

氏名(本籍)	か 香 孝一郎 (東京都)
学位の種類	博士(学術)
学位記番号	博甲第1,205号
学位授与年月日	平成6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	生物科学研究科
学位論文題目	Studies on Biosynthesis of Mammalian Tachykinin Peptides (哺乳類タヒキニン群ペプチドの生合成機構に関する研究)
主査	筑波大学教授 理学博士 渋谷達明
副査	筑波大学教授 農学博士 田仲可昌
副査	筑波大学教授 理学博士 宗像英輔
副査	筑波大学教授 農学博士 村上和雄

論 文 の 要 旨

生体内で機能する生理活性ペプチドのうち、神経系に局在するものは神経ペプチドと呼ばれている。中でも、タヒキニン群ペプチドは一次知覚神経ならびに交感神経に局在し、シナプスにおける情報伝達に深く関与している神経ペプチドの一種である。哺乳動物のタヒキニンペプチドとして、サブスタンス P (SP)、ニューロキニン A (NKA)、およびニューロキニン B (NKB) の3種がすでに知られているが、その生理作用の発現、ならびに生合成機構については未だ不明な点が多い。一方、哺乳類におけるタンパク質の翻訳後修飾に関する研究が、主としてマウスを用いて近年急速に進展してきた。そこで本研究では、これまで明らかにされていなかったタヒキニンペプチドの生合成過程を分子レベルで解明することを目的とし、まず、(1)マウスの脳からタヒキニン前駆体 cDNA をクローニングし、その塩基配列を解析した。哺乳動物のタヒキニン前駆体には、SP および NKA をコードするプレプロタヒキニン A (PPT-A) と、NKB をコードするプレプロタヒキニン B (PPT-B) が存在し、選択的スプライシングにより PPT-A にはさらに α -、 β -、 γ -の3種の variant が存在する。塩基配列解析の結果、得られたクローンはマウスの β -、および γ -PPT-A、さらに PPT-B のそれぞれ全長をコードしていることがわかった。また、推定されるアミノ酸配列を他の動物種と比較したところ、成熟タヒキニン配列とその前後の塩基生アミノ酸対 (Lys-Arg)、さらに SP の N 末端付近 (Arg-X-X-Arg) は完全に保存されていた。このことからタヒキニンペプチドは、その前駆体 PPT-A、B の塩基性アミノ酸対および Arg-X-X-Arg 部位で限定切断を受け、生成されることが推測された。これまでの研究で、すでにマウスおよびラットの培養内分泌細胞を用いて、PPT-A が正常にプロセシングされることが示されている。本研究では、次に PPT-B のプロセシング機構を詳細に解析するとにした。しかし、

プロセシングの機構を解析するためには、特異的な検出系が必要となる。そこで次に、(2) NKB の特異的 RIA 系を確立した。NKB は通常の条件で難溶性であるため、これまで良い抗体が作成されなかったが、その N 末端を延長したプロセシング中間体 (bPPT-B(54-95)-NH₂) を化学合成し、水溶性を上げたもので抗体を作成した。さらに放射性リガンドを調製し、RIA の系を組み立て抗体の免疫交差性を検討した。その結果、得られた抗体は成熟 NKB ならびに抗原として免疫した bPPT-B(54-95)-NH₂ を特異的かつ高感度に認識し、これにより後のプロセシングの解析が可能となった。(3)細胞内におけるプロセシングの解析を行うために、まず(1)で得られたマウスの PPT-BcDNA をマウス脳下垂体由来 AtT-20細胞およびマウスインスリノーマ MIN 6 細胞、ラット脳下垂体由来 CH₄C₁ 細胞にそれぞれリン酸カルシウム法により導入し、安定細胞株を確立した。次に、これらの細胞及び培養上清を抽出し、前述の NKB 特異的 RIA 系と逆相 HPLC を組合せ、定量的に解析を行った。その結果、プロセシング酵素 PC3 を内在的に発現している AtT-20細胞で、マウスプロタヒキニン B が正しくプロセシングされ成熟 NKB が生成していることが確認された。また、PC3 に加えもう一つのプロセシング酵素 PC2 をも内在的に発現している MIN6 細胞においても、同様にプロセシングが起こっていることが認められた。一方、もともと内在的にプロセシング酵素を欠失している CH₄C₁ 細胞に PC3 を共導したのもでも、同様にプロセシングが進行し、成熟 NKB へと変換されていることが確認された。さらにこれらの細胞では、8-Br-cAMP などの分泌刺激剤に応答して細胞外への分泌促進がみられた。

以上の結果から、以下の知見が得られた。

- ①今回クローニングされたマウス PPT-A, B において、成熟タヒキニン配列及びその前後のプロセシング部位が保存されており、翻訳後修飾の過程でこれらの部分での限定分解を受けると推測された。
- ②特異的に NKB を検出できる RIA の系を確立した。
- ③培養内分泌細胞を用いた実験から、NKB 前駆体であるプロタヒキニン B は調節性分泌経路において、塩基性アミノ酸部位で少なくともプロセシング酵素 PC3 に触媒される限定切断を受け、成熟 NKB として細胞外への分泌されることが示唆された。

審 査 の 要 旨

タヒキニン群ペプチドは、血圧降下や平滑筋収縮、唾液分泌促進など多様な生理作用を示す神経ペプチドである。その中でも、SP は古くから痛覚における神経伝達物質の候補とされ、鎮痛薬開発等の分野でも重要視されてきたペプチドである。これらタヒキニンペプチドは、神経や内分泌系の細胞において、最初により高分子の不活性な前駆体タンパクとして合成されると考えられる。しかし、多くの生理活性ペプチド前駆体において、その翻訳後修飾の詳細については長らく不明であった。一方、近年マウス由来の細胞および組織から、この修飾過程を触媒するいくつかのプロセシング酵素が単離されてきた。このような状況の中、本研究ではタヒキニン群ペプチドの翻訳後修飾を解析することを目的とし、マウスを用いたモデル系の確立を試みている。本研究では、まずマウス

のタヒキニン前駆体 cDNA を単離した。タヒキニン前駆体 (PPT-A, B) は、これまでウシ及びラットでクローニングされているが、マウスでのクローニングは本研究が最初である。さらに、溶解性が低いためにこれまでよい検出系が報告されていなかった、NKB の特異的かつ高感度の RIA の系を確立したことは意義ある成果である。そして得られた PPT-BcDNA をマウス由来の内分泌細胞に導入し、プロセシングが正常に行われ、細胞外へ成熟 NKB が分泌されることを RIA により確認した。また、その際前駆体プロタヒキニン B の塩基性アミノ酸対部位での限定切断が、少なくともプロセシング酵素 PC3 で触媒されること、更にこのプロセシングは恐らく調節性分泌経路を経て進行していることを示唆している。このようにプロセシング酵素の機能に言及した翻訳後調節に関する研究は、これまでに POMC やレニン等の 2, 3 のペプチドホルモンで報告されてはいるものの、タヒキニンのような比較的 low molecular weight の神経ペプチドでの報告は本研究が初めてである。しかしながら、気道系疾患への関与が最近指摘されている PPT-A 翻訳後修飾についても、PPT-B 同様解析する必要があると思われる。さらに、本研究で得られた知見をもとに、タヒキニンなどの神経ペプチドとプロセシング酵素との局在について検討することで、将来的に神経ペプチドの生合成と分泌のメカニズムの解明が大きいと期待される。

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