

氏名(本籍)	ほ さか まさ ひろ 穂 坂 正 博 (東京都)		
学位の種類	博 士 (学 術)		
学位記番号	博 甲 第 1,347 号		
学位授与年月日	平成 7 年 3 月 23 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 学 研 究 科		
学位論文題目	Studies on structure and function of the pro-protein processing endoproteases, furin, PC 3, and PACE 4 〔タンパク質前駆体のプロセシング酵素 (furin, PC 3, PACE 4) の構造と機能に関する研究〕		
主 査	筑波大学教授	理学博士	山 根 國 男
副 査	筑波大学教授	理学博士	岡 田 益 吉
副 査	筑波大学教授	農学博士	村 上 和 雄
副 査	筑波大学助教授	医学博士	中 山 和 久

論 文 の 要 旨

本論文は、ペプチドホルモン及び前駆体タンパク質の機能発現に寄与する、プロセシング酵素の構造と機能についての研究を述べたものである。

ペプチドホルモンの多くは、内分泌細胞において分子量の大きな不活性型前駆体（プロホルモン）として合成され、分泌顆粒へ濃縮されるまでの過程で、その配列中に存在する塩基性アミノ酸対（主に Lys-Arg, Arg-Arg）部位を、特異的に認識するエンドプロテアーゼによる切断（プロセシング）を受け、成熟型のホルモンとなる。このプロセシング機構は、多くの真核生物に共通にみられるにも関わらず、プロセシング酵素の実体に関してはほとんど分かっていなかった。分子レベル、生化学的レベルで機能が解明されている唯一のプロセシング酵素は、酵母の Kex 2 プロテアーゼのみであった。データベース検索から、ヒトの *fes/fps* オンコジーンの上流に存在する機能不明の *fur* 遺伝子のコードするタンパク質 (furin) が、Kex 2 プロテアーゼの触媒領域と高い相同性を持つことが見い出され、哺乳動物のプロセシング酵素ではないかと考えられた。これを契機に、著者は、マウス及びヒトより 3 種類のプロセシング酵素 (furin, PC 3, PACE 4) の cDNA を単離し、その構造及び性質など以下のことを明らかにした。

1) マウス腎臓より furin の cDNA を単離し、その構造を解析した。更に、種々の組織及び培養細胞における furin の mRNA の発現を調べたところ、プロホルモンのプロセシング活性を持たない非内分泌細胞でもその発現が見られた。一方、内分泌細胞でありながらプロセシング活性を持たない細胞

株で furin と同時に、基質としてプロホルモン的一种であるプロレニンを発現させたところ、特異的な切断を受けなかった。このことから furin は、プロホルモンを塩基性アミノ酸対部位でプロセシングする活性を持たないと考えられた。

また、furin の cDNA クローニングの過程で furin とは、別個の furin 様 mRNA が、マウス下垂体由来 AtT-20細胞で、発現していることを見出した。そこで著者は、この furin 様タンパク質 (PC 3 と命名) の cDNA を AtT-20細胞より単離し、その構造を解析し、PC 3 がプロレニンを塩基性アミノ酸対部位で切断することを証明した。

2) ペプチドホルモンの多くは、内分泌細胞において不活性型前駆体として合成され、プロセシングを受け、成熟型のホルモンとなる。このホルモンは、分泌顆粒に貯えられ刺激に応じて分泌される (調節性分泌)。一方、ある種のウイルス被膜糖タンパク質、細胞増殖因子、血液凝固系プロテアーゼなどの前駆体は、非内分泌細胞においてもプロセシングを受け、合成後細胞内に貯えることなく分泌される (構成的分泌)。この場合、プロセシング部位に Arg-X-Lys/Arg-Arg の様な塩基性アミノ酸のクラスターが存在する。このことは構成的分泌経路における前駆体切断には、切断部位の上流 4 番目の位置 (-4 位) に Arg 残基の存在が不可欠であることを示唆しており、調節性分泌経路で Lys-Arg 以外に -4 位の Arg を認識して切断するプロテアーゼが別個のものである可能性が考えられる。ところで、furin はすべての組織及び細胞に存在し、また Kex 2 プロテアーゼと高い相同性を持つことから、furin が構成的分泌経路における前駆体タンパク質のプロセシングに関与する可能性が考えられた。また、PC 3 は、非内分泌細胞には存在せず、更にプロレニンを、PC 3 と共に、調節性分泌経路を持ちながらプロセシング活性を持たない内分泌細胞で発現させたところ、プロレニンのプロセシングが認められたことから、PC 3 は、調節性分泌経路において塩基性アミノ酸対部位 (Lys-Arg, Arg-Arg) を切断することが考えられた。その結果、細胞内で上記のような二種類のプロテアーゼが存在し、各々異なった分泌経路で活性を示すことを明らかにすることが出来た。

3) 更に、furin, PC 3 と明らかに異なっている別個のプロセシング酵素 (PACE 4) を、ヒト肝癌細胞由来の cDNA ライブラリーより単離し、構成的分泌経路において塩基性アミノ酸のクラスター Arg-X-Lys/Arg-Arg を持つ前駆体をプロセシングすること、及び基質特異性が furin に比べてより厳密であることを証明した。

審 査 の 要 旨

プロセシング酵素の実体を知ることは、複雑に制御されるペプチドホルモンや、前駆体タンパク質の合成機構を解明し、ひいては生体の恒常性維持の機構を知る上で不可欠である。本論文はその様な立場から、プロセシング酵素の構造及び機能に関して研究を行ったものである。

これまでプロセシング酵素の研究の多くが、組織及び細胞株からのタンパク質の精製であったのに対して、本研究は、遺伝子から研究を進めることにより、その実体を明確にしており、更に細胞内での分泌経路とプロセシング酵素の相関性にまで検討している。これらの意味で本研究は、これまでの

研究を進展させ、新しい局面の発展をもたらす独創的な研究と考えられる。

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。