

氏名(本籍)	わた なべ とし お (群馬県)		
学位の種類	博 士 (農 学)		
学位記番号	博 甲 第 1073 号		
学位授与年月日	平成 5 年 3 月 25 日		
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当		
審査研究科	農 学 研 究 科		
学位論文題目	SEQUENCE REQUIREMENTS FOR PRECURSOR CLEAVAGES WITHIN THE CONSTITUTIVE AND REGULATED SECRETORY PATHWAYS (構成的および調節性分泌経路における前駆体タンパク切断の配列要求性に関する研究)		
主 査	筑波大学教授	農学博士	村 上 和 雄
副 査	筑波大学教授	農学博士	日 下 部 功
副 査	筑波大学教授	理学博士	宗 像 英 輔
副 査	筑波大学教授	薬学博士	後 藤 勝 年

論 文 の 要 旨

I. 構成的分泌経路のタンパク前駆体切断における配列要求性

ペプチドホルモンの多くは、内分泌細胞内でまず分子量の大きい不活性な前駆体(プロホルモン)として合成されたのち、調節性分泌経路において塩基性アミノ酸対 (Lys-Arg, Arg-Arg) 部位で限定切断を受け、活性型のホルモンとなる。一方、増殖因子や血中プロテアーゼ、ウイルスのエンペロープタンパクのうち、非内分泌細胞の構成的分泌経路において、塩基性アミノ酸クラスター部分で切断されて前駆体から成熟型になるものが多く知られている。これらの前駆体の切断部位近傍のアミノ酸配列を比較することによって、著者らの研究グループはそのほとんどが切断部位にコンセンサス配列 (Arg-X-Lys/Arg-Arg, RXK/RR) を有することに気づいた。

著者はこの構成的分泌経路における切断の配列要求性を詳しく調べるために、マウス *Ren-2* プロレニンおよびヒトプロレニンの種々の変異体を作製し、それらのCHO細胞(非内分泌細胞)内での切断を解析した。

(1) -4位および-2位の効果について

様々な配列を持つ *Ren-2* プロレニンcDNAを作製し、これらを発現用プラスミドに組み込んでそれぞれCHO細胞へ導入した。[³⁵S]メチオニンを含む培地でこれらの細胞を培養し、培地中に分泌されたプロレニンおよびレニンを免疫沈降法により回収した。それをSDS-ポリアクリルアミド電気泳動とオートラジオグラフィにより解析し、プロレニンからレニンへの変換効率を調べた。

RXKR, RXRR, KXKR, およびKXRRの配列を持つ変異体の解析から、-4位のアミノ酸についてはKよりもRの方が、-2位については逆にRよりもKの方が効率よく切断されることがわかった。

(2) Rの位置の効果について

Rの位置が切断効率に与える効果を調べるために、-4位以外にRを導入した変異体、RKR, RXXKR, RXXXKRを解析した結果、-4位だけではなく-6位にRがあっても切断シグナルとして機能し得ることがわかった。

(3) Rの数の効果について

Rの数が切断効率に与える効果を調べるために、RXKRに対してさらにRを追加した変異体、RRKR, RRXKRを作製した。これらの切断効率はいずれもRXKRとかわらなかった。つまり-4位、-2位および-1位とに塩基性アミノ酸があれば、切断シグナルとしては十分であることがわかった。

(4) +1位のアミノ酸の効果について

構成的分泌経路における切断がマウス*Ren-2*プロレニン変異体に特異的な現象でないことを確認するために、ヒトプロレニンについても同様に変異体RXKR, RXXXKRを作製し、その切断を調べた。しかし予想に反して、これらはCHO細胞では切断されなかった。

*Ren-2*プロレニンとヒトプロレニンとを比較してみると、+1位が*Ren-2*ではSerであるのに対し、ヒトではLeuである。そこで+1位をSerに換えたヒトプロレニン変異体RXKRS, RXXXKRSを作製したところ、切断されるようになった。また逆に、*Ren-2*プロレニンについてRXKRL, RXKRVを作製したところ、全く切断されなくなった。

これらの結果から、+1位がLやVのとき切断されなくなることがわかった。

以上の結果をまとめると、構成的分泌経路における前駆体切断の配列要求性に関して、以下のようなルールが導かれた。

- 1) 切断部位の上流-1位及び-2位の塩基性アミノ酸に加えて、-4位あるいは-6位の塩基性アミノ酸が必須である。
- 2) -4位はLysよりもArgの方が切断効率が高い。
- 3) -2位はArgよりLysの方が切断効率が高い。
- 4) +1位に疎水性の大きい脂肪族アミノ酸が存在すると切断されなくなる。

II. 単一アルギニン部位での切断におけるコンセンサス配列

ペプチドホルモンの多くは内分泌系細胞が持つ調節性分泌経路において、まず不活性型の前駆体(プロホルモン)として合成され、その配列中に存在する塩基性アミノ酸対(KR, RR等)部位で特異的なエンドプロテアーゼによる切断(プロセッシング)を受けて活性型ホルモンになる。

近年、哺乳動物におけるプロセッシングエンドプロテアーゼとしてfurin, PC2, PC3, およびPC4の四つが同定された。このうちPC3は内分泌細胞の調節性分泌経路において塩基性アミノ酸対(KR, RR)部位を切断することが知られている。

ところで、プロホルモンの中には塩基性アミノ酸対ではなく、単一のR部位で切断されるものが知られている。そして我々は偶然、RXXRという配列が内分泌細胞AtT-20内で切断されることを発見した。AtT-20細胞はPC3を内在性に発現していることから、PC3がこの切断に関与している可能性が考えられた。そこで私はAtT-20細胞の調節性分泌経路における前駆体切断のアミノ酸配列要求性について詳しく検討した。

切断部位近傍に変異を導入したマウス*Ren-2*プロレニンcDNAを作製し、これらをAtT-20細胞へ導入した。以下I章と同様に解析し、変異体のプロレニンからレニンへの変換効率を調べた。

(1) Rの位置の効果について

Rの位置が切断効率に与える効果を調べるために、-4位以外にRを導入した変異体、RXR, RXXXR, RXXXXRを作製した。RXXXR変異体の切断効率が約50%であったのに対し、これらはそれぞれ0%, 5%, 25%であった。この結果から、-4位だけではなく-6位にRがあっても切断シグナルとして機能し得ることがわかった。

(2) -4位の塩基性アミノ酸の効果について

KXXXR, HXXXRの配列を持つ変異体を作製したところ、その切断効率はそれぞれ約10%, 0%であった。このことから、-4位のアミノ酸についてはKよりもRの方が効率よく切断されることがわかった。

(3) +1位のアミノ酸の効果について

AtT-20における切断がマウス*Ren-2*プロレニン変異体に特異的な現象でないことを確認するために、ヒトプロレニンについても同様にRXXXR変異体を作製し、その切断を調べた。しかし予想に反して、この変異体はAtT-20では切断されなかった。

*Ren-2*プロレニンとヒトプロレニンとを比較してみると、+1位が*Ren-2*ではSであるのに対し、ヒトではLである。そこで+1位を換えた*Ren-2*プロレニンRXXRL, RXXRVを作製したところ、全く切断されなくなった。また、*Ren-2*プロレニンRXXRAでは、切断はされたがその効率は減少した。

これらの結果から、+1位がLやVのとき切断されなくなることがわかった。

以上の結果をまとめると、調節性分泌経路における前駆体切断の配列要求性に関して、以下のようルールが導かれた。

- 1) 切断部位の上流-1位のArgに加えて、-4位あるいは-6位の塩基性アミノ酸が必須である。
- 2) -4位はLysよりもArgの方が切断効率が高い。
- 3) +1位に疎水性の大きい脂肪族アミノ酸が存在すると切断されなくなる。

調節性分泌経路を持つが内在性にPC3を発現していないGH₄C₁細胞において、変異体とPC3とをcoexpressionさせると変異体は切断されたことから、これら前駆体切断はPC3によって行われていることもわかった。

審 査 の 要 旨

ペプチドホルモンは生体の恒常性維持や種々の生理機能の調節に中心的役割を果たしている。従ってその不活性前駆体のプロセッシングは、ホルモンによる生体調節にとって最も重要な段階の一つであると考えられる。

これまでに構成的分泌経路において前駆体タンパクは、RXK/RRという共通配列で切断されることが明らかにされていた。本研究の I 章において、構成的経路における切断のさらに詳細な配列要求性が明らかになった。

調節性分泌経路において前駆体タンパクは塩基性アミノ酸対 (KR, RR) 部位で切断されることが知られていたが、一部に単一のArg部位で切断されるものも知られていた。今回、RXXRという配列が調整性経路における切断シグナルとして機能していること、調節性経路の切断はプロテアーゼ PC3が行っていること、そしてその切断における詳細な配列要求性が、本研究の II 章において明らかになった。

以上の研究成果は、それぞれ構成的および調節性分泌経路における前駆体プロセッシングに関する研究の発展に大きく貢献したものである。

よって、著者は博士 (農学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。