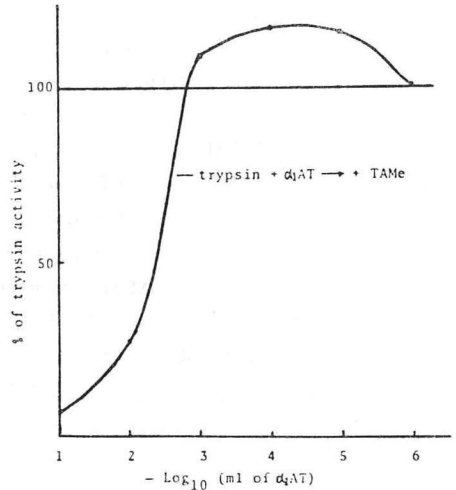


Fig. 6. 純化 α_1 -AT による trypsin の阻害.
 α_1 -AT の 1 ml (11 μ M) を稀釈して 0.1 ml を 2 μ g の trypsin と混合した.

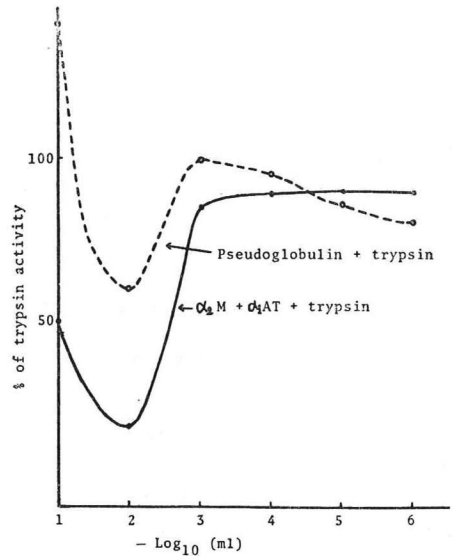


Fig. 7. 純化 α_2 -M と α_1 -AT による trypsin の阻害.

2 μ g の trypsin を α_2 -M と α_1 -AT の混液に加えた. 1 ml の α_2 -M, α_1 -AT の混液は 0.9 μ M の α_2 -M と 11 μ M の α_1 -AT を含む.

10倍以上の濃度で存在する。 α_2 -M と trypsin の結合定数は α_1 -AT と trypsin との結合定数より高いことが示されている。¹⁰⁾ したがって、上記の現象は次のように説明される。Trypsin を血漿に加えるとまず α_2 -M にとり込まれ、trypsin α_2 -M complex は TAME を水解することは出来るが casein を分解出来ない。血漿を 100 倍に稀釈すると α_2 -M は加えた trypsin (2 μ g) に対し、 α_2 -M はモルにして約 1/10 量、 α_1 -AT は大体等モル存在する。したがって、ここでは trypsin は α_1 -AT と結合するが、 α_1 -AT-trypsin の結合は不可逆で、active site を block するので TAME も casein の水解も阻害される。さらに血漿を稀釈すれば α_1 -AT も α_2 -M も稀釈され、trypsin を阻害することが出来ない。

α_2 -M は小分子基質の protease による水解は抑制しないと言われるが、その分子量と α_2 -M trypsin complex による水解能との関係を示したものが Table 3 である。分子量 800 以下の小分子基質の場合はだいたい分子量の大きいものほど α_2 -M と結合した trypsin による水解が free の trypsin より少ないが、S-2444 のように分子量が小さくても抑制されることがあるので立体構造も重要であると考えられる。また、TAME の水解のように α_2 -M-trypsin complex のほうがやや水解能が高いこともある。以上から少なくとも trypsin の抑制に関しては α_2 -M が primary inhibitor で α_1 -AT は secondary inhibitor であることが判かる。

(b) α_2 -M と plasmin の反応

plasmin と α_2 -M、 α_2 -AP との反応を述べる前に、プラスミノゲン (plg) の構造と活性化について述べる必要がある。Fig. 8 に示すようにプラスミノゲンは生体内では一般に N 末端にグルタミン酸をもつ Glu-plg として存在する。Plg はウロキナーゼ (UK) などの acti-

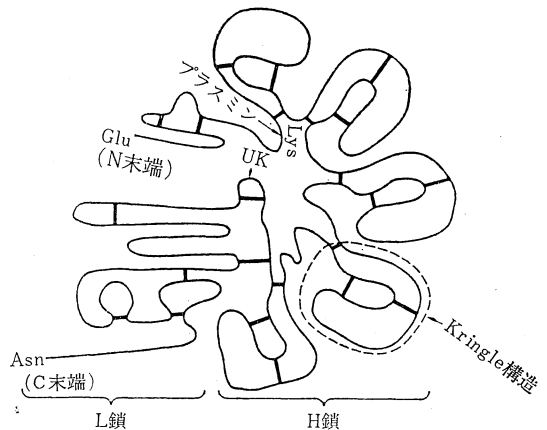


Fig. 8. Glu-plg のモデルと plasmin になった際の H鎖, L鎖.

vator により Arg-Val bond が切断され、plasmin になるが、この light chain (C 末端側) に active site がある。Heavy chain には 5 つの kringle 構造があり、1 ~ 4 までの kringle にリジンと結合するリジン結合部位 (lysine binding site: LBS) がある。このうち第 1 の kringle (N 末端側) にはリジンとの結合の強い high affinity の LBS と結合の弱い low affinity の LBS がある。Markus ら¹¹⁾ は high affinity の LBS にリジンが結合しても Glu-plg の立体構造はあまり変化しないが、low affinity の LBS にリジンが結合すると立体構造が大きく変化することを示した。Lerch ら¹²⁾ は第 1 の kringle と low affinity の LBS は N 末端の peptide 鎖と結合しているので Glu-plg は構造が tight であるが、ここにリジンやその類似物質がついたり、N 末端の pep-

Table 3. α_2 -M-trypsin complex による種々基質の水解.

	Trypsin	α_2 -M-trypsin	M. W. ^{a)}	α_2 -M-trypsin/trypsin ^{b)}
S-2222 (2HCl)	1.032 ^{c)}	0.488 ^{c)}	741	0.47
S-2160 (HCl)	0.141 ^{c)}	0.102 ^{c)}	681	0.72
S-2238 (2HCl)	0.298 ^{c)}	0.281 ^{c)}	626	0.94
S-2251 (2HCl)	0.022 ^{c)}	0.025 ^{c)}	551	1.14
S-2444 (HCl)	0.664 ^{c)}	0.406 ^{c)}	499	0.61
TAME (HCl)	0.260 ^{d)}	0.360 ^{d)}	379	1.31

a) : molecular weight of the substrate as mono or dihydrochlorides.

b) : ratio of hydrolysis of substrate by α_2 -M-trypsin complex to that by trypsin.

c) : Δ OD/min.

d) : μ moles/min.

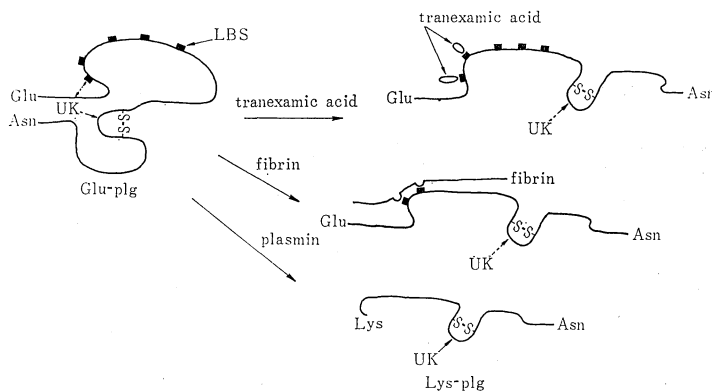


Fig. 9. Glu-plg の立体構造の変化と Lys-plg.

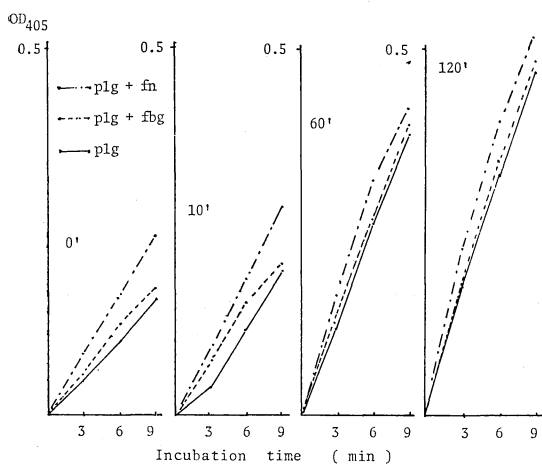


Fig. 10. フィブリノーゲンまたは fibrin 存在下における Glu-plg, Lys-plg の urokinase による活性化.

Glu-plg を少量の plasmin で Lys-form にして、これに urokinase を加え、活性化の程度を S-2251 の水解でみたもの。

(0' は Glu-plg と plasmin を混じてすぐ urokinase を加えたもの。120' は 2 時間後に活性化した場合)

tide が切断され Lys-plg になると立体構造が変化すると述べている (Fig. 9)。Fig. 10 は Glu-plg を UK で活性化した場合の plasmin 活性を S-2251 の水解でみたものを示している。Glu-plg に fibrin がつくと活性化がよくなる。一方 Glu-plg に plasmin を加え 1~2 時間インキュベートとして Lys-plg に変えると活性化は非常によくなり、fibrin の存在の影響をあまりうけなくなる。

Fig. 11 は Glu-plg または Lys-plg に種々の濃度の tranexamic acid を加え UK で活性化した場合を示してあ

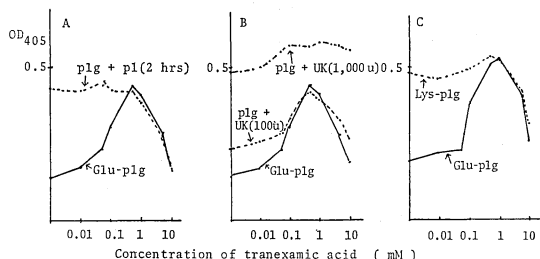


Fig. 11. 種々の tranexamic acid の濃度下における plg の活性化.

左図は Glu-plg と (Glu-plg + plasmin) の比較。

右図は Glu-plg と Lys-plg の比較。

る。Glu-plg は tranexamic acid 1 mM で非常に活性化されやすくなるが、Lys-plg は tranexamic acid のないところで充分活性化されやすく、tranexamic acid を加えても活性化は増加しない。

さて、このようにして活性化された plasmin に対する α_2 -M と α_2 -AP の阻害の関係はいかであらうか。Fig. 12 は 0.1 cu の plg を UK により活性化して生成された plasmin の α_2 -AP と α_2 -M による阻害を示す。0.1 cu の plasmin はほぼ 0.1 μ M に相当するので α_2 -AP はモル：モルで完全に阻害するが、 α_2 -M は 8 倍の 0.8 μ M の濃度でもあまり阻害がかからないことがわかる。一方、 α_2 -AP が plasmin を阻害するときはまず α_2 -AP は plasmin の LBS と結合する必要がある。¹³⁾ しかし、plasmin の LBS が fibrin や tranexamic acid などに結合しているときは α_2 -AP は plasmin を阻害しにくい。^{14,15)} Fig. 13 に示すように 0.2 cu の plg より生成された plasmin は 0.2 μ M の α_2 -AP により完全に阻害されるが、fibrin の存在下では阻害が少ない。一方、この

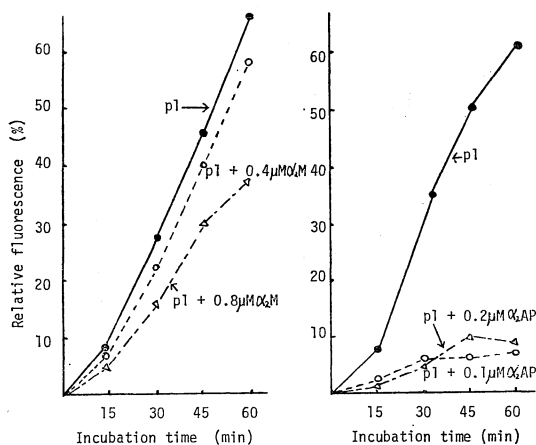


Fig. 12. α_2 -M と α_2 -AP による plasmin の阻害.
plasmin は 0.1 casein unit.

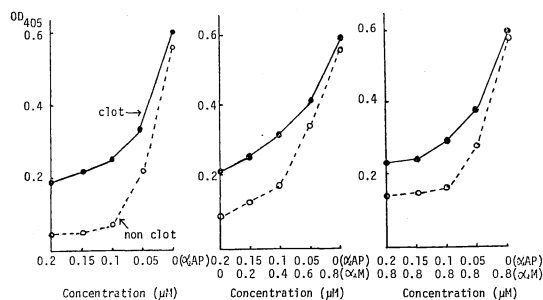


Fig. 13. Fibrin の存在の有無における 0.1 cu の plasmin の α_2 -M, α_2 -AP との反応.

mixture に α_2 -M を加えた際、もし plasmin が α_2 -M にとり込まれれば、 α_2 -AP により阻害されないで S-2251 水解は増加するはずである。しかし、実際は水解の増加はわずかであり (Fig. 13 中、右)、plasmin の阻害に対する α_2 -M の役割の少ないことを示す。ここを図解して示したものが Fig. 14 である。一方、tranexamic acid など LBS が結合された plasmin は α_2 -AP には結合しにくい、 α_2 -M に結合しやすくなるのが Fig. 15 に示される。Plasma に UK を加え、種々の濃度の tranexamic acid を加えると casein 分解は低下する。これは tranexamic acid の結合した plasmin が α_2 -M にとり込まれるためと考えられる。実際純化した α_2 -M を用いても同様の現象が見られる (Fig. 15 右)。Müllertz¹⁶⁾ は凝固がおこると plasmin は α_2 -M にとり込まれやすくなると言っているが、上述のごとく tranexamic acid や fibrin が LBS に結合した plasmin は α_2 -M と反応しやすくなると思われる。

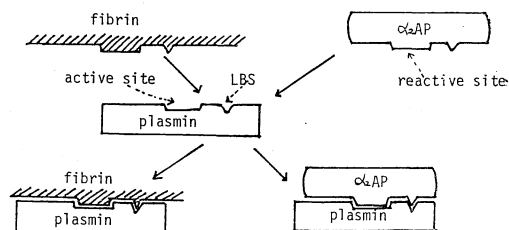


Fig. 14. Plasmin と fibrin, α_2 -AP との反応.

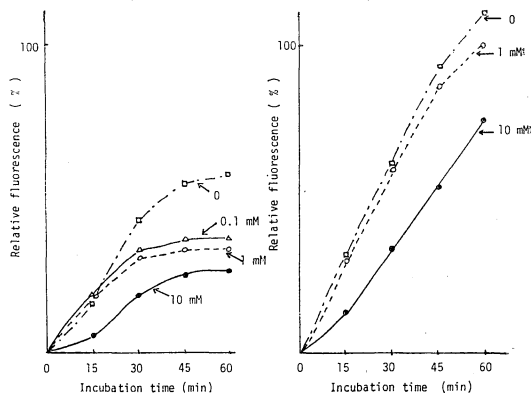


Fig. 15. 種々の tranexamic acid の濃度における α_2 -M と plasmin の反応.

左図は plasmin を血漿に加えた場合、右図は plasmin と純化 α_2 -M との反応。

(c) α_2 -M と thrombin の反応

Antithrombin-III (AT-III) は thrombin とモル：モルで反応し、thrombin の作用を不活化する。Rosenberg^{17,18)} は heparin が AT-III と結合すると thrombin の不活化の速度を非常に増大させることを示している。一方、Shapiro and Anderson¹⁹⁾ は血漿のような crude な系では thrombin はまず α_2 -M により trap されると述べている。われわれは thrombin の阻害に対する AT-III と α_2 -M の役割をしらべた。方法としては次のようにした。

(1) Plasma または脱線維素血漿 (defibrinated plasma) を稀釈してこれに Ca^{++} を加え凝固させ、一定時間インキュベートして後、これに heparin の存在下または heparin なしで S-2238 (thrombin の特異的基質) の水解を見た。

(2) Plasma または脱線維素血漿を稀釈してこれに thrombin を加え、一定時間インキュベートし、これに heparin を加えた場合、加えない場合の S-2238 の水解をみた。

(3) Heparin を稀釈血漿に加え、これに thrombin を加え一定時間インキュベートし、これに S-2238 を加えて水解をみた。

Fig. 16 は実験の場合で、 Ca^{++} を加えて clot させた場合、たとえば30分後に S-2238 を加えると実線のごとき curve が得られる。一方、一定時間後に heparin を加え S-2238 の水解を見たものが点線で示してある。たとえば、30分インキュベートした場合点線と実線の差が AT-III-heparin で阻害された部分と考えられる。点線の部分の水解は $\alpha_2\text{-M}$ にとり込まれた thrombin によるも

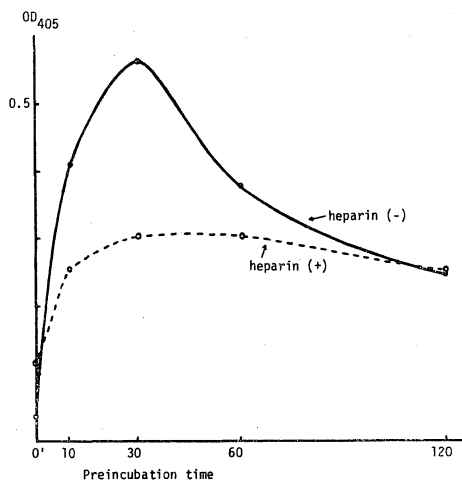


Fig. 16. Ca^{++} 再添加血漿の heparin 存在下における S-2238 水解量。

たとえば30分のところでは稀釈血漿に Ca^{++} を加え30分後にこの溶液に heparin と S-2238 または S-2238 のみを加えた。

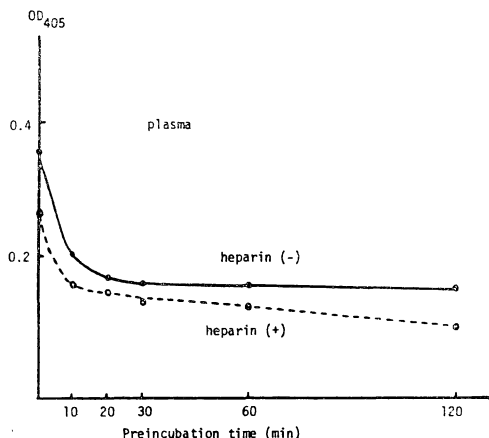


Fig. 17. 血漿に人 thrombin を加えた場合の heparin の存在有無における S-2238 の水解。

のであると考えられる。 Ca^{++} を加えて2時間インキュベートした血漿は、もはや heparin を加えても加えなくても同じ量の S-2238 を水解した。

Fig. 17 は(2)の場合で thrombin を脱線維素血漿に加えると heparin の有無と関係ない水解量を示した。Fig. 18は(3)の場合で heparin 加の血漿に加えた thrombin は heparin のない血漿より少ない S-2238 水解量を示した

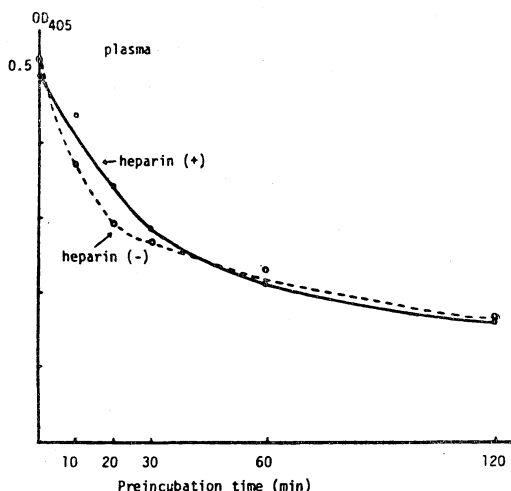


Fig. 18. Heparin 加血漿に thrombin を加えた場合。

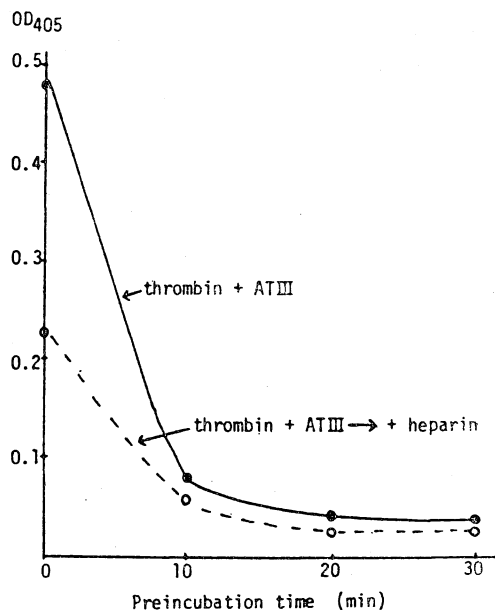


Fig. 19. 純化 AT-III と thrombin の反応。Thrombin は 1 unit, AT-III は $0.92 \mu\text{M}$ 。

これらの実験は heparin のないところで血漿に加えられた thrombin は主として α_2 -M にとり込まれ, heparin の存在下で血漿に加えられた thrombin や生成された thrombin は AT-III と反応する可能性を示す. 一方, 純化した AT-III, α_2 -M と thrombin の反応をしらべると Fig. 19 に示したように thrombin は heparin の存在しないときもかなり早く AT-III と結合し, heparin の存在下ではこの反応が促進されることが示される. このことは Shapiro and Anderson¹⁹⁾ の言うごとく thrombin と AT-III, α_2 -M の反応は純化の系と crude な系で異なる可能性を示している.

結 語

α_2 -M は trypsin とは primary に反応し, plasmin とは secondary であり thrombin の場合は血漿中で heparin のない場合とある場合で異なるように思われる. しかし plasmin の場合も fibrin の存在下, リジン類似物質の存在下で α_2 -M と α_2 -AP の阻害に関する関与の程度が異なることが示される. また, α_2 -M と protease の反応自体でもなぜ異なる特異性をもつ protease が bait region を水解するのか, trap の機作はどのようになっているのか, などの不明な点が多い.

さらに α_2 -M は血中濃度が高いので生物学的機能がなにかあると考えられているが, 今のところはっきりした機能がとらえられていない. たとえば免疫抑制作用が知られている.²⁰⁾

以上のように α_2 -M については構造的にも, 機能的にも不明の点が多いので今後の解明が望まれる.

文 献

1) Jones, J. M. et al. : Biochem. J., **127** : 187,

1972.
 2) Harpel, P. C. : J. Exp. Med., **138** : 508, 1973.
 3) Swenson, R. P. and Howard, J. B. : J. Biol. Chem., **254** : 4452, 1979.
 4) Frenoy, J. P. et al. : J. Biol. Chem., **252** : 1129, 1977.
 5) Salvesen, G. R. and Barrett, A. J. : Biochem. J., **187** : 695, 1980.
 6) Haverback, B. J. et al. : J. Clin. Invest., **41** : 972, 1962.
 7) Barrett, A. J. and Starkey, P. M. : Biochem. J., **133** : 709, 1973.
 8) Takada, A. : Thromb. Res., **14** : 413, 1979.
 9) Takada, A. and Takada, Y. : Thromb. Res., **18** : 205, 1980.
 10) Bieth, J. et al. : "Proteinase Inhibitors" Springer Verlag Berlin, 1974, p. 53.
 11) Markns, G. et al. : J. Biol. Chem., **254** : 1211, 1979.
 12) Lerch, P. G. et al. : Eur. J. Biochem., **107** : 7, 1980.
 13) Wiman, B. and Collen, D. : Eur. J. Biochem., **84** : 573, 1978.
 14) Takada, A. and Takada, Y. : Thromb. Res., **18** : 237, 1980.
 15) Takada, A. et al. : Thromb. Hemost., **43** : 20, 1980.
 16) Müllertz, S. : Biochem. J., **143** : 273, 1974.
 17) Damus, P. S. et al. : Nature, **246** : 355, 1973.
 18) Rosenberg, R. D. and Damus, P. S. : J. Biol. Chem., **248** : 6490, 1973.
 19) Shapiro, S. S. and Anderson, D. B. : "Chemistry and Biology of Thrombin" Ann Arbor Science, Ann Arbor, Mich., 1977, p. 361.
 20) Chase, P. S. : Cell Immun., **5** : 544, 1972.