

氏 名・(本籍)	山 本 好 男 (岡山県)
学 位 の 種 類	博士 (医学)
学 位 記 番 号	博士 (論) 第232号
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位授与年月日	平成10年6月30日
学位論文題目	Isolation and characterization of an alanyl aminopeptidase from rat liver cytosol as a puromycin-sensitive enkephalin-degrading aminopeptidase (ピューロマイシン感受性エンケファリン不活化アミノペプチダーゼとしてのラット肝臓細胞質アラニルアミノペプチダーゼの単離と諸性質の検討)
審査委員	主査 教授 堀 池 喜八郎 副査 教授 大久保 岩 男 副査 教授 西 克 治

## 論文内容の要旨

### 【目 的】

アラニルアミノペプチダーゼ (AAP) は、種々の哺乳類の肝臓、腎臓、肺、胎盤等に存在するタンパク質分解酵素の一つで、enkephalinやMet-Lys-bradykinin等の生理活性物質のN末端のAlaやMet等のアミノ酸を一残基遊離することによって、これらの生理活性物質を不活性化することが知られている。また、このAAPには細胞質に存在するものと細胞膜に存在する二種類の酵素が知られている。本論文では、細胞質に存在するAAPをラットの肝臓より精製し、得られた単一標品 (AAP-S) のN末端のアミノ酸配列やpuromycinに対する感受性などを含む物理化学的諸性質ならびに免疫組織化学的性質を明らかにすることを目的とした。

### 【材料および方法】

ラット肝臓をホモジナイズし、105,000 gにて遠心し、上清を得た。次いで、硫酸分画 (40-70% 飽和)、Q-Sepharose、Red A、Sephacryl S-200、Hydroxyapatite等のカラムを用いて単離精製した。精製酵素の基質特異性、Km、Vmax、至適pH、pH安定性、温度安定性、N末端のアミノ酸配列やpuromycinに対する感受性などの物理化学的性質を検討した。さらに、作成した抗体を用いて免疫組織学的検討を行った。

### 【結 果】

- (1) AAP-Sを倍率約2,500倍、回収率9.8%にまで精製した。分子量はゲル濾過法で100,000、還元剤存在下でのSDS-PAGEにて90,000であった。
- (2) 基質特異性において、Ala-、Tyr-とMet-MCAは同程度に、次いでLys-、Leu-、Phe-MCAの順に加水分解した。AAP-Sの至適pHは7.5であり、Ala-MCAとMet-MCAに対するKmとVmaxは、それぞれ235、115  $\mu$ Mおよび10.0、10.9  $\mu$ moles/mg/minであった。また、AAP-Sは広い範囲のpH (pH4.0-9.0) に対して安定であった。さらに、耐熱性に関して50℃まで安定であった。
- (3) AAP-Sは $\beta$ -MEによって約2倍活性化される一方、1,10-phenanthroline、amastatin、actinonin、bestatin、leuhistin、PCMBs、 $Zn^{2+}$ 、 $Cd^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$ 、 $Hg^{2+}$ などによって強くその活性が阻害された。またAEBSF、 $\alpha$ -PMSF、PMSFなどによっても中等度に活性が阻害された。さらにpuromycin 1  $\mu$ Mで活性が半減し、10  $\mu$ M以上の濃度では強く阻害された。
- (4) N末端の43残基のアミノ酸配列が明らかになった。
- (5) 免疫組織染色では、肝細胞細胞質が強く染色され、その他腎尿細管上皮細胞、心筋細胞、肺胞上皮、腸管の上皮、胎盤などもよく染色された。

### 【考 察】

本AAP-Sはnativeな状態で単量体であると考えられた。また基質特異性およびインヒビター、二価金属イオンの存在下における活性から、metalloenzymeの性質を有するアミノペプチダーゼであ

ることが明らかになった。さらにN末端のアミノ酸配列とpuromycinに対する感受性などから、本AAP-Sがpuromycin-sensitive aminopeptidaseとして知られている酵素と同一酵素であることが初めて明らかとなった。また、免疫組織化学染色における局在の検討から、本酵素は広く組織に存在することが初めて明らかとなった。

#### 【結 論】

本AAP-Sはピューロマイシン感受性エンケファリン不活化アミノペプチダーゼであった。

### 論文審査の結果の要旨

タンパク質分解酵素の一つであるアラニルアミノペプチダーゼには、細胞質に存在するものと細胞膜に存在するものの二種類の酵素が存在する。本研究は、細胞質に存在するアラニルアミノペプチダーゼをラット肝臓より単一標品にまで精製し、その酵素標品の物理化学的・酵素学的・タンパク質化学的諸性質を詳細に検討したものである。さらに、作成した抗体を用いて免疫組織化学的に酵素の局在も検討している。その結果、本酵素が、1) ピューロマイシン感受性エンケファリン不活化アミノペプチダーゼであること、2) 金属酵素の性質を有すること、3) 哺乳類の組織に広く分布することを初めて明らかにした。これらの成果は、生理活性をもつペプチドの不活化機構の解明に寄与するところ大である。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成10年5月22日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。