

氏名(本籍)	はつ 初	ざわ 沢	きよ 清	たか 隆	(千葉県)
学位の種類	博	士	(農	学)	
学位記番号	博	甲	第	1075	号
学位授与年月日	平成	5	年	3	月
学位授与の要件	学位規則	第	5	条	第
審査研究科	農	学	研	究	科
学位論文題目	STUDIES ON FURIN, A MAMMALIAN HOMOLOGUE OF THE YEAST KEX2 PROCESSING ENDOPEPTIDASE (前駆体タンパク質のプロセッシング酵素Furinに関する研究)				
主査	筑波大学教授	農学博士	村	上	和
副査	筑波大学教授	理学博士	新	井	勇
副査	筑波大学助教授	農学博士	星	野	貴
副査	筑波大学教授	理学博士	山	根	國

論 文 の 要 旨

ペプチドホルモンの多くは、内分泌細胞でまず分子量の大きな前駆体として合成された後、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、他の分泌タンパクや膜タンパクには、非内分泌細胞にも存在する構成性分泌経路において塩基性アミノ酸のクラスター部分、つまりArg-X-Lys/Arg-Arg (RXK/RR) 部位で限定切断を受け成熟型になるものも多く知られている。

これまで、これらの限定切断にかかわるプロセッシング酵素の研究はほとんど進んでいなかった。分子レベル、生化学的レベルでその機能の解明されている唯一の例外は酵母のKex2プロテアーゼである。最近データベース検索により、機能不明のヒトfur遺伝子のコードするタンパクFurinがKex2プロテアーゼと高い相同性を示し、哺乳動物の前駆体タンパク質プロセッシング酵素である可能性が示唆された。そこで、本論文ではFurinのプロセッシング酵素としての機能及び性質を解明することを目的として、まず、マウスよりFurin cDNAを単離し、これを動物細胞の系を用い発見することで、Furinのプロセッシング活性を調べた。さらに、膜貫通領域を欠失し分泌型にしたFurinについて、動物細胞の系を用い大量発現し精製することにより、詳細に酵素学的性質を調べた。

I. マウスFurinのクローニングと発現

ヒトfur遺伝子配列をもとにPCR (Polymerase Chain Reaction)法により調整したDNA断片をプローブとして、マウスよりFurin cDNAを単離しその全塩基配列を決定した。cDNAから予想されるマウスFurinは、触媒領域の配列でヒトFurinと99%、Kex2プロテアーゼと53%の相同性があった。

また、ノーザンブロットングでFurin mRNAの発現を調べたところ、調べた限り全ての組織、細胞で発現していた。内分泌系の組織、細胞に限った発現パターンではないことから、Furinは調節性というよりはむしろ構成性分泌経路において機能している可能性が示唆された。これを証明するために、本来は調節性分泌経路でのみKR部位で切断されるプロレニンを改変してRXKR配列を持つ変異体を作製し、非内分泌細胞のCHO (Chinese hamster ovary) 細胞でFurinと同時に発現させたところ完全に切断された。また、野性型プロレニンの場合は、全く切断されなかった。

これらからFurinは、構成性分泌経路で前駆体タンパク質中のRXK/RR配列を特異的に認識して切断することが明らかになった。

II. Furinの分子的、酵素学的性質の解析

Furinはその触媒領域のC末端側にCys残基に富んだ領域 (CRD)、及び膜貫通領域 (TMD) を有しており、この部位でゴルジ膜に結合し触媒領域をその内側に突き出した形で存在すると考えられた。そこでこれらの領域の機能を知るために、C末端を順次欠失した改変型Furinを作製し活性に及ぼす影響について検討した。その際の基質前駆体としては、改変型プロレニン (RXKR type) を用い種々の改変型FurinとCHO細胞で発現させ、レニンへのプロセッシング活性を調べた。

その結果、CRD及びTMDを欠失したFurinには野性型Furinとほとんど変わらない活性が見られた。ところがCRDよりもさらに欠失させた場合には活性は全くなかった。つまり、Furinの活性にCRD及びTMDは必須ではないこと、一方、触媒領域のC末端側で他のKex2様プロテアーゼファミリーとの間で有意に保存された領域は不可欠であることが明らかになった。つづいて、TMD欠失型Furinの培養上清について活性の検討を行った。

まず改変型プロレニン (RXKR type) をCHO細胞にパーマメントに発現させ、その培養上清を基質として調べたところ、TMD欠失型Furinを発現した培養上清には、Ca²⁺依存性のプロセッシング活性が検出され、TMD欠失型Furinは活性型として培養上清中に分泌されていることがわかった。

つぎにTMD欠失型Furinについて、MCA合成基質を用いて検討した。TMD欠失型Furinは、塩基性アミノ酸対を有する合成基質を切断する活性は全くなかった。ところが、-4位にArgを有するBoc-Arg-Val-Arg-Arg-MCAには強い活性を示した。そこでこの合成基質を用いて酵素学的解析を行ったところ、至適pH7.0、Ca²⁺依存性のプロテアーゼであることがわかった。また種々のプロテアーゼ阻害剤に対する感受性は、Kex2プロテアーゼに酷似していた。

III. 組換え型Furinの完全精製及び性質検討

FurinはそのC末端側にTMDを有しゴルジ装置に局在していると考えられ、この状態で精製するのは非常に困難と思われたので、先の実験で、CHO細胞で発現させたその培養上清に活性が検出されたTMD欠失型Furinについて精製を行った。

はじめにCHO細胞のTMD欠失型Furin高産生株を単離した後、完全無血清培地で培養したその上清を出発材料に、硫酸分画を行い、AF-Blue Toyopearlによりバッチサイズで活性画分を分離し、この画分をDEAE-Toyopearlクロマトグラフィーで分離精製した。Furinは最終的なDEAE-Toyopearlクロマトグラフィーの段階で、2つのピーク、即ち分子量83kDaと81kDaのmixture form

及び96kDa formとして精製された。

この分子量の違いは、*N*-glycanase処理によってもその差が変わらないことから糖鎖によるものではないことがわかった。また2つのピークについてN末端アミノ酸シーケンスを行ったところ解析可能な10サイクルめまで全く同じ配列だった。このN末端の配列は、Furin cDNAから予想される前駆体中に存在するArg-X-Lys-Arg配列の直後のアスパラギン酸からはじまっており、この配列がFurinによる切断シグナルであることから、活性型Furinは、恐らく自己触媒的に産生されると考えられた。またこの結果から2つのピークに見られた分子量の違いは、N末端ではなくC末端側の長さの違いによることが示唆された。恐らく、96kDa formがTMD欠失型Furinで、83, 81 kDa formはそのC末端がさらに短くなったものと予想された。

2つのピークは同様の酵素学的性質を示し、至適pHは7.0, Ca²⁺依存性で、阻害剤に対する感受性はKex2プロテアーゼに酷似していた。つぎに活性型Furinの基質特異性を合成基質を用いて検討したところ、塩基性アミノ酸対に対する活性は全くなかったが、-4位にArgをもつRXK/RRタイプの基質に対しては高い活性を示した。また面白いことに、RXXR配列の合成基質に対しても弱いながら活性を示した。これらから、Furinによる切断の特異性には、プロセッシング部位の-1, -4位にArgが必須であること、また-2位が塩基性アミノ酸であることがその場合の効率に重要であることが明らかになった。

以上の結果より、Furinは構成分泌経路において前駆体タンパク質中の主として、RXK/RR部位を切断するプロセッシング酵素であることが証明された。

審 査 の 要 旨

前駆体タンパク質の限定切断による細胞内プロセッシングは、ペプチドホルモンや膜タンパク質などの生合成の調節、ひいてはそれらタンパク質の示す多様な生体機能の調節における非常に重要なステップと考えられる。ところが、この限定切断にかかわるプロセッシング酵素の実体はほとんど不明だった。唯一の例外として、酵母のKex2プロテアーゼについての研究は進んでいたが、近年、データベース検索によりKex2プロテアーゼの触媒領域と高い相同性を持つ機能不明のタンパクFurinの存在が明らかになった。

本研究において、世界に先駆けてFurin cDNAクローニングに成功し、発現実験により、Furinが構成性分泌経路において前駆体タンパクのRXK/RR配列を切断するプロセッシング酵素であることが明らかになった。さらに、Furinの完全精製により、詳細な酵素学的性質が明らかになった。

以上の研究成果は、構成性分泌経路における前駆体タンパク質の生合成機構解明の一助となるばかりでなく、これからの前駆体プロセッシングに関する研究の発展に非常に意味あることと思われる。

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。