

氏名(本籍)	杜 培 革 (中国)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博士第407号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	平成14年3月25日
学位論文題目	Rat tripeptidyl peptidase I: Molecular cloning, functional expression, tissue localization and enzymatic characterization (ラットトリペプチジルペプチダーゼIの分子クローニング、機能発現、組織局在および酵素学的諸性質に関する研究)

審査委員	主査 教授	堀 池 喜八郎
	副査 教授	木 村 博
	副査 教授	今 本 喜久子

## 論文内容の要旨

### 【目的】

Tripeptidyl peptidase I (TPP I) はタンパク質やペプチドのN末端に存在するAla-Ala-Phe-のアミノ酸を特異的に認識し、遊離するリソソーム局在のプロテアーゼである。この酵素は哺乳類の腎臓、肝臓、脾臓、脳、肺などに存在する。本酵素の遺伝子欠損または異常は、classical late infantile neuronal lipofusinosiを引き起こすことが知られている。しかし、その分子構造、物理化学的諸性質、生理機能などについては未だ不明な点が多い。本研究では、ラット腎臓由来TPP Iを精製し、その物理化学的諸性質や全一次構造、機能発現および組織局在などの解析を行った。

### 【方法】

ラット腎臓(約500g)を細断し、生理食塩水による洗浄後、warring blenderでホモジナイズし、次いで17,300gで遠心分離してリソソーム分画を得た。次いで、SP-Sepharose、Phenyl-Cellulofine、Resouce-S、Superdex G-75などのカラムを用いて本酵素を精製し、そのN末端のアミノ酸配列を含む諸性質を検討し、さらに本酵素による種々の生理活性ペプチドの切断についても検討した。さらに、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  dCTPでラベルしたヒトCLN<sub>2</sub>プローブでラット肝臓cDNAライブラリーよりTPP IをコードするcDNAを単離し、そのヌクレオチド構造から一次構造を推定した。ノーザンブロッティング法によるmRNAの臓器発現を解析し、さらに抗ラットTPP I抗体を用いて(ABC法)、TPP Iの組織局在も明らかにした。

### 【結果】

- 1: TPP Iはラット腎臓より回収率7.4%、精製倍率約8,000倍まで精製された。
- 2: 本酵素はSDS-PAGE上で単一バンドを示し、還元剤非存在下と存在下での分子量はそれぞれ43,000、46,000であった。TOF-MSでは46,904.32であった。Native-PAGEおよびゲル濾過法における分子量が280,000、ゲル濾過法での分子量が290,000であった。
- 3: 本酵素のN末端のアミノ酸配列51残基を決定した。
- 4: 本酵素はAla-Ala-Phe-MCAのみ基質特異性を示した。そのKm、Vmax、kcatとkcat/Kmはそれぞれ680 μM、3.7 μmoles/mg/min、33.1 s<sup>-1</sup>と4.87×10<sup>4</sup> s<sup>-1</sup>・M<sup>-1</sup>であった。
- 5: 本酵素の最適pHは4.0であり、pH 2-7の範囲で安定であった。温度安定性では50℃、30分間の加熱に耐えた。
- 6: 本酵素はPCMBsとHgCl<sub>2</sub>によって強く阻害され、DFPには軽度阻害された。
- 7: 14種類の生理活性ペプチドのうち、angiotensins (I~III)、neuromedin B、neurotensinおよびβ-neo-endorphinはTPP Iによって分解された。特に、angiotensin IIIは15分間で、95%が切断された。

8 : cDNAは2,485bpよりなり、本酵素のN末端のアミノ酸配列を含む563残基のpre-TPP Iの全一次配列を決定した。ラットのアミノ酸配列はヒトとマウスのTPP Iに対して、それぞれ87.57%と94.01%の相同性を示した。

9 : Northern blot analysisでは、腎臓に最もmRNAの発現が多く、次いで肝臓>心臓>脳>肺>脾臓>筋肉、精巣の順であった。

10 : 免疫組織染色では、腎臓の遠位尿細管細胞および集合管、肝臓の肝細胞、脾臓の赤脾髄細胞などにTPP Iが強く染色された。

#### 【考 察】

ラット腎臓のリソソーム分画由来TPP Iを単一標品にまで精製した。精製酵素の分子量はTOF-MS、電気泳動法とゲル濾過法などの結果から、本酵素は6個の同一サブユニットから構成されていることが判明した。本酵素の物理化学的諸性質はウシやヒトなどで報告されている性質と類似していた。TPP IはPCMBsとHgCl<sub>2</sub>によって強く阻害され、DFPには軽度で阻害されることから、本酵素がSH試薬により活性が制御される。serine-typeのpeptidaseであることが示唆された。本酵素の活性中心と考えられるserine近傍のアミノ酸配列はGTSATであり、serine peptidaseのコンセンサス配列(G-X-S-X-G)として報告されているものとは1残基異なっていた。この1残基の違いがDFPによる軽度阻害の原因と考えられた。ラットのpre-TPP I活性中心付近のアミノ酸配列はヒトやマウスのそれと一致していた。また、ラットTPP IはAla-Ala-Phe-MCAより速やくangiotensin IIIからArg-Val-Tyrを遊離し、Ala-Ala-Phe-MCAと同様の速さでneuromedin BよりGly-Asn-Leuのtripeptideを遊離した。この結果からangiotensin IIIとneuromedin BがTPP Iのよい基質であること、およびTPP Iの新たな基質特異性(認識配列)が明らかとなった。TPP I mRNAは腎臓、肝臓や心臓などで強く発現しており、免疫組織化学的染色による組織局在の結果とはほぼ一致していた。

#### 【結 論】

ラットTPP Iを腎臓より単一標品まで精製し、部分アミノ酸配列を明らかにすると共に、TPP IのcDNA構造やmRNAの発現も明らかにすることができた。また、angiotensin IIIおよびneuromedin BがTPP Iの基質になることも新たに見いだした。

## 論文審査の結果の要旨

Tripeptidyl Peptidase (TPP I)は、ペプチドのN末端のAla-Ala-Pheを認識・遊離するリソソーム局在のペプチダーゼである。Classical Late Infantile Neuronal Lipofuscinosis (CLN2)はこの酵素の欠損や異常による。

本研究は、ラット腎臓のTPP Iを初めて単一標品にまで精製し、酵素化学的性質、一次構造、酵素遺伝子の塩基配列、機能発現、組織局在を検討したものである。重要な結果として次のことが挙げられる。1) TPP Iはセリンペプチダーゼであるが、そのコンセンサス配列は従来のものとは1残基異なる。2) アンギオテンシンIIIやニューロメジンBのような生理活性ペプチドが良い基質となる。すなわち新たな基質特異性(認識配列Arg-Val-TyrとGly-Asn-Leu)を見いだした。3) mRNA発現や免疫組織化学的解析から、腎臓・肝臓・心臓で強く発現している。

これらの成果はペプチダーゼの制御機構や生理活性ペプチドの分解機構の解明に寄与するところ大であり、本論文は博士(医学)の学位論文に値する。

なお、本学位授与申請者は、平成14年2月19日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められた。