

PRF

蛋白質研究奨励会ペプチド研究所報 Vol. 4 No. 1 1978. 9.

血液凝固 — キニン — 線溶系プロテアーゼの 新しいペプチド合成基質

大阪大学蛋白研助教授 岩永貞昭

はじめに

血漿中には数多くのプロテアーゼが含まれている。多くは血液凝固および線溶系、補体系、キニン系など生体防衛に直接関与するもので、病態時におけるこれら酵素の活性変動は疾患の診断に欠かせない情報である。しかし従来こうしたプロテアーゼの活性を特異的かつ迅速に測定する方法は皆無に近く、補体系のプロテアーゼにあっては主に溶血反応を、また凝固系や線溶系にあってはフィブリンクロットの形成と溶解を指標としたものであった。近年になり凝固因子や線溶因子の純化が進み、それらの酵素化学的性質の解明と相まってようやく新しい活性測定法の開発が試みられつつある。その一つは免疫学的方法の導入であり、もう一つはペプチド合成基質を用いての方法²⁾である。本稿では、後者の方法を中心にすでに実用化の段階にある合成基質およびその測定原理などについて述べる。なお、限られた紙数なのでペプチド基質の登場してきた背景や測定法の実際などは割愛するが、それらは末尾の文献³⁰⁻⁴³⁾で補っていただきたい。

凝固 — キニン — 線溶系プロテアーゼの基質特異性

約20種余りある血中プロテアーゼの中でも、凝固 — 線溶 — キニン系に関与するプロテアーゼはトリプシンと同様セリンプロテアーゼに属している。トリプシンは蛋白質を消化するが、そうした作用はこれらのプロテアーゼにはなく、固有の蛋白質を限定分解する著しい特徴がある。プラスミンは数多くの蛋白質を消化するものの、フィブリンに強い親和性を示す点でトリプシンとは異なっている。表1は、凝固—キニン系プロテアーゼおよび関連酵素によってそれぞれ固有の蛋白質が水解される際の切断部位とその

周辺アミノ酸配列をまとめたものである⁸⁾。いずれのプロテアーゼもP₁サイトのArg-XとLys-X結合に高い特異性をもつ。組織カリクレインの場合は例外で、Arg-X結合の他Met-Lys結合も切断するがその理由はまだ明らかでない。一方、水解部位のアミノ末側のP₂、P₃サイトのアミノ酸残基をみると、それぞれの天然基質に大幅な違いがみだされる。従って、たとえ塩基性アミノ酸残基に共通の親和性があっても、個々の酵素の特異性はP₂、P₃サイトに位置する残基の種類によって左右される可能性が示唆される。事実、 α -スロンピンで限定分解される蛋白基質のP₂、P₃サイトには表1に掲げた以外の蛋白基質でもPro-Argの配列が多数みだされており⁴⁾ また従来からトリプシノーゲンの活性化にのみ働くとしてされているエンテロキナーゼは、Lys-Ile結合の水解の際、P₂、P₃サイトのAsp残基を認識することが知られている⁷⁾ すなわち、これらのプロテアーゼにはP₁サイトのArgやLys残基のみならず、P₂、P₃サイトの残基をも認識する機能があることを意味している。ペプチド合成基質はこうしたプロテアーゼの作用特異性が基礎になって発展したもので、今日では凝固系プロテアーゼ²⁻⁵⁾の他生体組織のいろいろなプロテアーゼに対する特異基質⁹⁻¹⁷⁾が開発されている。

表1. 各種プロテアーゼによる天然基質の切断位置^{7,8)}

酵 素	天 然 基 質	切断される周辺のアミノ酸配列
		P ₅ P ₄ P ₃ P ₂ P ₁ P' ₁ P' ₂ P' ₃
ブタエンテロキナーゼ	ウシトリプシノーゲン	Asp-Asp-Asp-Asp-Lys [↓] Ile-Val-Gly
ヒト α -スロンピン*	ヒトフィブリノーゲン	A α 鎖 Gly-Gly-Gly-Gly-Arg [↓] Gly-Pro-Arg B β 鎖 Phe-Phe-Ser-Ala-Arg [↓] Gly-His-Arg
	ウシ XIII 因子	Leu-Val-Pro-Arg [↓] Gly-Phe-Asx
	ウシプロスロンピン	Val-Ile-Pro-Arg [↓] Ser-Gly-Gly
ウシXa因子	〃	Ile-Glu-Gly-Arg [↓] Thr-Ser-Glu
ウシIXa因子*	ウシX因子	Gln-Val-Val-Arg [↓] Ile-Val-Gly
ウシ血漿カリクレイン	ウシ高分子キニノーゲン	Ser-Leu-Met-Lys [↓] Arg-Pro-Pro Ser-Pro-Phe-Arg [↓] Ser-Val-Gln Tyr-Asp-Trp-Arg [↓] Thr-Pro-Tyr
ブタ膵カリクレインおよび尿カリクレイン	ウシ低分子キニノーゲン	Ser-Leu-Met [↓] Lys-Arg-Pro
ヒトウロキナーゼ	ヒトプラスミノノーゲン	Ser-Pro-Phe-Arg [↓] Ser-Val-Gln
カプトガン凝固酵素	コアギュローゲン	Cys-Pro-Gly-Arg [↓] Val-Val-Gly Val-Leu-Gly-Arg [↓] Thr-Gln-Ile Val-Ser-Gly-Arg [↓] Gly-Phe-Ser

*ここに示した酵素のうち、 α -スロンピンおよびIXa因子などは、それぞれ α -スロンピンから β -スロンピンへの変換において、またIXaによるX因子の活性化において、さらに別のペプチドを切断するが、それらの切断位置は加えていない。

ペプチド合成基質の種類

表2に、現在利用段階にありかつ市販されているペプチド合成基質をまとめたが、いずれも図1に示すような発色団をペプチドのカルボキシル末端に導入し、基質の感度を高めるとともに測定の見易化を図る工夫がなされている。プロテアーゼ活性は、例えばペプチド-*p*-ニトロアニリドの場合、遊離される*p*-ニトロアニリンの405nmでの吸光度($\epsilon=9950$)を測定して求められる(図2)。なお、*p*-ニトロアニリンの405nmでの分子吸光係数(ϵ)は比較的小さいので、検出感度を上げるためにその誘導体を生成させて定量する方法も考案されている。³⁹⁾ すなわち、酵素反応後に*p*-ニトロアニリンをジアゾ化し次いでN-(1-ナフチル)-エチレンジアミンにカップルさせると、生成物の最大吸収は545nmに移り、その波長での ϵ は 4.54×10^4 であるという。従ってこの方法を活用すれば、約5倍感度を上昇させるとともに黄色試料にも適用できることになる。また、ペプチド-4-メチルクマリル-7-アミド(MCA)では、遊離される7-アミノ-4-メチルクマリル(AMC)の蛍光強度を380nmでの励起波長を用い、460nmで測定する(図3)。AMCの遊

表2. ペプチド-PNA基質およびペプチド-MCA基質

酵 素	基 質	販 売 会 社
スロンピン	Bz-Phe-Val-Arg-PNA	KABI(S-2160)
	Z-Gly-Pro-Arg-PNA	
	Tos-Gly-Pro-Arg-PNA	Pentapharm(Chromozym TH)
	Gly-Pip-Arg-PNA	KABI(S-2238)
	Boc-Val-Pro-Arg-MCA	PRF
Xa因子	Bz-Ile-Glu-Gly-Arg-PNA	KABI(S-2222)
	Boc-Ile-Glu-Gly-Arg-MCA	PRF
血漿カリクレイン	Bz-Pro-Phe-Arg-PNA	Pentapharm(Chromozym PK)
	H·D-Pro-Phe-Arg-PNA	KABI(S-2302)
	Z-Phe-Arg-MCA	PRF
プラスミン	H·D-Val-Leu-Lys-PNA	KABI(S-2251)
	Tos-Gly-Pro-Lys-PNA	Pentapharm
	Boc-Glu-Lys-Lys-MCA	PRF
腺性カリクレイン	H·D-Val-Leu-Arg-PNA	KABI(S-2266)
	Pro-Phe-Arg-MCA	PRF
ウロキナーゼ	Bz-Val-Gly-Arg-PNA	Pentapharm(Chromozym UK)
	Pyr-Gly-Arg-PNA	KABI(S-2444)
	Glutaryl-Gly-Arg-MCA	PRF
カプトガニ凝固酵素	Boc-Leu-Gly-Arg-PNA	PRF
	Boc-Leu-Gly-Arg-MCA	PRF

Bz, ベンゾイル; Z, ベンジルオキシカルボニル; Tos, *p*-トルエンスルフォニル; Boc, 第3級ブチルオキシカルボニル; Pyr, ピログルタミル; Pip, ピペコリル; H·D, D-光学異性体; KABI-スウェーデン, Pentapharm-スイス, PRF, 蛋白質研究奨励会

離量はそのほか、370nmでの吸光度($\epsilon=7500$)からも求められる(図3)。合成基質は一般にトリないしテトラペプチドからなるものが多く、また天然基質の切断周辺にないアミノ酸配列をもつものもあるが、これはペプチド合成上の問題や溶解度、安定性などを考慮しているからである。より天然基質の構造に近くかつアミノ末側とカルボキシル末側のPサイトの数を増すほど特異基質になりやすいことは言うまでもないが、こうした理想的な基質を合成するにはなおさまざまな困難がある。例えば、合成的にSerやThr、

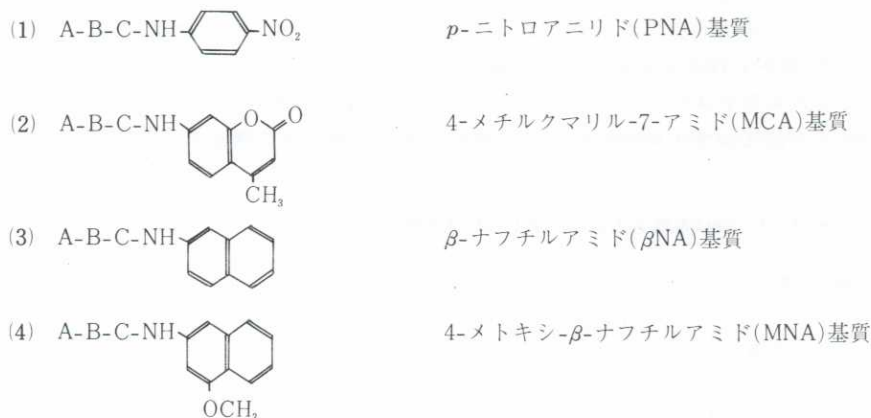


図1. ペプチド合成基質の発色団および蛍光基

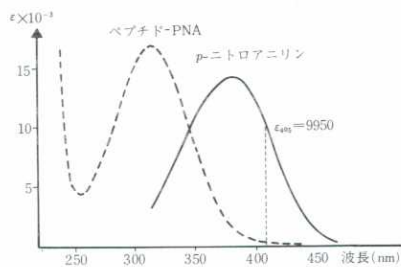


図2. ペプチド-PNAと*p*-ニトロアニリンの吸収曲線²⁾

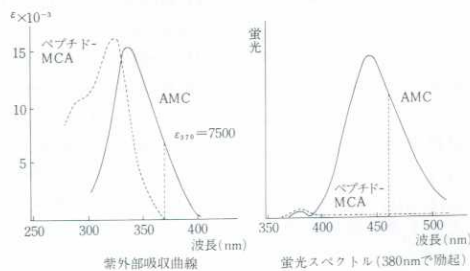


図3. ペプチド-MCAとAMCの吸収および蛍光スペクトル⁵⁾

Trp, Met, Cys 残基などを配列に加えるにはある種の制限がともなうし、またカルボキシル末側の P'_1 , P'_2 に残基を延ばしていけば測定原理の改良が必要となる。中でも基質の溶解度の問題は重要で、ペプチドのアミノ末端残基をD-アミノ酸に置換して保護基(Bz, Z, Bocなど)を除く理由の一つはそこにある。一方、保護基を付けるのは、ペプチド基質のアミノ末端がL-配位で遊離したままにあるとトリプシン様酵素に対して阻害的に働くのと、アミノペプチダーゼの攻撃から免れるためである。

さて、先にも述べたごとく、ペプチド基質は通常プロテアーゼによる天然基質の切断部位周辺のアミノ酸配列を参考にして合成されるが、そうしたものが必ずしも目的の酵素の特異基質にならない場合がある。例えば、表1の中のウロキナーゼによるプラスミノゲンの切断位置(Pro-Gly-Arg-Val)、あるいはIXaによるX因子の切断位置(Val-Val-Arg-Ile)を情報源にして合成されたPNAおよびMCA基質は、いずれも両プロテアーゼによって殆ど水解されなかった^{34,18)} 従って、ウロキナーゼの基質のBz-Val-Gly-Arg-PNAやGlutaryl-Gly-Arg-MCA、また膵カリクレインのD-Val-Leu-Arg-PNAはいずれも種々の基質の合成途上でみいだされたもので、天然基質の情報をもとにしていない。また、個々のプロテアーゼの特異基質と言われるものでも他の酵素で若干水解されるのも多く、表2のプラスミン基質のD-Val-Leu-Lys-PNAは、血漿カリクレインや膵カリクレインによって可成り水解される²⁾。また、プラスミンも反応速度に多少の差はあるものの、本来的に表2の基質をすべて水解するとみなしてよい。従って、複数のプロテアーゼの存在下である一つの酵素活性を選択的に測定するには、反応の条件設定に充分注意を払う必要があり、それがペプチド基質を活用する際の不可欠な要請である^{33,38)}。また、結果を正しく解釈するためにも、天然基質を用いる従来法との併用が現状では望ましい。図4にヒトスロンピンの貯蔵期間中にみられるクロット形成能とアミダーゼ活性(Bz-Phe-Val-Arg-PNAとTos-Gly-Pro-Arg-PNAを使用)の変化を示したが、両者には測定法如何で相対活性の差がみられる¹⁹⁾。この結果は、 α -スロンピンが時間とともに β -スロンピンに変換したためと解釈されており²⁰⁾ 事実分離した β -スロンピンは、アミダーゼ活性が α -スロンピンと同程度であるにもかかわらず、クロット能は著しく弱い²³⁾。こうしたプロテアーゼの自己分解にもとづく基質特異性の変遷は、 α -スロンピンはもとよりXa、プラスミンなどすべてのセリンプロテアーゼでみられる現象で、従ってペプチド合成基質の利用に当たって充分考慮すべき問題である。ペプチド基質はその利用の仕方如何で測定の簡易化と自動化²¹⁾にも寄与する有利な面はあるものの、上述した欠点も本来的にもつことを明記したい。

なお、表3と表4に凝固—線溶—キニン系プロテアーゼの各種ペプチド基質に対するKm値とVmax値を列記した。天然基質に対するプロテアーゼのKmは 10^{-6} ~ 10^{-7} Mの範囲にあるので、合成基質の親和性はかなり低い。ここで各プロテアーゼの特異性について言及する紙数はないが、これらの数値は基質を選択する際の参考となろう。また、表5には生体組織や体液などに含まれる種々のプロテアーゼの合成基質をまとめた。いずれ

も水解部位のカルボキシル末端側をMCAおよび β -ナフチルアミド(β NA)²⁵⁾、4-メトキシ- β -ナフチルアミド(MNA)^{11,15)}とし活性測定の感度上昇を図っており、従来のTos-Arg-OMe(TAME)やBz-Arg-OEt(BAEE)、Ac-Tyr-OEt(ATEE)などのエステル基質⁴⁴⁾に代わるものとして利用され始めている。

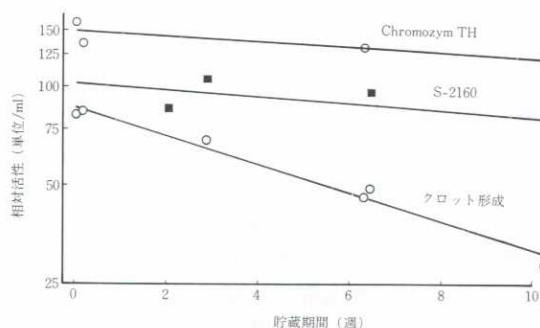


図4. 貯蔵中のヒトスロンビンのクロット形成能とアミダーゼ活性の変化¹⁹⁾

表3. ペプチド-PNA、ペプチド- β NAおよびペプチド-MNA基質に対する各種酵素の K_m 値と V_{max} 値

基 質	酵 素	K_m (モル/L)*	V_{max} *
Bz-Phe-Val-Arg-PNA ³⁾	ウシスロンビン	8×10^{-5}	6.8×10^{-8} モル/分/NIH単位
	レプチラーゼ	2.9×10^{-4}	16.3×10^{-8} モル/分/単位
	ウシトリプシン	5×10^{-5}	1.6×10^{-8} (TAME)
	ブタトリプシン	3×10^{-5}	1.5×10^{-7} モル/分/ μ g
	パパイイン	5×10^{-5}	1.0×10^{-7} モル/分/単位(BAME)
	プリナーゼ**	4×10^{-5}	1.3×10^{-5} モル/分/単位
Tos-Gly-Pro-Arg-PNA ²⁾	ヒトスロンビン	1.05×10^{-5}	1.51×10^{-9} モル/分/NIH単位
Z-Gly-Pro-Arg-PNA ²⁾	〃	3.51×10^{-5}	9.63×10^{-8} 〃
Gly-Pip-Arg-PNA	ウシスロンビン	6×10^{-5}	1.7×10^{-7} 〃
	〃	0.9×10^{-5}	2.2×10^{-7} 〃
Bz-Ile-Glu-Gly-Arg-PNA ⁹⁾	ウシ Xa 因子	3×10^{-4}	7×10^{-4} モル/分/単位
	ブタトリプシン	2×10^{-5}	Kcat=280/秒
H-D-Pro-Phe-Arg-PNA ²⁾	ヒト血漿カリクレイン	2×10^{-4}	4.2×10^{-11} モル/分/単位
Bz-Pro-Phe-Arg-PNA ²⁾	〃	1.54×10^{-4}	8.04×10^{-7} (BAEE)
	トリプシン	1.11×10^{-4}	8.07×10^{-7} (BAEE)
	ヒトプラスミン	2.86×10^{-4}	3.3×10^{-7} モル/分/単位
	ヒトスロンビン	20.0×10^{-4}	3×10^{-4} モル/分/NIH単位
H-D-Val-Leu-Arg-PNA	ブタ 糜カリクレイン	2.2×10^{-5}	8×10^{-9} モル/分/単位
	ヒト尿カリクレイン	3×10^{-5}	
	ヒトプラスミン(UK)	3×10^{-4}	0.5×10^{-6} 〃
H-D-Val-Leu-Lys-PNA	SK-プラスミン	2×10^{-4}	1×10^{-6} 〃

Bz-Val-Gly-Arg-PNA	ウロキナーゼ	1.79×10^{-5}	1.21×10^{-10} モル/分/CTA単位
Pyr-Gly-Arg-PNA	〃	6×10^{-5}	1.3×10^{-10} 〃
Boc-Val-Leu-Gly-Arg-PNA ²³⁾	カプトガニ凝固酵素	5.4×10^{-5}	3.2×10^{-6} モル/分/A ₂₈₀ =1.0
Boc-Leu-Gly-Arg-PNA ²⁴⁾	〃	6.5×10^{-5}	4.2×10^{-6} 〃
Boc-Val-Ser-Gly-Arg-PNA ²⁴⁾	〃	1.4×10^{-4}	3.3×10^{-6} 〃
Gly-Arg-βNA ²⁵⁾	ウロキナーゼ	7.5×10^{-3}	21.8×10^{-12} モル/分/CTA単位
	組織アクチベーター***	ND	ND
	ヒトプラスミン	1.7×10^{-3}	0.6×10^{-9} モル/分/カゼイン単位
Val-Gly-Arg-βNA ²⁵⁾	ウロキナーゼ	6×10^{-4}	4.8×10^{-12} モル/分/CTA単位
	組織アクチベーター	ND	ND
	ヒトプラスミン	9×10^{-4}	1.2×10^{-9} モル/分/カゼイン単位
Boc-Val-Gly-Arg-βNA ²⁵⁾	ウロキナーゼ	1.1×10^{-3}	3.0×10^{-12} モル/分/CTA単位
	組織アクチベーター	5×10^{-4}	2.4×10^{-12} 〃
	ヒトプラスミン	1.6×10^{-3}	2.4×10^{-9} モル/分/カゼイン単位
Boc-Gly-Gly-Arg-MNA ¹¹⁾	ウロキナーゼ	2.6×10^{-3}	

* 表中のパラメーターは文献以外にKABIおよびPentapharm両社の資料を参考にした。

** *Aspergillus oryzae*のプロテアーゼ I, *** ヒト子宮の精製組織アクチベーター:ND、殆ど水
解しない

遊離のβ-ナフチルアミンは336nmで励起させ、415nmでの蛍光強度を測定する。²⁵⁾ また、4-メトキシ-β-ナフチルアミンの場合は、Fast blue B (tetrazotized o-dianisidine) とカップルさせ、生成色素を520nmで測定することもできる¹⁵⁾

表4. ペプチド-MCA基質に対する各種酵素のK_m値とV_{max}値

基 質	酵 素	K _m (モル/L)	V _{max} (μ モ ル/分/mg)	V _{max} /K _m
Boc-Val-Pro-Arg-MCA ^{4,5)}	ウシ α-スロンピン	2.1×10^{-5}	78.1	3919
Boc-Ile-Glu-Gly-Arg-MCA ^{4,5)}	ウシ X _a 因子	1.6×10^{-4}	6.0	38
Z-Phe-Arg-MCA ^{4,5)}	ウシ血漿カリクレイン	2.4×10^{-4}	8.0*	34
Boc-Glu-Lys-Lys-MCA**	ウシプラスミン	5.0×10^{-4}		
Boc-Val-Leu-Lys-MCA**	〃	1.3×10^{-4}		
Pro-Phe-Arg-MCA ^{4,5)}	ブタ膵カリクレイン	1.6×10^{-4}	11.9*	74
	ブタ尿カリクレイン	2.2×10^{-4}	30.0	136
Glutaryl-Gly-Arg-MCA ^{4,5)}	ウロキナーゼ	4.4×10^{-4}	18.4	42
Boc-Val-Leu-Gly-Arg-MCA ²⁴⁾	カプトガニ凝固酵素	6.0×10^{-5}	4.3*	72
Boc-Leu-Gly-Arg-MCA ²⁴⁾	〃	2.7×10^{-5}	4.8*	178
Boc-Val-Ser-Gly-Arg-MCA ²⁴⁾	〃	1.1×10^{-4}	3.1*	28
Boc-Ser-Gly-Arg-MCA ²⁴⁾	〃	2.4×10^{-5}	4.3*	179

* μ モル/分/A₂₈₀=1.0, **未発表データ (筆者ら、1978)

表5. その他のペプチド合成基質

酵 素	ペプチド合成基質	備 考
ウロキナーゼ (プラスミノゲンアクチベーター)	Z-Gly-Gly-Arg-MCA Boc-Val-Gly-Arg-βNA Z-Gly-Gly-Arg-MNA	Zimmerman ら ²⁶⁾ Nieuwenhuizen ら ²⁵⁾ Huseby ら ¹¹⁾
プラスミン	Z-Ala-Ala-Lys-MNA	Clavin ら ¹⁵⁾
α-キモトリプシン	Glutaryl-Phe-MCA Ala-Ala-Phe-MCA	Zimmerman ら ¹³⁾ 〃
トリプシン	Bz-Arg-MCA Z-Arg-MCA	Kanaoka ら ²⁷⁾ Zimmerman ら ¹²⁾
エラストラーゼ	Ac-Ala-Ala-Pro-Ala-MCA	〃 ¹³⁾
エンテロキナーゼ	Boc-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys-βNA	Hesford ら ¹⁴⁾
アミノペプチダーゼ	Leu-MCA	Kanaoka ら ¹⁷⁾
Gly-Pro ペプチダーゼ	Gly-Pro-MCA	Nagatsu ら ²⁸⁾
ピログルタミナーゼ	Pyr-MCA	Tsuru ら ²⁹⁾

Ac, アセチル

おわりに

生体には無数のプロテアーゼがあり、それらは細胞の内外で蛋白質の消化のみならず、チモーゲン（プロ酵素）の活性化やペプチドホルモンの産生、生理活性物質の放出などに重要な役割を果たしている。また最近では、細胞分裂の開始反応や孢子形成、受精などにもプロテアーゼが直接関与する例が数多く知られてきた。一方、プロテアーゼの活性は炎症はもとよりアレルギー、高血圧、肺気腫、筋無力症、筋ジストロフィー症などの病態とも密接な関連をもつ。このようにプロテアーゼの生理的意義は益々重要性を増しつつ各方面から注目されているが、その酵素活性の測定はなお従来のカゼイン法やヘモグロビン法、合成エステル基質法を用いているのが現状である。本稿でふれたペプチド合成基質を用いての方法は、まだ改良の余地は残されているものの、基質に特異性をもたした点で従来法を補うものである。こうした領域の発展は、ペプチド合成化学に携わる研究者の協力なしには進められないが、今後も緊密な情報交換を図り一層利用価値の高いペプチド基質の開発に努力したいと考えている。

なお、本稿のMCA基質の合成はすべて蛋白質研究奨励会ペプチド研究所の榊原俊平博士のグループによってなされたもので、また、プロテアーゼのkineticsは蛋白研の加藤久雄、森田隆司、原田敏枝、足立憲昭の諸氏によるものであることを付記する。

参考文献

- 1) 参考資料, 加藤文雄, 森田清三, 化学と生物, 15, 2 (1977).
- 2) Witt, L., "New methods for the analysis of coagulation using chromogenic substrates", Walter de Gruyter, Berlin-New York (1977).
- 3) Svendsen, L., Blombäck, B., Blombäck, M., and Olsson, P., *Thromb. Res.*, **1**, 267 (1972).
- 4) Morita, T., Kato, H., Iwanaga, S., Takada, K., Kimura, T., and Sakakibara, S., *J. Biochem.*, **82**, 1495 (1977).
- 5) A new assay method for α -thrombin, Factor Xa, kallikreins and urokinase using peptide-MCA substrates. in pamphlet published by Protein Research Foundation, Minoh, Osaka, 1977.
- 6) Davie, E. and Fujikawa, K., *Ann. Rev. Biochem.*, **44**, 799 (1975).
- 7) 参考資料, 代誌, 118 (1974).
- 8) 参考資料, 加藤文雄, 代誌, 116, 535 (1973).
- 9) Aurell, L., Friberger, P., Karlsson, G., and Claesson, G., *Thromb. Res.*, **11**, 595 (1977).
- 10) Mitchell, G.A., Hudson, P.M., Haseby, R.M., Pachron, S.P., and Cargiolo, R.J., *Thromb. Res.*, **12**, 219 (1978).
- 11) Haseby, R.M., Clavin, S.A., Smith, R.E., Hull, R.N., and Smithwick, E.L. Jr., *Thromb. Res.*, **10**, 679 (1977).
- 12) Zimmerman, M., Yurewicz, E., and Patel, G., *Anal. Biochem.*, **70**, 258 (1976).
- 13) Zimmerman, M., Ashe, B., Yurewicz, E.C., and Patel, G., *Anal. Biochem.*, **78**, 47 (1977).
- 14) Hasford, F. and Hadorn, H., *FEBS Lett.*, **71**, 279 (1976).
- 15) Clavin, S.A., Bobbitt, J.L., Shuman, R.T., and Smithwick, E.L. Jr., *Anal. Biochem.*, **80**, 955 (1977).
- 16) Poregay, M., Csáspár, R. Jr., Elödi, P., and Bajusz, S., *FEBS Lett.*, **74**, 67 (1977).
- 17) Kanaoka, Y., Takahashi, T., and Nakamura, H., *Chem. Pharm. Bull.*, **25**, 362 (1977).
- 18) Suomela, H., Blombäck, M., and Blombäck, B., *Thromb. Res.*, **10**, 267 (1977).
- 19) Garfney, J.F., Lord, K., Braasher, M., and Kirkwood, T.B.L., *Thromb. Res.*, **10**, 549 (1977).
- 20) Workman, F.F. Jr., Utleg, L.C., Kingdon, H.S., and Lundblad, R.L., "Isolation and characterization of bovine thrombin. Chemistry and Biology of thrombin" ed. Lundblad, R.L., Fenton II, J.W., Mann, K.G., *Ann. Arbor. Science, Ann. Arbor* (1977) p.23.
- 21) Bergertröm, K. and Blombäck, M., *Thromb. Res.*, **2**, 719 (1974).
- 22) Mattler, L.E. and Hang, N.U., *Thromb. Haemostas.* (Stuttg.), **30**, 776 (1977).
- 23) Iwanaga, S., Morita, T., Harada, T., Nakamura, S., Niwa, M., Takada, K., Kimura, T., and Sakakibara, S., *Haemostas.*, **7**, 183 (1978).
- 24) 参考資料, 森田清三, 参考資料, 参考資料, 参考資料, 参考資料.
- 25) Nieuwenhuizen, W., Wijngaads, G., and Groeneweld, E., *Anal. Biochem.*, **83**, 149 (1977).
- 26) Zimmerman, M., Quigley, J.P., Ashe, B., Dorn, C., Goldfarb, R., and Troll, W., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **75**, 730 (1978).
- 27) 参考資料, 中山正一, 参考資料, 参考資料, 参考資料.
- 28) 参考資料, 参考資料, 参考資料, 参考資料, 参考資料, 参考資料.
- 29) 参考資料, 高子中子, 参考資料, 参考資料, 参考資料, 参考資料, 参考資料, 参考資料.
- 30) Blombäck, M., Blombäck, B., Olsson, P., and Svendsen, L., *Thromb. Res.*, **5**, 621 (1974).
- 31) Ödegård, O.R., Lie, M., and Ahlidaad, U., *Thromb. Res.*, **6**, 287 (1975).
- 32) Teien, A.N., Lie, M., and Ahlidaad, U., *Thromb. Res.*, **6**, 413 (1976).
- 33) Teien, A.N. and Lie, M., *Thromb. Res.*, **10**, 399 (1977).
- 34) Axelsson, G., Korsan-Bengtson, K., and Waldenström, J., *Thromb. Haemostas.*, **36**, 517 (1976).
- 35) Ahlidaad, U., Lie, M., and Ödegård, O.R., *Thromb. Res.*, **11**, 549 (1977).
- 36) Teger-Nilsson, A.C., Friberger, P., and Gylander, E., *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **22**, 809 (1977).
- 37) 参考資料, 参考資料, 参考資料, 参考資料, 参考資料, 参考資料.
- 38) Klut, C., *J. Lab. Clin. Med.*, **83**, 83 (1976).
- 39) Friedman, R.B., Kwan, H.C., and Szeceński, M., *Thromb. Res.*, **12**, 37 (1977).
- 40) Aoki, N., Moroi, M., Matsuda, M., and Tachya, K., *J. Clin. Invest.*, **60**, 361 (1977).
- 41) Teien, A.N., Ahlidaad, U., Höök, M., and Lindahl, U., *Thromb. Res.*, **11**, 107 (1977).
- 42) Ödegård, O.R., Ahlidaad, U., Lie, M., and Miller-Andersson, M., *Thromb. Res.*, **11**, 205 (1977).
- 43) 参考資料, Troll, W., 参考資料, 参考資料, 参考資料, 参考資料, 参考資料, 参考資料, 参考資料.
- 44) Sherry, S. and Troll, W., *J. Biol. Chem.*, **238**, 95 (1964).
- 45) Gráf, L., Baráti, E., Borvendég, J., Hermann, L., and Pathy, A., *Eur. J. Biochem.*, **64**, 333 (1976).

蛋白研メモ

ひとの動き

- ・蛋白質研究所附属研究施設として、53年4月1日付で結晶解析研究センターが新設され、同日付で角戸正夫 物理構造部門教授がセンター長として併任されました。
- ・勝部幸輝 鳥取大学工学部教授と山下魏 筑波大学生物科学系助教授は、53年4月1日付でそれぞれ蛋白質機能評価部門（客員部門）の客員教授、助教授として併任されました。
- ・尾崎宏 氏は、53年6月1日付で有機化学部門助手になられました。
- ・阿久津秀雄 物性部門助手は、「昭和52年度日本学術振興会スイス派遣研究員」として、53年1月4日から54年1月3日までの予定でスイスに出張されました。

蛋白研セミナー

i) 53年11月までに予定されるセミナー

題 目	開 催 予 定	担 当 者	担 当 部 門
光合成 第1部 光合成の機作 第2部 光合成を利用したエネルギー転換系の組立	9月1日～9月3日	八木達彦・井口洋夫 落合英夫・藤茂 宏 山下 魏・植木龍夫	酵 素
生体窒素代謝の臓器特異性と相関性	10月2日	橘 正道・市原 明 中川八郎	代 謝

グリコーゲン代謝の調節機構	11月8日	福井俊郎・垣内史郎	化学構造
ポルフィリンの化学	11月下旬	生越久靖・泉美治 佐藤了・京極好正	有機化学 物性

- ii) 53年12月から54年3月までに予定されるセミナー
- ・動物行動に対する情報生理学的解析 (53年12月8日、代謝)
 - ・微生物の細胞分化における蛋白合成の調節 (53年12月11日~12月12日、合成)
 - ・蛋白質の動的構造 (53年12月中旬、物性)
 - ・分子区別に関するセミナー (53年12月、有機化学)
 - ・血小板の構造と機能に関するセミナー (54年1月、機能制御)
 - ・蛋白質および生体関連物質のX線解析 (54年1月、物理構造)
 - ・生理活性ペプチドの構造と機能 (54年1月下旬、ペプチド)
 - ・血中脂質の動態に関するセミナー (54年2月、機能制御)

最近の話題

物忘れ防止に効くペプチドホルモン

数年前から vasopressin が動物の訓練に有効であり、一度覚えた事を長く忘れさせない作用があると言われていた。最近同様な事実が種々の vasopressin 及びその類似物についてもテストされ、ラットに対しては [Arg⁸]-vasopressin が最も有効であることが認められた。更にまた [Lys⁸]-vasopressin が50才以上の高齢者の物忘れの防止や記憶喪失症の治療にも有効であるとの臨床データが示されたので紹介する。

55才から65才までの一群の健康人に、16国際単位の [Lys⁸]-vasopressin を1日3回にわけて鼻から噴霧し3日間連続投与した例で、種々の心理テストを行ない擬似薬を投与した同年令のグループと比較した結果、vasopressin を投与したグループには明らかに注意力、集中力、行動力、記憶力、学習力、認識力において優位の差が認められた。また、アルコール中毒や交通事故による健忘症の患者に対して同様に鼻から vasopressin を投与した結果、著明な治療効果が認められたとの症例報告 (4例) も提出された。

この vasopressin の効果が直接のものか、或いは ACTH のようなものの分泌刺激を介して行なわれるものかについてはまだ十分調べられていない。また、Met⁵-enkephalin にも同様な作用が認められたとの報告もある。(奨励会ペプチド研 高井道博)

- 1) D. de Wied, *et al.*, *Progr. Brain Res.*, **45**, 181 (1976).
- 2) R. Walter, J. M. van Ree, and D. de Wied,

Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., **75**, 2493 (1978).

- 3) J. J. Legros, *et al.*, *Lancet*, **1**, 41(1978).
- 4) J. C. Oliveros, *et al.*, *ibid.*, **1**, 42(1978).
- 5) H. Rigter, *Science*, **200**, 83 (1978).

強力な抗利尿作用をもつ vasopressin 誘導体

Vasopressin の主な生理作用には血管収縮作用と抗利尿作用とがあって、それぞれの作用の強さの比は構成アミノ酸をかえることによって大きく変化する。最近、血管収縮作用 (血圧上昇作用) をほとんど示さず、非常に強い抗利尿作用のみを示す誘導体2種が合成された。その1つは、1-de-amino-[Asn⁴, D-Arg⁸]-vasopressin¹⁾ であり、もう1つは、1-de-amino-[Phe², (3,4-dehydro Pro)⁷, Arg⁸]-vasopressin²⁾ である。前者の抗利尿作用は11000 IU/mg、後者は13000 IU/mgで、天然型 vasopressin の約25倍であると報告されている。特に興味深いのは、後者の誘導体が vasopressin の溶液中でのコンフォーメーションとレセプターとの結合部位に関する考察から、抗利尿レセプターとの結合性を強めるようにデザインして得た化合物である点で、立体構造と結合性に関する知見を特異な生理活性をもった物質のデザインに応用し成功した例である。

(奨励会ペプチド研 高田克己)

- 1) M. Zaoral and I. Blaha, *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **42**, 3654 (1977).
- 2) C. W. Smith and R. Walter, *Science*, **199**, 297 (1978).

Chemotaxis (化学走性) に関する話題

Aswanikumar らは以前から白血球を誘引する物質に興味を持ち、種々の合成ペプチドについてその作用を調べた結果、For-Met-Leu-Phe (I) が最も強い作用 ($ED_{50}=7 \times 10^{-11} M$) を示すことを認めていた。その後彼らは chemotaxis に関していくつかの報告をしているのでその中から興味ある2編を紹介したい。

その1つは、(I) に Leu-Phe 結合があることに着目し、バクテリアの産生する抗生物質の中で Leu (Ile)-Phe 結合を持つグラミシジン S、チロシジン、バシトラン及び合成した X-Phe-D-Leu-Phe-D-Leu-Phe (X: H, For, Ac, Boc) の chemotactic な作用について調べたものである。その結果、上記3種の抗生物質にも chemotactic な作用があり ($ED_{50}=10^{-6} \sim 10^{-8} M$)、また、合成ペプチドにおいては X が For の場合最も強い作用 ($ED_{50}=2 \times 10^{-8} M$) を示し、X が Boc の場合 (I) による chemotactic な作用を阻害することを見出した。

もう1つは、chemotactic な合成ペプチドと白血球との相互作用の生化学的な機構に関するもの

である。著者らは、ウサギの腹膜から取った好中球中にタンパク質の carboxylmethyltransferase 系があって、それが chemotactic ペプチドによって活性化され数分内に細胞内のある種のタンパク質のメチルエステル化を起こすことを見出した。しかもそのペプチドの濃度が $10^{-8} M$ の時エステル化量が最高度に達することを認めた。更に、このメチルエステル化反応は、chemotaxis の阻害剤である For-Phe-Met 及び前記 Boc-pentapeptide で阻害されることが判明した。chemotaxis の機構に関しては未知のことが多いが、彼らは白血球中のタンパク質のエステル化がその高次構造を変え、その結果白血球の運動が起こるのではないかと考えている。

このように、生体本来の防御作用に関する知見が合成ペプチドとの生化学的な相互作用としてとらえられた点が興味深い。

(奨励会ペプチド研 茅野直良)

- 1) S. Aswanikumar, *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **80**, 464 (1978).
- 2) R. F. O'Dea, *et al.*, *Nature.*, **272**, 462 (1978).

PRF · NEWS

Peptide Information 索引のお知らせ

前号の PRF にて Peptide Information Vol. 1, 2 の索引発売のご案内をいたしました。今回 Vol. 3 の索引が完成いたしました。巻数を経るごとに厚さを増していくのがよくわかります。索引の価格は下記の通りで、本書とは別売になっておりますので、ご利用の方は当会までご注文下さい。なお、検索サービスの会会員の方には無料でお届けいたします。

Peptide Information 索引	Vol. 1	(20頁)	¥1,500
	Vol. 2	(33頁)	¥2,000
	Vol. 3	(46頁)	¥2,500

来年には小型コンピューターを導入し、Information の編集と同時に雑誌名、著者名、物質名、事項名を記憶させ、自由に取り出して索引の作成ができるようなプログラミングを作る予定です。このシステムが完成すれば毎号の Information にも索引をのせることができます。ご期待下さい。

財団法人 蛋白質研究奨励会

新製品の販売について

このたび、微化研 梅沢浜夫先生のご配慮により新たに Antipain と Chymostatin を販売させていただくことになりました。包装及び価格につきましては株式会社ペプチド研究所へお問い合わせ下さい。

また、別紙記載の化合物も新たに発売いたしますのでご利用下さい。価格等につきましては当社へお問い合わせ下さい。

近々新価格表を発行いたします。出来上がり次第お届けいたしますのでしばらくお待ち下さい。

株式会社 ペプチド研究所

ペプチド類の輸入販売について

前にもお知らせいたしましたように、当社は米国 Beckman 社、Peninsula Laboratories 社と提携して、両社のペプチド類の取り次ぎ販売をしております。両社の製品は Merrifield の固相合成法によって合成されたもので、固相法の特徴を生かし別紙のように複雑な構造のペプチド類をタイムリーに合成し販売しております。特に最近はドルの値下がりにより外国品が購入しやすくなりましたので、この円高差益を直接皆様方に還元いたします。ご参考までにドル価格と当社の再販レートをお知らせいたしますので、両社製品も奨励会製品同様ご愛用下さい。再販レートは、米国からの送料、通関手数料輸入関税、当社取り扱い手数料などを含めて算出したものであります。

皆様方にお渡しする時の値段は、右の表よりご注文いただいた日の前日の為替レート（中心レート、円の桁は四捨五入）から当社再販レートを出し、それに米国国内価

円/ドル公式為替レート(1\$当り)	当社再販レート(1\$当り)
220円	320円
210	310
200	300
190	290
180	280
170	270

格（ドル価格）を掛けて算出させていただきます。従って、念のためご注文の際に各商品についての再販価格を当社営業部にてご確認ください。

なお、Beckman 社、Peninsula Laboratories 社以外の米国製品の輸入代行もいたしますので、ご希望の方はお問い合わせ下さい。

株式会社 ペプチド研究所

PRF

Vol. 4 No. 1 1978.9

編集発行 財団法人 蛋白質研究奨励会

〒562 大阪府箕面市稲476 TEL (0727) 29-4121