

肝ミクロソーム膜結合プロテアーゼの  
精製と性状

平成6年3月 博士(理学)申請

東京大学大学院理学系研究科  
生物化学専攻

玉野上 佳明

①

学 位 論 文

<<Purification and characterization of  
proteinases from the microsomal membranes of  
liver>>

(肝ミクロソーム膜結合プロテアーゼの精製と性  
状)

平成6年3月博士(理学)申請

東京大学大学院理学系研究科  
生物化学専攻

<玉野上 佳明>

指導教官 高橋 健治

## 目次

略語表	1
1. 序論	
1.1. 細胞内プロテアーゼ	2
1.2. プロセシング	2
1.3. 膜結合プロテアーゼ	5
1.4. ミクロソーム膜結合セリンプロテアーゼ	6
1.5. ミクロソーム膜結合金属依存性プロテアーゼ	6
2. 材料と試薬	7
3. 方法	
3.1. ミクローム画分の調製	8
3.2. ミクロソーム膜の処理	8
3.3. 中性プロテアーゼ活性の測定法	9
3.4. メチルクマリルアミド基質によるペプチダーゼ活性の測定	9
3.5. ペプチド基質に対する加水分解	10
3.6. タンパク質の定量	10
3.7. SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動	10
3.8. 高速液体クロマトグラフィー	10
3.9. [ <sup>3</sup> H]-DFPラベル	10
3.10. 活性のpH依存性	11
3.11. 速度論的パラメーターの決定	11
3.12. ミクロソーム膜の可溶化	11
3.13. カラムクロマトグラフィー	11
3.13.1. 最初の共通なカラムクロマトグラフィー	11
3.13.1.1. ヒドロキシルアパタイトカラム	11
3.13.1.2. DE52セルロースカラム	12
3.13.2. セリンプロテアーゼ (MSP) の精製	12
3.13.2.1. ベンズアミジンセファロース6Bカラム	12

3.13.2.2.	ポリアクリルアミド電気泳動	12
3.13.3.	金属依存性プロテアーゼの精製	13
3.13.3.1.	キレーティングセファロース6B	13
3.13.3.2.	セファクリルS-200	13
3.13.3.3.	FPLC MonoQ	13
3.14.	N末端アミノ酸配列の決定	13
3.15.	メタロプロテアーゼ活性と金属依存性セリンプロテアーゼ活性 の同一分子性の検定	13
3.15.1.	FPLC Superose 12	14
3.15.2.	ポリアクリルアミドゲル電気泳動	14
3.16.	活性化	14
3.16.1.	プロテアーゼ阻害剤の効果	14
3.16.2.	活性化と分子量	14
3.16.3.	活性化とDE52	15
3.17.	ブタの肝臓のミクロソーム膜のセリンプロテアーゼの精製	15
3.18.	細胞内局在と活性化	15
4.	肝ミクロソーム膜セリンプロテアーゼ (MSP)	
4.1.	結果	17
4.1.1.	ラットの肝臓のミクロソーム膜のセリンプロテアーゼの精製	17
4.1.2.	分子量	17
4.1.3.	pH依存性	17
4.1.4.	各種の試薬の効果	18
4.1.5.	各種のMCA基質に対する基質特異性	18
4.1.6.	ヒドロキシアパタイトカラムクロマトグラフィーによる活性化	18
4.1.7.	ペプチドの切断	19
4.1.8.	タンパク質の加水分解	19
4.1.9.	ブタの肝臓のミクロソーム膜のセリンプロテアーゼ	19
4.2.	考察	21
4.2.1.	MSPの精製	21

4.2.2. MSPのアイソフォーム	21
4.2.3. MSPの活性化	21
4.2.4. MSPに対する阻害剤の効果	22
4.2.5. MSPの基質特異性	22
4.2.6. MSPの新規性	23
4.2.7. MSPの生理的役割	23
4.2.8. PMSPとMSPとの比較	24
5. 肝ミクロソーム膜結合金属依存性プロテアーゼ	
5.1. 結果	25
5.1.1. ラットの肝臓のミクロソーム膜の金属依存性プロテアーゼの精製	25
5.1.2. 金属依存性プロテアーゼのpH依存性	25
5.1.3. 金属依存性プロテアーゼに対する阻害剤類の効果	26
5.1.4. メタロプロテアーゼに対する $\text{Co}^{2+}$ イオンの効果	26
5.1.5. メタロプロテアーゼに対するEDTAの効果	26
5.1.6. ラット肝臓ミクロソーム膜のメタロプロテアーゼ活性と金属依存性セリンプロテアーゼ活性のMCA基質特異性	26
5.1.7. ラット肝臓ミクロソーム膜のメタロプロテアーゼ活性と金属依存性セリンプロテアーゼ活性のペプチド性基質に対する特異性	27
5.1.8. メタロプロテアーゼ活性のタンパク質性基質に対する作用	27
5.1.9. メタロプロテアーゼ活性と金属依存性セリンプロテアーゼ活性の同一分子性の検定	27
5.1.10. 熱安定性	27
5.1.11. 細胞内局在と活性化	28
5.2. 考察	
5.2.1. 金属依存性プロテアーゼの精製	29
5.2.2. 金属依存性プロテアーゼのpH依存性	29
5.2.3. 金属依存性プロテアーゼに対する阻害剤類の効果	29
5.2.4. 金属依存性プロテアーゼの基質特異性	30
5.2.5. メタロプロテアーゼ活性と金属依存性セリンプロテアーゼ活性の	

同一分子性	30
5.2.6. 金属依存性プロテアーゼの新規性	31
5.2.7. 金属依存性プロテアーゼの細胞内局在	31
5.2.8. 金属依存性プロテアーゼの活性化	31
5.2.9. 金属依存性プロテアーゼと金属イオン	31
6. 総合考察	
6.1. 生理的役割	33
6.2. ミクロソーム膜プロテアーゼ類の活性化	34
6.3. 本研究の意義	36
7. 結論	38
参考文献	39
表	56
図	66
謝辞	104

## 略語表

APMSF	4-(amidinophenyl)methanesulphonyl fluoride
BAM-12P	bovine adrenal medulla dodecapeptide
Boc-	<i>t</i> -butoxycarbonyl
BPTI	bovine pancreas trypsin inhibitor
BSA	bovine serum albumin
CA	carbonic anhydrase
CYT-C	cytochrome c
DFP	diisopropyl fluorophosphate
DMSO	dimethyl sulfoxide
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
GLB	$\gamma$ -globulin
MCA	4-methyl-7-coumarylamide
MSP	microsomal serine proteinase
OVA	ovalbumin
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
pAPMA	<i>p</i> -aminophenylmercuric acetate
pCMB	<i>p</i> -chloromercuribenzoic acid
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride
PMSP	porcine microsomal serine proteinase
POMC	proopiomelanocortin
SBTI	soybean trypsin inhibitor
SDS	sodium dodecyl sulfate
TLCK	<i>N</i> <sup>ε</sup> -tosyl-L-lysine chloromethyl ketone
TPCK	<i>N</i> <sup>ε</sup> -tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone
TCR	T cell antigen receptor

## 1. 序論

### 1.1. 細胞内プロテアーゼ

細胞内には常にタンパク質のターンオーバーが起こっており、このときタンパク質の分解を行うのがプロテアーゼである。細胞内プロテアーゼには大きく分けて細胞質に存在するプロテアーゼと細胞内小器官に存在するプロテアーゼとがあり、それぞれ役割を異にしている。細胞質に存在するプロテアーゼで代表的なものは、多機能プロテアーゼ（高分子量プロテアーゼ、プロテアソーム）がある (Rivett 1989a; Rivett 1989b)。この酵素は真核生物に普遍的に存在しており、非リソソーム系路における種々のタンパク質の分解を行っている。一方、細胞内小器官に存在するプロテアーゼの代表的なものは、リソソームに存在するカテプシン群があり、非限定的分解に関与している (Bond and Butler 1987)。細胞内小器官に存在するプロテアーゼの中にはさらに、分泌経路における前駆体タンパク質のプロセッシングを行う酵素がある (Barr 1991; Fisher and Scheller 1988)。これらの酵素は生合成されたばかりの前駆体タンパク質のプロセッシングに関与している (Harris 1989)。これらのプロセッシングプロテアーゼは、分泌性タンパク質の分泌経路である小胞体、ゴルジ体、分泌小胞などに存在している。前駆体タンパク質の多くは、その塩基性アミノ酸対の部位でプロセッシングを受ける。また、プロセッシングプロテアーゼは塩基性アミノ酸対に特異性を有している。このプロセッシングによって切断されるプロ配列は、フォールディングを行っていないタンパク質が小胞体内でフォールディングを行うのを促進する役割がある。例えばバクテリアのサチライシンの場合、プロペプチドが活性のあるプロテアーゼを産生するのに必要である (Ikemura and Inouye 1988; Ikemura, Takagi *et al.* 1987)。また、Zhuらは、フォールディングしていないサチライシンのリフォールディングにプロペプチドが必要なことを *in vitro* で示した (Zhu, Ohta *et al.* 1989)。逆にまた、プロ配列がGlaドメインのフォールディングを抑制することによって、タンパク質の膜との早尚な結合を抑えることも知られている (Bristol, Furie *et al.* 1993)。このような分泌性タンパク質の前駆体のプロセッシングを行うプロテアーゼの中でKex2とそのホモログに関する研究はかなり進展している。しかし、タンパク質の分泌経路にはさらに何種類ものプロセッシングプロテアーゼの存在が示唆されてきており、これらの酵素の分子的な解明は依然としてなされていない。

### 1.2. プロセッシング

塩基性アミノ酸対でのプロセッシングは、多くのホルモン、神経ペプチド、他の生理活性ペプチドやタンパク質の成熟において重要な役割を果たしている (Harris 1989; Herbert and Uhler 1982; Loh, Brownstein *et al.* 1984)。オピオイドペプチド前駆体 (ACTH/ $\beta$ -LPH前駆体、プレプロエンケファリンA、プレプロエンケファリンB (Hinman and Herbert 1980; Rosa, Policastro *et al.*



1980)やサブスタンスP前駆体、VIP前駆体(Itoh, Obata *et al.* 1983)には、いくつもの塩基性アミノ酸対があり、それぞれの部位でプロセシングが起り、1つの前駆体から活性ペプチドが生じる。また、ACTH/ $\beta$ -LPH前駆体などは、同じ前駆体でも組織によって異なるプロセシングを受ける。しかし、このようなプロセシングの違いが、組織によって異なるプロセシング酵素があるためなのか、あるいは共通のプロセシング酵素が組織によって異なる調節を受けているためなのかは不明であった。塩基性アミノ酸対は神経ペプチドのほかに、プロインシュリン(Steiner, Cunningham *et al.* 1967)のようなペプチドホルモン前駆体、酵母の $\alpha$ 接合因子前駆体(Julius, Blair *et al.* 1983; Julius, Schekman *et al.* 1984; Kurjan and Hershkowitz 1982)、キラートキシン前駆体(Bostian, Elliot *et al.* 1984; Skipper, Thomas *et al.* 1984)、アメフラシの産卵ホルモン前駆体(Scheller, Jackson *et al.* 1983)などのプロセシングサイトにも見られ、真核生物における生理活性ペプチド前駆体のプロセシングシグナルとして広く共通に保存されている。また、レニン(Imai, Miyazaki *et al.* 1983)、凝固系プロテアーゼ(プロスロンビン、プロテインCなど)(Pan and Price 1985)、アルブミン(Geller, Judah *et al.* 1972)、神経成長因子(Berger and Shooter 1977)などの分泌性タンパク質や、インシュリンレセプター(Ullrich, Bell *et al.* 1985)のような膜結合性タンパク質の前駆体のプロセシング部位にも、塩基性アミノ酸対が存在している。また、これとは別に、塩基性アミノ酸対以外の部位での前駆体のプロセシングの例もいくつか見つかってきた(Schwartz 1986)。

ミクロソームにあるプロセシングプロテアーゼの1つとして、酵母菌よりKex2が同定された(Julius, Brake *et al.* 1984)。この酵素は、 $Ca^{2+}$ 依存性の膜結合性セリンプロテアーゼであり、サチライシン様触媒部位、Pドメイン、Ser/Thrドメイン、膜貫通ドメイン、細胞質ドメインからなっている。Kex2をホルモンの前駆体とともに細胞で発現させると前駆体をプロセシングした(Foster, Holly *et al.* 1991; Fuller, Brake *et al.* 1989; Mizuno, Nakamura *et al.* 1988; Mizuno, Nakamura *et al.* 1987; Thomas, Thorne *et al.* 1988)。このKex2は塩基性アミノ酸対に特異性が高くこれらの前駆体を正しい部位で切断した。

また、Kex2とホモロジーのあるタンパク質PC2、PC1/PC3がヒトインシュリノーマよりクローニングされ、これらの酵素もサチライシン様触媒部位とPドメインをもっていたが、膜貫通ドメインと細胞質ドメインは持っていなかった(Korner, Chun *et al.* 1991; Nakayama, Hosaka *et al.* 1991; Shennan, Seal *et al.* 1991; Shennan, Smeekens *et al.* 1991; Smeekens, Avruch *et al.* 1991; Smeekens and Steiner 1990)。しかし、PC2とPC1/PC3はミクロソーム膜画分に回収されることから、これらは何らかの相互作用によってミクロソーム膜の内側に結合していると考えられている。プロインシュリン等に対する作用の違いから、PC2とPC1/PC3は生理的な条件下では基質特異性が異なっていることが示された(Smeekens, Montag *et al.* 1992; Thomas, Leduc *et al.* 1991; Wulff, Johansen *et al.* 1993; Zhou and Lindberg 1993)。プロインシュリンには2つのプロセシング部

位があり、それぞれB鎖/C鎖junction (Arg<sup>31</sup>-Arg<sup>35</sup>)とC鎖/A鎖junction (Lys<sup>64</sup>-Arg<sup>65</sup>)と呼ばれている(Steiner, Cunningham *et al.* 1967)。これまでにそれぞれの部位を切断する活性を持つプロテアーゼの性質が調べられてきており、至適pHの異なる2種類のプロテアーゼが見出されている(Davidson, Rhodes *et al.* 1988)。B鎖/C鎖junctionを切断する活性は1型プロインシュリンプロテアーゼ、C鎖/A鎖junctionを切断するプロテアーゼは2型プロインシュリンプロテアーゼと呼ばれている。ラットのプロインシュリンをCOS-7細胞にヒトのPC2やマウスのPC1/3とコインフェクトすると、PC2は2型プロインシュリンプロテアーゼと同様の活性を示し、PC1/3は1型プロインシュリンプロテアーゼと似た性質を示した(Smeekens, Montag *et al.* 1992)。これら2つのプロインシュリンプロテアーゼは切断部位だけでなく、ペプチド全体の構造をも認識しているようである(Docherty, Rhodes *et al.* 1989; Gross, Villa-Komaroff *et al.* 1989; Weiss, Frank *et al.* 1990)。したがって、PC2とPC1/PC3はそれぞれ基質の異なる構造を認識して特異的に切断していると考えられる。PC2とPC1/PC3はまた内分泌性細胞において発現しているが、脳下垂体内では前葉においてはPC1/PC3のみが多く、中葉においてはPC1/PC3とPC2の両方が発現しており、このような局在の差異がPOMCのプロセッシングパターンに影響を与えているようである(Bloomquist, Eipper *et al.* 1991; Kirchmair, Gee *et al.* 1992; Marcinkiewicz, Day *et al.* 1993)。

さらに、ヒトのガン遺伝子FES/FPSの上流にコードされていたFUR遺伝子の転写産物furinもKex2とホモロジーがあり、培養細胞で発現させると塩基性アミノ酸対の部位で前駆体を切断した(Hatsuzawa, Hosaka *et al.* 1990; Misumi, Sohda *et al.* 1990; Roebroek, Schalken *et al.* 1986; van den Ouweland, van Duijnhoven *et al.* 1990)。furinにはサチライシン様触媒部位、Pドメイン、Cysドメイン、膜貫通ドメインおよび細胞質ドメインがある。furinはPC1/PC3、PC2とは異なり、塩基性アミノ酸対以外にもArg-X-X-ArgのCOOH末端側も加水分解することができる(Hosaka, Nagahama *et al.* 1991; Watanabe, Murakami *et al.* 1993; Watanabe, Nakagawa *et al.* 1992)。PC類は神経内分泌細胞にしか発現していないがfurinは脾臓をのぞくほとんど全ての組織で発現している(Hatsuzawa, Hosaka *et al.* 1990)。これまでに培養細胞における前駆体のコトランスフェクションによってfurinにより正しく切断されることが確かめられたタンパク質には、von Willebrand因子(Wise, Barr *et al.* 1990)、β-NGF(Bresnahan, Leduc *et al.* 1990)、血清アルブミンと補体C3(Misumi, Oda *et al.* 1991)、インフルエンザウイルスのヘマグルチニン(Steineke-Grober, Vey *et al.* 1992)、血液凝固因子IX(Wasley, Rehmtulla *et al.* 1993)、HGF/SFレセプター(Komada, Hatsuzawa *et al.* 1993)、インシュリンレセプター(Robertson, Moehring *et al.* 1993)などがある。furinも前駆体として合成されプロペプチドがフォールディングを誘導した後に(Rehmtulla, Dorner *et al.* 1992)自己触媒的にプロセッシングを行って初めて活性が現れる(Leduc, Molloy *et al.* 1992)。

また、ミトコンドリアのマトリックスからもCa<sup>2+</sup>依存性のプロセッシング酵素が単離されており、細胞質で合成されてミトコンドリアに輸送された前駆体タンパク質のリーダー配列を切断

することが知られている(Hawlicscek, Schneider *et al.* 1988 ; Schneider, Behrens *et al.* 1991; Yang, Jensen *et al.* 1988)。

哺乳類においては以上に述べたPC類と furin がゴルジ体において、少なくとも分泌性タンパク質やレセプターなどの前駆体のプロセッシングを行っていると考えられている。しかし、全ての前駆体のプロセッシングをこれらの酵素だけで賅っているとは考えにくく、プロセッシングを行う全く異なるクラスのプロテアーゼが存在している可能性も否定できないであろうと私は考えた。事実、KawabataらがビタミンK依存性血漿タンパク質の前駆体をプロセッシングする酵素を1992年に新たに見出しクローニングを行った(Kawabata and Davie 1992; Kawabata, Nakagawa *et al.* 1993)。この酵素も塩基性アミノ酸対に高い特異性を示し、血漿タンパク質の前駆体のプロ配列と同じ配列を持つ合成ペプチドを正しく加水分解した。この酵素の基質特異性は厳密にはArg-X-X-Argに対して高く、これは furin の基質特異性と似ている。しかし、このプロテアーゼは上記の furin と同様な機能を持っていながら、furin の属するセリンプロテアーゼではなくメタロプロテアーゼであった。このメタロプロテアーゼの生理的機能については、まだ *in vivo* で証明されたわけではないが、その性状から考えて前駆体タンパク質のプロセッシングを行っていると思われる。

このように、前駆体タンパク質のプロセッシングを行う酵素には依然として未知なものが数多く存在しており、組織や発生過程において複雑な調節を受けて生体のホメオスタシス等に寄与している可能性があり、そのような機能を持つプロテアーゼを新たに見出し精製して性状を検討することは重要であると私は考えた。

### 1.3. 膜結合プロテアーゼ

本研究には、上に述べたような意義のほか以下に述べるような意義がある。

これまでに精製され性状が調べられてきているプロテアーゼのほとんどは可溶性のプロテアーゼである。これに対して膜結合プロテアーゼに関する研究は非常に遅れている。というのも、膜結合プロテアーゼはその存在量が少ない上に、膜からの可溶化に用いる界面活性剤がなくなると酵素が会合して活性を失うために、各種のカラムクロマトグラフィーを行う際に界面活性剤を共存させなければならず、これがクロマトグラフィーでのタンパク質の分離を著しく悪化させるからである。したがって多くの膜結合プロテアーゼは部分精製しかなされておらず、その詳細な性状や一次構造については不明なままである(Beynon, Shannon *et al.* 1981; LaBombardi, Shaw *et al.* 1983)。このような困難にも関わらずこれまでに完全な一次構造が明らかにされたプロテアーゼには(1) シグナルペプチダーゼ類(Boehni, Deshaies *et al.* 1988; Dalbey and von Heijne 1992; Shelness and Blobel 1990; Shelness, Kanwar *et al.* 1988; Van Dijk, De Jong *et al.* 1992; Wolfe, Wickner *et al.* 1983; Zhao and Wu 1992)、(2) Kex2類、(3) 細胞膜結合プロテアーゼ類(DPP IV

(Ogata, Misumi *et al.* 1989)、NEP (Devault, Lazure *et al.* 1987)、ヘプシン (Leytus, Loeb *et al.* 1988; Tsuji, Torres-Rosado *et al.* 1991) etc.) がある。これらのプロテアーゼは変異株が見つかったり、発現量が多かったり、偶然ほかの遺伝子の近傍にコードされていて配列が見つかったりしたものである。したがって、これらのプロテアーゼの配列は明確になってはいるが、これらの膜結合プロテアーゼがどのような構造をとって膜に埋め込まれていて、酵素がどのように機能しているかはいまだに不明な重要な問題である。

以上に述べたような意義を持つプロテアーゼ2つについては私は研究を行った。

#### 1.4. ミクロソーム膜結合セリンプロテアーゼ

1978年にSogawaらがラットの肝臓のミクロソーム膜に中性プロテアーゼ活性があること初めて見いだした (Sogawa and Takahashi 1978)。そしてまたニホンザルの肝臓のミクロソーム膜に中性プロテアーゼ活性があることをSogawaらが1979年に報告した (Sogawa and Takahashi 1979)。それ以後、このプロテアーゼの完全精製が試みられたきたが、このプロテアーゼの存在する量が微量なためにことごとく失敗に終わってきた。それゆえに、その性状については本プロテアーゼの部分精製標品で検討がなされてきた (Takahashi, Tamanoue *et al.* 1991)。それによると、本プロテアーゼはセリンプロテアーゼであり、中性付近に至適pHをもち、塩基性アミノ酸対のCOOH末端側に特異性が高く、精製の際ヒドロキシルアパタイトカラムから溶出したフラクションを4°Cで保存しておくという特徴があった。この酵素の特異性の結果から本プロテアーゼはミクロソームにおいて前駆体タンパク質のプロセッシングを行っている可能性が示唆された。しかし、このプロテアーゼの生理的役割を明らかにするためには、完全精製を行った上でその性状を詳細に検討することが重要であった。

#### 1.5. ミクロソーム膜結合金属依存性プロテアーゼ

上記のセリンプロテアーゼをラットの肝臓のミクロソーム膜から精製する過程において、新たなプロテアーゼ活性が活性化してくることがわかった。この新規のプロテアーゼはヒドロキシルアパタイトカラムを行った後に、溶出したフラクションを4°Cで保存しておくときわめて遅い速度で活性化し、約1ヵ月の時間を要した。私はこのプロテアーゼを完全に精製しその性質を調べた。その結果、このプロテアーゼは同一の分子であるにもかかわらず2種のプロテアーゼ活性を有していた。pH 8.0においてはメタロプロテアーゼ活性を有し、pH 5.3においては金属依存性セリンプロテアーゼ活性を有していた。これらの2種のプロテアーゼ活性は、触媒のメカニズムが異なるにもかかわらずともに塩基性アミノ酸対に対して高い特異性を持っており、本酵素も前駆体タンパク質のプロセッシングを行っている可能性が示唆された。

## 2. 材料と試薬

ペプチドMCA基質、ダイノルフィンA、 $\alpha$ -ネオエンドルフィン、ニューロテンジンは、ペプチド研究所（大阪）から購入した。ヒドルクシルアパタイトは生化学工業（東京）より購入した。DEAE-セルロース（DE52）はWhatmanより購入した。ベンズアミジンセファロース6B、セファクリルS-200、キレーティングセファロース6B、NAP-10は、Pharmacia-LKB Biotechnologyより購入した。BCA試薬はPierceより購入した。フルオレスアミン、ヒストン、BSA、オボアルブミン、 $\gamma$ -イミノグロブリン、ジイソプロピルフルオロフォスフェート、4-（アミジノフェニル）-メタンスルフォニルフルオリド、フェニルメタンスルフォニルフルオリド、 $p$ -クロメルクリベンゼンスルホン酸、ベンザミジン塩酸塩、TPCK、 $\alpha$ -フェナントロリン、BPTI（Kunitz）はSigmaより購入した。コール酸ナトリウム、ルブロールPXはナカライテスク（京都）より購入した。ミオグロビンはBiozyme Laboratoriesより購入した。カゼイン（Hammasten）はメルクより購入した。TLCKはAldrichより購入した。SBTIはWorthington Biochemicalより購入した。SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動のための低分子量マーカーはBio-Radより購入した。 $[^3\text{H}]$ -DFPはNEN-DuPontより購入した。フルオログラフィーのアンブリファイはアマシャムより購入した。セントリカット・ミニはバイオフィールドより購入した。ウルトラフリーC3プラスはミリポアより購入した。ロイペプチン、アンチパイン、キモスタチン、エラストチナール、E-64、ベスタチン、アマスタチンは青柳高明博士（微生物化学研究所）の御供与による。ラット（ウィスター種、オス、7週令、体重約200g）は日本生物材料より購入した。ブタの肝臓は帝国臓器より購入した。その他の試薬は全て特級のものを用了。

### 3. 方法

#### 3.1. ミクロソーム画分の調製

ラット5匹(ウィスター種、オス、7週令、体重約200 g)を一晩絶食させ水だけを与えておき、薬剤を用いずにラットの首と尾を引いて脊椎をはずして殺し、肝臓を抽出した。それぞれの肝臓を0.25 Mシヨ糖を含む50 mMトリエタノールアミン塩酸緩衝液pH 8.0で十分にかんりゅうした。

肝臓をハサミで細かく切断した後、0.25 Mシヨ糖を含む50 mMトリエタノールアミン塩酸緩衝液pH 8.0を160 ml加え、ポッター・エルページェム型ガラステフロンホモジェナイザーにより細胞を破壊した。このときのホモジェナイズは、約400 rpmの回転数で2ストローク行った。得られた粗ホモジェネートからSogawaraの方法(Sogawa and Takahashi 1978)を改変した下記の方法を用いて、ミクロソーム画分を調製した。

まず、ホモジェネートを11,000 x g, 30 min遠心して慎重にデカンテーションし、上清と沈澱を得た。ここで得られた上清を4°Cで保存した。一方、沈澱に0.25 Mシヨ糖を含む50 mMトリエタノールアミン塩酸緩衝液pH 8.0を90 ml加えて、できるだけ遅い回転数で1ストロークだけホモジェナイズした。得られたホモジェネートを再び11,000 x g, 30 min遠心して慎重にデカンテーションして上清を得た。ここで得た上清と先に得た上清を混ぜて、100,000 x g, 90 minの超遠心にかけ沈澱を得た。得られた沈澱に0.25 Mシヨ糖を含む50 mMトリエタノールアミン塩酸緩衝液pH 8.0を130 ml加えてホモジェナイズした。得られたホモジェネートを再び100,000 x g, 90 minの超遠心にかけ沈澱を得た。得られた沈澱に10 mMトリエタノールアミン塩酸緩衝液pH 8.5を75 ml加えてホモジェナイズを行い、ミクロソーム膜画分を得た。

#### 3.2. ミクロソーム膜の処理

ミクロソーム膜画分を3回凍結融解した。

その後、ミクロソーム画分に3 M塩化カリウムを含む10 mMトリエタノールアミン塩酸緩衝液pH 8.5を40 ml加えてホモジェナイズし、4°Cで30分放置した。これを100,000 x g, 90 min超遠心し、膜の小胞内、及び膜表面に結合している分子を上清として除去した。得られた沈澱を1 M塩化カリウムを含む10 mMトリエタノールアミン塩酸緩衝液pH 8.5, 125 mlに再び懸濁し、同じ操作を行った。

次に、この沈澱に1 mM EDTA溶液pH 7.0を125 ml加えてホモジェナイズし、4°Cで30分放置した。これを100,000 x g, 90 min超遠心し沈澱を得た。この沈澱を同じ溶液125 mlに懸濁し、同じ操作を行った。得られた沈澱に10 mMリン酸カリウム緩衝液( $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4$ ) pH 7.5を80 ml加えてホモジェナイズし、100,000 x g, 90 minの超遠心を行って溶媒を交換した。そして、沈澱

として、1 M塩化カリウム及び1 mM EDTA処理を行ったミクソソーム膜を得た。この沈殿は、10 mMリン酸カリウム緩衝液pH 7.5を50 ml加えてホモジェナイズし-80°Cで保存した。

### 3.3. 中性プロテアーゼ活性の測定法

精製されたプロテアーゼの各種のタンパク質に対する中性プロテアーゼの活性の測定は、Sogawaraの方法(Sogawa and Takahashi 1978)を改変した方法によって行った。基質溶液は、1%熱変性タンパク質を含む0.1 Mホウ酸ナトリウム緩衝液pH 8.0である。この基質溶液は、1gのタンパク質に0.1 Mホウ酸ナトリウム緩衝液pH 8.0を100 ml加え、80°Cで4時間加熱して作ったものである。活性を測定するために、基質溶液50  $\mu$ lに酵素を含む溶液を50  $\mu$ l加え、37°Cで2時間反応させた。反応を停止させるために5%トリクロロ酢酸溶液を150  $\mu$ l加えた後、室温で30分放置した。さらに、これらの反応溶液を12,000 rpmで10 min遠心してタンパク質を沈澱させた。そして、その上清50  $\mu$ lを取り、それに0.2 Mホウ酸ナトリウム緩衝液pH 8.5を1.45 ml加え、次いで0.3 mg/mlのフルオレスアミンを含むアセトン溶液0.5 mlを激しく攪はんしながら加えて反応させた。この反応した溶液の蛍光強度を、390 nmの励起波長と480 nmの蛍光波長で測定した。なお、50  $\mu$ Mのグリシン溶液に上記と同じ方法でフルオレスアミンを反応させたときの蛍光の値を、蛍光強度の標準とした。蛍光強度の測定は、日立蛍光分光光度計650-10S型を用いて行った。

中性プロテアーゼ活性の単位の定義として、1 nmolのグリシンに相当する $\alpha$ -アミノ基を1時間に遊離させる酵素量を1ユニットとした。

フルオレスアミン(4-phenylspiro[furan-2(3H),1'-phthalan]-3,3'-dione)は第一級アミンと反応し、強い蛍光物質を形成する。この蛍光を測定することにより、微量のアミノ酸、ペプチド、更には他の第一級アミンの迅速な分析が可能である。上記の活性測定方法は、フルオレスアミンのこのような特徴を利用したものである。

### 3.4. メチルクマリルアミド基質によるペプチダーゼ活性の測定

精製過程におけるプロテアーゼ活性の測定はメチルクマリルアミド基質を用いて行った。メチルクマリルアミド基質を用いたペプチダーゼ活性の測定は、Barrettらの方法(Barrett 1972; Barrett 1980; Barrett and Kirshke 1981)を改変した方法を用いた。10 mMのBoc-Gln-Arg-Arg-MCAを含むDMSO溶液5  $\mu$ lと、0.1 Mのトリス-塩酸緩衝液pH 8.0, 0.5 mlを混ぜておき、そこへ酵素試料溶液10  $\mu$ lを加えて37°Cで30分間反応させた。反応を停止させるために0.1 Mのモノクロロ酢酸を含む0.1 Mの酢酸ナトリウム緩衝液pH 4.3を2.5 ml加えた。この反応溶液の蛍光強度を、励起波長370 nm、蛍光波長460 nmで測定した。

1 mMのMCAのDMSO溶液5  $\mu$ lに、0.1 Mのトリス塩酸緩衝液pH 8.0を0.5 mlと、0.1 Mのモノ

クロロ酢酸を含む0.1 Mの酢酸ナトリウム緩衝液pH 4.3を2.5 ml加えたものの蛍光の値を蛍光強度の標準とした。

MCA活性の単位の定義は、1 pmolのMCAを1分間に遊離する酵素量を1ユニットとした。

MCA (7-amino-4-methylcoumarin) 基質は、結合型から遊離型になると蛍光の強度が500-700倍になる。また、反応の初速度は、100倍の酵素濃度の範囲で酵素濃度に比例する。上記の活性測定方法は、MCA基質のこのような特徴を利用したものである。

### 3.5. ペプチド基質に対する加水分解

それぞれのペプチド1 nmolに対して酵素約15ユニットを加え、50 mlの0.04 Mトリエタノールアミン塩酸緩衝液pH 8.0 (pHを変えるときには他の緩衝液) 中で37°Cで3~6時間反応させた。反応終了後、溶液を即座に高速液体クロマトグラフィーにかけ、加水分解によって新たに生じたペプチド断片を分取し、Applied Biosystems社のデリバタイザー-アナライザー (420A/130A-920A) によってアミノ酸組成分析を行った。

### 3.6. タンパク質の定量

タンパク質の定量は、280 nmの吸光度の測定、ならびにSmithらによるBCA試薬を用いた方法 (Smith, Krohn *et al.* 1985) によって測定した。タンパク質の標準として、ウシ血清アルブミン溶液を用いた。

微量な量しか得られないミクロソーム膜セリンプロテアーゼの最終精製標品については、精製用ポリアクリルアミドゲルから得られた酵素試料の一部だけをSDS-PAGEにかけた。電気泳動終了後にゲルを銀染色にかけ、450 nmでゲルをスキャンしウシカーボニックアンハイドラーゼを基準としてタンパク質量を推定した。このスキャンは、2波長クロマトスキャナー-CS-930 (島津)を用いて行った。

### 3.7. SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動

Laemmliの方法 (Laemmli 1970) にしたがって、0.1 %のSDS存在下で12.5 %のポリアクリルアミドゲル中で電気泳動を行った。タンパク質はCoomassie brilliant blueで染色した。

### 3.8. 高速液体クロマトグラフィー

日立655A-11システムとトーヨーソーダのTSKゲルODS120Tカラムを用いて高速液体クロマトグラフィーを行った。0.1 %のTFA溶液をAバッファー、0.08 %のTFAを含むアセトニトリル溶液をBバッファーとして、Bバッファーのアセトニトリルの濃度を0 %から50 %まで直線的に上げることによって溶出を行った。



### 3.9. [<sup>3</sup>H]-DFPラベル

24 ngのセリンプロテアーゼに8 mCiの[<sup>3</sup>H]-DFPを加え、16 μlの12 mMトリエタノールアミン塩酸緩衝液pH 8.0中、37°Cで2時間反応させた。この溶液をSDS-PAGEにかけた後、ゲルをフルオログラフィーにかけてオートラジオグラフィーを行った。

### 3.10. 活性のpH依存性

MCA基質に対する酵素活性を、0.1 Mグリシンナトリウム緩衝液 (pH 8.0-10.5)、0.1 Mホウ酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.5-11.0)、トリス塩酸緩衝液 (pH 6.0-10.0)、トリエタノールアミン塩酸緩衝液 (pH 8.0-9.5) 中で調べた。基質として用いたペプチドはそれぞれプロテアーゼによって一箇所切断され、HPLCによる分析においては2つの新規のペプチドのピークが生じた。それぞれのペプチドのピークの高さを測定して、活性を推定した。ペプチドの切断部位とピークの高さとペプチド量との関係は、アミノ酸分析によって決定した。

### 3.11. 速度論的パラメーターの決定

種々の基質に対する速度論的パラメーターを0.1 Mトリス塩酸緩衝液pH 8.0, 37°Cにおける測定によって決定した。

### 3.12. ミクロソーム膜の可溶化

1 M塩化カリウム処理、及び1 mM EDTA処理を行ったラット肝臓ミクロソーム膜に結合しているタンパク質を可溶化するために、次に示すような操作を行った。

まず、ミクロソーム膜のホモジェネート約55 mlに、タンパク質濃度が2~3 mg/mlになるように、1%コール酸ナトリウムと0.15 M塩化ナトリウムを含む10 mMリン酸カリウム緩衝液pH 7.5を190 mlと、10%コール酸ナトリウムと0.15 M塩化ナトリウムを含む10 mMリン酸カリウム緩衝液pH 7.5を5.5 ml加えて4°Cで2時間攪はんした。このミクロソーム膜溶液を100,000 × g, 60 minの超速心にかけ、上清としてミクロソーム膜からの可溶化物を得た。この溶液を、ミクロソーム膜可溶化タンパク質溶液としてカラムクロマトグラフィーによる精製に使用した。

### 3.13. カラムクロマトグラフィー

#### 3.13.1. 最初の共通なカラムクロマトグラフィー

##### 3.13.1.1. ヒドロキシルアパタイトカラム

1%コール酸ナトリウムと0.15 M塩化ナトリウムを含む10 mMリン酸カリウム緩衝液pH 7.5に

よってラット5匹分のマイクロソーム膜を可溶化して得られた試料を、ヒドロキシルアパタイトカラム (3 x 21 cm) にかけた (図1)。ヒドロキシルアパタイトカラムは、70gのヒドロキシルアパタイトを上と同じ緩衝液に溶いてカラムに詰め、あらかじめ同じ緩衝液で十分に平衡化しておいた。このカラムに試料をかけた後、カラムを同じ緩衝液で十分に洗った。その後、1%コール酸ナトリウムと0.15 M塩化ナトリウムを含むリン酸カリウム緩衝液の濃度を10 mMから200 mMまで800 mlの体積で勾配をかけて溶出を行った。このときの流速は20 ml/hrであった。

なお、このヒドロキシルアパタイトカラムから溶出されたフラクションを4°Cで数日間保存しておく、時間の経過とともにプロテアーゼ活性が増加するという現象がみられた。このプロテアーゼの活性化については後に述べる。

このヒドロキシルアパタイトカラムクロマトグラフィーを繰り返し行って、ラット20~40匹分の試料を処理した。

#### 3.13.1.2. DE52セルロースカラム

ヒドロキシルアパタイトカラムによって得られた活性画分を、0.05%ルブロールPXを含む20 mMトリス塩酸緩衝液pH 8.5 (またはpH 9.0)に対して透析を行った。この透析した試料を、同じ緩衝液で平衡化したDE52セルロースカラム (3 x 25 cm) にかけた (図2, 17)。このカラムを同じ緩衝液で十分に洗ってから、緩衝液中の塩化ナトリウムの濃度を0 Mから0.25 Mまで2 lの体積で上昇させて溶出を行った。このときの流速は30 ml/hrであった。

このDE52クロマトグラフィーによってセリンプロテアーゼ活性と金属依存性プロテアーゼ活性が分離できたので、以下のクロマトグラフィーはそれぞれ別に行った。

#### 3.13.2. セリンプロテアーゼ (MSP) の精製

##### 3.13.2.1. ベンズアミジンセファロース6Bカラム

DE52セルロースカラムによって得られたセリンプロテアーゼの活性画分を、透析チューブに入れて0.02% ルブロールPXを含むトリエタノールアミン塩酸緩衝液pH 8.0に対して透析を行った。透析した試料溶液を、同じ緩衝液で平衡化したベンズアミジンセファロース6Bカラムにかけた。その後、0.5 M NaClを含む同じ緩衝液で280 nmの吸収がベースラインに戻るまで洗いをを行った。カラムの洗いの後、さらに0.1 Mベンズアミジン塩酸を含む緩衝液で溶出を行った。溶出したフラクションはそれぞれ元の緩衝液に対して透析を行い、ベンズアミジンを取り除いた。

##### 3.13.2.2. ポリアクリルアミド電気泳動

ベンズアミジンセファロース6Bカラムによって得られた活性画分を等量の2 X サンプルバッ

ファーと混合し、7回に分けて4°Cにおいて不連続ポリアクリルアミド電気泳動にかけた。分離ゲルは5%アクリルアミド/ビスアクリルアミド、0.375 M トリス-塩酸緩衝液 pH 8.8、0.05% 過硫酸アンモニウム、0.05% TEMED および 0.01% ルブロールPX を含んでいた。濃縮ゲルは上記の溶液の組成の中でトリス-塩酸緩衝液だけを 0.125 M トリス-塩酸緩衝液 pH 6.8 にしたものを用いた。この電気泳動の後、ポリアクリルアミドゲルを 1.5 mm ずつ分離ゲルの上端から切断し、それぞれを細かくすり潰して少量の 0.01% ルブロールPX を含む 0.02 M トリエタノールアミン塩酸緩衝液 pH 8.0 を加えて 4°C で保存した。この結果、2つのセリンプロテアーゼ活性が現われた。

### 3.13.3. 金属依存性プロテアーゼの精製

#### 3.13.3.1. キレーティングセファロース6B

DE52セルロースカラムによって得られた金属依存性プロテアーゼの活性画分を、0.02% ルブロールPX と 0.5 M NaCl を含む 0.02 M トリエタノールアミン塩酸緩衝液 pH 8.0 に対して透析した。この活性画分を同じ緩衝液で平衡化したキレーティングセファロース6Bカラム (1 x 3 cm) にかけて。カラムを同じ緩衝液で洗った後、0.2 M グリシンを含む緩衝液で溶出を行った。得られた活性画分をセントリカット・ミニを用いて濃縮し 3.8 ml にした。

#### 3.13.3.2. セファクリルS-200

キレーティングセファロース6Bによって得られた活性画分を、0.6% コール酸ナトリウムと 0.2 M NaCl を含む 20 mM トリエタノールアミン塩酸緩衝液 pH 8.0 で平衡化したセファクリルS-200カラムにかけてゲルろ過を行った。

#### 3.13.3.3. FPLC MonoQ

セファクリルS-200によって得られた活性画分を 0.01% ルブロールPX を含む トリエタノールアミン塩酸緩衝液 pH 8.0 に対して透析した。透析した活性画分を 3等分し、それぞれ 0.02 M トリエタノールアミン塩酸緩衝液 pH 8.0 で平衡化した FPLC の MonoQカラム にかけて。カラムを同じ緩衝液で洗った後、0—0.5 M NaCl (15ml) で溶出を行った。

### 3.14. N末端アミノ酸配列の決定

FPLC の MonoQ によって得られた金属依存性プロテアーゼを蒸留水で平衡化した NAP-10カラム にかけて、蒸留水で溶出を行うことによって酵素溶液に含まれる塩を取り除いた。この試料を凍結乾燥にかけて完全に乾燥させた後、再び 30  $\mu$ l の蒸留水に溶解した。このタンパク質溶液を ABI 社のパルス-リキッドシークエンサーモデル 477A/120A にかけて N末端のアミノ酸配列

を決定した。

### 3.15. メタロプロテアーゼ活性と金属依存性セリンプロテアーゼ活性の同一分子性の検定

精製された金属依存性プロテアーゼがもつメタロプロテアーゼ活性 (pH 8.0) と金属依存性プロテアーゼ活性 (pH 5.3) が同一の酵素分子に由来するものなのか、あるいは別々の酵素分子に由来するものなのかを調べた。

#### 3.15.1. FPLC Superose 12

精製された金属依存性プロテアーゼをFPLCのSuperose 12にかけた。カラムの平衡化と溶出には0.2 M NaClを含む0.02 M トリエタノールアミン塩酸緩衝液pH 8.0を用い、流速は0.5 ml/minであった。

#### 3.15.2. ポリアクリルアミドゲル電気泳動

精製された金属依存性プロテアーゼを不連続ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけた。分離ゲルは5%アクリルアミド/ビスアクリルアミド、0.375 M トリス-塩酸緩衝液pH 8.8、0.05%過硫酸アンモニウム、0.05% TEMED、0.01%ルブロールPX、1 mM  $\text{CaCl}_2$ および0.02 mM  $\text{ZnCl}_2$ を含んでいた。濃縮ゲルは上記の溶液の組成の中でトリス-塩酸緩衝液だけを0.125 M トリス-塩酸緩衝液pH 6.8にしたものを用いた。泳動は4°Cで行い、泳動終了後に分離ゲルを上端から1.5 mm ずつスライスし、それぞれをサンプルチューブに入れて0.02 M トリエタノールアミン塩酸緩衝液pH 8.0を200  $\mu$  加え、4°Cで保存しゲルから溶解するプロテアーゼ活性を測定した。

### 3.16. 活性化

#### 3.16.1. プロテアーゼ阻害剤の効果

ヒドロキシルアパタイトカラムから溶出した直後のフラクションに各種のプロテアーゼ阻害剤を混ぜて4°Cで保存し、セリンプロテアーゼと金属依存性プロテアーゼの活性化に与える影響を調べた。阻害剤として、2 mM DFP、40 mM EDTA、0.01 mM E-64、 $\alpha$ -フェナントリン、0.2 mM キモスタチン、 $\text{FeCl}_3$ 、0.2 mM アンチパイン、0.4 mM ロイペプチン、1 mM ベスタチン、ベンズアミジン、TPCK、TLCKなどを用いた。また、活性化前のフラクションにプロテインジスルフィドイソメラーゼを0.18 mg/mlになるように加え、さらに還元型グルタチオンと酸化型グルタチオンを種々のモル比で加えて4°Cで保存し、活性化に与える影響を調べた。

### 3.16.2. 活性化と分子量

ラットの肝臓のミクロソーム膜を調製し1 M KClと1 mM EDTA処理にかけたものを可溶化し、ヒドロキシルアパタイトカラムにかけないでセファクリルS-200によるゲルろ過にかけた。カラムの平衡化と溶出は、1%コール酸ナトリウムと0.2 M NaClを含む10 mMリン酸カリウム緩衝液 pH 7.5で行った。

### 3.16.3. 活性化とDE52

ラットの肝臓のミクロソーム膜を調製し1 M KClと1 mM EDTA処理にかけたものを可溶化し、ヒドロキシルアパタイトカラムにかけないでDE52によるイオン交換カラムクロマトグラフィーにかけた。カラムは0.1 %ルブロールPXを含む50 mM N-メチルジエタノールアミン塩酸緩衝液 pH 8.0で平衡化し、可溶化ミクロソーム膜をかけた後同じ緩衝液で洗い、緩衝液中のNaClを0.02 Mに上げることによって溶出を行った。

### 3.17. ブタの肝臓のミクロソーム膜のセリンプロテアーゼの精製

ブタの肝臓のミクロソーム膜からラットの場合と同様の方法で酵素を調製した。ブタの肝臓約200 gを1 lの0.25 M ショ糖を含む0.05 M トリエタノールアミン塩酸緩衝液 pH 8.0でワーリン・ブレンダーを用いてホモジェナイズした。このホモジェネートを11,000 x g, 30 minの遠心にかけて上清として細胞質画分を得た。この上清を100,000 x g, 90 minの超遠心にかけて沈殿としてミクロソーム膜画分を得た。このミクロソーム膜画分を10 mM トリエタノールアミン塩酸緩衝液 pH 8.0に懸濁した後、1 M KClによる洗いを2回、1 mM EDTAによる洗いを2回を行った。最後に0.01 M リン酸カリウム緩衝液 pH 7.5に懸濁した後、1%コール酸ナトリウムと0.15 M NaClを含む0.01 M リン酸カリウム緩衝液 pH 7.5によって可溶化を行った。この可溶化物を同じ緩衝液で平衡化したヒドロキシルアパタイトカラムにかけた。カラムを同じ緩衝液で十分洗った後、溶出を0.01-0.2 M リン酸 (0.81)で行った。溶出したフラクションのセリンプロテアーゼ活性の変化を調べた。

### 3.18. 細胞内局在と活性化

ラットの肝臓よりミクロソーム膜画分を抽出した後、このミクロソーム膜を1.21 Mのショ糖溶液 (pH 7.0)でホモジェナイズした。遠心管にはじめに2.1 M ショ糖溶液をいれ、その上にミクロソーム膜画分を重層し、その上にさらに0.6 Mと0.25 Mのショ糖溶液を重層した。最後にバランスを0.25 M ショ糖溶液であわせて、77,000 x gで16時間遠心した。0.6 M / 1.21 M ショ糖の境界に浮遊している顆粒を集めゴルジ体画分とし、1.21 M / 2.1 M ショ糖の境界に浮遊している顆粒を集めて小胞体画分とした。それぞれの画分を10 mM トリエタノールアミン塩酸緩衝液 pH

8.5に体して透析した。透析後の画分を2回凍結融解にかけた。小胞体とゴルジ体の画分にそれぞれの体積の1/2の3 M KClを含む10 mM トリエタノールアミン塩酸緩衝液pH 8.5を加えホモジェナイズした。それぞれのホモジェネートを77,000 x gで2時間遠心した。それぞれの沈殿に20 mlの1 M KClを含む10 mM トリエタノールアミン塩酸緩衝液pH 8.5を加えてホモジェナイズし、77,000 x gで2時間遠心した。小胞体画分の沈殿を等分し、一方に20 mlの20 mM トリエタノールアミン塩酸緩衝液pH 8.0を加え、他方に20 mlの10 mM リン酸カリウム緩衝液pH 7.5を加えてホモジェナイズした。ゴルジ体画分についても同様の操作を行った。それぞれのホモジェネートを77,000 x gで2時間遠心し、トリエタノールアミン塩酸緩衝液でホモジェナイズした小胞体とゴルジ体画分の沈殿をそれぞれ5 mlと2 mlの1% コール酸ナトリウムと0.15 M NaClを含む20 mM トリエタノールアミン塩酸緩衝液pH 8.5でホモジェナイズし4°Cで保存した。また、リン酸カリウム緩衝液でホモジェナイズした小胞体とゴルジ体画分の沈殿をそれぞれ5 mlと2 mlの1% コール酸ナトリウムと0.15 M NaClを含む10 mM リン酸カリウム緩衝液pH 7.5でホモジェナイズした。

1% コール酸ナトリウムと0.15 M NaClを含む10 mM リン酸カリウム緩衝液pH 7.5でホモジェナイズした小胞体とゴルジ体画分をそれぞれ同じ緩衝液で可溶化したヒドロキシルアパタイトカラムにかけた。同じ緩衝液でカラムを洗った後、10-200 mM(0.8 l)のリン酸の濃度勾配によって溶出を行った。

## 4. 肝ミクロソーム膜セリンプロテアーゼ (MSP)

### 4.1. 結果

#### 4.1.1. ラットの肝臓のミクロソーム膜のセリンプロテアーゼの精製

表1に示すように、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィーを含む最初の2つのステップは、部分精製酵素標品を得るために以前に用いたステップと類似している。DEAE-セルロースクロマトグラフィーと改良したベンザミジンセファロース6Bクロマトグラフィーを含む最後の3つのステップは、酵素の完全精製にとって最良の組み合わせであった。比活性が約240倍上昇していることから判断して、最も効果的なステップはベンズアミジンセファロース6Bでのアフィニティークロマトグラフィーであった(図3)。しかし、ベンズアミジンセファロース6Bの段階で得られた酵素標品は、非常に類似した酵素的性質をもつ少なくとも2つのプロテアーゼと他のタンパク質を含んでいた。これらの2種のプロテアーゼは、ルブロールPXを含むポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分離することができた(図4)。移動度の大きい方のプロテアーゼは純粋な状態で得られ、ミクロソームセリンプロテアーゼ1 (MSP1)と命名した。もう一方の移動度の小さい方のプロテアーゼを、ミクロソームセリンプロテアーゼ2 (MSP2)と命名した。全体としての精製度の上昇は、MSP1が約8,000倍で、MSP2が800倍であった。ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー後の活性化が完全に終わった時点での活性の値をもとにした場合の酵素活性の回収率は、MSP1が3.5%、MSP2が4.2%であった。MSP2の比活性が低いことからMSP2のバンドはかなり濃く染まること期待されたが、図4では2つのバンドは同じように染まった。この原因については現在のところ不明である。

#### 4.1.2. 分子量

MSP1の最終精製標品は還元条件下でのSDS-PAGEにおいて分子量約32kdの単一のバンドを与えた(図5)。非還元条件下でのSDS-PAGEでもこのバンドの移動度は同じであった。このバンドだけが $[^3\text{H}]$ -ジイソプロピルフルオロフォスフェイト (DFP) によってラベルされ、この酵素がセリンプロテアーゼであることが示された。一方、TSK G3000SWによるゲル濾過において、MSP1とMSP2はともに分子量約40kdに相当する位置に溶出した。これらの結果から、この酵素は1本のポリペプチド鎖からなっていると考えられる。

#### 4.1.3. pH依存性

Boc-Gln-Arg-Arg-MCAに対するMSP1の活性は、用いた緩衝液の種類によって大きく異なるpH依存性を示した。図6 a, b に示すように本質的に同じ結果がMSP2についても得られた。ベ

プチド基質である $\alpha$ -ネオエンドルフィンとダイノルフィンAに対する酵素活性を、トリス塩酸緩衝液を用いて種々のpHにおいて測定した結果を図6cに示す。ペプチドに対するpH依存性についても、MSP1とMSP2の両方で本質的に同じ結果が得られた。これらの結果から、本酵素の至適pHを明確に決定することはできないが、中性からアルカリのpHのかなり広い範囲に亘って活性を保持することが判明した。しかし、pHが6.0以下か11.0以上になると、本酵素の活性はほとんど失われてしまった。

#### 4.1.4. 各種の試薬の効果

各種のプロテアーゼインヒビターと金属イオンの存在下で、MSP1とMSP2の活性をBoc-Gln-Arg-Arg-MCAとダイノルフィンAを用いて測定した(表2)。両酵素のMCAとペプチドに対する活性は、DFP、TLCK、APMSF、ベンズアミジン、ロイペプチン、アンチペイン、BPTIなどのセリンプロテアーゼの阻害剤によって強く阻害された。これらの結果は、本酵素のセリンプロテアーゼとしての分類と一致している。さらに、E-64、SBTIおよび $Zn^{2+}$ は、部分的にはあるが強く両酵素を阻害した。一方、PMSFはわずかしか阻害しなかった。その他の阻害剤や金属イオンは、本実験の条件下ではほとんど効果はなかった。

#### 4.1.5. 各種のMCA基質に対する基質特異性

種々のMCA基質に対するMSP1の速度論的パラメーターを決定した(表3)。 $k_{cat}/K_m$ の値から判断して、これらのMCA基質の中でBoc-Gln-Arg-Arg-MCAが最も良い基質であった。ついてBoc-Leu-Thr-Arg-MCAに対して高く、その次にBoc-Gly-Arg-Arg-MCAとBoc-Gln-Ala-Arg-MCAとなっている。P<sub>1</sub>部位にArgがある基質に対しては $K_m$ 値はほぼ一定であるが、同じ部位にLysがある基質(Boc-Glu-Lys-Lys-MCA)に対する $K_m$ 値は約10倍高い値であった。ほとんど同じ結果がMSP2についても得られた。

#### 4.1.6. ヒドロキシアパタイトカラムクロマトグラフィーによる活性化

ヒドロキシアパタイトカラムから溶出されたフラクションを4°Cでしばらく保存しておくと、この酵素の活性は著しく増加した(図7)。活性化が起こる前のこの酵素の $K_m$ は543  $\mu$ M、 $V_{max}$ は472 units/mlであったが、活性化が起こった後の $K_m$ は210  $\mu$ M、 $V_{max}$ は8,000 units/mlであった。活性化によって、この酵素の $K_m$ は減少し $V_{max}$ は増加した。

ヒドロキシルアパタイトカラムから溶出したフラクションに各種のプロテアーゼ阻害剤を加えて4°Cで保存した。その結果、本酵素の活性化はキモスタチンによって強く抑制された。また、活性化は $\alpha$ -フェナンスロリンやE-64によっても部分的に抑制された(図8)。

ヒドロキシルアパタイトカラムから溶出して4°Cに保存しておいて活性化が起こった後のフ



ラクシオンの一部を再びヒドロキシルアパタイトカラムにかけたところ、リン酸の濃度が約0.05 Mの位置に溶出した(図9)。

可溶化したラットの肝臓のミクロソーム膜の抽出物をセファクリルS-200(3 x 108 cm)にかけてゲルろ過を行った。その結果、ボイドに相当する位置と分子量70 kdの位置にMSPの活性が現れた(図10)。このうちの70 kdの活性画分を再びセファクリルS-200(3 x 103 cm)にかけたところ、この2度目のゲルろ過では分子量45 kdの位置にMSP活性は溶出した(図11)。

可溶化したラットの肝臓のミクロソーム膜の抽出物をDES2カラムにかけた。その結果、MSPは活性化してこなかった(data not shown)。

#### 4.1.7. ペプチドの切断

本酵素は $\alpha$ -ネオエンドルフィン、ダイノルフィンA、ニューロテンシンを1箇所て切断した(Takahashi, Tamanoue *et al.* 1991)。そこで、MSP1がこれらのペプチドを塩基性アミノ酸対の部位で切断し、単一の塩基性アミノ酸の部位での切断が起こらないことを確かめた。これらのペプチドに対する速度論的パラメーターを表3に示す。これらのパラメーター値から、これらのペプチド基質がかなり似た触媒効率で加水分解されることが分かる。

#### 4.1.8. タンパク質の加水分解

MSP1はヒストンを最も効率よく加水分解するが、他のタンパク質はほとんど加水分解しなかった(表4)。MSP2によるタンパク質加水分解の結果もMSP1と同じであった。

#### 4.1.9. ブタの肝臓のミクロソーム膜のセリンプロテアーゼ

ブタの肝臓のミクロソーム膜を1 M KClと1 mM EDTA処理にかけて、1%コール酸ナトリウムによって可溶化しヒドロキシルアパタイトカラムにかけた(図12)。その結果、2つのBoc-Gln-Arg-Arg-MCA分解活性が現われた。これら2つのピークのプロテアーゼ活性は、ラットのMSPと同様に4°Cで保存しておくで徐々に活性化した(図15)。これらのブタのプロテアーゼ活性の活性化は約10日間続き平衡に達した。ここで得られたブタのプロテアーゼの2つのピークFr.39とFr.63をそれぞれTSK G3000SWにかけて、ゲルろ過によって分子量を推定した。ゲルの平衡化と酵素の溶出には1%コール酸ナトリウムと0.15 M NaClを含む10 mMリン酸カリウム緩衝液pH 7.5を用いた。その結果、2種のプロテアーゼの分子量はともに23 kdであった(図13)。また、プロテアーゼ阻害剤による影響を調べたところ、これらのプロテアーゼはともにDFPによって強く阻害された(表5)。したがって、これら2種のプロテアーゼはともにセリンプロテアーゼであると考えられる。これらの2種のプロテアーゼのMCA基質に対する基質特異性を調べたところ、これらはともにBoc-Gln-Arg-Arg-MCAを最も良い基質とし、そのほかに

Boc-Leu-Thr-Arg-MCA、Boc-Gly-Arg-Arg-MCAなどに高い特異性を示した(表6)。また、ヒドロキシルアパタイトカラムクロマトグラフィーで溶出したブタの2つの酵素をそれぞれプールし、先に溶出したフラクションをPMSP1とし、後に溶出したフラクションをPMSP2とした。それぞれの活性画分をFPLCのMono Qにかけたところ、ほぼ同じ位置に溶出した(図14)。これらの結果から、ブタ肝臓ミクロソーム膜由来の2種のプロテアーゼPMSP1とPMSP2はおたがいかなり似た性質を持っていることがわかった。また、これら2種のブタのプロテアーゼはラットの肝臓ミクロソーム膜のセリンプロテアーゼMSPともほとんど同じ性質を示した。

## 4.2. 考察

### 4.2.1. MSPの精製

先に私はラットの肝臓のミクロソーム膜に強く結合しているトリプシン様セリンプロテアーゼの部分精製を行ないいくつかの性質について調べた。この酵素の性状をより詳細に決定するためには、より純度の高い標品を得ることが重要であった。この精製は本酵素が膜結合性であり存在する量が微量であるために非常に困難であった。しかし、試行錯誤を繰り返した後、私は本酵素を完全に精製することができた。

本酵素のクロマトグラフィーでの挙動と酵素活性の回収率は用いる界面活性剤の種類によって大きな影響を受けることを見出した。それゆえに適正な界面活性剤の選択が精製過程での各段階において重要であった。非イオン性界面活性剤ルブロールPXの使用が最後の3段階のステップにおいて有効であった。特に、このルブロールPX存在下での精製用電気泳動による分画によって、本酵素 (MSP1) を活性のある純粋な状態で精製することができた。一方、FPLCでの Mono Q、Mono S、Mono Pカラムや、TSK G3000SWカラムによるゲルろ過のようなクロマトグラフィーは、本酵素の精製には有効ではなかった。

### 4.2.2. MSPのアイソフォーム

調製用電気泳動において2つの酵素活性 (MSP1とMSP2) が明確に分離したことは予期に反していた。電気泳動上での移動度を除いては、MSP1とMSP2は分子量やクロマトグラフィーでの挙動や基質特異性や速度論的性質や活性のpH依存性や種々のプロテアーゼ阻害剤に対する感受性や金属イオンの効果などの性質について非常によく似ていた。よって、これらの2つの酵素活性はアイソフォームであると推定される。現在のところ、これらの2つのアイソフォームが2つの異なる遺伝子に由来するのがあるいは1つの遺伝子産物の翻訳後修飾によって生じるものなのかは不明である。これらのアイソフォームの分子的差異ならびに生理的意義は今後明らかにしなければならない。

### 4.2.3. MSPの活性化

精製過程における興味深い現象は、ヒドロキシルアパタイトカラム溶出後に酵素活性が自発的に顕著に増加することである。この活性化は $V_{max}$ の大きな増加を伴い、 $K_m$ の変化は小さかった。この活性化には2通りの原因が考えられる。初め酵素は不活性な前駆体として存在していて、ヒドロキシルアパタイトカラム後にプロテアーゼによる切断を受けて活性な成熟体に変換されるのかもしれない。これは、活性化後の酵素を再びヒドロキシルアパタイトカラムにかけると、活性化が起こる前のヒドロキシルアパタイトカラムからの溶出位置とは異なる位置に溶

出した結果と一致している。さらに、ミクロソーム膜を可溶化して得られた粗抽出物の酵素活性がセファクリルS-200から分子量70 kdに相当するのピークとして溶出し、活性画分を再び同じカラムにかけると45 kdの位置に溶出した結果とも一致している。セファクリルS-200から溶出した後に不完全ではあるが他のプロテアーゼによって切断されて活性化が起り、再びゲルろ過にかけるとより少ない分子量に相当する位置に溶出するものと考えられる。これに関連して、MSP2が前駆体の活性化中間体である可能性がある。一方、ヒドロキシルアパタイトカラムクロマトグラフィーの段階まで酵素と結合している内在性の阻害剤があって、分解などによってそのような阻害剤が除去されるために活性化が起るように見えるのかもしれない。ミクロソーム膜に存在している他のプロテアーゼがMSPの活性化に関与している可能性を検討するために、種々のプロテアーゼ阻害剤の存在下での活性化の変化を調べた。その結果、*o*-フェナンスロリン、E-64、キモスタチンが部分的に活性化を抑制した。したがって、金属プロテアーゼやシステインプロテアーゼが関与している可能性がある。図8において、pAPMAによって活性が低下しているのはMSPが氷銀を含む化合物によって阻害されるためである。また、キモスタチンを加えた場合にも若干活性が低下しているが、ほとんどの場合キモスタチンを加えても活性が低下することなく活性化が部分的に抑制されるだけであった。しかしまた、活性化が自己触媒的に起る可能性もある。MSPの活性化のメカニズムについてはさらに検討が必要である。本酵素と類似した精製過程における自発的活性化を、Baker & Livelyがニワトリの卵管のミクロソーム膜シグナルペプチダーゼについて報告している(Baker and Lively 1987)。

#### 4.2.4. MSPに対する阻害剤の効果

種々の阻害剤の効果を調べた結果によると、本酵素はセリンプロテアーゼである。しかし、本酵素の活性はPMSF、E-64、TLCK、 $Zn^{2+}$ などによって部分的にはあるが阻害された(表2)。これらの結果の理由については現在のところ不明である。PMSFの場合、より高濃度の条件では本酵素を阻害した。同様の結果は、ラットの小腸粘膜より精製されたアルギニン特異的セリンプロテアーゼについて報告されている(Bourdaï, Pierotti *et al.* 1991)。他方、TLCKとE-64による阻害は、活性部位の近傍に重要なチオール基が存在していることに起因するのかもしれない。しかし、これらの結果を明確にするためにはさらに検討が必要である。

#### 4.2.5. MSPの基質特異性

今回得られたMSP1の基質特異性の結果は、以前に部分精製標品で得た結果と一致しており、本酵素はアルギニン残基を含む塩基性アミノ酸対に高い特異性を示し、天然に存在するペプチド性基質の場合には切断は塩基性アミノ酸対の間かあるいはCOOH末端側で起こった(表3)。検討した範囲内では、ペプチド基質の中で単一で存在する塩基性アミノ酸の部位で加水分解が起

ることは全くなかった。さらに、加水分解は塩基性アミノ酸対の中のアルギニン残基のCOOH末端側においてのみ起き、リシンのCOOH末端側では起きなかった。これらの結果より、本酵素の基質結合部位 $S_1$ は $P_1$ 残基としてアルギニンしか許容しない。 $P_2$ と $P_3$ 残基を認識する $S_2$ と $S_3$ のさらに2つの基質認識部位も重要であると考えられる。これら3つの部位( $S_1 \sim S_3$ )が占有されることがペプチドの加水分解のために必要であると思われる。というのは、本酵素はBoc-Gln-Arg-Arg-MCAやBoc-Leu-Thr-Arg-MCAのようなトリペプチドMCAは高い効率で加水分解するが、Bz-Arg-MCAやBz-Arg-Arg-MCAのようなアミノ酸MCAやジペプチドMCAは加水分解しないからである。基質結合部位 $S_1$ は、ArgやThrを好み、AlaやSerやProはあまり好まれなかった。それに対して、基質結合部位 $S_2$ は、ArgやThrを好み、AlaやSerやProはあまり好まれなかった。それに対して、基質結合部位 $S_3$ は、かなり広い範囲のアミノ酸を許容できるようである。また、基質結合部位 $S_1$ についてもかなり広い特異性が示唆されている。というのも、加水分解がArg-Arg(ダイノルフィンAとニューロテンシン)、Arg-Lys( $\alpha$ -ネオエンドルフィンとVIP)、Arg-Asp(プロアルブミンN末端ペプチド1-20)、Arg-Val(BAM-12P)などのペプチド結合の部位で起こっているからである。

基質として試したタンパク質のうち、ヒストンだけが本酵素によってかなり高い効率で切断された(表4)。本酵素は少なくとも1つのアルギニン残基を含む塩基性アミノ酸対に高い特異性を示すので、そのような塩基性アミノ酸対の含有量が重要である。ヒストンはそのような加水分解可能部位を多く含んでいるが、他のタンパク質性基質にはそのような部位はほとんどあるいは全く含まれていない。これらの結果から、本酵素がある種のタンパク質に対して高い特異性を示すであろうと考えられる。完全精製標品で得られた以上の結果は、以前に部分精製標品で得られた結果と一致している。

#### 4.2.6. MSPの新規性

ゴルジ体を含むタンパク質分泌経路に存在する塩基性アミノ酸対に厳密な特異性を示すセリンプロテアーゼがいくつか報告されている。それらのうちで、Kex2とその関連酵素が最もよく性状が調べられている( Fuller, Brake *et al.* 1989; Hatuszawa, Nagahama *et al.* 1992; Mizuno, Nakamura *et al.* 1989; Shennan, Smeekens *et al.* 1991; Zhou and Lindberg 1993)。しかし、これらの酵素は至適pHを5.5-6.0にもち、 $Ca^{2+}$ イオンを活性に必要とし、本酵素よりかなり大きい分子量をもっている。一方、Cromlishらは、 $Ca^{2+}$ 非存在下で完全な活性を示すセリンプロテアーゼの存在を報告している(Cromlish, Seidah *et al.* 1986)。しかし、この酵素の分子量(169,000-190,000)は本セリンプロテアーゼの分子量とは明確に異なっている。Shenらはウシ副腎コロマフィン顆粒膜よりプロエンケフェリンに対するセリントイプのプロセシングプロテアーゼを部分精製した(Shen, Roberts *et al.* 1989)。この酵素は、分子量や $Ca^{2+}$ 非依存性などの性質が本プロテアーゼと似ている。しかし、Boc-Glu-Lys-Lys-MCAに対する作用は本酵素と異なっており、

別の酵素である。このようにして、今回得られたセリンプロテアーゼはこれまでに報告されているいかなる酵素とも異なっている。

#### 4.2.7. MSPの生理的役割

本酵素の生理的基質は現在のところ不明である。この酵素の塩基性アミノ酸に対する特異性は、プロタンパク質やプロホルモンのプロセッシングに関与している可能性を示している。一方、正しく会合しなかったアシアログリコпротеインレセプターのサブユニットは小胞体で分解されることが報告されている (Amara, Lederkremer *et al.* 1989)。この分解は、プロテアーゼ阻害剤のTLCKやTPCKによって抑制される (Wikstroem and Lodish 1991)。本酵素はTLCKによって強く阻害されることから、小胞体内タンパク質分解に関与しているかもしれない。これに加えて、小胞体やアプレゴルジにおける3-ヒドロキシ-3-メチルグルタルル-CoAレダクターゼ (Chun, Bar-Nun *et al.* 1990)、T細胞抗原レセプター (Stafford and Bonifacino 1991)、リポフォリン1 (Tsao, Ivessa *et al.* 1992)、アポリポプロテインB-100 (Sato, Imanaka *et al.* 1990)、アセチルコリンレセプター (Blount, Smith *et al.* 1990)、アセチルコリンエステラーゼ (Rotundo 1988)などの急速な分解が観察されている。小胞体におけるタンパク質の分解への関与などの本酵素の役割を明らかにするためには、本プロテアーゼの生理的基質が同定されなければならない。

#### 4.2.8. PMSPとMSPとの比較

ブタの肝臓のミクロソーム膜を可溶化してヒドロキシルアパタイトカラムクロマトグラフィーにかけると、PMSP1とPMSP2の2つのプロテアーゼ活性が見いだされた。これらの2種のプロテアーゼ活性はともにカラム溶出後に活性化すること、セリンプロテアーゼであること、およびMSPとほとんど同じMCA基質特異性のパターンを示すことから、PMSPはMSPのブタにおけるアナログであると考えられる。しかし、PMSP1とPMSP2の分子量はゲルろ過によると23 kdであるのに対して、MSP1とMSP2の分子量は32 kdであり、分子量が異なっている。

PMSPの場合には、ヒドロキシルアパタイトカラムクロマトグラフィーにおいて2つのアイソフォームと思われるピークに分かれた(図12)。これら2つのプロテアーゼは分子量や基質特異性などの性質がほぼ一致していた。ラットのMSP1とMSP2はヒドロキシルアパタイトカラムでは分離できず、最後の電気泳動でしか分離できなかった。これらのことから、PMSP1とPMSP2の差異はMSP1とMSP2の差異よりも大きいと思われる。

DFP以外の阻害剤のうちフェナンスロリンによって部分的に阻害されたのは、他のプロテアーゼの混在によるものと思われる。

## 5. 肝マイクロソーム膜結合金属依存性プロテアーゼ

### 5.1. 結果

#### 5.1.1. ラットの肝臓のマイクロソーム膜の金属依存性プロテアーゼの精製

ラットの肝臓を可溶化してヒドロキシルアパタイトカラムとDE52カラムにかけたときにMSPと分離したBoc-Arg-Val-Arg-Arg-MCAを分解する活性を、さらにカラムクロマトグラフィーにかけて精製を行った(図16-20)。その結果、 $Zn^{2+}$ イオンを結合させたキレーティングセファロース6BのステップがDE52について大きな精製度の上昇を示した(表7)。さらに、セファクリルS-200とFPLCのMonoQによって精製を行った。この精製標品をSDS-PAGEにかけたところ、分子量約45 kdの位置に単一のバンドが得られた(図21)。精製過程のセファクリルS-200においても分子量43 kdに相当する位置に溶出しており、これらの結果からこの金属依存性プロテアーゼは45 kdの1本のポリペプチド鎖からなっていると思われる。ヒドロキシルアパタイトカラム後の活性の値を基準にすると、最終的な精製度の上昇は422倍で、活性の回収率は41%であった。

精製された金属依存性プロテアーゼを濃縮・脱塩した後にシーケンサーにかけてN末端のアミノ酸配列を決定した。その結果、 $^1$ Ala-Gln-Pro/Lys-Tyr/Lys-Asp/Asn- $^5$ Tyr-Xxx-Ser-Gln-Ile- $^{10}$ Asp-Ser-Phe-Ser-His- $^{15}$ Leu-Asp-Argという配列が得られた。得られたプロテアーゼの量が微量であったため、またブルロールPXを完全に除去することができなかったために、完全なN末端配列を決定することはできなかった。

#### 5.1.2. 金属依存性プロテアーゼのpH依存性

Boc-Arg-Val-Arg-Arg-MCAに対するラット肝臓マイクロソーム膜金属依存性プロテアーゼ活性のpH依存性を調べたところ、金属イオンの非存在下では本酵素はpH 5.3付近に至適pHを示した(図22)。しかし、 $Co^{2+}$ イオンの存在下ではpH 5.3のほかさらにpH 8.0付近に至適pHを示した。pH 8.0における $Co^{2+}$ イオンによるプロテアーゼの活性化は、 $Co^{2+}$ イオンによってだけ起こり他のイオン( $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$ )によっては起こらなかった。また、pH 5.3においては $Co^{2+}$ イオンによる活性化は見られなかった。

金属イオンの非存在化でのダイノルフィンAに対する本酵素の活性のpH依存性を調べた(図26)。その結果、本酵素の至適pHはMCA基質に対する至適pHとは異なり、ペプチド基質に対してはpH 6.0-7.0付近に単一のピークを示した。BAM-12Pに対する本酵素の活性のpH依存性を調べたところ、pH 6.0-8.0にブロードなピークを示した(図28)。ペプチドに対しては $Co^{2+}$ を加えてもプロテアーゼの活性化は起こらずむしろ阻害的に作用し、至適pHは変化しなかった(図27)。

### 5.1.3. 金属依存性プロテアーゼに対する阻害剤類の効果

ラット肝臓ミクロソーム膜金属依存性プロテアーゼのpH 5.3と $\text{Co}^{2+}$ 存在下pH 8.0での2つの活性が異なる種類のプロテアーゼに属するかを明らかにするために、種々のプロテアーゼ阻害剤や試薬の効果を調べた。このとき酵素の基質としてBoc-Arg-Val-Arg-Arg-MCAを用いた。 $\text{Co}^{2+}$ 存在下pH 8.0におけるプロテアーゼ活性に対しては、EDTAと $\alpha$ -フェナンスロリンだけが強い阻害効果を示し、その他の阻害剤はほとんど効果がなかった(表8)。したがって、pH 8.0における活性はメタロプロテアーゼ活性である。一方、pH 5.3におけるプロテアーゼ活性に対しては、EDTAと $\alpha$ -フェナンスロリンのほかにDFPと $\text{HgCl}_2$ が強い阻害効果を示した。よって、pH 5.3における活性は金属依存性セリンプロテアーゼ活性であると考えられる。

### 5.1.4. メタロプロテアーゼに対する $\text{Co}^{2+}$ イオンの効果

Boc-Arg-Val-Arg-Arg-MCA基質を用いてラット肝臓ミクロソーム膜金属依存性プロテアーゼに対する $\text{Co}^{2+}$ イオンの効果を調べた(図23)。その結果、 $\text{Co}^{2+}$ イオンによる効果は1 mMでプラトーに達し、このときの酵素活性は $\text{Co}^{2+}$ イオンのないときに比べて約6倍になっていた。

### 5.1.5. メタロプロテアーゼに対するEDTAの効果

Boc-Arg-Val-Arg-Arg-MCA基質を用いてラット肝臓ミクロソーム膜金属依存性プロテアーゼに対するEDTAの効果はpH 8.0で調べた(図24)。その結果、50 mM EDTAでこの活性はほとんど阻害され、また $\text{IC}_{50}$ は3 mMであった。

### 5.1.6. ラット肝臓ミクロソーム膜のメタロプロテアーゼ活性と金属依存性セリンプロテアーゼ活性のMCA基質特異性

ラットの肝臓のミクロソーム膜から得られた金属依存性プロテアーゼのMCA基質に対する特異性を、pH 5.3と1 mM  $\text{CoCl}_2$ 存在下pH 8.0の2つの条件で調べた(表9)。その結果、pH 5.3で高い活性を持つ金属依存性セリンプロテアーゼ活性は、Boc-Arg-Val-Arg-Arg-MCAに対して最も高い特異性を示し、さらにBoc-Gln-Arg-Arg-MCA、Boc-Val-Leu-Lys-MCA、Boc-Gly-Lys-Arg-MCAの順に高い特異性を示した。また、 $\text{Co}^{2+}$ 存在下pH 8.0で高い活性を持つメタロプロテアーゼ活性も、Boc-Arg-Val-Arg-Arg-MCAに対して最も高い特異性を示し、さらにBoc-Gln-Arg-Arg-MCA、Boc-Gly-Arg-Arg-MCA、Boc-Gly-Lys-Arg-MCA、Boc-Val-Leu-Lys-MCAの順に高い特異性を示した。これらの結果は、金属依存性セリンプロテアーゼ活性とメタロプロテアーゼ活性が塩基性アミノ酸対に高い特異性を持っていることを示しており、また両者の種々のMCA基質に対する特異性のプロフィールは高い類似性を持っている。



### 5.1.7. ラット肝臓ミクロソーム膜のメタロプロテアーゼ活性と金属依存性セリンプロテアーゼ活性のペプチド性基質に対する特異性

pH 8.0でメタロプロテアーゼ活性の各種生理活性ペプチドに対する作用を調べた(図25)。その結果、BAM-12Pに対してはArg-ArgのCOOH末端側を加水分解した。ダイノルフィンAに対してもArg-ArgのCOOH末端側を加水分解した。ニューロテンシンに対してはArg-Argの間のペプチド結合を加水分解した。 $\alpha$ -ネオエンドルフィンに対してはこのプロテアーゼはほとんど作用しなかった。また、pH 8.0において $\text{Co}^{2+}$ イオン存在下でペプチド性基質に対するメタロプロテアーゼの作用を調べたところ、加水分解するサイトは変わらなかったが、その加水分解速度はむしろ低下した。

pH 5.3における金属依存性セリンプロテアーゼ活性はBAM-12PやダイノルフィンAに対してpH 8.0におけるメタロプロテアーゼと同様にArg-ArgのCOOH末端側を加水分解した。

プロアルブミンペプチドに対しては主にArg-ArgのCOOH末端側を加水分解したが、低い効率ではあるがその1残基COOH末端側のAspのCOOH末端側でも加水分解した(図29)。これら2つの活性は異なるpH依存性を示し、Arg-Aspの間を切断する活性はpH 6.0に、Asp-Alaの間を切断する活性はpH 7.0 - 8.0に最適pHを示した。

### 5.1.8. メタロプロテアーゼ活性のタンパク質性基質に対する作用

pH 8.0におけるメタロプロテアーゼ活性の各種タンパク質性基質に対する作用を調べた(表10)。その結果、この酵素活性はヒストンを最もよく加水分解し、ほかにミオグロビン、BSA、オボアルブミンなどをよく加水分解した。ヒストンに対する高い特異性は、同酵素のMCA基質に対する塩基性アミノ酸対への特異性と一致している。

### 5.1.9. メタロプロテアーゼ活性と金属依存性セリンプロテアーゼ活性の同一分子性

ラットの肝臓のミクロソーム膜から精製されたメタロプロテアーゼ活性と金属依存性のセリンプロテアーゼ活性とが、同一のタンパク質分子に由来しているのかあるいは異なるタンパク質分子に由来しているのかを確かめるために、精製された酵素をさらにFPLCのSuperose 12にかけた(図30)。このクロマトグラフィーにおいて2つのプロテアーゼ活性はほとんど同じ挙動を示した。さらに、精製された酵素をポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけた(図31)。この電気泳動においても2つのプロテアーゼはともに同じ挙動を示した。

精製された金属依存性プロテアーゼに対してpH 5.3でDFPを作用させてセリンプロテアーゼ活性を阻害した後、pH 8.0におけるメタロプロテアーゼ活性を測定したところこの活性は阻害されなかった。

#### 5.1.10. 熱安定性

43°C、pH 8.0におけるこれら2種の酵素活性の熱安定性を調べた(図32)。その結果、初めの5分間で金属依存性セリンプロテアーゼ活性の方がメタロプロテアーゼ活性よりも大きく失活した。10分から、両酵素の活性はほぼ同じ大きさになり、30分まで同様なパターンで活性は減少した。

#### 5.1.11. 細胞内局在と活性化

ラットの肝臓のミクロソーム膜画分をショ糖密度勾配遠心にかけることによって、小胞体とゴルジ体を分離し、いずれの膜画分に酵素が局在しているかを調べた。その結果、金属依存性プロテアーゼは膜を可溶化した後に4°Cで保存しておくことにより大幅に活性化し、特にKCl処理を行った小胞体膜画分に最も高い活性が見られた(図33)。また、この活性化は小胞体膜の場合、膜を可溶化してから1週間後から開始し、16日後に終了した。KCl処理をしたゴルジ体膜画分の活性化は小胞体よりも少し遅く起ったが、KCl処理をしていないゴルジ体画分には全く活性はみられなかった。

KCl処理を行っていない小胞体膜画分を用いて、室温における金属依存性プロテアーゼの活性化を調べた(図34)。その結果、金属依存性プロテアーゼの活性化は4°Cにおける場合よりも早い速度で起った。また、このときDFPを共存させておくと金属依存性プロテアーゼは全く活性化しなかった。

KCl処理を行った小胞体膜画分とゴルジ体膜画分のプロテアーゼ活性の性質を調べた。pH 5.3とpH 8.0における阻害剤の効果は、小胞体とゴルジ体ともにEDTAが最も大きかった(図35, 36)。また、MCA基質特異性はpH 8.0における小胞体膜画分の特異性が完全に精製した金属依存性プロテアーゼの特異性と類似していたが、ゴルジ体膜画分は比較的広い特異性を示し、他のプロテアーゼが共雑している可能性があった(図37, 38)。

小胞体膜とゴルジ体膜を、KCl処理を行ってから1%コール酸ナトリウムと0.15 M NaClを含む10 mMリン酸カリウム緩衝液pH 7.5で可溶化し、それぞれヒドロキシルアパタイトカラムにかけたフラクションを4°Cに保存しておいたが、活性化は起こらなかった。

## 5.2. 考察

### 5.2.1. 金属依存性プロテアーゼの精製

ラットのMSPの精製の過程において、現在まで知られていなかったプロテアーゼ活性を見いだした。このプロテアーゼもMSPと同様に塩基性アミノ酸対に特異性が高いが、MCA基質の中ではBoc-Arg-Val-Arg-Arg-MCAを最もよい基質とした。さらに、本プロテアーゼはpH 8.0で $\text{Co}^{2+}$ イオンで活性化されるメタロプロテアーゼ活性とpH 5.3における金属依存性セリンプロテアーゼ活性の2種のプロテアーゼ活性をもつという特徴があった。したがって、新しいタイプのプロテアーゼである可能性があり、そのためにはまず本酵素の精製が不可欠であった。

### 5.2.2. 金属依存性プロテアーゼのpH依存性

金属依存性プロテアーゼの至適pHは、ペプチド性基質に対しては6.0 - 7.0付近だけであったが、MCA基質に対しては5.3と8.0の2つであった(図22, 26)。MCA基質に対しては金属依存性プロテアーゼの2つの触媒部位の至適pHの幅は狭く、それらの中間のpH 6.0 - 7.0付近では活性は僅少になるが、ペプチド性基質に対しては2つの活性部位の至適pHの幅は広く、それらの中間のpHでは両方の活性部位が触媒を行うために、それらの活性が重なりあってpH 6.0 - 7.0の広い範囲の至適pHを示すと考えられる。このように単一の酵素が異なる基質に対して異なるpH依存性を示したり、2つの至適pHを示したりすることは珍しいことではない(Estivariz, Friedman *et al.* 1992)。生理的には本酵素はペプチドやタンパク質を切断していると考えられるので、生体内での至適pHは6.0 - 7.0であると思われる。そのような条件を考慮すると、本プロテアーゼは小胞体からゴルジ体へ亘って機能していると考えられる。

### 5.2.3. 金属依存性プロテアーゼに対する阻害剤類の効果

金属依存性プロテアーゼは、pH 5.3とpH 8.0とで全く異なるパターンでの阻害剤による影響を受けた。pH 8.0においては本酵素の活性は金属キレーターによってのみ強く阻害された。一方、pH 5.3においてはこのプロテアーゼの活性は金属キレーターによって阻害されるだけでなく、セリンプロテアーゼの阻害剤によっても強く阻害され、金属依存性セリンプロテアーゼ活性を持っていると考えられた。この金属依存性セリンプロテアーゼ活性は、トリプシンインヒビターによっても阻害され、これは本酵素がトリプシン様活性を持つことと一致している。また、セリンプロテアーゼ活性はシステインプロテアーゼの阻害剤によっても部分的に阻害されたので、この酵素のセリンプロテアーゼの活性部位の近傍に重要なチオール基が存在しているのかもしれない。また、pH 5.3における活性は種々の金属イオンを加えても変化しなかったし、またEDTAを加えた後にさらに金属イオンを加えても活性は回復しなかったので、このセリンプロテアー

ゼ活性は活性に必須な金属イオンを内部に含んでいると思われる(data not shown)。

#### 5.2.4. 金属依存性プロテアーゼの基質特異性

金属依存性プロテアーゼはアルギニン残基を含む塩基性アミノ酸対に高い特異性を示し、天然に存在するペプチド基質の場合には切断は塩基性アミノ酸対のCOOH末端側で主に起こり、それよりもずっと低い効率で塩基性アミノ酸の間で起こった。ペプチド基質の中で単一で存在する塩基性アミノ酸の部位で加水分解が起こることは全くなかった。さらに、加水分解は塩基性アミノ酸対の中のアルギニン残基のCOOH末端側においてのみ起き、リシンのCOOH末端側では起きなかった。これらの結果より、本酵素の基質結合部位 $S_1$ は $P_1$ 残基としてアルギニンしか許容しない。本酵素はBoc-Gln-Arg-Arg-MCAやBoc-Leu-Thr-Arg-MCAのようなトリペプチドMCAは高い効率で加水分解するが、Bz-Arg-MCAやBz-Arg-Arg-MCAのようなアミノ酸MCAやジペプチドMCAは加水分解しないから、 $S_1 \sim S_3$ が占有されることがペプチドの加水分解のために必要であると思われる。したがって、基質の $P_2$ と $P_3$ 残基を認識する $S_2$ と $S_3$ の基質認識部位も酵素活性にとって重要であると考えられる。基質結合部位 $S_2$ は、ArgやLeuを好み、ProやGlyやThrはあまり好まれなかった。基質結合部位 $S_3$ は、ValやGlnやGlyを好み、Leuはあまり好まれなかった。さらに本プロテアーゼの基質結合部位 $S_4$ も活性に影響を与えており、Argを好んでいるようである。また、基質結合部位 $S_5$ についてもかなり広い特異性が示唆されている。というのも、加水分解がArg-Ile (ダイノルフィンA)、Arg-Val (BAM-12P)、Arg-Arg (ニューロテンシン)などのペプチド結合の部位で起こっているからである。

ただし、プロアルブミンペプチドに対しては本酵素は塩基性アミノ酸対のCOOH末端側だけでなく、そこから1残基COOH末端側のAsp-Alaのペプチド結合を低い効率で加水分解したが、これは上記の特異性からははずれており、この加水分解については他の原因があるのかもしれない。

タンパク質に対する金属依存性プロテアーゼの基質特異性を調べたところ、ヒストンだけが本酵素によってかなり高い効率で切断された(表10)。本酵素は少なくとも1つのアルギニン残基を含む塩基性アミノ酸対に高い特異性を示すので、そのような塩基性アミノ酸対の含有量が重要である。ヒストンはそのような加水分解可能部位を多く含んでいるが、他のタンパク質性基質にはそのような部位はあまり含まれていない。これらの結果から、本酵素がある種のタンパク質に対して高い特異性を示すであろうと考えられる。

#### 5.2.5. メタロプロテアーゼ活性と金属依存性セリンプロテアーゼ活性の同一分子性

精製された金属依存性プロテアーゼには、メタロプロテアーゼ活性と金属依存性セリンプロテアーゼ活性があった。この2つの活性はFPLC MonoQやポリアクリルアミドゲル電気泳動に

よって分離することはできなかった。また、精製の過程においてもこれら2つの活性はほぼ同じ挙動を示した。SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動においてもたゞ1本のバンドしか認められなかったことから、これら2つの活性部位が同一のポリペプチド鎖上に存在する可能性がある。DFPによって金属依存性セリンプロテアーゼ活性を抑制してもメタロプロテアーゼ活性は抑制されないことから、これらの2つの活性部位は異なる位置にあるものと考えられた。しかし、DFPがセリン残基以外にチロシン残基などと結合することもあるので、厳密にセリンプロテアーゼ活性部位とメタロプロテアーゼ活性部位の2つの触媒部位があることを示すためには、実際にDFPがセリン残基と結合していることを確かめる必要がある。その上で、DFPが金属依存性プロテアーゼと結合する比率と本酵素の活性の減少とがストイキオメトリックに一致していることを確かめる必要がある。現在のところ、これら2つの活性が分子量や性質が非常によく似た2つの酵素分子が混在することによって現れていて、調べた範囲内の各種のクロマトグラフィーにおいて分離することができなかっただけである可能性もまだ残っており、そのような可能性を完全に否定することはできない。

#### 5.2.6. 金属依存性プロテアーゼの新規性

小胞体やゴルジ体などのタンパク質輸送経路に存在する塩基性アミノ酸に特異性の高い金属依存性プロテアーゼがいくつか報告されている。Kex2とその関連酵素は、今回見出した金属依存性プロテアーゼの2種類の活性のうち金属依存性セリンプロテアーゼ活性との類似が考えられる。しかし、Kex2関連プロテアーゼは本酵素よりかなり大きい分子量を持っている点で異なっている。また、Brennanらが見出したCa<sup>2+</sup>依存性Kex2様プロテアーゼも本酵素と類似しているが(Brennan and Peach 1988)、Brennanらの酵素の活性は、EDTAによる阻害の後Ca<sup>2+</sup>を加えることによって回復するが、本酵素ではそのような活性の回復が見られないことから、本プロテアーゼとは異なると考えられる。一方、Kawabataらがウサギの肝臓のミクロソーム膜から精製したメタロプロテアーゼは、金属依存性プロテアーゼの2種類の活性のうちメタロプロテアーゼ活性と類似している(Kawabata and Davie 1992)。彼らの酵素もCo<sup>2+</sup>によって活性化され、Arg-X-Arg配列に特異性が高いが、分子量が69,000であり、本酵素の分子量と大きく異なっており、これらは同一の酵素ではないと考えられる。したがって、今回得られた酵素はこれまでに報告されているいかなる酵素とも異なっている。

#### 5.2.7. 金属依存性プロテアーゼの細胞内局在

ショ糖密度勾配遠心によってミクロソーム画分を小胞体とゴルジ体に分離して、金属依存性プロテアーゼの局在を調べたところ、このプロテアーゼは小胞体とゴルジ体の両方の画分に存在していた。本プロテアーゼはpH 8.0とpH 5.3の2つの至適pHをもっており、小胞体とゴルジ体

の両方で機能していると考えられる。

#### 5.2.8. 金属依存性プロテアーゼのヒドロキシルアパタイトカラム溶出後の活性化

ミクソソーム膜を可溶化した場合、金属依存性プロテアーゼの活性化はDFP、キモスタチン、およびTPCKによって強く抑制された。またさらに、このプロテアーゼの活性は初めの6日間はほとんど変化せず、7日目から活性化が始まった。なおかつ、この活性化は温度を上げることによって大幅に早めることができた。したがって、金属依存性プロテアーゼの活性化には他のキモトリプシン様セリンプロテアーゼが関与していると思われる。金属依存性プロテアーゼの活性化は、 $\text{Ca}^{2+}$ を共存させておくことによって促進された。したがって、金属依存性プロテアーゼの活性化には、 $\text{Ca}^{2+}$ 依存性キモトリプシン様セリンプロテアーゼが関与している可能性がある。

KCl処理を行った小胞体と行っていない小胞体では可溶化によってともに金属依存性プロテアーゼが活性化してきた。これに対して、KCl処理を行ったゴルジ体では可溶化によって同プロテアーゼが活性化してきたが、KCl処理を行っていないゴルジ体では活性化はほとんど起こらなかった。したがって、ゴルジ体においては金属依存性プロテアーゼに対する阻害剤、あるいは金属依存性プロテアーゼを活性化するセリンプロテアーゼに対する阻害剤が存在している可能性がある。

#### 5.2.9. 金属依存性プロテアーゼと金属イオン

金属依存性プロテアーゼは、 $\text{Zn}^{2+}$ イオンを結合したキレーティングセファロース6Bによって精製されてくることから、メタロプロテアーゼ活性の活性中心には $\text{Zn}^{2+}$ イオンがあるものと予想される。しかし、この金属依存性プロテアーゼ中にいかなる金属イオンが含まれているか、またその原子数を決定するためには精製されたプロテアーゼを用いて原子吸光分析を行う必要がある。

メタロプロテアーゼ活性は $\text{Co}^{3+}$ イオンによって活性化されるが、このような現象はKawabataらが精製したMEPについても観察されている(Kawabata and Davie 1992)。 $\text{Co}^{3+}$ イオンによる活性化は、エンドプロテアーゼよりもエキソプロテアーゼで数多く報告されている。ロイシンミノペプチダーゼはそのうちの代表的なエキソペプチダーゼであり、X線結晶構造解析によって立体構造も決定されている(Thompson and Carpenter 1976; Burley, David et al. 1990; Burley, David et al. 1992)。

## 6. 総合考察

### 6.1. 生理的役割

小胞体やゴルジ体に存在しているタンパク質のうち、プロテアーゼによる分解を受けるものは、分泌性タンパク質の前駆体と異常なタンパク質である。分泌性タンパク質の前駆体の分解は限定的に起こるが、異常なタンパク質の分解は段階的に急速に起こる (Klausner and Sitia 1990)。このような急速な分解を受けるものには、T細胞抗原レセプター (TCR; Shin, Lee *et al.* 1993; Wileman, Carson *et al.* 1990)、H2bアシアログリコプロテインレセプター (Amara, Lederkremer *et al.* 1989)、およびIg κ軽鎖 (Gardner, Aviel *et al.* 1993)等が知られている。Ig κ軽鎖の分解は3,4-dichloroisocoumarin(セリンプロテアーゼ阻害剤)によって強く抑制される。また、アシアログリコプロテインレセプターの分解はTLCKとTPCKによって阻害される (Wikstroem and Lodish 1991; Wikstroem and Lodish 1993)。今回精製したプロテアーゼのうちMSPはセリンプロテアーゼであり、またTLCKによって阻害されることから、MSPが小胞体内タンパク質分解に関与している可能性がある。小胞体やプレゴルジにおける急速な分解は、さらに3-ヒドロキシ-3-メチルグルタルル-CoAレダクターゼ (Chun, Bar-Nun *et al.* 1990)、リボフォリン (Tsao, Ivessa *et al.* 1992)、アポリポプロテインB-100 (Sato, Imanaka *et al.* 1990)、アセチルコリンレセプター (Blount, Smith *et al.* 1990)、アセチルコリンエステラーゼ (Rotundo 1988)、チトクロームP-450 (Ronis, Johansson *et al.* 1991)などのタンパク質でも観察されている。これらのタンパク質がどのような部位で加水分解されているのかは現在のところ不明である。しかし、MSPとメタロプロテアーゼ活性は比較的高いpHに至適pHをもち、小胞体におけるタンパク質分解に関与している可能性は高い。逆に、pHが低いゴルジ体や分泌顆粒中ではMSPはほとんど活性を持つことはできないし、またメタロプロテアーゼ活性もほとんどなくなり、金属依存性セリンプロテアーゼ活性だけが残る。したがって、金属依存性プロテアーゼの場合、小胞体ではメタロプロテアーゼ活性が作用し、ゴルジ体や分泌顆粒に移動した後は金属依存性セリンプロテアーゼ活性が働く可能性がある。ただし、金属依存性プロテアーゼ活性のうちメタロプロテアーゼ活性は $\text{Co}^{2+}$ の非存在下での活性はかなり弱いために、小胞体などにおける作用は考えにくい。TCRの $\alpha$ 鎖の分子的な研究から、小胞体における急速な分解のシグナルが、1つしかない膜貫通領域にあることがわかった (Bonifacino, Suzuki *et al.* 1990)。TCR  $\beta$ 鎖に関する同様な研究からは、分解のためのシグナルがCOOH末端付近の膜貫通領域と短い細胞質領域にあることがわかった (Bonifacino, Cosson *et al.* 1990)。TCRの $\alpha$ 鎖と $\beta$ 鎖の膜貫通領域はそれぞれ2残基と1残基の塩基性アミノ酸を有している点が特徴的であり、TCR  $\alpha$ 鎖をもつキメラタンパク質の変異解析より、これらの塩基性アミノ酸残基が急速な分解に必須であることがわかった。したがって、これらの小胞体膜結合タンパク質の膜貫通領域に存在する塩基性アミノ酸を認識して、急速な分解の

端緒を開くプロテアーゼの存在が考えられる。今回精製したプロテアーゼは、膜に結合しており、塩基性アミノ酸に特異性が高いことから、このような急速分解に関与している可能性がある。また、Uradeらが1992年に報告したER-60プロテアーゼもこのような分解に関与しているかもしれない(Urade, Nasu *et al.* 1992; Urade and Kito 1992)。

また、生合成されたばかりの前駆体タンパク質のプロセッシングを行っているプロテアーゼとして、高等動物においてはfurin (Roebroek, Schalken *et al.* 1986; van den Ouweland, van Duijnhoven *et al.* 1990), PC2 (Smeekens and Steiner 1990), PC1/3 (Korner, Chun *et al.* 1991; Nakayama, Hosaka *et al.* 1991; Smeekens and Steiner 1990), PC4 (Nakayama, Kim *et al.* 1992), PC5 (Lusson, Vieau *et al.* 1993), PC6 (Nakagawa, Hosaka *et al.* 1993), MEP(ウサギ肝臓ミクロソーム、(Kawabata, Nakagawa *et al.* 1993))などがクロニングされている。これらの中でfurinについてはプロアルブミンや補体C3の前駆体を正しく切断することが示されている (Misumi, Oda *et al.* 1991)。furinは基質の切断部位の-6位から+1位までを認識しており、その基質特異性はかなり狭いといえる(Hosaka, Nagahama *et al.* 1991; Watanabe, Murakami. *et al.* 1993; Watanabe, Nakagawa *et al.* 1992)。これに対して、本研究で性状を調べたMSPもプロアルブミンのプロセッシング部位を正しく切断し、塩基性アミノ酸に高い特異性を示しプロセッシングに関与していると思われる。Arg-X-X-Argのようなプロセッシング部位をもつものには、血漿タンパク質である血液凝固因子や補体系タンパク質、インシュリンレセプターなどの膜タンパク質などの前駆体があり (Hatsuzawa, Hosaka *et al.* 1990)、これらの前駆体タンパク質をMSPがプロセッシングする可能性がある。これとは別に、最近細胞間の情報伝達物質であるヘレグリン(Holmes, Sliwkowski *et al.* 1992)、Neu differentiation factor(Wen, Peles *et al.* 1992)、Glial growth factor(Marchionni, Goodearl *et al.* 1993)、ARIA(Falls, Rosen *et al.* 1993)など単離されたが、これらは全て膜貫通ドメインのN末端側にある塩基性アミノ酸対の部位でプロセッシングを受ける。したがって、MSPがこれらの情報伝達物質の前駆体のプロセッシングを行っている可能性も予想される。

また、furin等が小胞体における急速な分解を担っている可能性もある。しかし、小胞体のCa<sup>2+</sup>を除去するとTCRのβ鎖とδ鎖が急速に分解されるようになり、furinはCa<sup>2+</sup>を必要とするためにこの小胞体内タンパク質分解に関与していないと考えられる(Wileman, Kane *et al.* 1991)。したがって、Ca<sup>2+</sup>非依存性のプロテアーゼであるMSPなどが関与している可能性の方が高いように思われる。

MSPの場合には、ラットの肝臓以外にブタの肝臓のミクロソーム膜にも性質のよく似たプロテアーゼが見出された。ラットとブタとでは酵素の分子量は異なっていたが、その性質は非常によく似ており互いにアナログであると思われた。しかし、金属依存性プロテアーゼはブタの肝臓では見出されなかった。ブタの肝臓には金属依存性プロテアーゼが本当に存在していないのか、あるいは単に活性化しなかっただけなのかについてはさらに検討が必要である。



## 6.2. ミクロソーム膜プロテアーゼ類の活性化

MSPと金属依存性プロテアーゼはともに4°Cで保存している間に活性が顕著に上昇した。MSPの場合には活性の上昇はヒドロキシルアパタイトカラム溶出後5日程で終了したが、金属依存性プロテアーゼの場合にはヒドロキシルアパタイトカラム溶出後あるいはミクロソーム膜の可溶化後7日目から活性が上昇し始め16日目で活性化は終了した。このような活性化に要する時間の差異は、これら2種のプロテアーゼの活性化の原因が必ずしも同一ではないことを示していると思われる。

ヒドロキシルアパタイトカラムから溶出したフラクションに各種の阻害剤を入れて効果を調べたところ、 $\alpha$ -フェナンスロリンがMSPの活性化を強く抑制した。しかし、場合によってはE-64やキモスタチンが活性化を抑制することもあった(data not shown)。このように、MSPの活性化にはプロテアーゼが関与していることが考えられるが、どのようなプロテアーゼが関与しているかは明確ではない。MSPが活性化してくるフラクションに他のプロテアーゼ活性を見出すことはできなかった。もしMSPを活性化するプロテアーゼがあるならばそのプロテアーゼの特異性は狭くMSPなどのプロセッシングのみを行っていると思われる。生体内において不要なタンパク質が蓄積した場合に、MSPと金属依存性プロテアーゼがともに特異的プロセッシングプロテアーゼによって活性化されるような、タンパク質分解のためのプロテアーゼのカスケードの一部として機能している可能性がある。また、ミクロソーム膜を調製する際に、KCl処理とEDTA処理を行って膜を洗うが、この操作を省略するとヒドロキシルアパタイトカラム溶出後にMSPの活性化は起こらなかった。小胞体膜の表面にはリボソームなどが $Mg^{2+}$ を介してネットワークを形成しており、EDTAは $Mg^{2+}$ を除去することによってこのリボソームを膜から遊離させる作用がある。このネットワークは小胞体の外側にあるが、EDTAによって膜を洗わなかった場合、このネットワークが膜プロテアーゼの可溶化を阻害するのかもしれない。また、小胞体の内部には $Ca^{2+}$ によってクロスリンクされたタンパク質のマトリックスがある(Booth and Koch 1989; Koch 1987; Sambrook 1990)。EDTA処理によって $Ca^{2+}$ を除去するとこのマトリックスが解体されてプロテアーゼが遊離し、基質との相互作用が可能になる。このようなタンパク質マトリックスの一部にMSPが組み込まれて通常は活性が抑制されており、何らかの刺激によってプロテアーゼがこのマトリックスから遊離して活性を発現するようになるという活性制御メカニズムが考えられる。

ミクロソーム膜を可溶化した場合、金属依存性プロテアーゼの活性化には他の $Ca^{2+}$ 依存性キモトリプシン様セリンプロテアーゼが関与していると思われる。このセリンプロテアーゼはMSPではないと思われる。というのは、MSPにはキモトリプシン様活性はないからであり、さらに、可溶化したミクロソーム膜画分においてMSPの活性化が起こらない場合でも金属依存性プロテアーゼの活性化が起きたからである。

### 6.3. 本研究の意義

これまでにホルモンや血漿タンパク質の前駆体をプロセッシングするプロテアーゼの部分精製が試みられ続けてきた。例えば、ミクロソーム膜に存在するプロセッシング酵素(Danielsen, Noren *et al.* 1983)、顎下腺にあるプロレニンプロセッシング酵素(Kim, Hatsuzawa *et al.* 1990)、POMCをプロセッシングするアスパラギン酸プロテアーゼ(Loh, Parish *et al.* 1985)、プロバラサイドホルモンのプロセッシング酵素(MacGregor, Chu *et al.* 1976)、神経下垂体分泌顆粒の塩基性アミノ酸対特異的酵素(Rouille, Spang *et al.* 1992)、プロエンケファリンのプロセッシング酵素(Shen, Roberts *et al.* 1989)、腎プロレニンプロセッシング酵素(Shinagawa, Do *et al.* 1990)、ソマトスタチン-28転換酵素(Gluschankof, Gomez *et al.* 1987; Gomez, Gluschankof *et al.* 1985)、副腎髄質の塩基性アミノ酸対特異的プロテアーゼ(Maret and Fauchere 1988)、プロオシトシン/ニューロフィジン転換酵素(Plevrakis, Clamagirand *et al.* 1989)、インシュリン分泌顆粒のプロテアーゼ(Rhodes, Brennan *et al.* 1989)、ソマトスタチン-28を産生するアスパラギン酸プロテアーゼ(Mackin, Noe *et al.* 1991)、インターロイキン $1\beta$ をプロセッシングするシステインプロテアーゼ(Thornberry, Bull *et al.* 1992)、脳下垂体分泌顆粒のシステインとアスパラギン酸プロテアーゼ(Toomim and Hook 1992)、プロシリンシユリンをプロセッシングするシステインプロテアーゼ(Docherty, Carroll *et al.* 1982)などがある。そのような研究によって数多くのプロテアーゼの存在が示唆されてきた。しかし、これらのプロセッシングプロテアーゼのほとんどがその性状について調べられただけで終わっており、完全に精製されて部分一次構造が明らかにされた例はまれであった。ごく最近になってはじめて酵母の遺伝子のKex2が $\alpha$ 接合因子をプロセッシングすることがわかってきた(Julius, Brake *et al.* 1984)。このKex2の遺伝子とホモロジーのある遺伝子の配列が哺乳類において見出された。これらの遺伝子がコードするプロテアーゼの性状や局在については多くの研究がなされた。しかし、先に研究されてきたようなKex2とは異なる性質を持つプロテアーゼが多数存在していることも事実である。これらの依然明確にアイデンティファイされていないプロテアーゼ群が複雑な調節を受けて生理的に重要な分泌性タンパク質のプロセッシングを行うことによって生体のホメオスタシスを保っていると考えられる。

したがって、小胞体やゴルジ体を含むミクロソーム内でのプロセッシングや分解についてはやっとならそその一端明らかになり始めただけにすぎない。本研究で精製したプロテアーゼも、我々の研究室で初めて見出されたものであり、まだまだ未知のプロテアーゼが存在していることを暗示している。特に、本研究で報告したプロテアーゼは $Ca^{2+}$ を必要としない点がKex2様プロテアーゼと大きく異なっている。また、本酵素の基質特異性も塩基性アミノ酸対のCOOH末端以外の部位も切断することができる点がKex2様プロテアーゼとは異なっている。このような新規なプロテアーゼを完全に精製しその性質を詳細に検討した意義は大きいと思われる。

また、今回報告した2つのプロテアーゼのうち金属依存性プロテアーゼは、セリンプロテアー

ゼ活性とメタロプロテアーゼ活性の2つ触媒部位をもっている可能性がある。これまでに異なるクラスのプロテアーゼの触媒部位が1本のポリペプチド鎖上に存在していたという報告はなく、このようなプロテアーゼが果たす役割について非常に興味を持たれる。また、進化的な意味においても、いかなる遺伝子の融合によって生じたのかは非常に興味深い。

## 7. 結論

ラットの肝臓のミクロソーム膜より塩基性アミノ酸対に特異性の高い2種のプロテアーゼについて精製と性状検索を行った。MSPについては完全精製を行うことができ、その結果中性付近に至適pHをもつセリンプロテアーゼであり、ペプチドやMCAを用いた基質特異性の検索の結果、塩基性アミノ酸対のCOOH末端側に高い特異性を示した。また、金属依存性プロテアーゼについても完全精製することができた。このプロテアーゼは、pH 5.3とpH 8.0の2つの至適pHをもち、pH 5.3ではセリンプロテアーゼ活性を示し、pH 8.0ではメタロプロテアーゼ活性を示した。pH 8.0でのメタロプロテアーゼ活性は $\text{Co}^{2+}$ によって活性化された。このプロテアーゼも塩基性アミノ酸対に対して高い特異性を示したが、切断部位は塩基性アミノ酸対のCOOH末端側と中間とさらに塩基性アミノ酸対のCOOH末端側に1残基離れたペプチド結合であった。MSPと金属依存性プロテアーゼは、その基質特異性から何らかの前駆体タンパク質のプロセッシングを行っている可能性が示唆された。このほかに、これらのプロテアーゼは小胞体における急速なタンパク質の分解を担っている可能性もある。これら2種のプロテアーゼはミクロソーム膜を可溶化した後にともに活性化されるという特徴があった。いずれの場合にも活性化には何らかのプロテアーゼが関与しているようである。

## 参考文献

- Amara, J. F., Lederkremer, G. and Lodish, H. F. (1989) Intracellular degradation of unassembled asialoglycoprotein receptor subunits: A pre-Golgi, nonlysosomal endoproteolytic cleavage. *J. Cell Biol.* **109**, 3315-3324
- Baker, R. K. and Lively, M. O. (1987) Purification and characterization of hen oviduct microsomal signal peptidase. *Biochemistry* **26**, 8561-8567
- Barr, P. J. (1991) Mammalian subtilisins: The long-sought dibasic processing endoproteases. *Cell* **66**, 1-3
- Barrett, A. J. (1972) A new assay for cathepsin B1 and other thiol proteinases. *Anal. Biochem.* **47**, 280-297
- Barrett, A. J. (1980) Fluorimetric assays for cathepsin B and cathepsin H with methylcoumarylamide substrates. *Biochem. J.* **187**, 909-912
- Barrett, A. J. and Kirshke, H. (1981) Cathepsin B, cathepsin H, and cathepsin L. *Methods Enzymol.* **80**, 535-561
- Berger, E. A. and Shooter, E. M. (1977) Evidence for pro- $\beta$ -nerve growth factor, a biosynthetic precursor  $\beta$ -nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **74**, 3647-3651
- Beynon, R. J., Shannon, J. D. and Bond, J. S. (1981) Purification and characterization of a metallo-endoproteinase from mouse kidney. *Biochem. J.* **199**, 591-598
- Bloomquist, B. T., Eipper, B. A. and Mains, R. E. (1991) Prohormone-converting enzymes: Regulation and evaluation of function using antisense RNA. *Mol. Endocrinol.* **12**, 2014-2024
- Blount, P., Smith, M. M. and Merlie, J. P. (1990) Assembly intermediates of the mouse muscle nicotinic acetylcholine receptor in stably transfected fibroblasts. *J. Cell Biol.* **111**, 2601-2611

- Boehni, P. C., Deshaies, R. J. and Schekman, R. W. (1988) *SEC11* is required for signal peptide processing and yeast cell growth. *J. Cell Biol.* **106**, 1035-1042
- Bond, J. S. and Butler, P. E. (1987) Intracellular proteases. *Ann. Rev. Biochem.* **56**, 333-364
- Bonifacino, J. S., Cosson, P. and Klausner, R. D. (1990) Colocalized transmembrane determinants for ER degradation and subunit assembly explain the intracellular fate of TCR chains. *Cell* **63**, 503-513
- Bonifacino, J. S., Suzuki, C. K. and Klausner, R. D. (1990) A peptide sequence confers retention and rapid degradation in the endoplasmic reticulum. *Science* **247**, 79-82
- Booth, C. and Koch, G. L. E. (1989) Perturbation of cellular calcium induces secretion of luminal ER proteins. *Cell* **59**, 729-737
- Bostian, K. A., Elliot, O., Bussey, H., Burn, V., Simth, A. and Tipper, D. J. (1984) Sequence of the prepro-toxin dsRNA gene of type 1 killer yeast: multiple processing events produce a two-component toxin. *Cell* **36**, 741-751
- Bourdais, J., Pierotti, A. R., Boussetta, H., Barre, N., Devilliers, G. and Cohen, P. (1991) Isolation and functional properties of an arginine-selective endoprotease from rat intestinal mucosa. A putative prosomatostatin convertase. *J. Biol. Chem.* **266**, 23386-23391
- Brennan, S. O. and Peach, R. J. (1988) Calcium-dependent Kex2-like protease found in hepatic secretory vesicles converts proalbumin to albumin. *FEBS Lett.* **229**, 167-170
- Bresnahan, P. A., Leduc, R., Thomas, L., Thorner, J., Gibson, H. L., Brake, A. J., Barr, P. J. and Thomas, G. (1990) Human fur gene encodes a yeast Kex2-like endoprotease that cleaves pro- $\beta$ -NGF in vivo. *J. Cell Biol.* **111**, 2851-2859
- Bristol, J. A., Furie, B. C. and Furie, B. (1993) Propeptide processing during factor IX biosynthesis. Effect of point mutations adjacent to the propeptide cleavage site. *J. Biol. Chem.* **268**, 7577-7584
- Burley, S. K., David, P. R., Taylor, A. and Lipscomb, W. N. (1990) Molecular structure of leucine

aminopeptidase at 2.7-Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 6878-6882

Burley, S. K., David, P. R., Sweet, R. M., Taylor, A. and Lipscomb, W. N. (1992) Structure determination and refinement of bovine lens leucine aminopeptidase and its complex with bestatin. *J. Mol. Biol.* **224**, 113-140

Chun, K. T., Bar-Nun, S. and Simoni, R. D. (1990) The regulated degradation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase requires a short-lived protein and occurs in the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **265**, 22004-22010

Cromlish, J. A., Seidah, N. G. and Chretien, M. (1986) A novel serine protease (IRCM-serine protease 1) from porcine neurointermediate and anterior pituitary lobes. Isolation, polypeptide chain structure, inhibitor sensitivity, and substrate specificity with fluorogenic peptide substrates. *J. Biol. Chem.* **261**, 10850-10858

Dalbey, R. E. and von Heijne, G. (1992) Signal peptidases in prokaryotes and eukaryotes - a new protease family. *TIBS* **17**, 474-478

Danielsen, E. M., Noren, O. and Sjostrom, H. (1983) Biosynthesis of intestinal microvillar proteins: processing of aminopeptidase N by microsomal membranes. *Biochem. J.* **212**, 161-165

Davidson, H. W., Rhodes, C. J. and Hutton, J. C. (1988) Intraorganellar calcium and pH control proinsulin cleavage in the pancreatic beta cell via two distinct site-specific endopeptidases. *Nature* **333**, 93-96

Devault, A., Lazure, C., Nault, C., Le Moual, H., Seidah, N. G., Chretien, M., Kahn, P., Powell, J., Mallet, J., Beaumont, A., Roques, B. P., Crine, P. and Boileau, G. (1987) Amino acid sequence of rabbit kidney neutral endopeptidase 24.11 (enkephalinase) deduced from a complementary DNA. *EMBO J.* **6**, 1317-1322

Docherty, K., Carroll, R. J. and Steiner, D. F. (1982) Conversion of proinsulin to insulin: Involvement of a 31,500 molecular weight thiol protease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 4613-4617

Docherty, K., Rhodes, C. J., Taylor, N. A., Shennan, K. I. J. and Hutton, J. C. (1989) Proinsulin endopeptidase substrate specificities defined by site-directed mutagenesis of proinsulin. *J. Biol. Chem.* **264**, 18335-18339

Estivariz, F. E., Friedman, T. C., Chikuma, T. and Loh, Y. P. (1992) Processing of adrenocorticotropin by two proteases in bovine intermediate lobe secretory vesicle membranes. A distinct acidic, tetrabasic residue-specific calcium-activated serine protease and a PC2-like enzyme. *J. Biol. Chem.* **267**, 7456-7463

Falls, D. L., Rosen, K. M., Corfas, G., Lane, W. S. and Fischbach, G. D. (1993) ARIA, a protein that stimulates acetylcholine receptor synthesis, is a member of the neu ligand family. *Cell* **72**, 801-815

Fisher, J. M. and Scheller, R. H. (1988) Prohormone processing and the secretory pathway. *J. Biol. Chem.* **263**, 16515-16518

Foster, D. C., Holly, R. D., Sprecher, C. A., Walker, K. M. and Kumar, A. A. (1991) Endoproteolytic processing of the human protein C precursor by the yeast Kex2 endopeptidase coexpressed in mammalian cells. *Biochemistry* **30**, 367-372

Fuller, R., Brake, A. and Thorne, J. (1989) Yeast prohormone processing enzyme (KEX2 gene product) is a Ca-dependent serine protease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 1434-1438

Gardner, A. M., Aviel, S. and Argon, Y. (1993) Rapid degradation of an unassembled immunoglobulin light chain is mediated by a serine protease and occurs in a pre-Golgi compartment. *J. Biol. Chem.* **268**, 25940-25947

Geller, D. M., Judah, J. D. and Nicholls, M. R. (1972) Intracellular distribution of serum albumin and its possible precursors in rat liver. *Biochem. J.* **127**, 865-874

Gluschkof, P., Gomez, S., Morel, A. and Cohen, P. (1987) Enzymes that process somatostatin precursors: a novel endopeptidase that cleaves before the arginine-lysine doublet is involved in somatostatin-28 convertase activity of rat brain cortex. *J. Biol. Chem.* **262**, 9615-9620



- Gomez, S., Gluschkof, P., Morel, A. and Cohen, P. (1985) The somatostatin-28 convertase of rat brain cortex is associated with secretory granule membranes. *J. Biol. Chem.* **260**, 10541-10545
- Gross, D. J., Villa-Komaroff, L., Kahn, C. R., Weir, G. C. and Halban, P. A. (1989) Deletion of a highly conserved tetrapeptide sequence of the proinsulin connecting peptide (C-peptide) inhibits proinsulin to insulin conversion by transfected pituitary corticotroph (AtT20) cells. *J. Biol. Chem.* **264**, 21486-21490
- Harris, R. B. (1989) Processing of pro-hormone precursor proteins. *Archiv. Biochem. Biophys.* **275**, 315-333
- Hatsuzawa, K., Hosaka, M., Nakagawa, T., Nagase, M., Shoda, A., Murakami, K. and Nakayama, K. (1990) Structure and expression of mouse furin, a yeast Kex2-related protease. Lack of processing of coexpressed prorenin in GH<sub>4</sub>C<sub>1</sub> cells. *J. Biol. Chem.* **265**, 22075-22078
- Hatsuzawa, K., Nagahama, M., Takahashi, S., Takada, K., Murakami, K. and Nakayama, K. (1992) Purification and characterization of Furin, a Kex2-like processing endoprotease, produced in chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* **267**, 16094-16099
- Hawlicscek, G., Schneider, H., Schmidt, B., Tropschug, M., Hartl, F.-U. and Neupert, W. (1988) Mitochondrial protein import: identification of processing peptidase and of PEP, a processing enhancing protein. *Cell* **53**, 795-806
- Herbert, E. and Uhler, M. (1982) Biosynthesis of polyprotein precursors to regulatory peptides. *Cell* **30**, 1-2
- Hinman, M. B. and Herbert, E. (1980) Processing of the precursor of adrenocorticotrophic hormone and  $\beta$ -lipotropin in monolayer cultures of mouse anterior pituitary. *Biochemistry* **19**, 5395-5402
- Holmes, W. E., Sliwkowski, M. X., Akita, R. W., Henzel, W. J., Lee, J., Park, J. W., Yansura, D., Abadi, N., Raab, H., Lewis, G. D., Shepard, H. M., Kuang, W.-J., Wood, W. I., Goeddel, D. V. and Vandlen, R. L. (1992) Identification of heregulin, a specific activator of p185<sup>erbB2</sup>. *Science* **256**, 1205-1210
- Hosaka, M., Nagahama, M., Kim, W.-S., Watanabe, T., Hatsuzawa, K., Ikemizu, J., Murakami, K. and

- Nakayama, K. (1991) Arg-X-Lys/Arg-Arg motif as a signal for precursor cleavage catalyzed by furin within the constitutive secretory pathway. *J. Biol. Chem.* **266**, 12127-12130
- Ikemura, H. and Inouye, M. (1988) *In vitro* processing of pro-subtilisin produced in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **263**, 12959-12963
- Ikemura, H., Takagi, H. and Inouye, M. (1987) Requirement of pro-sequence for the production of active subtilisin E in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **262**, 7859-7864
- Imai, T., Miyazaki, H., Hirose, S., Hori, H., Hayashi, T., Kageyama, R., Ohkubo, H., Nakanishi, S. and Murakami, K. (1983) Cloning and sequence analysis of cDNA for human renin precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **80**, 7405-7409
- Itoh, N., Obata, K., Yanaiharu, N. and Okamoto, H. (1983) Human preprovasoactive intestinal polypeptide contains a novel PHI-27 like peptide, PHM-27. *Nature* **304**, 547-549
- Julius, D., Blair, L., Brake, A., Sprague, G. and Thorner, J. (1983) Yeast  $\alpha$ -factor is processed from a larger precursor polypeptide: the essential role of a membrane-bound dipeptidyl aminopeptidase. *Cell* **32**, 839-852
- Julius, D., Brake, A., Blair, L., Kunisawa, R. and Thorner, J. (1984) Isolation of the putative structural gene for the lysine-arginine-cleaving endopeptidase required for processing of yeast prepro- $\alpha$ -factor. *Cell* **37**, 1075-1089
- Julius, D., Schekman, R. and Thorner, J. (1984) Glycosylation and processing of prepro- $\alpha$ -factor through the yeast secretory pathway. *Cell* **36**, 309-318
- Kawabata, S. and Davie, E. W. (1992) A microsomal endopeptidase from liver with substrate specificity for processing proproteins such as the vitamin K-dependent proteins of plasma. *J. Biol. Chem.* **267**, 10331-10336
- Kawabata, S., Nakagawa, K., Muta, T., Iwanaga, S. and Davie, E. W. (1993) Rabbit liver microsomal endopeptidase with substrate specificity for processing proproteins is structurally related to rat testis

metalloendopeptidase 24.15. *J. Biol. Chem.* **268**, 12498-12503

Kim, W.-S., Hatsuzawa, K., Ishizuka, Y., Hashiba, K., Murakami, K. and Nakayama, K. (1990) A processing enzyme for prorenin in mouse submandibular gland. Purification and characterization. *J. Biol. Chem.* **265**, 5930-5933

Kirchmair, R., Gee, P., Hogue-Angeletti, R., Laslop, A., Fischer-colbric, R. and Winkler, H. (1992) Immunological characterization of the endoproteases PC1 and PC2 in adrenal chromaffin granules and in the pituitary gland. *FEBS Lett.* **297**, 302-305

Klausner, R.D. and Sitia, R. (1990) Protein degradation in the endoplasmic reticulum. *Cell* **62**, 611-614

Koch, G. L. E. (1987) Reticuloplasmins: a novel group of proteins in the endoplasmic reticulum. *J. Cell Sci.* **87**, 491-492

Komada, M., Hatsuzawa, K., Shibamoto, S., Ito, F., Nakayama, K. and Kitamura, N. (1993) Proteolytic processing of the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor by furin. *FEBS Lett.* **328**, 25-29

Korner, J., Chun, J., Harter, D. and Axel, R. (1991) Isolation and functional expression of a mammalian prohormone processing enzyme, murine prohormone convertase 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**, 6834-6838

Kurjan, J. and Hershkowitz, I. (1982) Structure of a yeast pheromone gene (MF $\alpha$ ): a putative  $\alpha$ -factor precursor contains four tandem copies of mature  $\alpha$ -factor. *Cell* **30**, 933-943

LaBombardi, V. J., Shaw, E., DiStefano, J. F., Beck, G., Brown, F. and Zucker, S. (1983) Isolation and characterization of a trypsin-like serine proteinase from the membranes of walker 256 carcino-sarcoma cells. *Biochem. J.* **211**, 695-700

Laemmli, U. K. (1970) *Nature* **227**, 680-685

Leduc, R., Molloy, S. S., Thorne, B. A. and Thomas, G. (1992) Activation of human furin precursor

processing endoprotease occurs by an intramolecular autoproteolytic cleavage. *J. Biol. Chem.* **267**, 14304-14308

Leytus, S. P., Loeb, K. R., Hagen, F. S., Kurachi, K. and Davie, E. W. (1988) A novel trypsin-like serine protease (hepsin) with a putative transmembrane domain expressed by human liver and hepatoma cells. *Biochemistry* **27**, 1067-1074

Loh, Y. P., Brownstein, M. J. and Gainer, H. (1984) Proteolysis in neuropeptide processing and other neural functions. *Annu. Rev. Neurosci.* **7**, 189-222

Loh, Y. P., Parish, D. C. and Tuteja, R. (1985) Purification and characterization of a paired basic residue-specific pro-opiomelanocortin converting enzyme from bovine pituitary intermediate lobe secretory vesicles. *J. Biol. Chem.* **260**, 7194-7205

Lusson, J., Vieau, D., Hamelin, J., Day, R., Chretien, M. and Seidah, N. G. (1993) cDNA structure of the mouse and rat subtilisin/kexin-like PCS: a candidate proprotein convertase expressed in endocrine and nonendocrine cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**, 6691-6695

MacGregor, R. R., Chu, L. L. H. and Cohn, D. V. (1976) Conversion of parathyroid hormone to parathyroid hormone by a particulate enzyme of the parathyroid gland. *J. Biol. Chem.* **251**, 6711-6716

Mackin, R. B., Noe, B. D. and Spiess, J. (1991) The anglerfish somatostatin-28-generating propeptide converting enzyme is an aspartyl protease. *Endocrinology* **129**, 1951-1957

Marchionni, M. A., Goodearl, A. D. J., Chen, M. S., Bermingham-McDonogh, O., Kirk, C., Hendricks, M., Danehy, F., Misumi, D., Sudhalter, J., Kobayashi, K., Wroblewski, D., Lynch, C., Baldassare, M., Hiles, L., Davis, J. B., Hsuan, J. J., Totty, N. F., Otsu, M., McBurney, R. N., Waterfield, M. D., Stroobant, P. and Gwynne, D. (1993) Glial growth factors are alternatively spliced erbB2 ligands expressed in the nervous system. *Nature* **362**, 312-318

Marcinkiewicz, M., Day, R., Seidah, N. G. and Chretien, M. (1993) Ontogeny of the prohormone convertases PC1 and PC2 in the mouse hypophysis and their colocalization with corticotropin and  $\alpha$ -melanotropin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**, 4922-4926

Maret, G. E. and Fauchere, J. L. (1988) Purification of an endopeptidase from bovine adrenal medulla granules which cleaves in vitro at paired but not at single basic residues. *Anal. Biochem.* **172**, 248-258

Misumi, Y., Oda, K., Fujiwara, T., Takami, N., Tashiro, K. and Ikehara, Y. (1991) Functional expression of furin demonstrating its intracellular localization and endoprotease activity for processing of proalbumin and complement pro-C3. *J. Biol. Chem.* **266**, 16954-16959

Misumi, Y., Sohda, M. and Ikehara, Y. (1990) Sequence of the cDNA encoding rat furin, a possible propeptide-processing endoprotease. *Nucl. Acids Res.* **18**, 6719

Mizuno, K., Nakamura, T., Ohshima, T., Tanaka, S. and Matsuo, H. (1988) Yeast Kex2 gene encodes an endopeptidase homologous to subtilisin-like serine proteases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **156**, 246-254

Mizuno, K., Nakamura, T., Ohshima, T., Tanaka, S. and Matsuo, H. (1989) Characterization of Kex2-encoded endopeptidase from yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **159**, 305-311

Mizuno, K., Nakamura, T., Takada, K., Sakakibara, S. and Matsuo, H. (1987) A membrane-bound, calcium-dependent protease in yeast alpha-cell cleaving on the carboxyl side of paired basic residues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **144**, 807-814

Nakagawa, T., Hosaka, M., Torii, S., Watanabe, T., Murakami, K. and Nakayama, K. (1993) Identification and functional expression of a new member of the mammalian Kex2-like processing endoprotease family: Its striking structural similarity to PACE4. *J. Biochem.* **113**, 132-135

Nakayama, K., Hosaka, M., Hatsuzawa, K. and Murakami, K. (1991) Cloning and functional expression of a novel endoprotease involved in prohormone processing at dibasic sites. *J. Biochem.* **109**, 803-806

Nakayama, K., Kim, W.-S., Torii, S., Hosaka, M., Nakagawa, T., Ikemizu, J., Baba, T. and Murakami, K. (1992) Identification of the fourth member of the mammalian endoprotease family homologous to the yeast Kex2 protease. Its testis specific expression. *J. Biol. Chem.* **267**, 5897-5900

Ogata, S., Misumi, Y. and Ikehara, Y. (1989) Primary structure of rat liver dipeptidyl peptidase IV deduced from its cDNA and identification of the NH<sub>2</sub>-terminal sequence as the membrane-anchoring domain. *J. Biol. Chem.* **264**, 3596-3601

Pan, L. C. and Price, P. A. (1985) The propeptide of rat bone  $\gamma$ -carboxyglutamic acid protein shares homology with other vitamin K-dependent protein precursors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **82**, 6109-6113

Plevrakis, I., Clamagirand, C., Creminon, C., Brakch, N., Rholam, M. and Cohen, P. (1989) Procytocrin/neurophysin convertase from bovine neurohypophysis and corpus luteum secretory granules: complete purification, structure-function relationships, and competitive inhibitor. *Biochemistry* **28**, 2705-2710

Rehmtulla, A., Dorner, A. J. and Kaufman, R. J. (1992) Regulation of PACE propeptide-processing activity: requirement for a post-endoplasmic reticulum compartment and autoproteolytic activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**, 8235-8239

Rhodes, C. J., Brennan, S. O. and Hutton, J. C. (1989) Proalbumin to albumin conversion by a proinsulin processing endopeptidase of insulin secretory granules. *J. Biol. Chem.* **264**, 14240-14245

Rivett, A. J. (1989a) High molecular mass intracellular proteases. *Biochem. J.* **263**, 625-633

Rivett, A. J. (1989b) The multicatalytic proteinase of mammalian cells. *Arch. Biochem. Biophys.* **268**, 1-8

Robertson, B. J., Moehring, J. M. and Moehring, T. J. (1993) Defective processing of the insulin receptor in an endoprotease-deficient Chinese hamster cell strain is corrected by expression of mouse furin. *J. Biol. Chem.* **268**, 24274-24277

Roebroek, A. J. M., Schalken, J. A., Leunissen, J. A. M., Onnekink, C., Bloemers, H. P. J. and Van de Ven, W. J. M. (1986) Evolutionary conserved close linkage of the *c-fes/fps* proto-oncogene and genetic sequences encoding a receptor-like protein. *EMBO J.* **5**, 2197-2202

- Ronis, M. J. J., Johansson, I., Hultenby, K., Lagercrantz, J., Glaumann, H. and Ingelman-Sundberg, M. (1991) Acetone-regulated synthesis and degradation of cytochrome P450E2 and cytochrome P450B1 in rat liver. *Eur. J. Biochem.* **198**, 383-389
- Rosa, P. A., PolICASTRO, P. and Herbert, E. (1980) A cellular basis for the difference in regulation of synthesis and secretion of ACTH/endorphin peptides in anterior and intermediate lobes of the pituitary. *J. Exp. Biol.* **89**, 215-237
- Rotundo, R. L. (1988) Biogenesis of acetylcholinesterase molecular forms in muscle. Evidence for a rapidly turning over, catalytically inactive precursor pool. *J. Biol. Chem.* **263**, 19398-19406
- Rouille, Y., Spang, A., Chauvet, J. and Acher, R. (1992) Evidence for distinct dibasic processing endopeptidases with Lys-Arg and Arg-Arg specificities in neurohypophysial secretory granules. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **183**, 128-137
- Sambrook, J. F. (1990) The involvement of calcium in transport of secretory proteins from the endoplasmic reticulum. *Cell* **61**, 197-199
- Sato, R., Imanaka, T., Takatsuki, A. and Takano, T. (1990) Degradation of newly synthesized apolipoprotein B-100 in a pre-Golgi compartment. *J. Biol. Chem.* **265**, 11880-11884
- Scheller, R. H., Jackson, J. F., McAllister, L. B., Rothman, B. S., Mayeri, E. and Axel, R. (1983) A single gene encodes multiple neuropeptides mediating a stereotyped behavior. *Cell* **32**, 7-22
- Schneider, A., Behrens, M., Scherer, P., Pratz, E., Michaelis, G. and Schatz, G. (1991) Inner membrane protease I, an enzyme mediating intramitochondrial protein sorting in yeast. *EMBO J.* **10**, 247-254
- Schwartz, T. W. (1986) The processing of peptide precursors: 'proline-directed arginyl-cleavage' and other monobasic processing mechanisms. *FEBS Lett.* **200**, 1-10
- Shelness, G. S. and Blobel, G. (1990) Two subunits of the canine signal peptidase complex are homologous to yeast *SEC11* protein. *J. Biol. Chem.* **265**, 9512-9519

- Shelness, G. S., Kanwar, Y. S. and Blobel, G. (1988) cDNA-derived primary structure of the glycoprotein component of canine microsomal signal peptidase complex. *J. Biol. Chem.* **263**, 17063-17070
- Shen, F.-S., Roberts, S. F. and Lindberg, I. (1989) A putative processing enzyme for proenkephalin in bovine adrenal chromaffin granule membranes. Purification and properties. *J. Biol. Chem.* **264**, 15600-15605
- Shennan, K. I. J., Seal, A. J., Smeekens, S. P., Steiner, D. F. and Docherty, K. (1991) Site-directed mutagenesis and expression of PC2 in microinjected *Xenopus* oocytes. *J. Biol. Chem.* **266**, 24011-24017
- Shennan, K. I. J., Smeekens, S. P., Steiner, D. F. and Docherty, K. (1991) Characterization of PC2, a mammalian Kex2 homologue, following expression of the cDNA in microinjected *Xenopus* oocytes. *FEBS Lett.* **284**, 277-280
- Shin, J., Lee, S. and Strominger, J. L. (1993) Translocation of TCR $\alpha$  chains into the lumen of the endoplasmic reticulum and their degradation. *Science* **259**, 1901-1904
- Shinagawa, T., Do, Y. S., Baxter, J. D., Carilli, C., Schilling, J. and Hsueh, W. A. (1990) Identification of an enzyme in human kidney that correctly processes prorenin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**, 1927-1931
- Skipper, N., Thomas, D. Y. and Lau, P. C. K. (1984) Cloning and sequencing of the preprotoxin-coding region of yeast M1 double-stranded RNA. *EMBO J.* **3**, 107-111
- Smeekens, S. P., Avruch, A. S., LaMendola, J., Chan, S.J. and Steiner, D. F. (1991) Identification of a cDNA encoding a second putative prohormone convertase related to PC2 in AtT20 cells and islets of Langerhans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**, 340-344
- Smeekens, S. P., Montag, A. G., Thomas, G., Albiges-Rizo, C., Carroll, R., Benig, M., Phillips, L. A., Martin, S., Ohagi, S., Gardner, P., Swift, H. H. and Steiner, D. F. (1992) Proinsulin processing by the subtilisin-related proprotein convertases furin, PC2, and PC3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**, 8822-



Smeekens, S. P. and Steiner, D. F. (1990) Identification of a human insulinoma cDNA encoding a novel mammalian protein structurally related to the yeast dibasic processing protease Kex2. *J. Biol. Chem.* **265**, 2997-3000

Smith, P. K., Krohn, R. L., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, E. K., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olsen, B. J. and Klenk, D. C. (1985) Protein measurement using bicinconinic acid. *Anal. Biochem.* **150**, 76-85

Sogawa, K. and Takahashi, K. (1978) Evidence for the presence of a serine proteinase(s) associated with the microsomal membranes of rat liver. *J. Biochem.* **84**, 763-770

Sogawa, K. and Takahashi, K. (1979) A neutral proteinase of monkey liver microsome. Solubilization, partial purification, and properties. *J. Biochem.* **86**, 1313-1322

Stafford, F. J. and Bonifacino, J. S. (1991) A permeabilized cell system identifies the endoplasmic reticulum as a site of protein degradation. *J. Cell Biol.* **115**, 1225-1236

Steinke-Grober, A., Vey, M., Angliker, H., Shaw, E., Thomas, G., Roberts, C., Klenk, H-D. and Garten, W. (1992) Influenza virus hemagglutinin with multibasic cleavage site is activated by furin, a subtilisin-like endoprotease. *EMBO J.* **11**, 2407-2414

Steiner, D. F., Cunningham, D. D., Spiegelman, L. and Aten, B. (1967) Insulin Biosynthesis: Evidence for a precursor. *Science* **157**, 697

Takahashi, K., Tamanoue, Y., Yanagida, M., Sakurai, Y., Takahashi, T. and Sutoh, K. (1991) Specific cleavages of arginyl peptide bonds at basic amino acid pairs by a serine proteinase from the microsomal membranes of rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **175**, 1152-1158

Thomas, G., Thorne, B.A., Thomas, L., Allen, R. G., Hruby, D. E., Fuller, R. and Thorner, J. (1988) Yeast Kex2 endopeptidase correctly cleaves a neuroendocrine prohormone in mammalian cells. *Science* **241**, 226-230

Thomas, L., Leduc, R., Thorne, B. A., Smeekens, S. P., Steiner, D. F. and Thomas, G. (1991) Kex2-like endoproteases PC2 and PC3 accurately cleave a model prohormone in mammalian cells: evidence for a common core of neuroendocrine processing enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 5297-5301

Thompson, G. A. and Carpenter, F. H. (1976) Leucine aminopeptidase (bovine lens). The relative binding of cobalt and zinc to leucine aminopeptidase and the effect of cobalt substitution on specific activity. *J. Biol. Chem.* **251**, 1618-1624

Thomberry, N. A., Bull, H. G., Calaycay, J. R., Chapman, K. T., Howard, A. D., Kostura, M. J., Miller, D. K., Molineaux, S. M., Weidner, J. R., Aunins, J., Elliston, K. O., Ayala, J. M., Casano, F. J., Chin, J., Ding, G. J.-F., Egger, L. A., Gaffney, E. P., Limjuco, G., Palyha, O. C., Raju, S. M., Rolando, A. M., Salley, J. P., Yamin, T.-T., Lee, T. D., Shively, J. E., MacCross, M., Mumford, R. A., Schmidt, J. A. and Tocci, M. J. (1992) A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 $\beta$  processing in monocytes. *Nature* **356**, 768-774

Toomim, C. S. and Hook, V. Y. H. (1992) Thiol and aspartyl proteolytic activities in secretory vesicles of bovine pituitary. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **183**, 449-455

Tsao, Y. S., Ivessa, N. E., Adesnik, M., Sabatini, D. D. and Kreibich, G. (1992) Carboxy terminally truncated forms of ribophorin I are degraded in pre-Golgi compartments by a calcium-dependent process. *J. Cell Biol.* **116**, 57-67

Tsuji, A., Torres-Rosado, A., Arai, T., Le Beau, M. M., Lemons, R. S., Chou, S-H. and Kurachi, K. (1991) Hepsin, a cell membrane-associated protease: characterization, tissue distribution, and gene localization. *J. Biol. Chem.* **266**, 16948-16953

Ullrich, A., Bell, J. R., Chen, E. Y., Herrera, R., Petruzzelli, L. M., Dull, T. J., Gray, A., Coussens, L., Liao, Y.-C., Tsubokawa, M., Mason, A., Seeburg, P. H., Grunfeld, C., Rosen, O. M. and Ramachandran, J. (1985) Human insulin receptor and its relationship to the tyrosine kinase family of oncogenes. *Nature* **313**, 756-761

Urade, R. and Kito, M. (1992) Inhibition by acidic phospholipids of protein degradation by ER-60 protease, a novel cysteine protease, of endoplasmic reticulum. *FEBS Lett.* **312**, 83-86

- Urade, R., Nasu, M., Moriyama, T., Wada, K. and Kito, M. (1992) Protein degradation by the phosphoinositide-specific phospholipase C- $\alpha$  family from rat liver endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **267**, 15152-15159
- van den Ouweland, A. M. W., van Duijnhoven, H. L. P., Keizer, G. D., Dorssers, L. C. J. and van de Ven, W. J. M. (1990) Structural homology between the human fur gene product and the subtilisin-like protease encoded by yeast KEX2. *Nucl. Acids Res.* **18**, 664
- Van Dijl, J. M., De Jong, A., Vehmaanperae, J., Venema, G. and Bron, S. (1992) Signal peptidase I of *Bacillus subtilis*: patterns of conserved amino acids in prokaryotic and eukaryotic type I signal peptidases. *EMBO J.* **11**, 2819-2828
- Wasley, L. C., Rehemtulla, A., Bristol, J. A. and Kaufman, R. J. (1993) PACE/furin can process the vitamin K-dependent pro-factor IX precursor within the secretory pathway. *J. Biol. Chem.* **268**, 8458-8465
- Watanabe, T., Murakami, K. and Nakayama, K. (1993) Positional and additive effects of basic amino acids on processing of precursor proteins within the constitutive secretory pathway. *FEBS Lett.* **320**, 215-218
- Watanabe, T., Nakagawa, T., Nagahama, M., Murakami, K. and Nakayama, K. (1992) Sequence requirements for precursor cleavage within the constitutive secretory pathway. *J. Biol. Chem.* **267**, 8270-8274
- Weiss, M.A., Frank, B.H., Khait, I., Pekar, A., Heiney, R., Shoelson, S.E. and Neunger, L.J. (1990) NMR and photo-CIDNP studies of human proinsulin and prohormone processing intermediates with application to endopeptidase recognition. *Biochemistry* **29**, 8389-8401
- Wen, D., Peles, E., Cupples, R., Suggs, S. V., Bacus, S. S., Luo, Y., Trail, G., Hu, S., Silbiger, S. M., Levy, R. B., Koski, R. A., Lu, H. S. and Yarden, Y. (1992) Neu differentiation factor: a transmembrane glycoprotein containing an EGF domain and an immunoglobulin homology unit. *Cell* **69**, 559-572
- Wikstroem, L. and Lodish, H. F. (1991) Nonlysosomal, pre-Golgi degradation of unassembled

asialoglycoprotein receptor subunits: a TLCK- and TPCK-sensitive cleavage within the ER. *J. Cell Biol.* **113**, 997-1007

Wikstrom, L. and Lodish, H. F. (1993) Unfolded H2b asialoglycoprotein receptor subunit polypeptides are selectively degraded within the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **19**, 14412-14416

Wileman, T., Carson, G. R., Concino, M., Ahmed, A. and Terhorst, C. (1990) The  $\gamma$  and  $\epsilon$  subunits of the CD3 complex inhibit pre-Golgi degradation of newly synthesized T cell antigen receptors. *J. Cell Biol.* **110**, 973-986

Wileman, T., Kane, L. P., Carson, G. R. and Terhorst, C. (1991) Depletion of cellular calcium accelerates protein degradation in the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **266**, 4500-4507

Wise, R. J., Barr, P. J., Wong, P. A., Kiefer, M. C., Brake, A. J. and Kaufman, R. J. (1990) Expression of a human proprotein processing enzyme: correct cleavage of the von Willebrand factor precursor at a paired basic amino acid site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**, 9378-9382

Wolfe, P. B., Wickner, W. and Goodman, J. M. (1983) Sequence of the leader peptidase gene of *Escherichia coli* and the orientation of leader peptidase in the bacterial envelope. *J. Biol. Chem.* **258**, 12073-12080

Wulff, B. S., Johansen, T. E., Dalboge, H., O'Hare, M. M. T. and Schwartz, T. W. (1993) Processing of two homologous precursors, pro-neuropeptide Y and pro-pancreatic polypeptide, in transfected cell lines expressing different precursor convertase. *J. Biol. Chem.* **268**, 13327-13335

Yang, M., Jensen, R. E., Yaffe, M. P., Oppliger, W. and Schatz, G. (1988) Import of proteins into yeast mitochondria: The purified matrix processing protease contains two subunits which are encoded by the nuclear MAS1 and MAS2 genes. *EMBO J.* **7**, 3857-3862

Zhao, X.-J. and Wu, H. C. (1992) Nucleotide sequence of the *Staphylococcus aureus* signal peptidase II (lsp) gene. *FEBS Lett.* **299**, 80-84

Zhou, Y. and Lindberg, I. (1993) Purification and characterization of the prohormone convertase PC1

(PC3). *J. Biol. Chem.* **268**, 5615-5623

Zhu, X., Ohta, Y., Jordan, F. and Inouye, M. (1989) Pro-sequence of subtilisin can guide the refolding of denatured subtilisin in an intermolecular process. *Nature* **339**, 483-484

Purification of recombinant subtilisin from *Bacillus pasteurii*

Step	Total protein (mg)	Subtilisin activity (units)	Yield (%)	Purity (%)
Crude extract	2,400	10,000	100	-
Ammonium sulfate	180	120,000	12.5	50
DEAE-Sepharose	15.5	250,000	6.25	100
Phenyl-Sepharose	0.800	200,000	5.0	100
Final	0.100	150,000	3.75	100

Purification of microsomal membrane-bound serine proteinase

Step	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/ $\mu$ g)	Yield (%)	Purification (-fold)
Microsomes	2,400	165,000	0.0688	-	-
Hydroxylapatite	146	1,810,000	12.4	100	1
DEAE-cellulose	16.5	867,000	52.5	47.9	4.23
Benzamidine-Sepharose 6B	0.0400	499,000	12,500	27.6	1,010
PAGE					
MSP1	0.0006	63,200	105,000	3.5	8,470
MSP2	0.0076	75,300	9,910	4.2	799

表1 MSPの精製の結果

精製の各段階におけるMSPの活性とタンパク質量との関係を示す。酵素の活性は、1 pmolのBoc-Gln-Arg-Arg-MCAを1分間に加水分解する量を1 unitとする。

## Effects of proteinase inhibitors and metal ions

Reagent	Concentration (mM)	Relative activity (%)			
		Boc-Gln-Arg-Arg-MCA		Dynorphin A	
		MSP1	MSP2	MSP1	MSP2
None		100	100	100	100
DFP	1	0	0	0	0
APMSF	1	0	0	2	5
PMSF	1	84	73	100	100
Leupeptin	0.1	2	1	10	11
Antipain	0.1	6	3	- <sup>a</sup>	-
Benzamidine	1	16	14	20	28
TLCK	1	20	15	-	-
TPCK	0.2	100	100	100	100
Trypsin inhibitor					
Bovine pancreas	0.01	2	2	8	20
Soybean	0.01	46	44	37	42
EDTA	10	90	89	78	79
<i>o</i> -Phenanthroline	10	70	67	-	-
E-64	0.1	63	55	58	69
Bestatin	0.1	100	100	-	-
Chymostatin	0.1	100	100	81	83
Elastatinal	0.1	100	90	-	-
Ca <sup>2+</sup>	1	100	93	-	-
Mg <sup>2+</sup>	1	98	92	-	-
Mn <sup>2+</sup>	1	93	90	-	-
Zn <sup>2+</sup>	1	49	43	-	-

<sup>a</sup>Not examined.

表2 MSPに対する種々のプロテアーゼ阻害剤の効果

基質としてBoc-Gln-Arg-Arg-MCAとダイノルフィンAを用いた場合の種々の阻害剤やイオンの効果を調べた。

## Kinetic parameters of microsomal serine proteinase 1

Substrate	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	$K_m$ ( $\mu$ M)	$k_{cat}/K_m$ ( $\mu$ M <sup>-1</sup> ·s <sup>-1</sup> )
MCA substrates			
Boc-Gln-Arg-Arg-MCA	96	230	0.42
Boc-Leu-Thr-Arg-MCA	81	333	0.24
Boc-Gly-Arg-Arg-MCA	28	142	0.20
Boc-Leu-Arg-Arg-MCA	23	187	0.12
Boc-Gln-Ala-Arg-MCA	38	565	0.067
Boc-Gly-Lys-Arg-MCA	20	318	0.062
Boc-Leu-Lys-Arg-MCA	22	405	0.054
Boc-Val-Pro-Arg-MCA	16	408	0.039
Boc-Phe-Ser-Arg-MCA	7.1	452	0.016
Boc-Leu-Gly-Arg-MCA	2.5	422	0.0060
Boc-Glu-Lys-Lys-MCA	3.0	3330	0.0009
Peptide substrates <sup>a</sup>			
$\alpha$ -Neoendorphin	6.5	111	0.059
Dynorphin A	3.1	75	0.041
Neurotensin	6.1	450	0.014

<sup>a</sup>The amino acid sequence and the cleavage site (shown with an arrowhead) of each peptide are as follows. <Glu: pyroglutamic acid.

$\alpha$ -Neoendorphin: Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg<sup>▼</sup>-Lys-Tyr-Pro-Lys

Dynorphin A: Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg<sup>▼</sup>-Arg-Ile-Arg-Pro-Lys-  
Leu-Lys-Trp-Asp-Asn-Gln

Neurotensin: <Glu-Leu-Tyr-Glu-Asn-Lys-Pro-Arg<sup>▼</sup>-Arg-Pro-Tyr-  
Ile-Leu

表3 MSP1の速度論的パラメーター

MSP1の各種の基質に対する速度論的パラメーターを決定した。反応は、37°Cで30分間行い、緩衝液はMCA基質の場合には0.1 M トリス塩酸緩衝液pH 8.0を用い、ペプチド基質の場合には0.04 M トリス塩酸緩衝液pH 8.0を用いた。 $k_{cat}$ は、32 mgのタンパク質が1  $\mu$ molの酵素に相当すると仮定して求めた。



### Hydrolysis of proteins

Substrate	Relative activity (%)	
	MSP1	MSP2
Histone	100	100
Casein	4.9	5.5
Myoglobin	1.2	2.0
Ovalbumin	0.5	2.2
$\gamma$ -Immunoglobulin	0.4	0.3
Bovine serum albumin	0.1	0.1

表4 MSP1とMSP2のタンパク質性基質の加水分解

0.2 Mホウ酸ナトリウムpH8.0に溶解した1%のタンパク質をMSP1またはMSP2と37°Cで30 min反応させてそれぞれに対する作用を調べた。それぞれの酵素のヒストンに対する作用を100として示した。

Effects of various proteinase inhibitors on  
porcine microsomal serine proteinase

Inhibitor	Remaining activity (%)	
	PMSP1	PMSP2
DFP	0.7	3.3
E-64	81	73
<i>o</i> -Phenanthroline	44	39

表5 各種の阻害剤がPMSPに与える影響

1 mM DFP、0.1 mM E-64、10 mM *o*-フェナンスロリンの存在下でのPMSP1とPMSP2の  
Boc-Gln-Arg-Arg-MCA加水分解活性を調べた。

Specificity of porcine microsomal serine proteases toward various MCA substrates

Substrate	Relative activity (%)	
	PMSP1 (Fr.39)	PMSP2 (Fr.63)
Boc-Gln-Arg-Arg-MCA	100	100
Boc-Leu-Thr-Arg-MCA	38	41
Boc-Gly-Arg-Arg-MCA	32	28
Boc-Gln-Ala-Arg-MCA	25	35
Boc-Val-Pro-Arg-MCA	11	13
Boc-Gln-Gly-Arg-MCA	5.0	15
Boc-Leu-Gly-Arg-MCA	1.3	24
Boc-Glu-Lys-Lys-MCA	1.7	2.6
Z-Phe-Arg-MCA	1.6	10
Bz-Arg-MCA	0.9	1.1

表6 PMSPの各種のMCA基質に対する特異性

PMSP1とPMSP2の各種のMCA基質に対する特異性を調べた。反応は37°Cで30 min行った。

Table of purification

Step	Protein (mg)	Activity (units)	Specific act. (units/mg)	Purification (-fold)	Recovery (%)
Hydroxylapatite	123	116,000	943	1	100
DE52	18.0	215,000	11,900	12.6	185
Chelating Sepharose 6B	1.56	122,000	78,200	82.9	105
Sephacryl S-200	0.20	57,800	289,000	306	49.8
FPLC Mono Q	0.12	47,800	398,000	422	41.2

表7 金属依存性プロテアーゼの精製の結果

精製の各段階における金属依存性プロテアーゼの活性とタンパク質量との関係を示す。  
 酵素の活性は、1 pmolのBoc-Arg-Val-Arg-Arg-MCAを1 minで加水分解する量を1 unit とする。

Effects of various proteinase inhibitors on metal-dependent proteinase

Inhibitor	Remaining activity (%)	
	pH 5.3	pH 8.0 & Co <sup>2+</sup>
None	100	100
EDTA	0.1	0.5
<i>o</i> -Phenanthroline	6.8	0.8
Phosphoramidon	43.8	100
DFP	5.4	88.2
PMSF	32.3	82.7
E-64	40.8	74.4
<i>N</i> -ethylmaleimide	32.2	85.6
Leupeptin	33.7	89.9
BPTI	51.4	100
SBTI	37.0	100
HgCl <sub>2</sub>	0	nd

表8 メタロプロテアーゼと金属依存性セリンプロテアーゼに対する阻害剤の効果

金属依存性プロテアーゼ19 ngを0.1 M MES-NaOH緩衝液pH 5.3 0.5 mlまたは1 mM CoCl<sub>2</sub>を含む0.1 M トリス塩酸緩衝液pH 8.0 0.5 ml中で下記の濃度の阻害剤と室温で1 h インキュベートした後、0.1 mM Boc-Arg-Val-Arg-MCAと55 min反応させた。EDTA, 10 mM; *o*-phenanthroline, 10 mM; Phosphoramidon, 0.1 mM; DFP, 1 mM; PMSF, 1 mM; *N*-ethylmaleimide, 1 mM; E-64, 0.1 mM; Leupeptin, 0.1 mM; BPTI, 0.01 mM; SBTI, 0.01 mM; HgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM.

## Specificity of rat metal-dependent proteinase toward various MCA substrates

Substrate	Relative activity (%)		
	pH 5.3	pH 8.0 & Co <sup>2+</sup>	pH 8.0
Boc-Arg-Val-Arg-Arg-MCA	100	100	100
Boc-Gln-Arg-Arg-MCA	22.7	48.5	48.5
Boc-Val-Leu-Lys-MCA	17.7	15.8	39.1
Boc-Gly-Lys-Arg-MCA	16.7	18.0	23.9
Boc-Gly-Arg-Arg-MCA	7.8	20.7	21.2
Boc-Leu-Arg-Arg-MCA	1.8	4.9	2.6
Boc-Leu-Lys-Arg-MCA	1.7	4.9	3.8
Boc-Gln-Ala-Arg-MCA	1.2	13.6	17.2
Boc-Glu-Lys-Lys-MCA	0.7	2.7	0
Boc-Leu-Ser-Thr-Arg-MCA	0.5	3.0	5.7
Boc-Ala-Gly-Pro-Arg-MCA	0.3	1.3	-
Boc-Val-Pro-Arg-MCA	0.1	0.2	4.1
Boc-Phe-Ser-Arg-MCA	0	-	0.8
Boc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA	0	0.7	-
Boc-Leu-Thr-Arg-MCA	0	0	1.0
Boc-Leu-Gly-Arg-MCA	0	0	-
Boc-Gln-Gly-Arg-MCA	0	0	3.7
Boc-Ile-Glu-Gly-Arg-MCA	0	0	-
Arg-MCA	0	-	1.0

表9 メタロプロテアーゼと金属依存性セリンプロテアーゼのMCA基質に対する特異性

19 ngの金属依存性プロテアーゼを1 mM CoCl<sub>2</sub>を含むものと含まない0.1 M トリス塩酸緩衝液pH 8.0 0.5 mlかまたは0.1 M MES-Na緩衝液pH 5.3 0.5 ml中で0.1 mM MCA基質と37°Cで1 hr反応させた。それぞれの条件でのBoc-Arg-Val-Arg-Arg-MCAに対する活性の値を100とした。

Proteinase activity toward various protein substrates at pH 8.0

Protein substrate	Relative activity (%)
Histone	100
Myoglobin	39
Bovine serum albumin	11
Casein	8.9
Ovalbumin	1.2
$\gamma$ -Immunoglobulin	0

表10 金属依存性プロテアーゼのタンパク質性基質の加水分解

0.2 Mホウ酸ナトリウムpH 8.0に溶解した1%のタンパク質を金属依存性プロテアーゼと37°Cで30 min反応させてそれぞれに対する作用を調べた。

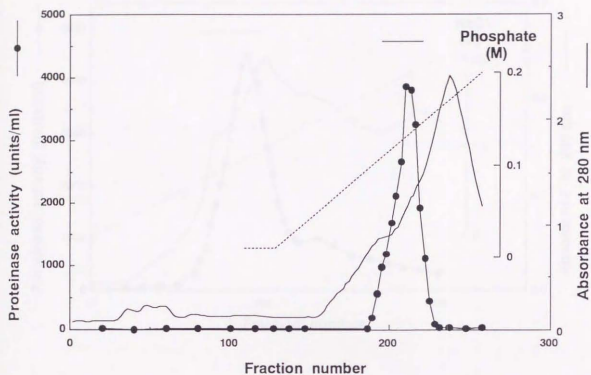


図1 ヒドロキシルアパタイトカラムクロマトグラフィー

可溶化したミクロソーム膜をヒドロキシルアパタイトカラム (3 x 21 cm) にかけて。緩衝液は1%コール酸ナトリウムと0.15 M塩化ナトリウムを含む0.01 Mリン酸カリウム緩衝液pH 7.5を用い、溶出は0.01 - 0.2 Mのリン酸の濃度勾配によって行った。溶出に用いた緩衝液は0.8 lで、フラクションサイズは5.6 mlであった。このときの流速は20 ml/hrであった。



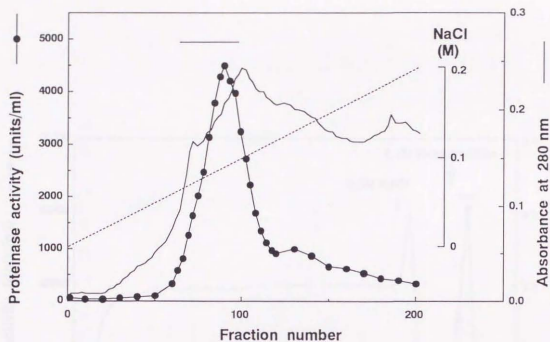


図2 DE52カラムクロマトグラフィー

ヒドロキシルアパタイトカラムによって得られた活性画分を0.05%ルブロールPXを含む20 mMトリス塩酸緩衝液pH 8.5に対して透析した後、DE52カラム(3 x 25 cm)にかけた。緩衝液は同じものを用い、はじめに十分にカラムを洗った後に0.025 M塩化ナトリウムによって溶出を行った。溶出に用いた緩衝液は21で、フラクションサイズは10.0 mlであった。このときの流速は30 ml/hrであった。

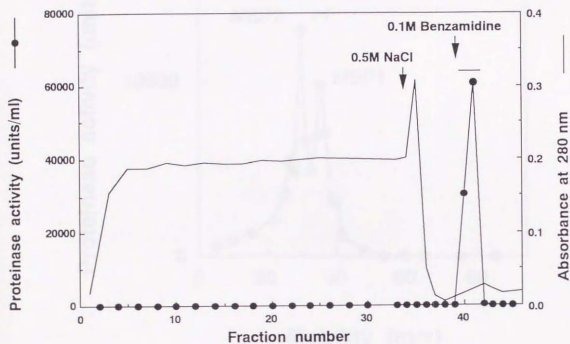


図3 ベンズアミジンセファロース6Bカラムクロマトグラフィー

DE52カラムクロマトグラフィーによって得られた活性画分を、ベンズアミジンセファロース6Bカラム (1.5 x 3 cm) にかけて。0.02%ルブロールPXを含むトリエタノール緩衝液pH8.0でカラムを洗った後に、さらに0.5M塩化ナトリウムを含む同じ緩衝液で洗った。このとき280 nmの吸光度を測定して、値がベースラインまで下がったところですぐに0.1 Mベンズアミジン塩酸を含む緩衝液で溶出を行った。このときの流速は20 ml/hrで、フラクションサイズは7.0 mlであった。

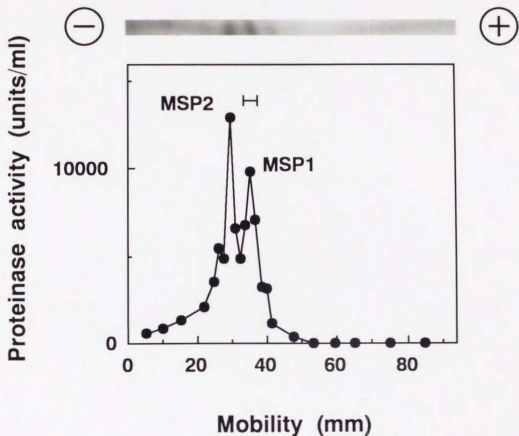


図4 ポリアクリルアミドゲル電気泳動

ベンズアミジンセファロース6B)によって得られた活性画分をポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけた。ゲルは5%Tで、0.01%ルブロールPXを含んでいた。ゲルの一部は銀染色にかけ、その結果を図の上部に示す。ゲルの残りは1.5 mmずつ切断してすり潰し、0.9 mlの0.01% ルブロールPXを含む0.02 Mトリエタノールアミン塩酸緩衝液pH 8.0に浸して4°Cに数日間保存して酵素を抽出した。

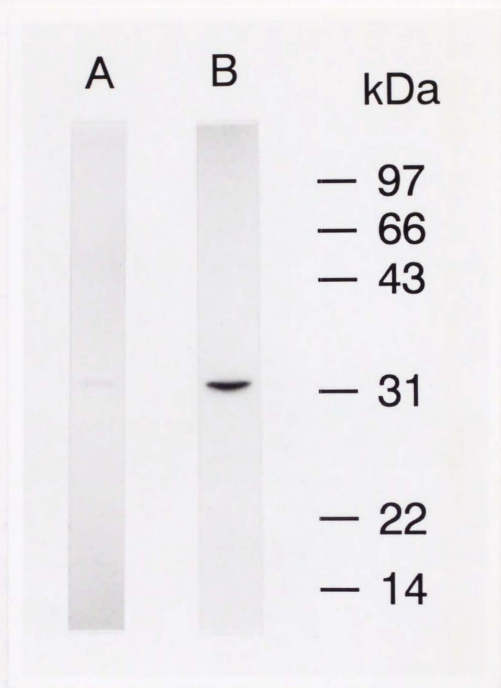
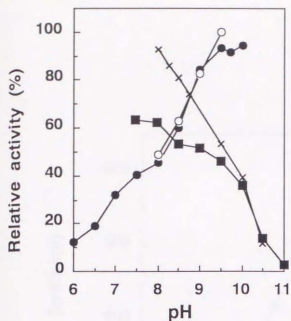


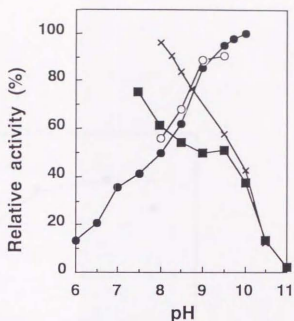
図5 MSP1のSDS-PAGEと [ $^3\text{H}$ ] -DFPラベル

A: ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって精製されたプロテアーゼMSP1をSDS-PAGEにかけた。ゲルは15%のものを用い、還元条件下で電気泳動を行ったのちCoomassie Brilliant Blueによって染色を行った。 B [ $^3\text{H}$ ]-DFPでラベルした酵素を上と同じ条件でSDS-PAGEにかけ、その後フルオログラフィーを行った。

A



B



C

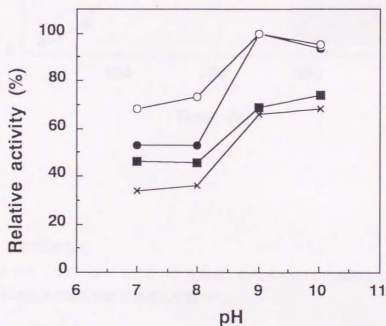


図6 MSP1とMSP2のpH依存性

A & B. 種々のpHでのBoc-Gln-Arg-Arg-MCAに対するMSP1 (A)とMSP2 (B)の酵素活性を測定した。用いた緩衝液は、0.1Mトリス塩酸(●)、0.1Mトリエタノールアミン塩酸緩衝液(○)、0.1Mグリシンナトリウム(×)、0.1Mホウ酸ナトリウム(■)。C. 0.1Mトリス塩酸緩衝液中でのMSP1のダイノルフィンA(○)と $\alpha$ -ネオエンドルフィン(■)に対する活性とMSP2のダイノルフィンA(●)と $\alpha$ -ネオエンドルフィン(×)に対する活性を測定した。

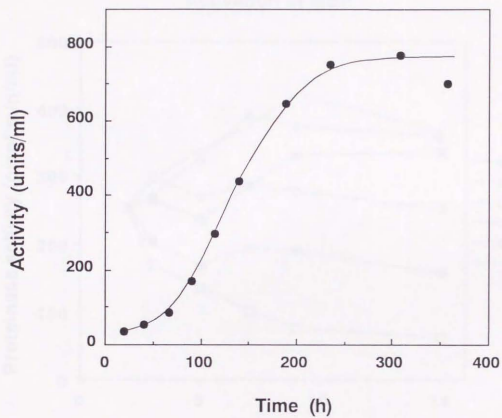


図7 MSPの活性化

ヒドロキシルアパタイトカラムから溶出したFr. 210を4°Cで保存したときのBoc-Gln-Arg-Arg-MCA加水分解活性の時間変化を調べた。

### Activation of MSP

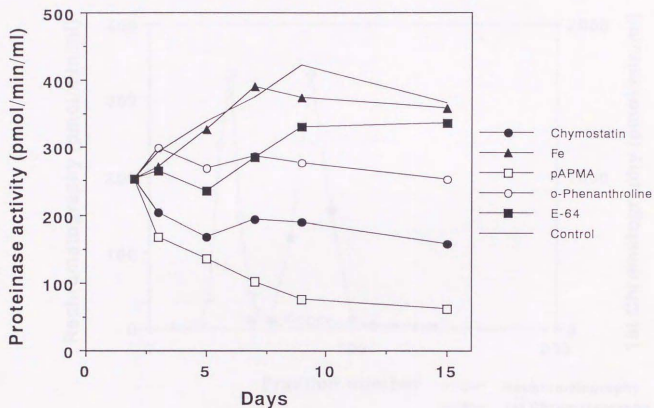


図8 MSPの活性化に対する種々のプロテアーゼ阻害剤の効果

ヒドロキシルアパタイトカラムから溶出したFr. 210を分注して種々のプロテアーゼ阻害剤を加え、4°Cにおける活性化のパターンの変化を調べた。

### Hydroxylapatite rechromatography

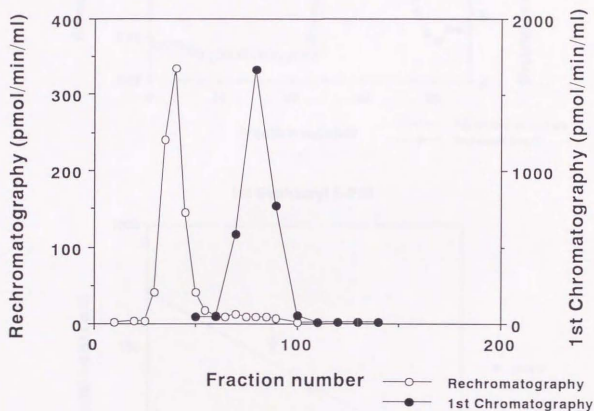


図9 MSPのヒドロキシルアパタイトカラムリクロマトグラフィー

ヒドロキシルアパタイトカラムから溶出したMSPの活性画分の一部(40ml, 42,400 pmol/min)を1%コール酸ナトリウムと0.15 M塩化ナトリウムを含む0.01 Mリン酸カリウム緩衝液pH 7.5に対して透析した後、再び同じ条件でヒドロキシルアパタイトカラムクロマトグラフィーにかけた。フラクションサイズは5.6 mlであり、流速は20 ml/hrであった。



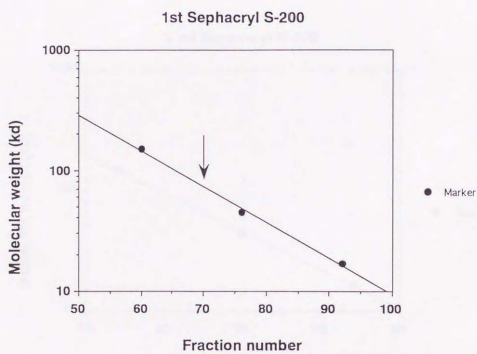
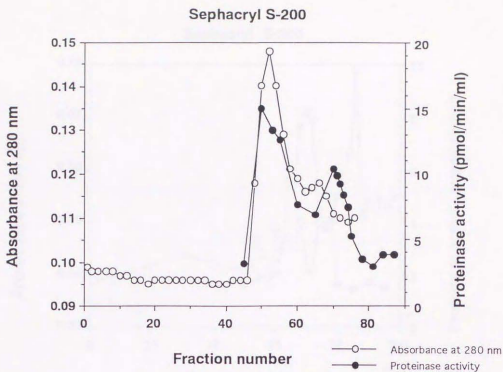


図10 可溶性ミクロソーム膜のセファクリルS-200カラムクロマトグラフィー  
 可溶性ラットの肝臓のミクロソーム膜をセファクリルS-200 (3 x 108 cm) にかけてゲル  
 濾過を行った。使用した緩衝液は1%コール酸ナトリウムと0.2 M塩化ナトリウムを含む0.01  
 Mリン酸カリウム緩衝液pH 7.5であった。このときのフラクションサイズは6.2 mlで、流速  
 は20 ml/hrであった。

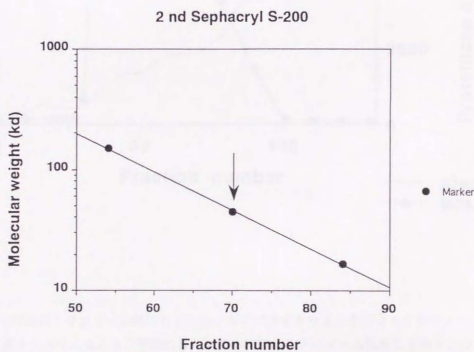
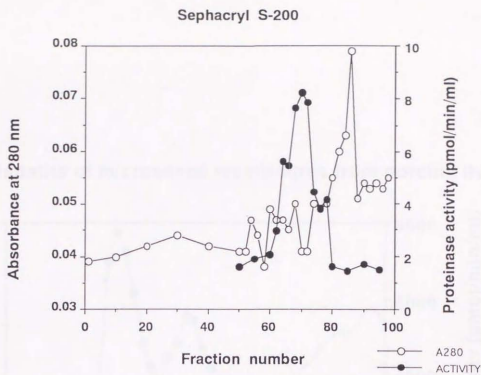


図11 70 kdに相当する活性のセファクリルS-200によるリクロマトグラフィー  
 可溶化したミクロソーム膜をセファクリルS-200にかけて得られた分子量70 kdに相当する活性画分を再びセファクリルS-200カラムにかけた。使用した緩衝液は0.6%コール酸ナトリウムと0.2 M塩化ナトリウムを含む0.01 Mリン酸カリウム緩衝液pH 7.5であった。このときのフラクションサイズは6.2 mlで、流速は20 ml/hrであった。

### Hydroxylapatite of microsomal membranes from porcine liver

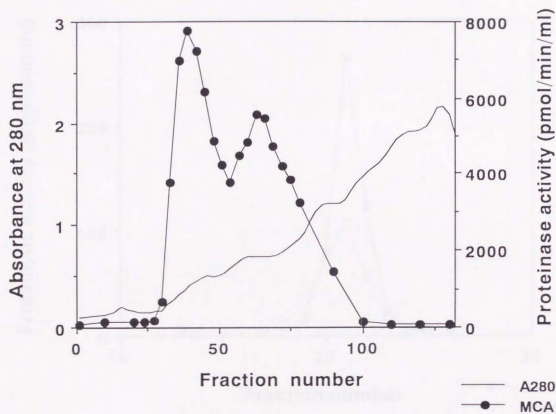


図12 ブタの可溶性ミクロソーム膜のヒドロキシルアパタイトカラムクロマトグラフィー  
 1%コール酸ナトリウムによって可溶化したブタの肝臓のミクロソーム膜をヒドロキシル  
 アパタイトカラム(3 x 23 cm)にかけた。このときのフラクションサイズは5.6 mlで、流速は  
 20 ml/hrであった。

TSKgel G3000SW

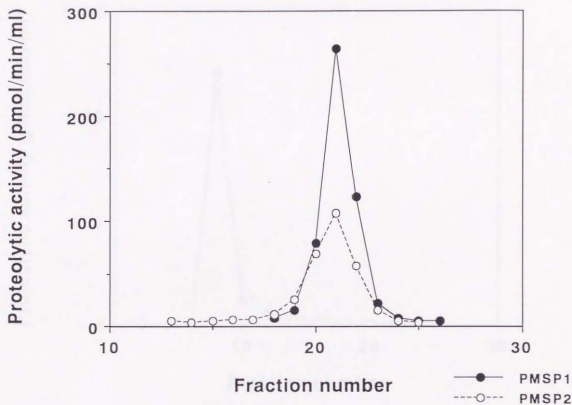


図13 PMSP1とPMSP2のTSK G3000SWカラムクロマトグラフィー

ヒドロキシルアパタイトカラムクロマトグラフィーによって得られたFr. 39 (PMSP1, 100  $\mu$ l, 830 pmol/min)とFr. 69 (PMSP2, 100  $\mu$ l, 470 pmol/min)をそれぞれTSK G3000SWによるゲルろ過にかけた。用いた緩衝液は0.6%コール酸ナトリウムと0.15 M塩化ナトリウムを含む0.01 Mリン酸カリウム緩衝液pH 7.5であり、流速は0.4 ml/minであった。このときのフラクションサイズは1 mlであった。

### FPLC MonoQ

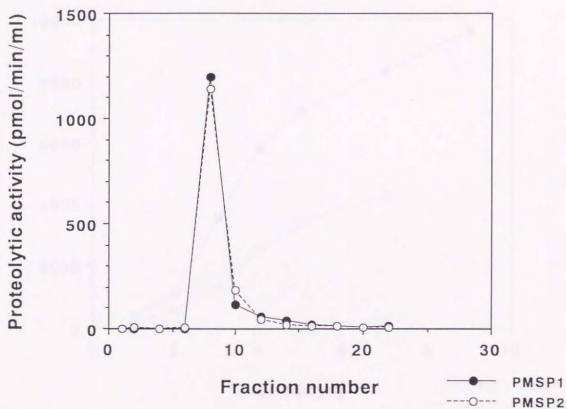


図14 PMSP1とPMSP2のFPLC Mono Qクロマトグラフィー

ヒドロキシルアパタイトカラムクロマトグラフィーによって得られた2つの活性画分を1 mlずつFPLCのMono Qカラムにかけた。0.02%ルブロールPXを含む0.02 M トリエタノールアミン塩酸緩液pH 8.0を用い、0-1.0 M塩化ナトリウム (15 ml) によって溶出を行った。このときのフラクションサイズは1 mlで、流速は0.5 ml/minであった。

### Spontaneous activation of porcine microsomal serine proteinase

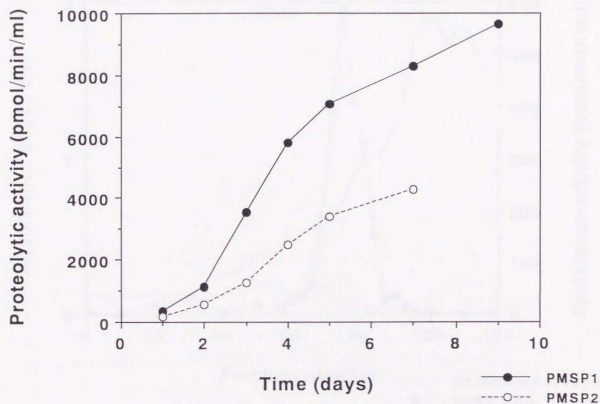


図15 PMSP1とPMSP2の活性化

ヒドロキシルアパタイトカラムから溶出したFr. 39 (PMSP1)とFr. 69 (PMSP2)を4°Cで保存したときの活性の時間変化を調べた。

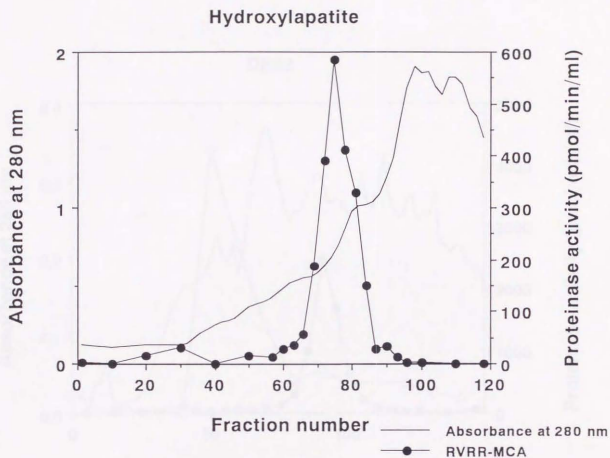


図16 金属依存性プロテアーゼのヒドロキシルアパタイトカラムクロマトグラフィー  
 可溶化したラットの肝臓のミクロソーム膜をヒドロキシルアパタイトカラム (3x 21 cm) にかけた。緩衝液は1%のコール酸ナトリウムと0.15 Mの塩化ナトリウムを含む0.01 Mリン酸カリウム緩衝液pH 7.5を用い、溶出は0.01 - 0.2 Mリン酸 (0.81) で行った。図に示す活性の値は溶出後4°Cで1ヶ月保存して活性化が終わった後の値である。このときのフラクションサイズは5.6 mlで、流速は20 ml/hrであった。

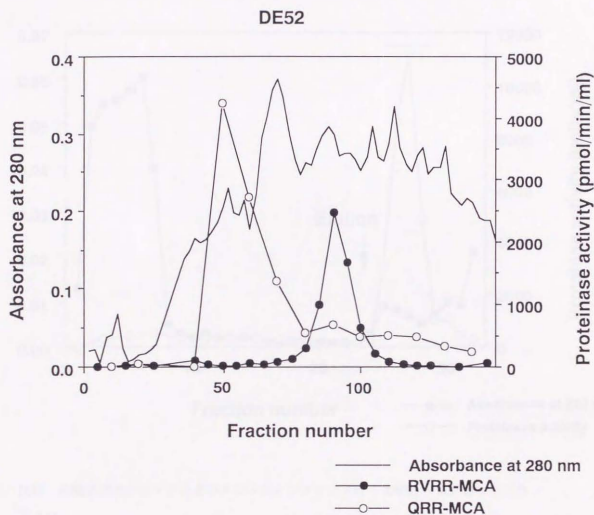


図17 金属依存性プロテアーゼのDE52カラムクロマトグラフィー

ヒドロキシルアパタイトによって得られた活性画分を0.06%ルブロールPXを含む20 mM トリエタノールアミン塩酸緩衝液pH 8.5に対して透析を行った後、DE52カラム (3 x 25 cm) にかいた。溶出は0.02 M塩化ナトリウム (11) で行った。このときのフラクションサイズは6.8 mlで、流速は30 ml/hrであった。



### Chelating Sepharose 6B

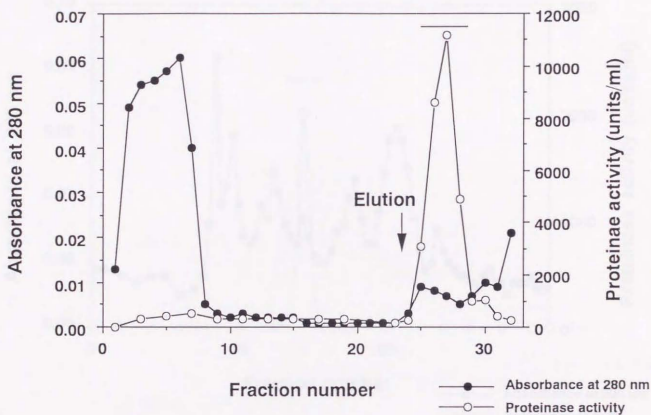


図18 金属依存性プロテアーゼのキレーティングセファロース6Bカラムクロマトグラフィ

DE52カラムクロマトグラフィによって得られた金属依存性プロテアーゼの活性画分を、0.02% ルブロールPXと0.5 M NaClを含む0.02 M トリエタノールアミン塩緩衝液pH 8.0に對して透析した。この活性画分をZn<sup>2+</sup>イオンを結合させた後と同じ緩衝液で平衡化したキレーティングセファロース6B (1 x 3 cm) にかけた。カラムを同じ緩衝液で洗ってから、溶出を0.2 Mグリシンを含む緩衝液で行った。このときのフラクションサイズは3 mlで、流速は10 ml/hrであった。

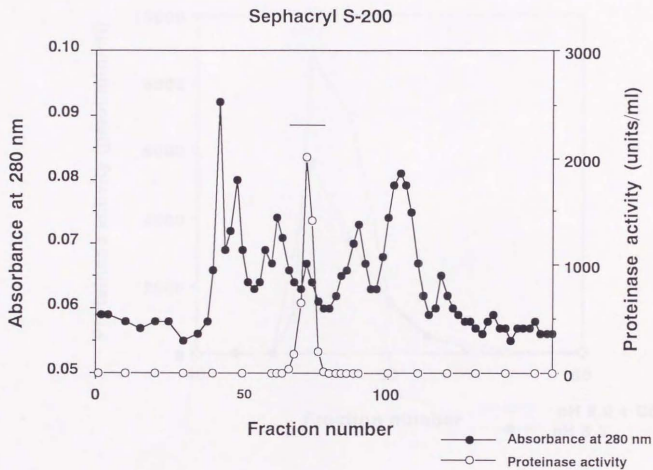


図19 金属依存性プロテアーゼのセファクリルS-200カラムクロマトグラフィー

キレーティングセファロース6Bカラムによって得られた活性画分を濃縮した後に、セファクリルS-200 (3 x 105 cm) によるゲルろ過にかけた。緩衝液として0.6%コール酸ナトリウムと0.2 M塩化ナトリウムを含む0.02 Mトリエタノールアミン塩酸緩衝液pH 8.0を用いた。このときのフラクシオンサイズは6.2 mlで、流速は20 ml/hrであった。

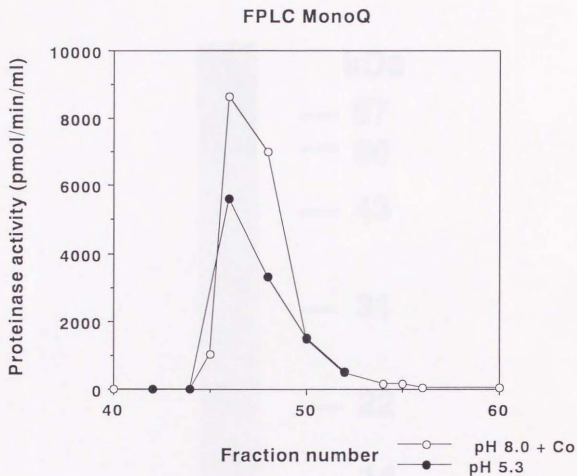


図20 金属依存性プロテアーゼのFPLC MonoQ

セファクリクS-200によって得られた活性画分を0.01 M ルブロールPXを含むトリエタノールアミン塩酸緩衝液pH 8.0に対して透析した。透析した活性画分を3等分し、それぞれ0.02 M トリエタノールアミン緩衝液pH 8.0で平衡化したFPLCのMonoQカラムにかけた。カラムを同じ緩衝液で洗った後、0-0.5 M NaCl (15ml) で溶出を行った。このときのフラクションサイズは0.3 mlで、流速は0.5 ml/minであった。

## SDS-PAGE

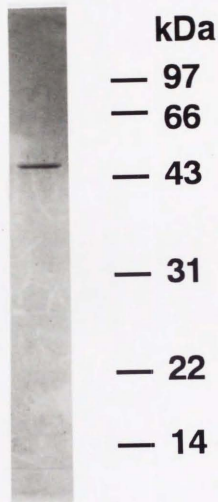


図21 金属依存性プロテアーゼのSDS-PAGE

FPLC MonoQによって得られた活性画分を、12.5%のゲルを用いて還元条件下でSDS-PAGEにかけた。泳動終了後にゲルを銀染色にかけた。

### pH Dependence of activity toward Boc-RVRR-MCA

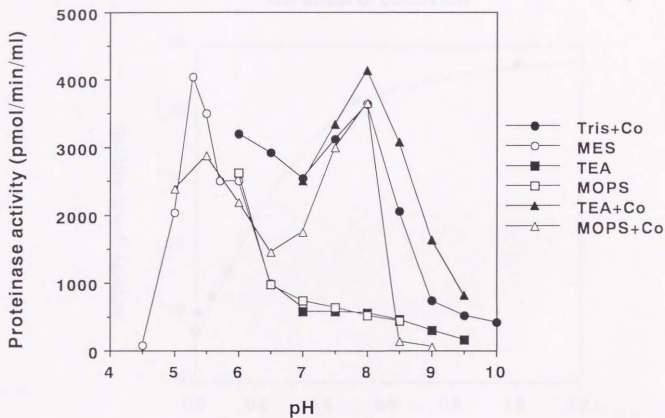


図22 金属依存性プロテアーゼのBoc-Arg-Val-Arg-Arg-MCAに対するpH依存性

精製された金属依存性プロテアーゼを用いて、活性のpH依存性を調べた。それぞれの緩衝液は0.1 Mのものを用い、 $\text{Co}^{2+}$ イオン存在下で活性を測定したときの $\text{Co}^{2+}$ イオンの濃度は1 mMであった。

The effect of cobalt ion

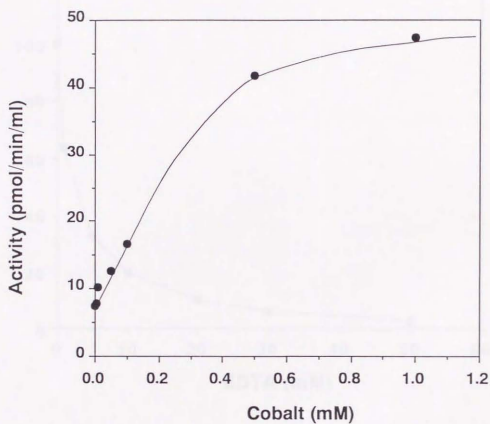


図23 金属依存性プロテアーゼに対する $\text{Co}^{2+}$ の効果

0.1 M トリス塩酸緩衝液 pH 8.0 中での Boc-Arg-Val-Arg-Arg-MCA 基質との反応に対する  $\text{Co}^{2+}$  イオンの効果を調べた。反応は  $37^\circ\text{C}$  で 69 分間行った。

### Effect of EDTA

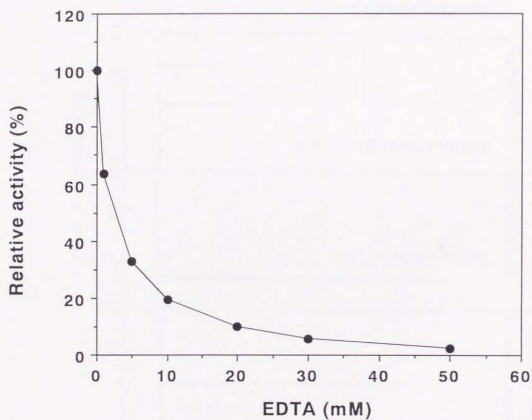


図24 金属依存性プロテアーゼに対するEDTAの効果

0.1 M トリス塩酸緩衝液 pH 8.0 中での Boc-Arg-Val-Arg-Arg-MCA 基質との反応に対する EDTA の効果を調べた。反応は 37°C で 69 分間行った。

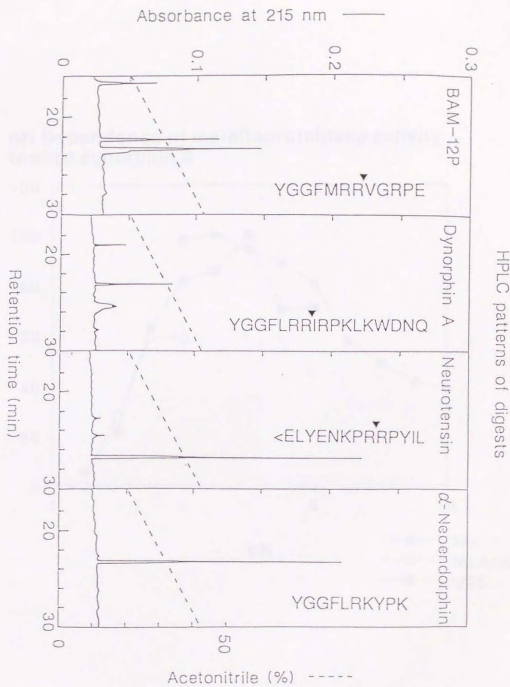


図25 金属依存性プロテアーゼのペプチドに対する基質特異性

0.04 M トリス塩酸緩衝液 pH 8.0 中での各種の生理活性ペプチド 1 nmol に対する基質特異性を調べた。反応は 37°C で 30 分間行い、生じた分解産物を HPLC によって分析した。



pH Dependence of metalloproteinase activity toward dynorphin A

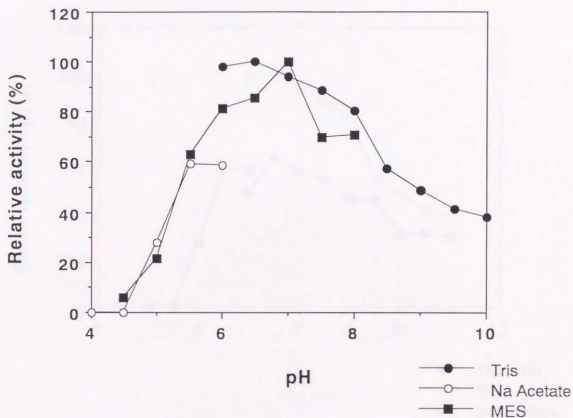


図26 ダイノルフィンAに対する金属依存性プロテアーゼのpH依存性

0.04 mMのダイノルフィンAに対して種々のpHの緩衝液中で金属依存性プロテアーゼを反応させた。トリス塩酸と酢酸ナトリウム緩衝液の濃度は0.04 Mで、 $\text{Co}^{2+}$ イオンがある場合は $\text{Co}^{2+}$ の濃度は1 mMであった。反応は37°Cで30分間行い、HPLCによって分析した。

pH Dependence of metalloproteinase activity toward dynorphin A

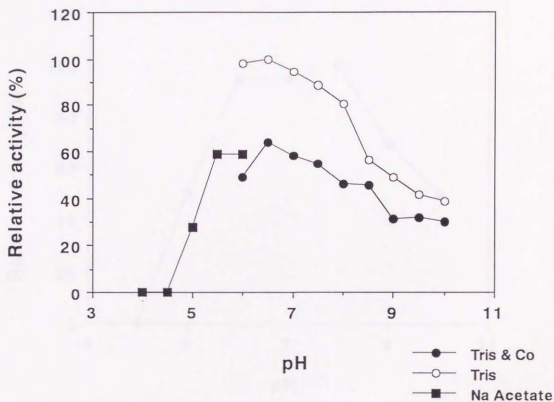


図27 ダイノルフィンAに対する金属依存性プロテアーゼのpH依存性  
 0.04 mMのダイノルフィンAに対して種々のpHの緩衝液中で金属依存性プロテアーゼを反応させた。用いた緩衝液はトリス塩酸とMES-NaOHと酢酸ナトリウムで、その濃度は0.04 Mであった。反応は37°Cで30分間行った。

### pH Dependence of metalloproteinase activity toward BAM-12P

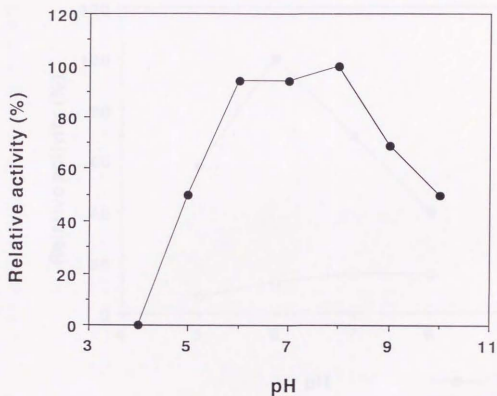


図28 BAM-12Pに対する金属依存性プロテアーゼのpH依存性

0.04 mMのBAM-12Pに対して種々のpHの緩衝液中で金属依存性プロテアーゼを反応させた。用いた緩衝液はトリス塩酸とMES-NaOHで、その濃度は0.04 Mであった。反応は37°Cで30分間行った。

### pH Dependence of metalloproteinase activity toward proalbumin 1-10

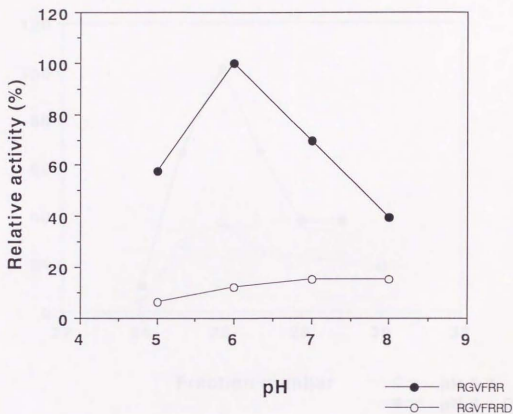


図29 プロアルブミンペプチド1-10に対する金属依存性プロテアーゼのpH依存性

0.04 mMのプロアルブミン (RGVFRDAAHK) に対して種々のpHの緩衝液中で金属依存性プロテアーゼを反応させた。用いた緩衝液はMES-NaOHで、その濃度は0.04 Mであった。反応は37°Cで1 hr行った。

### Identification of two proteolytic activities on Superose 12

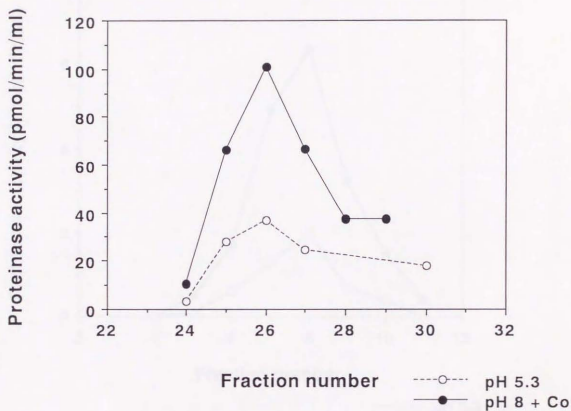


図30 金属依存性プロテアーゼのSuperose 12ゲルクロマトグラフィー

精製されたプロテアーゼをSuperose 12によるゲルクロマトグラフィーにかけた。カラムにかけたプロテアーゼは1,210 unitsで、用いた緩衝液は0.2 M塩化ナトリウムを含む0.02 M トリエタノールアミン塩酸緩衝液pH8.0であった。このときのフラクションサイズは1 mlで、流速は0.5 ml/minであった。

### Identification of two proteolytic activities on PAGE

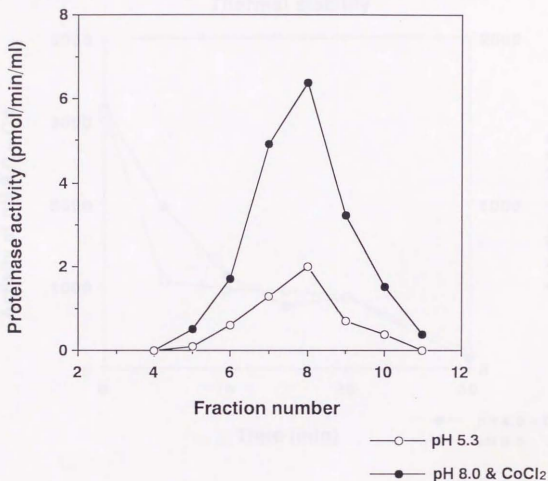


図31 金属依存性プロテアーゼのPAGE

精製された金属依存性プロテアーゼ120 unitsをPAGEにかけた。ゲルは5%Tで0.01%ルブロールPXと1 mM CaCl<sub>2</sub>と0.02 mM ZnCl<sub>2</sub>を含んでいた。泳動後に分離ゲルを上端から1.5 mmずつスライスし、すり潰した後に0.2 mlの0.02 Mトリエタノールアミン塩酸緩衝液pH 8.0を加えて4°Cで保存した後にそれぞれの断片から溶出してきたメタプロテアーゼとセリンプロテアーゼの活性を測定した。

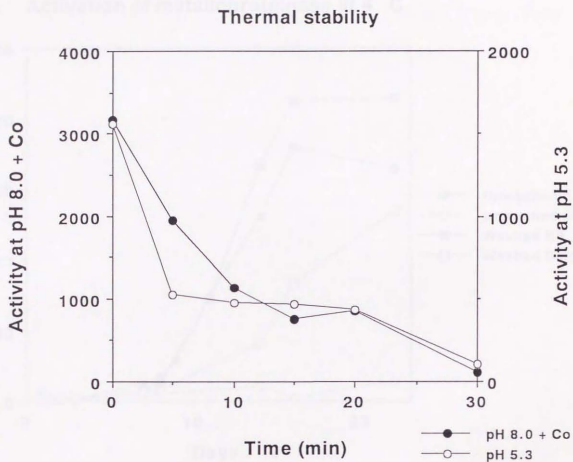


図32 金属依存性プロテアーゼの熱安定性

メタプロテアーゼ活性とセリンプロテアーゼ活性の43°Cにおける熱安定性を調べた。精製されたプロテアーゼ24 units (2  $\mu$ l) に水48  $\mu$ lを加えて43°Cに種々の時間置いた後にBoc-Arg-Val-Arg-Arg-MCA加水分解活性を調べた。

### Activation of metalloproteinase at 4 C

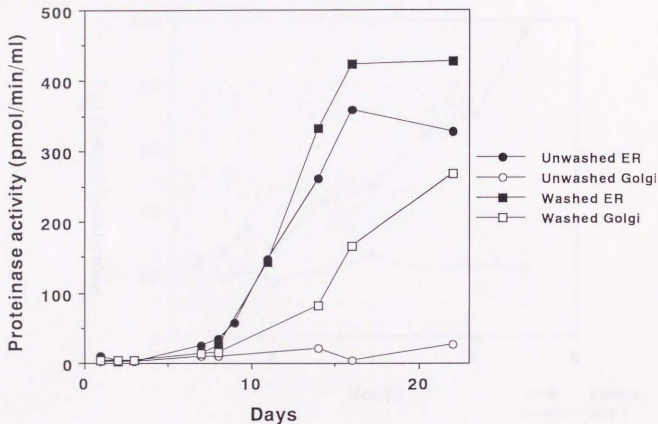


図33 可溶性ミクロソーム中の金属依存性プロテアーゼ活性の活性化

小胞体膜画分とゴルジ体膜画分をそれぞれ1%コル酸ナトリウムと0.15 M塩化ナトリウムを含む0.02 Mトリエタノールアミン塩酸緩衝液pH 8.5でホモジェナイズし、4°Cで保存した場合の活性の時間変化を調べた。小胞体とゴルジ体は、それぞれについて1 M KClで洗いの処理を行ったもので行っていないものを用いた。活性は、pH 8.0で1 mM  $\text{CoCl}_2$ 存在下で測定した。



### Activation of metalloproteinase at room temperature

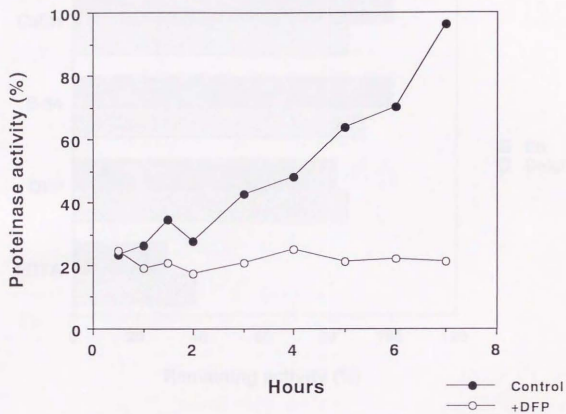


図34 可溶化ミクロソーム中の金属依存性プロテアーゼ活性の室温での活性化

1%コール酸ナトリウムと0.15 M塩化ナトリウムを含む0.02 Mトリエタノールアミン塩酸緩衝液pH 8.5で可溶化した、KCl未処理の小胞体膜画分中のメタロプロテアーゼ活性の室温における活性化を調べた。

### Effects of inhibitors at pH 5.3

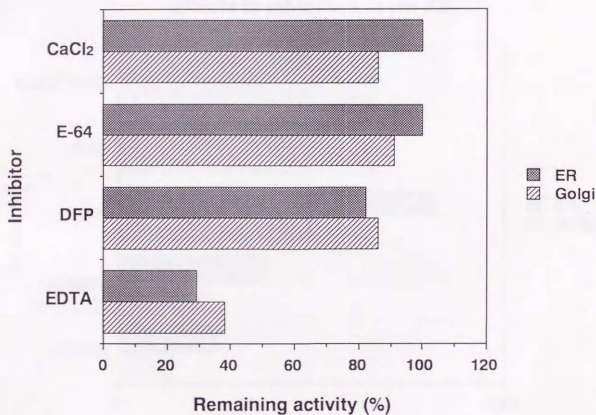


図35 小胞体とゴルジ体に存在する金属依存性プロテアーゼの阻害剤プロフィール  
可溶化した小胞体膜画分とゴルジ体膜画分中に活性化してきた金属依存性プロテアーゼ  
活性 (pH5.3) に対する種々のプロテアーゼ阻害剤の効果を調べた。用いた試薬は、1 mM  
CaCl<sub>2</sub>、0.1 mM E-64、1 mM DFP、10 mM EDTAであった。

### Effects of inhibitors at pH 8.0

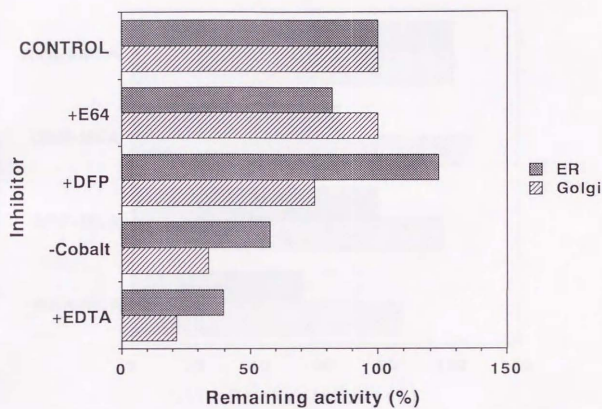


図36 小胞体とゴルジ体に存在する金属依存性プロテアーゼの阻害剤プロフィール

可溶化した小胞体膜画分とゴルジ体膜画分中に活性化してきた金属依存性プロテアーゼ活性 (pH 8.0, 1 mM  $\text{CoCl}_2$  存在下) に対する種々のプロテアーゼ阻害剤の効果を調べた。用いた試薬は、0.1 mM E-64、1 mM DFP、10 mM EDTAであった。

### Substrate specificity at pH 5.3

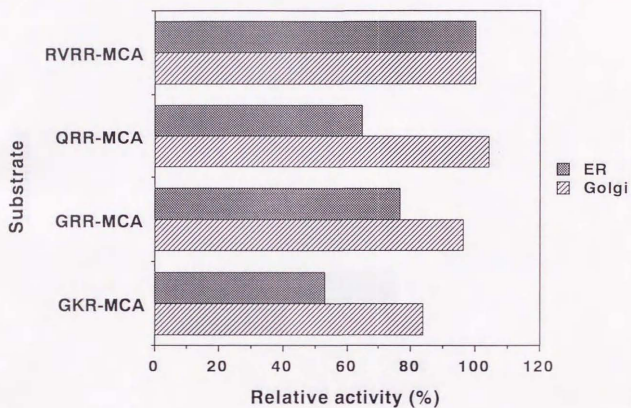


図37 小胞体とゴルジ体に存在する金属依存性プロテアーゼのMCA基質特異性

可溶化した小胞体膜画分とゴルジ体膜画分中に活性化してきた金属依存性プロテアーゼ活性 (pH 5.3) の種々のMCA基質に対する特異性を調べた。

### Substrate specificity at pH 8.0

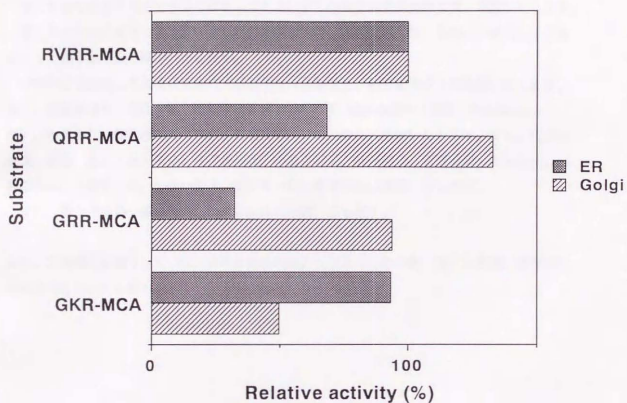


図38 小胞体とゴルジ体に存在する金属依存性プロテアーゼのMCA基質特異性  
可溶化した小胞体膜画分とゴルジ体膜画分中に活性化してきた金属依存性プロテアーゼ  
活性 (pH 8.0, 1 mM  $\text{CoCl}_2$  存在下) の種々のMCA基質に対する特異性を調べた。

## 謝辞

本研究を行うに当たり、6年間の長きに亘り終始あたたかい御指導と励ましを頂きました指導教官の東京大学教授 高橋健治先生に感謝いたします。公私にわたり種々の御助言を頂き、また自由に研究をさせて下さいましたことを深く感謝いたします。

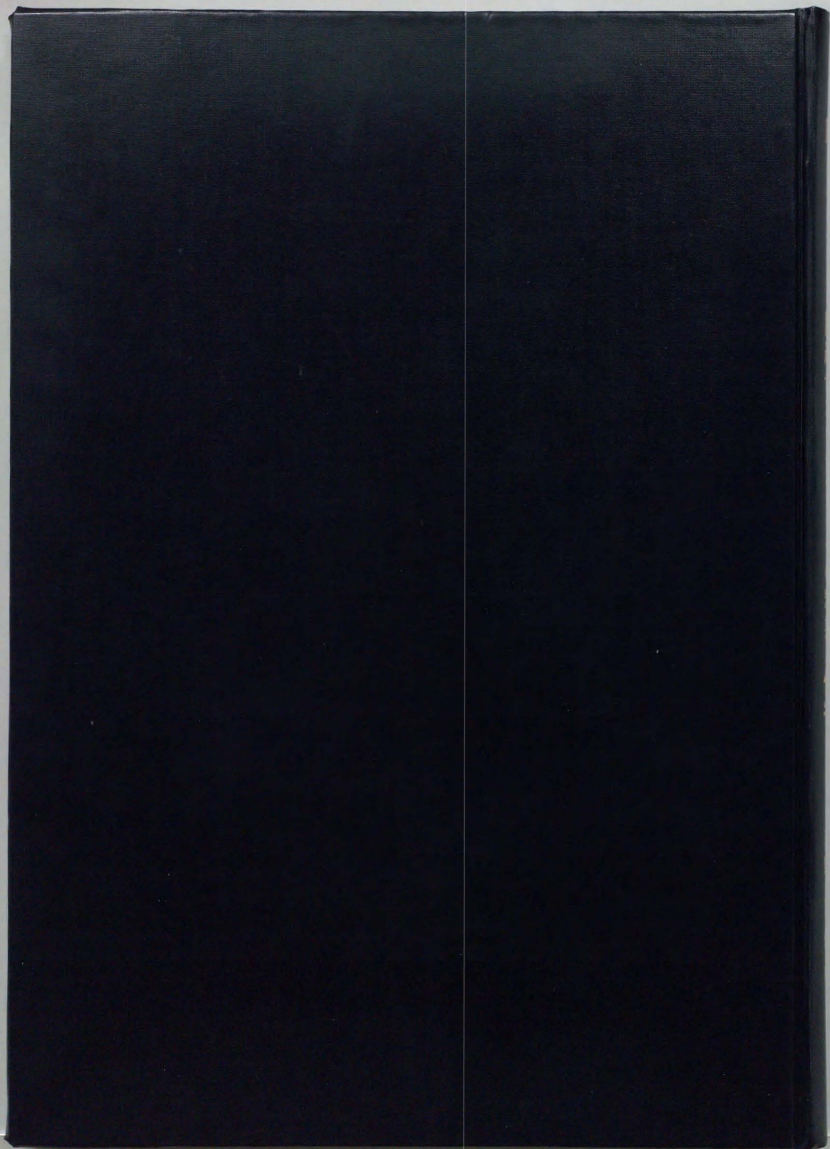
また、学部4年の頃から修士課程、博士課程にわたって細かな技術を熱心に御指導して下さいました高橋孝行先生（現在 北海道大学教授）に深く感謝いたします。

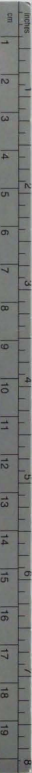
常に有益な助言を与えて下さり励まして下さいました田之倉優助教授に深く感謝いたします。常にあたたかく見守って下さいました井上英史先生、村松知成先生、各種の分析をして下さいました櫻井康子様に感謝いたします。

1988年以来在籍した高橋研究室の大学院学生、学部学生、研究生の方々に感謝いたします。特に、石原健博士（現在 国立遺伝学研究所）、S. B. P. Athauda博士（現在 Peradeniya大学）、内野尚氏、関本澄人氏（現在 群馬大学）、嶋田毅氏に感謝いたします。また、荒川秀雄氏（現在 東京工業大学）、渡辺長治氏、小島正樹氏、孔光勲氏、金龍泰氏、全光吳氏、金希姫さん、土屋勇一氏、小嶋一宏氏、秦野賢一氏、林貴明氏に感謝いたします。

また、第1内科の一瀬雅夫氏、松嶋成志氏に感謝いたします。

また、この場をお借りして、私の研究生生活を内面から支えてくれた妻 裕子と両親に感謝の意を表させていただきます。





### Kodak Color Control Patches

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black



### Kodak Gray Scale

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19



© Kodak, 2007 TM Kodak