

# ハムスター血漿中のプロテイナーゼインヒビター： 精製と性質および急性相反応

雨宮 修二

近畿大学医学部第2生化学教室

Proteinase inhibitors in hamster plasma :  
Purification, properties and acute phase response

Shuji Amemiya

Second Department of Biochemistry, Kinki University School  
of Medicine, Osaka, Japan

## ABSTRACT

In this study three proteins with trypsin inhibitory activity were purified to apparent homogeneity from hamster plasma and the changes in their plasma level after acute inflammation were examined.  $\alpha$ -1-Antiproteinase had a molecular mass of 68 kDa, and inhibited elastase, trypsin and chymotrypsin but not plasmin, porcine pancreas kallikrein or guinea pig plasma kallikrein. Countertrypsin and pre- $\alpha$ -trypsin inhibitor had a molecular mass of 55 kDa and 120 kDa, respectively, and both inhibited only trypsin. The pre- $\alpha$ -trypsin inhibitor consisted of light (25 kDa) and heavy (90 kDa) polypeptide chains, which were dissociated by chondroitinase ABC treatment but not by heating at 100°C in the presence of sodium dodecyl sulfate and dithiothreitol. Thirteen amino acids of the N-terminal eicosapeptide sequence of both light and heavy chains were identical with the corresponding regions of human serum pre- $\alpha$ -trypsin inhibitor. After induction of inflammation by intraperitoneal injection of *Salmonella typhimurium* lipopolysaccharide, the plasma level of pre- $\alpha$ -trypsin inhibitor increased and that of murinoglobulin decreased, but other inhibitors showed no significant change.

**Key Words :**  $\alpha$ -1-antiproteinase, countertrypsin, pre- $\alpha$ -trypsin inhibitor, hamster plasma, acute phase response, inflammation

## 緒 言

動物体内には多くのプロテイナーゼが存在し、その活性中心の構造によってセリン、チオ

ール、カルボキシおよび金属プロテイナーゼの4種類に分類されている。それらのプロテイナーゼの調節因子として多くのプロテイナーゼインヒビターが存在し、凝固、線溶、補体活性化、

免疫, 発癌, 細胞増殖など, さまざまな生理過程に関与しており, その血中の総量はヒト血漿蛋白質の約13%に及ぶ。

生体に炎症や組織傷害が起こった時, 血中濃度に変化する蛋白は急性相蛋白といわれ, プロテイナーゼインヒビターもそのひとつである。一般に進化の過程では構造遺伝子より調節遺伝子の方が変わりやすく, あるプロテイナーゼインヒビターがそれ自身の相同性は高くても急性相蛋白であるかどうかは動物種間で異なる場合が多い。例えば,  $\alpha$ -1-antiprotease ( $\alpha$ -1-AP) はヒトでは急性相蛋白であるがマウスではそうでない<sup>1,2</sup>。逆に, ラットの急性相蛋白である  $\alpha$ -2-macroglobulin ( $\alpha$ -2-MG) はヒトではそうでない<sup>3</sup>。したがって様々な種のプロテイナーゼインヒビターを研究し, 急性炎症時の挙動を比較することは遺伝子発現の調節機構を知る手がかりになる。

ハムスターは比較的ウイルスに感染しやすい種々の薬剤で腫瘍が発生しやすい実験動物である<sup>4</sup>。また気管内へのエラスターゼ散布によって起こされる肺気腫はヒトの汎葉性肺気腫に酷似していることが知られている<sup>5</sup>。こうした理由でハムスターは肺気腫, ウィルス感染および発癌などの研究の実験動物として使われている。しかしハムスターのプロテイナーゼインヒビターはまだ精製されていず, 急性相反応の知見も得られていない。そこで本実験ではハムスター血中からトリプシン阻害活性を指標にしてプロテイナーゼインヒビターを精製し, 急性炎症を起こした時の血漿中濃度変化を測定した。

## 方 法

### 1. 材料

Syrian hamster オス体重 150—220 g を, 空調管理下の飼育室 (室温  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ , 湿度  $55 \pm 5\%$  の明暗調節環境下) において水道水, 固形飼料 (舟橋農場 F-2) で飼育した。採血は, diethyl ether 麻酔下で心臓から行ない, 抗凝固剤として ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 10 mM を用いた。血漿は 3,000 rpm,

30分間遠心分離した後  $-80^\circ\text{C}$  にて保存した。

おもな材料と薬品の購入先は以下のとおりである。EDTA, (*p*-amidino phenyl) methane-sulfonyl fluoride hydrochloride (APMSF) (和光純薬); Blue cellulofine, chondroitinase ABC (*Proteus vulgaris*) (生化学工業); hydroxyapatite, CM Affi-Gel Blue (Bio-Rad Laboratories); Sephadex G-100, G-150, Q-Sepharose (Pharmacia Fine Chemicals); Toyopearl HW-65 (Tosoh); porcine pancreatic trypsin (Biozyme); porcine pancreatic elastase, porcine pancreatic kallikrein, human plasma kallikrein (Sigma); bovine pancreatic  $\alpha$ -chymotrypsin (Worthington); human plasmin (Boeringer); benzoyl-L-arginine *p*-nitroanilide (BAPNA), succinyl-L-alanyl-L-alanyl-L-alanine *p*-nitroanilide (Suc-(Ala)<sub>3</sub>pNA) (Peptide Institute); N-glutaryl-L-phenylalanine *p*-nitroanilide (GpNA) (Research Organics); H-D-valyl-L-leucyl-L-lysine *p*-nitroanilide (S-2251), H-D-valyl-L-leucyl-L-arginine *p*-nitroanilide (S-2266), H-D-proryl-L-phenylalanyl-L-arginine *p*-nitroanilide (S-2302) (Kabi Vitrum); lipopolysaccharide (*Salmonella typhimurium*) (LPS) (Difco)。

### 2. 方法

#### 2.1. 電気泳動法

sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) は Laemmli<sup>6</sup> の, native-PAGE は Davis の方法<sup>7</sup> に従って行なった。等電点電気泳動法は Yamamoto らの方法<sup>8</sup> に準じて行なった。

#### 2.2. プロテイナーゼ阻害活性測定法

トリプシン阻害活性は, 各フラクションの試料 50  $\mu\text{l}$  に 0.2 mg/ml trypsin 10  $\mu\text{l}$  と 50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.2 500  $\mu\text{l}$  を加え,  $37^\circ\text{C}$  にて 5 分間インキュベートした後, 基質 1mM BAPNA を 500  $\mu\text{l}$  加え  $37^\circ\text{C}$  にて 10 分間反応させ, 最後に 30% (v/v) 酢酸 250  $\mu\text{l}$  を

加えて反応を停止させ 410 nm の吸光度を測定した。試料の濃度とプロテイナーゼの種類によって試薬の種類と量及び反応時間は適宜変更した<sup>9</sup>。各プロテイナーゼ阻害活性を測定するため用いた基質は、以下のとおりである。

elastase, Suc-(Ala)<sub>3</sub> pNA; chymotrypsin, GpNA; plasmin, S-2251; pancreatic kallikrein, S-2266; plasma kallikrein, S-2302.

### 2.3. 抗血清作製法

精製した各プロテイナーゼインヒビター約 0.01 mg を, complete Freund's adjuvant と混ぜてウサギに皮下注射し, 2週間後 booster を追加した。Ouchterlony 法<sup>10</sup>にて各インヒビターに対する抗体ができていることを確認したのち, pentobarbital 全麻下で抗血清を採取した。

### 2.4. 炎症の起こし方

LPS を 20 mM phosphate buffered saline, pH 7.0 (PBS) に溶解し, 1個体につき LPS 200 µg を腹腔内注射した。

### 2.5. 血中濃度測定法

LPS 注射前, LPS 注射後 0.5, 1, 2, 3, 7日の各時点で5匹のハムスターから diethyl ether 麻酔下で心臓採血した。血清中の各インヒビターの濃度はロケット免疫電気泳動法<sup>11</sup>にて測定した。

### 2.6. アミノ酸分析, アミノ酸配列分析

アミノ酸分析は Applied Biosystems derivatizer amino acid analysis system 420A を用いて行なった。アミノ酸配列は精製した蛋白を SDS-PAGE した後 PVDF membrane に移し, 該当するバンドを切り出し Applied Biosystems 477A にかけて N 末端20個のアミノ酸配列を決定した。

### 2.7. コンドロイチナーゼ処理

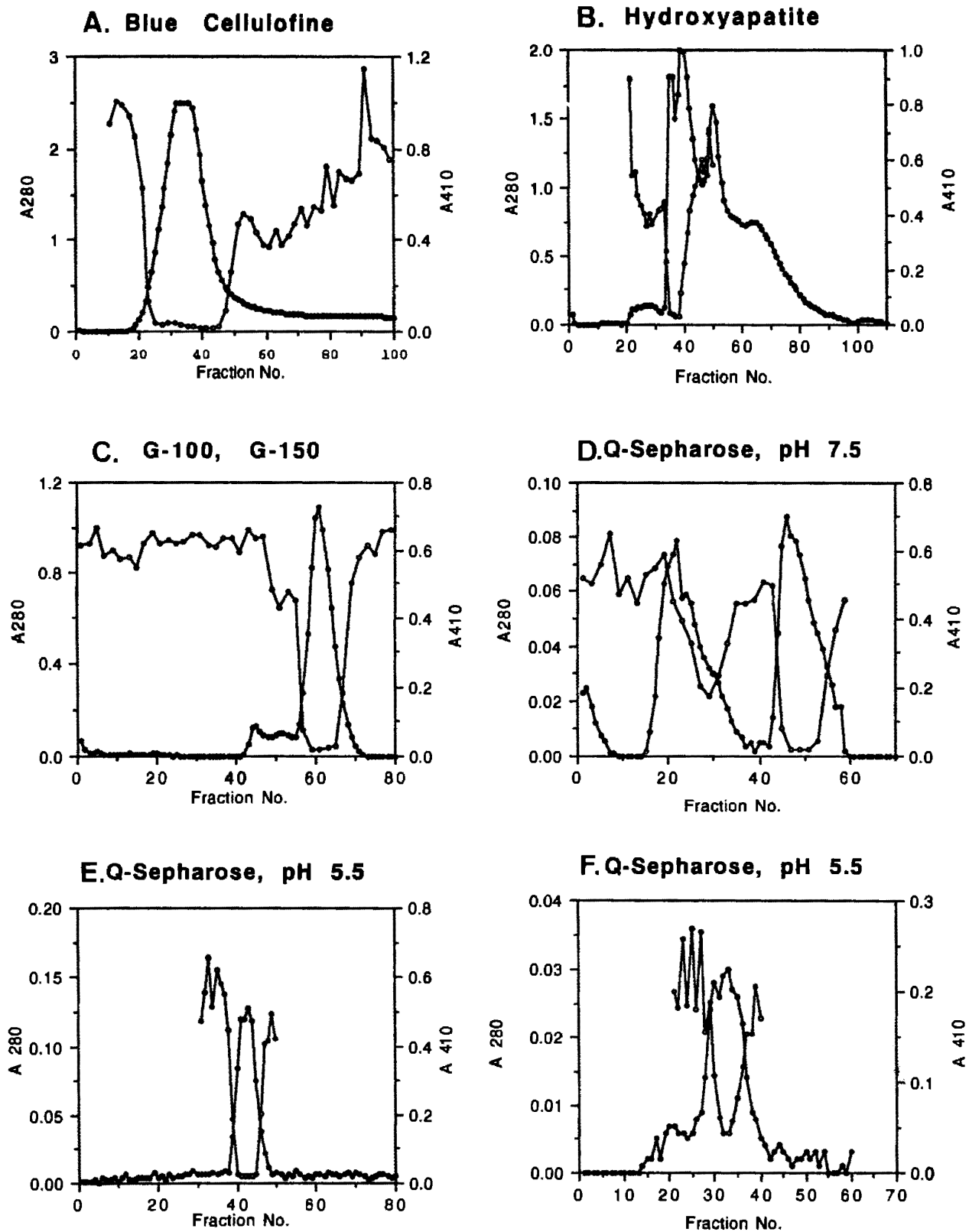
PαI 1.8 µg と chondroitinase ABC 0.02 U を 30 mM sodium acetate, 10 mM EDTA を含む 50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.2 中で 37°C 30分間反応させた。

## 結 果

### 1. 精製

#### 1.1 α-1-アンチプロテイナーゼ (AP) およびカウンタートリピン (CT) の精製

すべての操作は 4°C で行なった。解凍したハムスター血漿 (35 ml) を, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.15 M NaCl で平衡化した Blue Cellulofine のカラム (4×24 cm) にかけて, 流速 40 ml/h で同 buffer を流した。素通りを 10ml ずつ分取し, 各画分の 280 nm での吸光度と, trypsin 阻害活性を測定した (Fig. 1.A)。活性のあった部分 (画分21—50) を集め, 同 buffer で平衡化した hydroxyapatite カラム (4×12 cm) にかけて, 同一 buffer で洗浄したのち, sodium phosphate buffer, pH 7.5 の濃度勾配 (5—200 mM) を用いて溶出させた (流速 30 ml/h)。溶出液を 10 ml ずつ分取し, 同様に 280 nm での吸光度と, trypsin 阻害活性を測定した (Fig. 1.B)。次に, 活性画分 (34—39) を集め 80% 飽和硫酸にて塩析した。SORVALL RC2-B SS-34 にて 10,000 rpm, 10分間遠心分離して得られた沈殿を, 少量の buffer に溶解し, Sephadex G-100, G-150 (約 1:1 混合物) のカラム (3×155 cm) にかけて, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.15 M NaCl buffer を用いて分画し同様に活性を測定した (Fig. 1.C)。活性のあった画分 (59—64) を集め 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 buffer に対し 3日間透析した。次にその内液を, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 buffer で平衡化した Q-Sepharose カラム (3×6 cm) をかけ流速 24 ml/h で同 buffer を流した後, 0—0.3 M の NaCl 濃度勾配で溶出させた。活性を測定すると 2つのピークが出現し, 前方のピークは CT を, 後方のピークは AP を含んでいた (Fig. 1.D)。そこでまず, 後方のピークの画分 (46—50) を集め Immersible CX-30 で濃縮し, PD-10 にて 25 mM piperazine, pH 5.5 に buffer 交換した後, 同 buffer で平衡化した Q-Sepharose カラム (1×40 cm) にかけて, 流速 15 ml/h で平衡化



**Fig. 1** Purification of AP and CT

A-F Absorbance at 280 nm, (●—●);

Absorbance at 410 nm which represents trypsin inhibitory activity, (○—○)

buffer を流した後、0—0.3 M NaCl 濃度勾配にて溶出させ、ほぼ純粋な AP が得られた (Fig. 1.E). また AP と同様な手順で、前方のピーク (28—34) からは CT が単離された (Fig. 1.F).

### 1.2 プレ $\alpha$ トリプシンインヒビター (P $\alpha$ I) の精製

解凍したハススター血漿 35 ml を 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.15 M NaCl buffer で平衡化した Q-Sepharose のカラム (2.6 $\times$ 10 cm) にかき、同 buffer を流した後、流速 40 ml/h にて 0.15—0.50 M NaCl 濃度勾配で溶出させた。溶出液を 5 ml ずつ分取し 280 nm での吸光度と trypsin 阻害活性を測定した

(Fig. 2.A). 活性のあった画分 (39—48) を集め Immersible CX-30 で濃縮した後、50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.15 M NaCl, buffer で平衡化した Toyopearl HW-65 カラム (2.6 $\times$ 95 cm) にかき、同 buffer を流速 25 ml/h で流した。流出液を 5 ml ずつ分取し 280 nm での吸光度と trypsin 阻害活性を同様に測定した (Fig. 2.B). 活性のあった画分 (76—83) を 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.15 M NaCl buffer で平衡化した CM Affi-Gel Blue カラム (1 $\times$ 38 cm) にかき、同 buffer を流速 10 ml/h で流した。素通り画分からほぼ純粋な P $\alpha$ I が得られた (Fig. 2.C).

### 2 AP, CT および P $\alpha$ I の性質

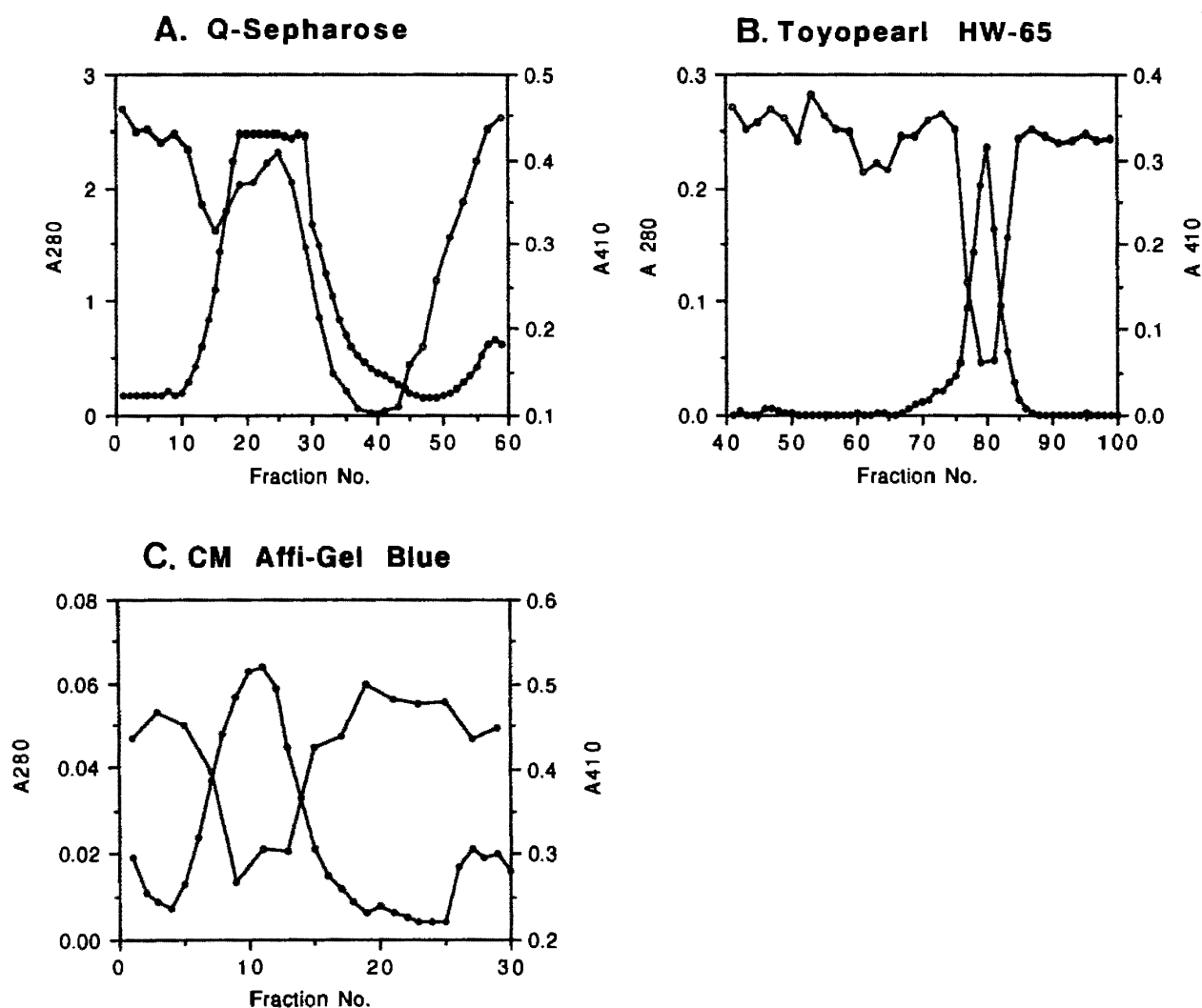


Fig. 2 Purification of P $\alpha$ I

A—C Absorbance at 280 nm, (●—●);

Absorbance at 410 nm which represents trypsin inhibitory activity, (○—○)

それぞれのインヒビターは native-PAGE, 還元, 非還元下 SDS-PAGE で単一なバンドとして泳動された (Figs. 3-5). CT と P $\alpha$ I は非常に分解しやすく, 数日のうちに単一バンドでなくなり, とくに CT は 280 nm の吸光度

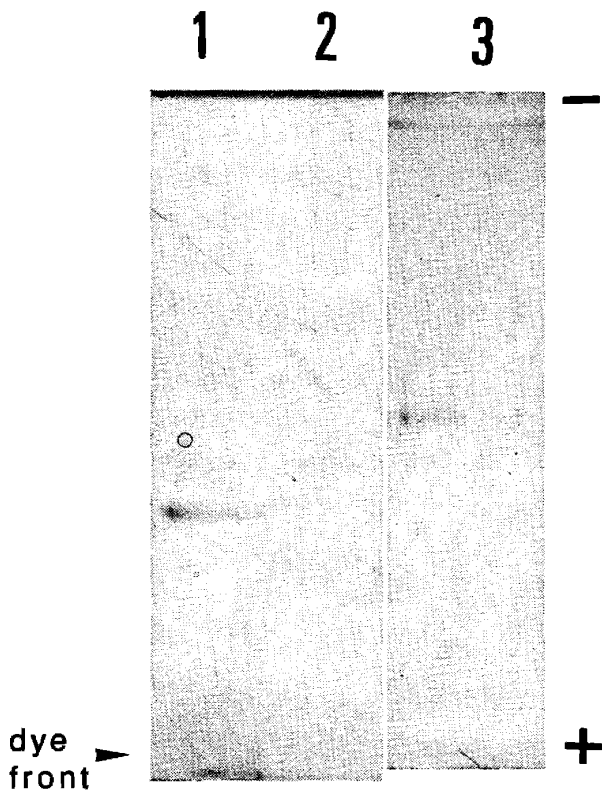


Fig. 3 native-PAGE of AP, CT and P $\alpha$ I  
Lane 1, AP; Lane 2, CT; Lane 3, P $\alpha$ I

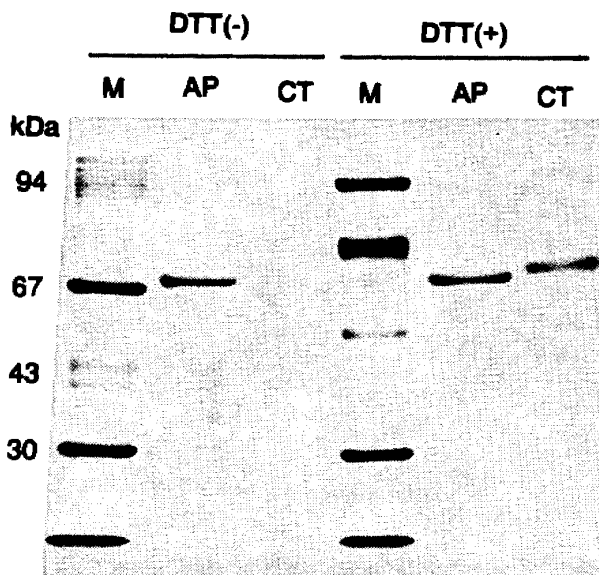


Fig. 4 SDS-PAGE of AP and CT  
DTT, Dithiothreitol; M, Molecular weight marker

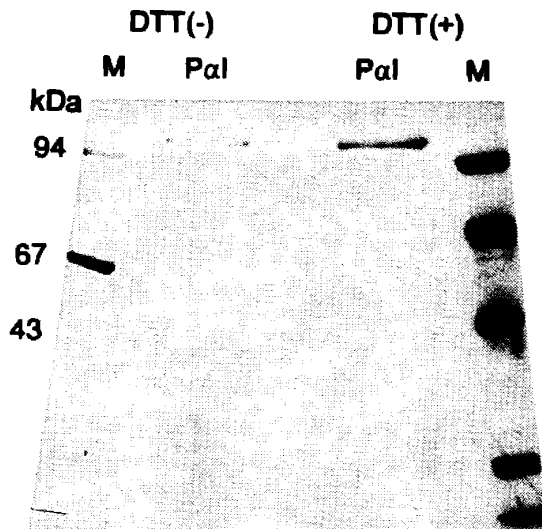


Fig. 5 SDS-PAGE of P $\alpha$ I  
DTT, Dithiothreitol; M, Molecular weight marker

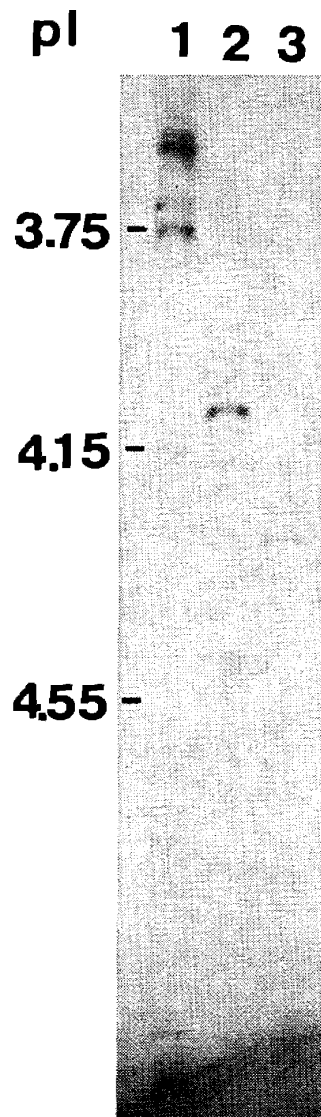


Fig. 6 Isoelectric focusing of AP and CT  
Lane 1, pI marker; Lane 2, AP; Lane 3, CT

が日に日に上昇する傾向があった。等電点電気泳動ではそれぞれ数本のバンドとして泳動された (Fig. 6)。ヒト AP を等電点電気泳動すると普通 microheterogeneity のため数本のバンドが現われるが<sup>12</sup>、ハムスター AP では強く染まるバンドが2本と薄く染まるバンドが1~2本現われるのみであった。電気泳動から求めた分子量と等電点は Table 1 のとおりである。

**Table 1** MW and pI of AP, CT and PαI

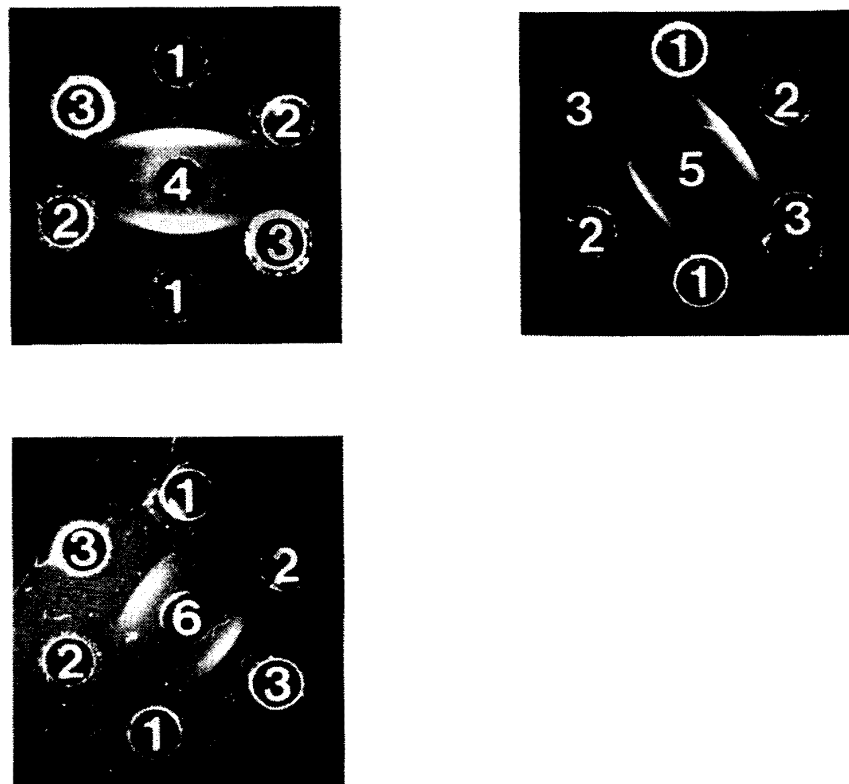
	AP	CT	PαI
MW(Da)	68,000	55,000	120,000
pI	4.06-4.14	4.25-4.30	4.30-4.37

AP は elastase, chymotrypsin と trypsin を阻害し、CT と PαI は trypsin のみを阻害した (Table 2)。Ouchterony 法ではインヒビター相互の共通抗原性は認められなかった (Fig. 7)。AP の N末端20個のアミノ酸配列を比較のためラットと並べて Figure 8 に示した。

**Table 2** Inhibitory Spectrum of AP, CT and PαI

	AP	CT	PαI
elastase (porcine pancreas)	+	-	-
plasmin (human plasma)	-	-	-
chymotrypsin (bovine pancreas)	+	-	-
kallikrein (porcine pancreas)	-	-	-
kallikrein (human plasma)			-
kallikrein (guinea pig plasma)	-	-	
trypsin (porcine pancreas)	+	+	+

ヒト PαI は還元剤では分解されず、chondroitinase ABC や hyaluronidase 処理によって2本のポリペプチド鎖に分解されることから、ジスルフィド結合ではなくグリコサミノグリカン鎖を介して、2本のポリペプチド鎖が結合していると考えられている<sup>13</sup>。そこで精製したハムスター PαI をコンドロイチナーゼ処理した後電気泳動をすると、分子量12万のバンドは消え、新たに分子量9万と2.5万のバンドが出現した (Fig. 9)。それぞれのバンドのN末端



**Fig. 7** Double immunodiffusion of AP, CT and PαI  
1, AP; 2, CT; 3, PαI; 4, anti AP; 5, anti CT; 6, anti PαI

inhibitor	N-terminal sequence																			
hamster AP	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
rat AP	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
hamster PaI (heavy chain)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
human PaI (heavy chain)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
hamster PaI (light chain)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
human PaI (light chain)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20

Fig. 8 Comparison of N-terminal eicosapeptide sequence

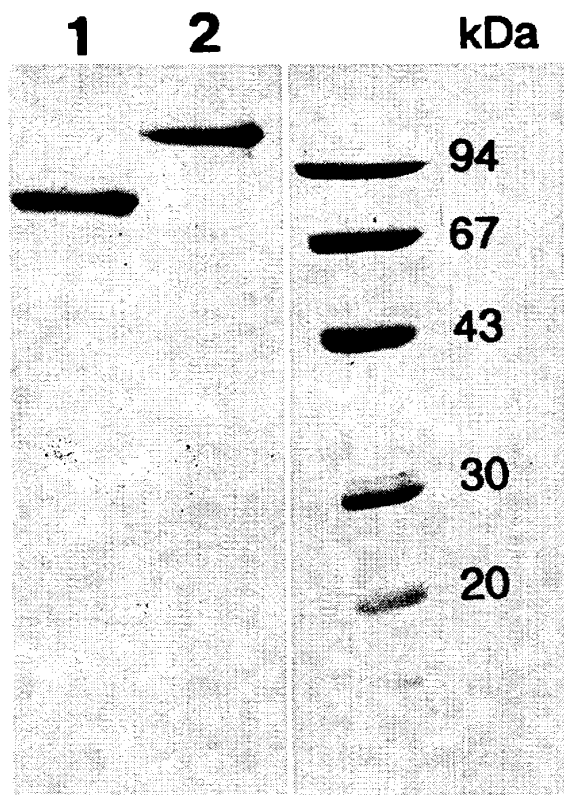


Fig. 9 SDS-PAGE of native PaI and chondroitinase-treated PaI

1, chondroitinase-treated PaI;  
2, native PaI

アミノ酸配列を決定し、ヒト PaI のアミノ酸配列と比較したところ、両鎖とも20個中13個が一致していた (Fig. 8).

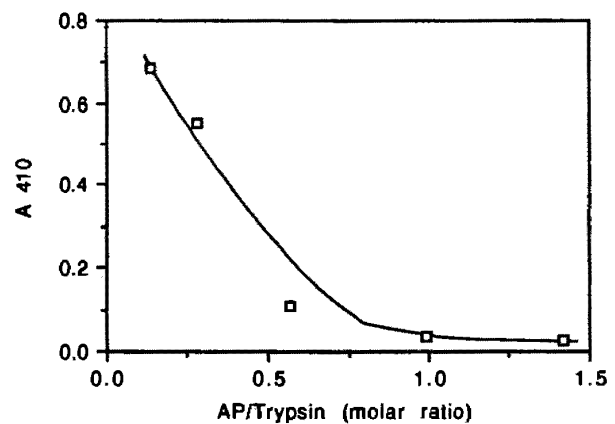
### 3 各インヒビターのトリプシン阻害活性

AP および CT 共に trypsin を約 1:1 のモル比で阻害するのに対し PaI は trypsin: PaI=1:1.6 のモル比であった (Fig. 10.A-C).

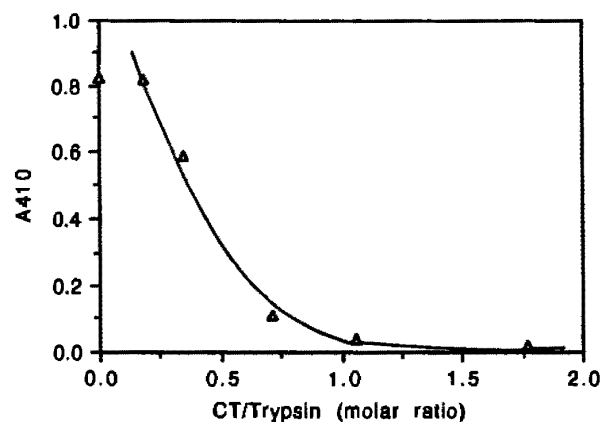
### 4 急性炎症時の濃度変化

今回精製した AP, CT および PaI に対する抗血清を用いて各インヒビターの濃度変化をロケット免疫電気泳動法にて測定した。また以前当教室で作製してあった  $\alpha$ -macroglobulin ( $\alpha$ -MG) と murinoglobulin (MUG) に対する

#### A. Trypsin Inhibition by AP



#### B. Trypsin Inhibition by CT





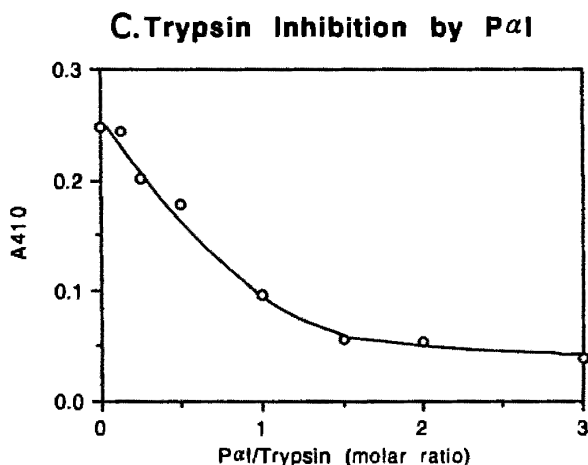


Fig. 10 Trypsin inhibition by AP, CT and PaI

抗血清を用いて  $\alpha$ -MG と MUG の濃度変化も合わせて測定した。PaI は起炎後1日から上昇し始め3日後にピークとなり、起炎前の約2倍になった。MUG は起炎12時間後から減少し始め、3日後に最低値となり7日後にも回復していなかった。AP, CT,  $\alpha$ -MG は大きな変化はしなかったが、AP は全体にやや減少、 $\alpha$ -MG は一過性にやや減少する傾向を認めた (Fig. 11)。

### 考 察

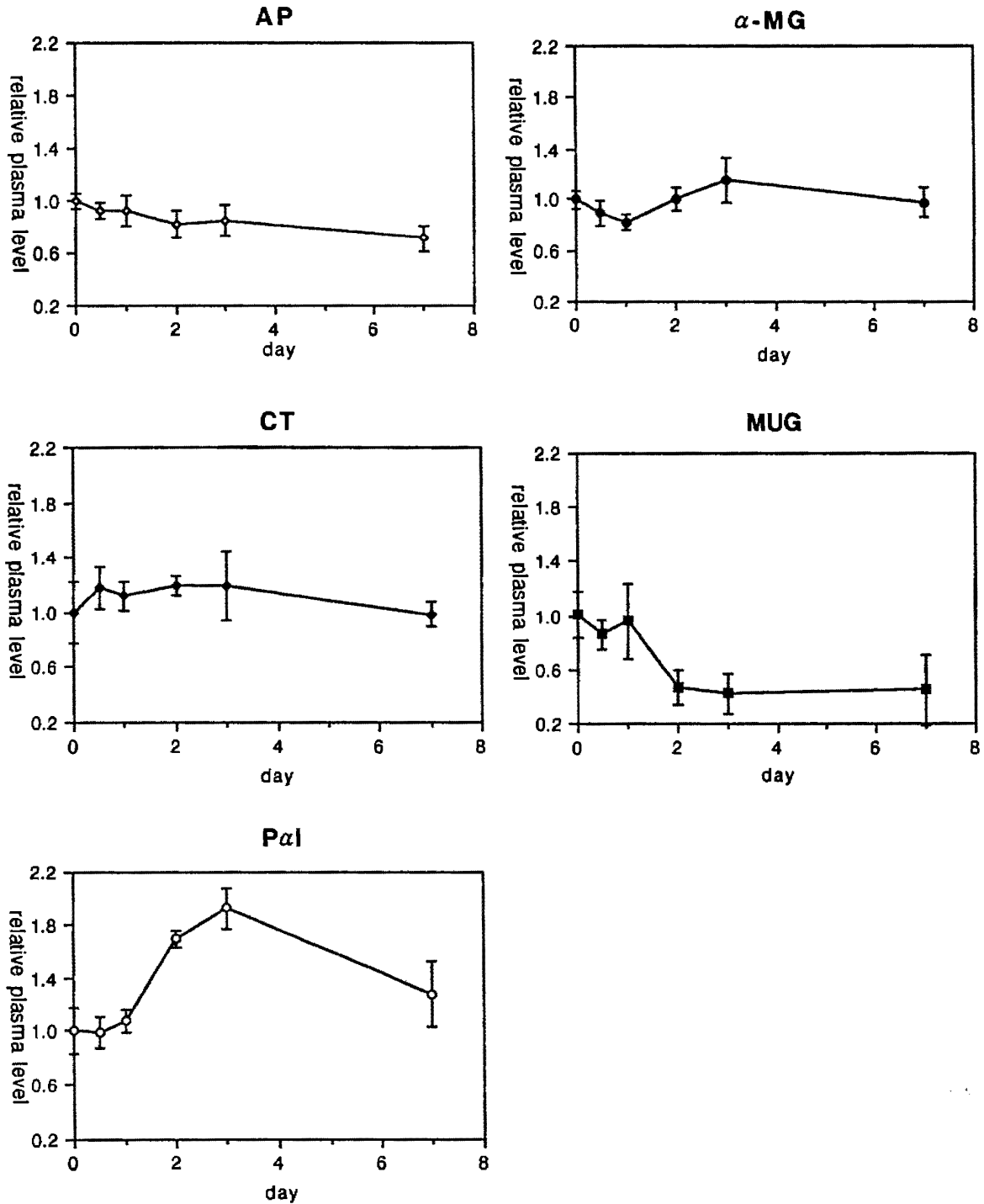
ハムスター血漿中からトリプシン阻害活性をもつ3種類のプロテイナーゼインヒビターを精製しその性質を調べ、炎症時の濃度変化を測定した。

ヒト AP は最もよく研究されたプロテイナーゼインヒビターの一つで、394個のアミノ酸からなる単一ポリペプチド鎖が3個の $\beta$ シートと8個の $\alpha$ ヘリックスを形作っている。AP の標的酵素は好中球エラスターゼであり、その先天的欠損症は肺組織の破壊の結果肺気腫をもたらす<sup>14</sup>。ハムスター AP は分子量6.8万でヒト AP の分子量よりやや大きい。この差が糖鎖によるものかアミノ酸によるものかは不明である。N末端20個のアミノ酸配列をヒトとラットの AP と比較するとラットとは11個ヒトとは9個一致していた (Fig. 8)。

CT は山本によりマウス腹水及び血中から精

製されたトリプシンのみを阻害するプロテイナーゼインヒビターである<sup>15</sup>。当初、容易に分解されること、トリプシンしか阻害しないことから inter- $\alpha$ -trypsin inhibitor (I $\alpha$ I) の分解産物とも考えられた。しかしN末端のアミノ酸配列が全く異なること、ハムスターにも同族と考えられる蛋白質が存在することなどから、別の蛋白質と考えられる。その生理的役割は不明で、今後の研究課題である。

I $\alpha$ I は protein  $\pi$  として初めて記述され<sup>16</sup>、後に trypsin の inhibitor であることが示された<sup>17</sup>。その名は電気泳動上  $\alpha_1$ - $\alpha_2$  globulin の間に移動することに由来する。I $\alpha$ I は、還元剤存在下 SDS-PAGE にて単一バンドとして泳動されるため、当初一本鎖の蛋白と考えられていた。しかし I $\alpha$ I に関連した baboon liver mRNA の翻訳産物が3種類のポリペプチドであったことや、ヒト肝 cDNA の知見から、I $\alpha$ I は2本以上の蛋白から成っていることが示唆され<sup>18-21</sup>、さらに testis hyaluronidase や chondroitinase ABC で処理すると3本のポリペプチド鎖に分れることがわかり<sup>13</sup>、I $\alpha$ I は2本の heavy chain と1本の light chain がコンドロイチン硫酸を介して結合しているのではないかと推測された<sup>22</sup>。最近ヒト血中には I $\alpha$ I のほかに、agarose 電気泳動で  $\alpha$  globulin の前に位置し分子量12.5万で heavy chain, light chain それぞれ1本からなる PaI が存在することが報告された<sup>23</sup>。本実験では当初ハムスター血漿から I $\alpha$ I を精製する目的でトリプシン阻害活性のある分画を追っていったところ、得られた精製物の分子量は12万で予想よりはるかに小さかった。そこでこの精製物を chondroitinase ABC 処理した後電気泳動してみたところ、分子量9万と2.5万の新たな2本のバンドが出現した。それぞれのアミノ酸配列を決定したところ、ヒト PaI と高い相同性が見られ、この精製物はヒト PaI に相当するインヒビターであることがわかった。ヒト以外の動物で PaI の存在が確認されたのは初めてであり、ハムスターは PaI の生理的役割の解明にとっ



**Fig. 11** Changes of plasma level of various proteinase inhibitors after acute inflammation  
 The vertical axis shows relative plasma levels, the horizontal axis days after the injection of LPS  
 The injection of LPS was done after the day 0  
 Each point represents the mean of five animals and each bar the standard deviation

**Table 3** Acute phase response in various species

Inhibitors	Hamster	Human	Rabbit	Rat	Mouse	Guinea pig
AP	—	↑	↑	↑	—	↑
CT	—					
PαI	↑					
α <sub>2</sub> -MG	—	—	—	↑↑	—	↑
MUG	↓			↓	↓	—

↑, 2-4-fold increase; ↑↑, over 10-fold increase; —, no significant change  
↓, decrease to 1/3 level of the control; blank, not detected in plasma

でも大切な動物であると言える。

急性相蛋白としてプロテイナーゼインヒビターがどのような生理的役割を担っているかは推測の域を出ないが、比較的近い種においても急性炎症時のプロテイナーゼインヒビターの挙動が異なるのは興味深い現象である。本実験で顕著に増加したのは PαI であった。IαI の一部である light chain が腫瘍や炎症時に増加するとの報告はあるが<sup>24</sup>, IαI は様々な病態でも変化しないという報告<sup>25,26</sup> や逆に減少するとの報告<sup>27-29</sup> もあり, IαI について一定した見解はない。また PαI についてはまだ何も報告されていない。MUG はマウス血中から単離された α-macroglobulin ファミリーに属する分子量 18 万の糖蛋白である<sup>30</sup>。α-MG ファミリーは脊椎及び無脊椎動物循環中や鳥類、爬虫類の卵白中に含まれる高分子量の糖蛋白で、プロテイナーゼに対し “molecular traps” として働いている。分子中に “bait” region と呼ばれるプロテイナーゼで切断され易い部分があり、この部分が切れると分子全体の conformation が変化しプロテイナーゼを trap できるようになっている。α-MG に trap されたプロテイナーゼは、α-MG の分子内に入りこめる低分子基質は分解できるが、入り込めない高分子基質は分解できない<sup>31</sup>。ヒト α<sub>2</sub>-MG は 4 量体だがマウス MUG は単量体でこの相同物はラット及びモルモットにも存在する<sup>32,33</sup>。ハムスター MUG は起炎 12 時間後から減り始め 1 週間後にも元に戻さなかった。これはラット、マウスと同様な反応である<sup>3,34</sup>。AP はヒト、ラット、モ

ルモットでは急性相蛋白であり<sup>1,3,35</sup>、マウスではそうでないが<sup>2</sup>、ハムスターではむしろやや減少する傾向が見られた。α-MG はラット、モルモットでは急性相蛋白であるが<sup>3,35</sup>、ヒト、ウサギ、マウスではそうでない<sup>1,34,36</sup>。ハムスターでも大きな変化はなかった。以上の結果をまとめると Table 3 になる。

ハムスター血中から 3 種類のトリプシン阻害活性を持つプロテイナーゼインヒビター (AP, CT, PαI) を精製し性質を調べた。AP はヒトに比しやや分子量が大きいものの際だった特長はなかった。PαI はヒト以外の動物からは初めて精製され、ハムスターにおいては急性相蛋白であることがわかった。

### 謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究の御指導と論文の御校閲をいただいた篠原兵庫教授に深く感謝いたします。また終始暖かい御援助と御助言をいただき、α-MG および MUG に対する抗血清を提供していただいた山本和彦先生に心から感謝いたします。さらに本研究の実験に御協力いただいた第 2 生化学教室の諸先生方に謝意を表します。また Syrian hamster の提供に対し動物室渡辺信介氏に感謝いたします。最後に本研究の機会を与えてくださった東洋医学研究所第 2 研究部門遠田裕政教授に深甚の感謝の念を捧げます。

本論文の要旨は、第 63 回日本生化学会 (1990 年 9 月, 大阪)、第 15 回国際生化学会 (1991 年 8 月, エルサレム) にて発表した。

### 文 献

1. Kushner I. The acute phase response: an overview. *Methods Enzymol* 1988; 163 : 373-383.
2. Bauman H, Latimer JJ, Glibetic MD. Mouse

- $\alpha_1$ -protease inhibitor is not an acute phase reactant. *Arch Biochem Biophys* 1986 ; 246 : 488-493.
3. Goto K, Saito A, Nagase S, Sinohara H. Acute phase response of plasma proteins in albuminemic rats. *J Biochem* 1988 ; 104 : 952-955.
  4. Billingham RE, Streilein JW. Introduction. *Adv Exp Med Biol* 1981 ; 134 : 1-3.
  5. Karlinsky JB, Snider GL. Animal models of emphysema. *Am Rev Res Dis.* 1978 ; 117 : 1109-1133.
  6. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970 ; 227 : 680-685.
  7. Davis BJ. Disc electrophoresis: II. Method and application to human serum proteins. *Ann NY Acad Sci* 1964 ; 121 : 404-429.
  8. Yamamoto K, Suzuki S, Sinohara H. Synthesis of contrapsin and  $\alpha_1$ -antiproteinase in inflamed and tumor-bearing mice. *Biochem Int* 1988 ; 16 : 921-928.
  9. Bergmeyer HU, Bergmeyer J, Grassl M, eds. *Methods of Enzymatic Analysis*. vol 5. 3rd ed. Florida: Verlag Chemie, 1984.
  10. Ouchterlony O. Diffusion in gel methods for immunological analysis. *Prog Allergy* 1953 ; 5 : 1-78.
  11. Laurell LB. Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in agarose gel containing antibodies. *Anal Biochem* 1966 ; 15 : 45-52.
  12. Carrell W C, Owen M C.  $\alpha_1$ -Antitrypsin: structure, variation and disease. *Essays Med Biochem* 1979 ; 4 : 83-119.
  13. Jessen TE, Faarvang KL, Ploug M. Carbohydrate as covalent crosslink in human inter- $\alpha$ -trypsin inhibitor: a novel plasma protein structure. *FEBS Lett* 1988 ; 230 : 195-200.
  14. Heidtmann H, Travis J. Human  $\alpha_1$ -proteinase inhibitor, In: Barrett AJ, Salvesen G eds. *Proteinase inhibitors* : Amsterdam: Elsevier Science Publishers BV, 1986 ; 441-456.
  15. 山本和彦, 篠原兵庫. マウス血漿カウタートリピンの精製と性質. *生化学* 1991 ; 63 : 825.
  16. Steinbuch M, Loeb J. Isolation of an  $\alpha_2$ -globulin from human plasma. *Nature* 1961 ; 192 : 1196.
  17. Heide K, Heimburger N, Haupt H. An inter- $\alpha$ -trypsin inhibitor of human serum. *Clin Chim Acta* 1965 ; 11 : 82-85.
  18. Bourguignon J, Vercaigne D, Sesbouié R, Martin JP, Salier JP. Inter- $\alpha$ -trypsin-inhibitor (ITI): two distinct mRNAs in baboon liver argue for a discrete synthesis of ITI and ITI derivatives. *FEBS Lett* 1983 ; 162 : 379-383.
  19. Schreitmüller T, Hochstrasser K, Reisinger PWM, Wachter E, Gebhard W. cDNA cloning of human inter- $\alpha$ -trypsin inhibitor discloses three different proteins. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 1987 ; 368 : 963-970.
  20. Salier JP, Diarra-Mehrpour M, Sesbouié R et al. Isolation and characterization of cDNAs encoding the heavy chain of human inter- $\alpha$ -trypsin inhibitor ( $I\alpha$ TI): Unambiguous evidence for multipolypeptide chain structure of  $I\alpha$ TI. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987 ; 84 : 8272-8276.
  21. Diarra-Mehrpour M, Bourguignon J, Sesbouié R et al. Human plasma inter- $\alpha$ -trypsin inhibitor is encoded by four genes on three chromosomes. *Eur J Biochem* 1989 ; 179 : 147-154.
  22. Balduyck M, Laroui S, Mizon C, Mizon J. A proteoglycan related to the urinary trypsin inhibitor (UTI) links the heavy chains of inter- $\alpha$ -trypsin inhibitor. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 1989 ; 370 : 329-336.
  23. Enghild JJ, Thøgersen IB, Pizzo SV, Salvesen G. Analysis of inter- $\alpha$ -trypsin inhibitor and a novel trypsin inhibitor, pre- $\alpha$ -trypsin inhibitor, from human plasma. *J Biol Chem* 1989 ; 264 : 15975-15981.
  24. Ødum L, Hansen-Nord G, Byrjalsen I. Human inter- $\alpha$ -trypsin inhibitor and immunologically related inhibitors investigated by quantitative immunoelectrophoresis. II. Pathological conditions. *Clin Chim Acta* 1987 ; 162 : 189-198.
  25. Smith JM, Balabanian MB, Freeman RM. Serum level of a component reacting with antiserum to urinary antitrypsin in health and disease with emphasis on high levels in renal failure. *J Lab Clin Med* 1976 ; 88 : 905-913.
  26. Sesbouié R, Basuyau JP, Salier JP. Quantitative study of human blood alpha-1-antitrypsin, alpha-2-macroglobulin and inter-alpha-trypsin-inhibitor with respect to plasma renin activity. *Clin Chim Acta* 1983 ; 135 : 23-33.
  27. Stark JM, Matthews N, Ryley HC, Greenwood BM, Lewis LS, Whittle HC. Meningococcal infection and proteolytic control. *J Clin Path* 1978 ; 31 : 1177-1181.

28. 石崎武志, 橋爪一子, 松原藤継, 筑田孝司, 服部 絢一, 右田俊介. Inter- $\alpha$ -trypsin inhibitor: disseminated intravascular coagulation (DIC) への関与の可能性. 日血会誌 1980; 43: 587-592.
29. Chawla RK, Rausch DJ, Frederick WM, Volger WR, Lawson DH. Abnormal profile of serum proteinase inhibitors in cancer patients. *Cancer Res* 1984; 44: 2718-2723.
30. Saito A, Sinohara H. Murinoglobulin, a novel protease inhibitor from murine plasma. *J Biol Chem* 1985; 260: 775-781.
31. Sottrup-Jensen L.  $\alpha$ -Macroglobulins: structure, shape, and mechanism of proteinase complex formation. *J Biol Chem* 1989; 264: 11539-11542.
32. Saito A, Sinohara H. Rat plasma murinoglobulin: isolation, characterization, and comparison with rat  $\alpha$ -1-and  $\alpha$ -2-macroglobulins. *J Biochem* 1985; 98: 501-516.
33. Suzuki Y, Sinohara H. Guinea pig plasma murinoglobulin. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 1986; 367: 579-589.
34. Yamamoto K, Tsujino Y, Saito A, Sinohara H. Concentration of murinoglobulin and  $\alpha$ -macroglobulin in the mouse serum: variation with age, sex, and experimental inflammation. *Biochem Int* 1985; 10: 463-469.
35. Suzuki Y, Yoshida K, Ichimiya T, Yamamoto K, Sinohara H. Trypsin inhibitors in guinea pig plasma: isolation and characterization of contrapsin and two isoforms of  $\alpha$ -1-antiproteinase and acute phase response of four major trypsin inhibitors. *J Biochem* 1990; 107: 173-179.
36. Lebreton de Vonne T, Gutman N, Mouray H. Les alpha macroglobulines de lapin au cours de la reaction inflammatoire. *Clin Chim Acta* 1970; 30: 603-607.