

氏名(本籍)	山根拓也(京都府)		
学位の種類	博士(医学)		
学位授与の要件	博士第417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	Legumain from bovine kidney:its purification, molecular cloning, immunohistochemical localization and degradation of annexin II and vitamin D-binding protein (ウシ腎臓からのlegumainの精製とその一次構造の決定、免疫組織化学的局在およびannexin IIとvitamin D-binding proteinの分解)		
	審査委員	主査 教授	堀池喜八郎
		副査 教授	服部隆則
		副査 教授	岡田裕作

論文内容の要旨

【目的】

LegumainはAsn残基と次のアミノ酸残基の間のペプチド結合を特異的に切断するシステインペプチダーゼである。近年、哺乳類における存在が確認されたが、この酵素が持つ機能の解明は始まったばかりである。本研究では本酵素のウシ腎臓からの精製、その生化学的諸性質、全一次構造の決定、免疫組織化学的局在、さらに本酵素がどのようなタンパク質を分解するかなどについて検討した。

【方法】

ウシ腎臓をホモジナイズし、その12,000×g遠心上清をSP-Sepharose、Phenyl Cellulofine、Heparin Sepharose、Superdex 75を用いて精製した。精製酵素の分子量はSDS-PAGEにより測定した。精製酵素を用いて基質特異性、至適pH、pH安定性、至適温度、温度安定性、各種ペプチダーゼインヒビターや二価金属による酵素活性の阻害などについて調べた。また、プロテインシーケンサーを用いて精製酵素のN末端および内部アミノ酸配列を決定した。さらに、ウシ腎臓cDNA libraryをラットlegumain cDNAを用いてスクリーニングし、得られたウシlegumain cDNAの塩基配列からその全一次構造を決定した。家兎を用いて精製酵素に対する抗体を調製し、ウェスタンブロットィングとラット各臓器における免疫組織染色を行った。Annexin IIのN末端のペプチドを固相法にて合成し、legumainで15-120min、37°Cで処理した後、ペプチドが切断されるか否かをHPLCを用いて分析した。精製annexin IIを用いて抗体を調製し、E-64またはNEMの存在下でウシ腎臓12,000×g遠心上清において、annexin IIの切断が起こるか否かについても検討した。さらに、腎臓の近位尿管上皮細胞においてvitamin D-binding protein (DBP) がlegumainにより分解されるかを明らかにするために、DBPを37°Cで15-60min、legumainで処理し、SDS-PAGEを用いて分析を行い、切断されたフラグメントの切断部位をプロテインシーケンサーを用いて同定した。

【結果】

(1) ウシ腎臓より、legumainは回収率：18.8%、精製倍率：1,045倍に精製された。(2) 本酵素はSDS-PAGE上単一バンドを示し、還元剤存在下での分子量は34,000であった。(3) 本酵素はZ-Ala-Ala-Asn-MCAにのみ基質特異性を示した。(4) 本酵素の至適pHは5.0であり、pH3.5-6.0の範囲で安定であった。温度安定性では45°Cで30分間の加熱に耐えた。(5) 本酵素はPCMBsやNEMによって強く阻害され、さらにHg²⁺やCu²⁺によっても強く阻害されたがE-64には阻害されなかった。(6) 得られたウシlegumain cDNAは1,934bpで、推定されたpre-legumainのアミノ酸残基数は433アミノ酸残基であった。また、ウシlegumainはアミノ酸レベルでヒトとは82.9%、

ラットとは80.9%、マウスとは81.1%相同であった。(7) 免疫組織染色の結果、legumainは腎臓では近位尿細管、肝臓では肝細胞、精巣ではライディッヒ細胞、精巣上体では不動毛に局在していた。(8) 近位尿細管においてmegalinのリガンドとして知られるDBPはlegumainによって15minで分解され、SDS-PAGEにおいて二つのバンドが検出された。その切断部位は両バンドともAsn残基であった。(9) Legumainの精製過程においてHeparin Sepharose columnのステップでannexin IIがco-purifiedされることが確認されたが、そのN末端アミノ酸配列はAsn残基の直後から始まっていた。また、合成ペプチドもlegumainにより分解された。(10) ウェスタンブロッティングの結果、E-64存在下ではannexin IIの切断が起こったが、NEM存在下では起こらなかった。

【考 察】

精製されたウシlegumainは分子量34,000でZ-Ala-Ala-Asn-MCAのみに基質特異性を示し、NEMには阻害されるが、E-64には阻害を受けないことが明らかとなった。また、ウシlegumain cDNAから推定されたアミノ酸配列と精製酵素のN末端、内部アミノ酸配列とから、ウシlegumainの全一次構造を決定した。Pre-legumainは433アミノ酸残基からなり、その配列中に5つのN-糖鎖結合部位が存在していることが明らかとなった。また、マウスlegumainにおいて同定された活性中心とその近傍のアミノ酸配列は同じであった。ヒト、マウス、ラットとの一次配列上の相同性は80%程度あり、7つのCys残基はよく保存されていた。Legumainの精製過程においてco-purifiedされたannexin IIはそのN末端アミノ酸配列がAsn残基の直後から始まっており、legumainによって切断されている可能性が考えられ、またannexin IIのN末端側ペプチドはlegumainによってAsn残基の後で切断された。抗annexin II抗体を用いたウェスタンブロッティングにおいては、NEM存在下でのみannexin IIは切断されなかった。これらの結果はannexin IIのN末端がlegumainにより分解されている可能性を強く示唆した。annexin IIのN末端はp11結合領域やリン酸化部位を有しており、さらにエンドソームの豊富な構成物質であることから、annexin IIがエンドソーム或いはリソソームにおいてlegumainにより不活化される可能性が推定された。Legumainが腎臓において近位尿細管に局在していることが免疫組織染色により明らかとなり、またDBPがlegumainにより分解された結果から、近位尿細管上皮細胞でmegalinと結合したDBPはエンドサイトーシスされた後、リソソームにおいてlegumainにより分解を受けている可能性が推定された。

【結 論】

ウシlegumainをウシ腎臓から精製し、その物理化学的諸性質を明らかにすると共に、cDNA構造も決定した。また、Legumainがannexin IIやDBPを分解することを明らかにした。

論文審査の結果の要旨

LegumainはAsn-X結合を特異的に切断するシステインペプチダーゼである。近年哺乳類でその存在が確認されたが、生理的役割は不明である。

本研究では、この酵素をウシ腎臓から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、組織分布について検討した。

その結果、1) cDNAから推定されるpre-legumainは433アミノ酸残基からなり、ウシ・ヒト・ラット・マウス間での相同性は80%以上であること、2) 免疫組織化学的に、近位尿細管細胞・肝細胞・ライディッヒ細胞・精巣上体管不動毛に局在していること、3) 近位尿細管細胞のmegalinのリガンドであるビタミンD結合タンパク質を分解すること、4) annexin IIも分解すること、などを示した。

これらの成果は、エンドソームやリソソームでのポリペプチドの不活性化機構やエンドサイトーシスの機構の解明に大きく寄与し、よって、本論文は博士(医学)の学位論文に値する。なお、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。