

小腸膜結合性新規プロテアーゼに関する研究

土屋 勇一

①

## 学位論文

< Study on a Novel Membrane-bound Proteinase from Intestinal Mucosa >

(小腸膜結合性新規プロテアーゼに関する研究)

平成7年12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

<土屋 勇一>

## 目次

略語表	-----	2
第一章	序章	----- 3
第二章	小腸膜結合性新規プロテアーゼの精製と性質 およびcDNAクローニングの試み	
	2-1 序	----- 9
	2-2 試薬と材料	----- 10
	2-3 方法	----- 13
	2-4 結果	----- 21
	2-5 考察	----- 37
第三章	小腸膜結合性新規プロテアーゼの生理機能に関する考察 -コレシストキニンプロセシング酵素の可能性について-	
	4-1 序	----- 43
	4-2 試薬と材料	----- 46
	4-3 方法	----- 47
	4-4 結果	----- 57
	4-5 考察	----- 61
第四章	総合的考察および展望	----- 64
第五章	引用文献	----- 70
第六章	謝辞	----- 79



## 略語表

- BAM-12P: bovine adrenal medulla dodecapeptide  
BCA: bicinconinic acid  
Bz-: benzoyl-  
Boc-: t-butyloxycarbonyl-  
CCK: cholecystokinin  
DFP: diisopropylfluorophosphate  
DMSO: dimethylsulfoxide  
EDTA: ethylenediaminetetraacetate  
EGTA: O,O'-bis (2-aminoethyl) ethyleneglycol-N,N,N',N'-tetraacetate  
E-64: L-trans-epoxysuccinyl-leucylamide-(4-guanidino-)-butane  
IPTG: isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside  
MATE: membrane-bound (associated) arginine-specific trypsin-like enzyme  
MCA: 4-methylcoumaryl-7-amide  
pCMB:p-chloromercurybenzoic acid  
SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis  
Suc-: succinyl-  
TLCK: N $^{\alpha}$ -tosyl-L-lysine chloromethyl ketone  
TPCK: N $^{\alpha}$ -tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone  
X-Gal: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D(-)-galactopyranoside  
Z-: benzyloxycarbonyl-

## 第一章

### 序章

蛋白質分解酵素（プロテアーゼ、EC 3.4.XX.XX）は、ペプチド結合の加水分解を触媒する酵素の総称である。プロテアーゼ研究の歴史は古く、特に消化に関与する分泌型プロテアーゼであるペプシン、トリプシン、キモトリプシンなどは、当研究室を始めとする多くの研究者により、その分子的性質、反応機構、活性化のメカニズムなどが詳細に解析されており、酵素学の発展において非常に重要な位置を占めている。

プロテアーゼはその活性中心構造によって大きく4つのグループに大別される（1）。すなわち、キモトリプシンやサチライシンなど活性中心残基がセリンであるセリンプロテアーゼ、パパインやカテプシン群など活性中心残基がシステインであるシステインプロテアーゼ、ペプシンなど活性中心がアスパラギン酸であるアスパラギン酸プロテアーゼ、そしてサーモリシンやコラゲナーゼなど活性中心に金属を配位する金属プロテアーゼである。各グループにはそれぞれ特異的な阻害剤が存在し、これらを用いることで容易に各酵素の帰属が可能であるが、近年になり、これらのいずれにも属しない新しいタイプのプロテアーゼが発見されている（スレオニンプロテアーゼであるプロテアソーム（2）など）。また各群の代表的酵素については詳細な結晶構造解析がなされており、蛋白質の構造機能相関研究に多大な貢献を与えている。

ウイルス・微生物から高等動物・植物に至るまでほぼすべての生物に広く存在するプロテアーゼは、生体内の機能調節因子としても広範かつ非常に重要な役割を担っている。ほ乳類においては食物の消化に関与する酵素群が極めて初期から研究の対象となってきたが、これ以外にも、例えば複数の因子が、限定分解により順次下流の分子を活性化することで生体機能を厳密に制御している「プロテアーゼ・カスケード」の例としては、血液凝固系（3）、補体系（4）、レニン-アンジオテンシン系による血圧調節系（5）などが古くから知られている。

近年特に注目を浴びている分野として、細胞内プロテアーゼの機能が挙げられる。これまでに着目されていたものとしては、リソソーム内に蓄積されたカテプシン群による細胞内不要蛋白質の分解がある。分泌蛋白質などが膜透過を行う際に機能する、蛋白質N末端のシグナルペプチドを認識・切断するシグナルペプチダーゼ（6）や、蛋白質がミトコンドリアに移行する際に働くミトコンドリアプロセッシングプロテアーゼ（7）についても、既に多くの研究がなされている。ごく近年になり、抗原のプロセッシング及び提示におけるプロテアソームの関与（8）、細胞質や核内において、細胞周期制御因子がユビキチン分解系によって調節を受けていること（9）、正しくフォールディングの行われなかった異



常蛋白質などが、小胞体において速やかに分解される例 (10) などが知られるようになった。さらにアポトーシス (予定細胞死) と呼ばれる現象においても、プロテアーゼがその鍵分子として働いていること (11) などが明らかになり、改めてプロテアーゼの重要性が認識されるところとなっている。

このようなプロテアーゼの多様かつ重要な生理機能の中でも、近年最も進歩を遂げた分野の一つとして、前駆体活性化の分子機構がある。ペプチドホルモンや生理活性ペプチドなどは最初前駆体として合成され、細胞内の特定器官において厳密な限定分解を受けた結果、初めて生理活性を持つ機能分子として作用するようになる。様々な前駆体 cDNA の配列が解析された結果、大部分の分子は活性化の切断シグナルとして Arg 残基、特に Arg-Arg / Lys-Arg といった塩基性アミノ酸対を持っていることが明らかになった。したがって前駆体活性化に関与するプロセッシングプロテアーゼもこの配列を特異的に認識すると考えられ、古くからその酵素の実体を明らかにする試みがなされてきた。前駆体蛋白質や合成基質を用いた生化学的解析は、主に脳や肝臓において数多くなされており、その結果多数の新規プロテアーゼが同定、精製されている。また近年には、酵母 *S.cerevisiae* の遺伝学的解析から得られた KEX2 遺伝子の産物であるセリンプロテアーゼ Kex2 が、prepro- $\alpha$ -mating factor 及び killer toxin の活性化酵素であることが証明された。さらにこの酵素と高い相同性を持つ乳類ホモログとして、furin / PC2 / PC3 / PC4 / PACE4 / PC6 など数多くの分子がクローニングされており、現在では kexin family として総称されている (12、13、14)。これら一群の酵素は、組織から完全な形で精製は成功していないものの、発現系を用いた生化学的特性の解析や、前駆体との共発現系を用いた実験から、前述した典型的な活性化シグナルを正確に認識してプロセッシングを行うことが証明されている。これらの酵素はトランスゴルジあるいは分泌顆粒といった細胞内コンパートメントに局在する膜結合酵素であると考えられている。膜結合性というのは酵素の機能を考える上で非常に重要な問題である。すなわち前駆体分子は生合成後分泌に至る経路の中で、ある特定の小器官において正確に限定分解が行われる必要があり、そのためには活性化酵素自体がある特定の場所に止まって機能することが必要であるからで、前述の kexin family プロテアーゼ群はこの条件を満たすものである。またこれらの酵素群については、切断配列特異性についても詳細な解析がなされており、すでに知られている前駆体内の活性化部位、特に C 末端のアミド化を伴うような配列に対しては正確にプロセッシングを行うことが明らかにされていることから、大部分の前駆体は、構成的あるいは誘導的分泌経路どちらを通るかに依存して、kexin family のいずれかの酵素によりプロセッシングを受けるという説が共通の認識となっ

ている。しかしながら、これらのプロテアーゼによっては認識されないであろうと思われる切断シグナルを持つ前駆体分子も多数報告されており(14、15、16)、前駆体活性化のメカニズムにはまだ明らかにすべき点が多く残されている。

小腸は胃と並んで重要な消化・吸収の場である。さらに最近になって、小腸には自律神経とは別個に、脳中枢神経系とは独立した腸管神経系が存在することが明らかにされてきている。またそれに伴い、ペプチド性神経伝達物質やペプチドホルモンなどで、脳に存在する分子が小腸にも発現している場合(「脳腸ホルモン」)や、腸管特異的に発現する分子なども発見されてきた。このような意味から小腸は、脳に劣らず重要な生体高次機能を担う器官であると考えられ、その機能調節に関与すると思われる酵素の解析は非常に重要かつ興味深い問題である。小腸に存在するプロテアーゼの中で、これまでに詳細な解析が行われたものとしては、消化系の膵臓分泌酵素であるトリプシン、キモトリプシン、エラスターゼの他に、いくつかの膜結合酵素がある。アミノペプチダーゼM、ジペプチジルペプチダーゼIV、中性エンドペプチダーゼ(エンケファリナーゼ)、メブリン、アンジオテンシンI変換酵素(ACE)といった、金属プロテアーゼを中心とする酵素がこれまでに同定されているが、これらはいずれも主として小腸上皮細胞の刷子縁膜に存在することが証明されている。また小腸以外にも腎臓や肝臓を始め各種器官の細胞膜に存在していることが知られており、消化ペプチド断片の完全分解以外にも、各種生理活性ペプチドの作用後の速やかな分解に関与していることが様々な解析から明らかになってきている。さらに小腸特異的に発現している酵素としてセリンプロテアーゼであるエンテロペプチダーゼが知られている。この酵素は十二指腸より消化管に分泌され、膵臓から送られる消化酵素前駆体の一つトリプシノゲンを限定分解により活性化する、プロセシングプロテアーゼの一種である。しかしながら前述したような、膜結合性の前駆体活性化酵素の報告はほとんどない。脳や副腎髄質、肝臓においては、各種生理活性ペプチド前駆体の活性化に関与すると推測される膜結合プロテアーゼの同定が生化学的手法により数多く行われており、小腸においても同一あるいは類似の酵素が存在すると十分に推察できる。しかしながら小腸においてこのような研究は、潜在的重要性にもかかわらずほとんどなされていない。我々はこの点に着目し本研究に着手した。

上に述べた理由より、前駆体プロセシングに関与する可能性のある酵素の条件として、○膜画分、特に小胞体などの細胞内小器官が回収されるミクロソーム画分に含まれる、membrane-bound / membrane-associated な酵素である

○トリプシン様活性(特にArg残基のC端側を切断する)活性を持つ



という二点を条件とし、大量に入手しやすいブタ小腸粘膜を用いて、合成基質によるスクリーニングを開始したところ、前述した既知の酵素活性以外に、Boc-Gln-Ala-Arg-MCA を最も良い基質とする新規膜結合性プロテアーゼの活性を見出すことができた。以後本論文ではこの酵素を、Membrane-bound(associated) Arginine-specific Trypsin-like Enzyme の略としてMATEと表記する。本論文では、生化学及び遺伝子工学などの技術を用いて、MATEの生化学的性質及び生理機能の解析を総合的に解明することを目的とした。内容の関連性から、大きく以下の三章に分けてまとめることとする。

まず第二章では、生化学的手法による、MATEの完全精製と性質の解析及び部分アミノ酸配列の決定について示す。本章の内容は既報(17)に基づく。第三章では、分子生物学的手法を中心に用い、cDNAライブラリーの作製及びスクリーニング、RT-PCRによるMATEのcDNAクローニングの試みを記す。さらに第四章においては、生理機能に関する一考察として、生理活性ペプチドの一つであるコレシストキニン(CCK)のプロセッシングへのMATEの関与の可能性を、生化学及び遺伝子工学的手法を用い基質の立場から解析する。そして第五章において、本論で述べなかった予備的データを含め、総合的な考察及び今後の展望について述べることとする。

## 第二章

### 小腸膜結合性新規プロテアーゼの精製と性質 およびcDNAクローニングの試み



## 2-1 序

序章で述べた作業仮説、すなわち

○膜画分、特に小胞体などの細胞内小器官が回収されるミクロソーム画分に含まれる、membrane-bound / membrane-associated な酵素である

○トリプシン様活性（特にArg残基のC端側を切断する）活性を持つ

という二点を条件とし、大量に入手しやすいブタ小腸粘膜を用いて、スクリーニングを開始するとともに、既知の酵素についても異同を明らかにするため活性を同定した。アミノペプチダーゼM、ジベプチジルペプチダーゼIVについては合成基質により、エンケファリナーゼは熱変性カゼインにより、エンテロペプチダーゼはトリプシノーゲン活性化能によりそれぞれ活性を測定し、部分精製を行った。しかしこれらとは全く別個で、 $P_1$ 部位にArgを持つ基質に良く作用する新規活性を検出した。当初は Boc-Gln-Arg-Arg-MCAを用い pH8.0で活性を検出していたが、基質を Boc-Gln-Ala-Arg-MCAに、pHを9.5に変更することで、この活性をより特異的に検出できることが判明したため、このように活性測定系を改良し、新規膜結合性トリプシン様プロテアーゼを完全精製することができた。本章ではまず前半部で、本酵素の精製、生化学的性質の解析および部分アミノ酸配列について報告する。さらに後半部では、RT-PCRおよびライブラリーのスクリーニングの二種類の方法を用いてcDNAクローニングを試みたのであわせて報告する。

## 2-2. 試薬と材料

### <酵素の精製と性質>

ブタ小腸	東京芝浦臓器
DE52	ワットマン
ブチルトヨパール	東ソー
TSKgel ODS-120T	"
Bio-Gel P-150	バイオラッド
SDS-PAGE 分子量マーカー	"
ベンズアミジナーセファロース	ファルマシア
FPLC MonoQ	"
FPLC Mono P	"
フルオレスアミン	シグマ
DFP	"
大豆トリプシンインヒビター	"
ウシ膵臓トリプシンインヒビター	"
pCMB	"
EDTA	"
o-フェナントロリン	"
ルブロールPX	"
酸化インシュリンB鎖	"
クマシーブリリアントブルーG250	"
各種MCA基質	ペプチド研究所
各種生理活性ペプチド	"
E-64	"
ホスホラミドン	"
デオキシコール酸ナトリウム	ナカライテスク
銀染色キット	和光純薬
TPCK	"



TLCK	アルドリッチ
BCAT <sup>TM</sup> /microBCAT <sup>TM</sup> キット	ビアス
ProSpin <sup>TM</sup>	アプライドバイオシステム
ヒドロキシアパタイト	生化学工業
ロイベプチン	青柳高明博士の御供与による
アンチパイン	"

その他の試薬は、特級もしくはそれ以上のものを用いた。

#### <cDNAクローニング>

ラット小腸・肝臓	埼玉実験動物
各種制限酵素	東洋紡
アルカリフォスファターゼ (子牛小腸)	"
T4ポリヌクレオチドキナーゼ	"
DNAライゲーションキット	宝酒造
QuickPrep <i>Micro</i> mRNA purification Kit	ファルマシア
First Strand cDNA Synthesis Kit	"
TimeSaver cDNA Synthesis Kit	"
dNTP mix	"
AutoRead Sequencing Kit	"
NICKカラム	"
Taq ポリメラーゼ	Promega
アガロース	ニッポンジーン
cDNA rapid Cloning Module - $\lambda$ gt10	アマシャム
Hybond N	"
イーストエクストラクト	Difco
バクトトリプトン	"
合成 DNA	サワディーテクノロジー
GeneClean II	Bio 101

GigaPack II Gold

STRATAGENE

その他の試薬は、特級もしくはそれ以上のものを用いた。

大腸菌

MV1190  $\Delta(lac-pro AB), \Delta(srl-rec A) 306:: Tn10, sup E, thi-, [F', lac Iq, lacZ \Delta M15 pro AB, tra D 36]$

プラスミド調製など一般的用途

L87  $hsd R (r_k-m_k^+) trp R met D sup E ton A$

NM514  $hsd R514 (r_k-m_k^-) argH gal E gal X str A lyc B7 (Hfl^+)$

cDNAライブラリー作製

ベクター

$\lambda$ gt10 cDNAライブラリー作製

M13mp19 DNAシーケンス用サブクローニング



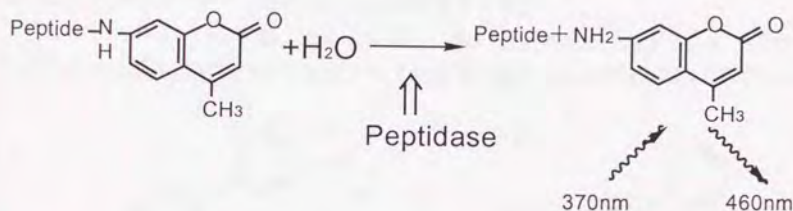
## 2.3.方法

### ＜酵素の精製と性質＞

#### メチルクマリリアミド (MCA) 基質によるペプチダーゼ活性の測定

メチルクマリリアミド誘導体を基質とした活性は、Yanagidaらの方法 (18) に従った。

4-メチル-7-クマリリアミド基質はペプチダーゼにより下図の様に加水分解される。この時蛍光物質である7-アミノ-4-メチルクマリンが遊離するので、この蛍光強度を測定することにより、活性が測定できる。



実際には、適当な pH の緩衝液 0.5ml に酵素溶液 1-10 $\mu$ l を加え、37 $^{\circ}$ C で数分予温したのち、10mM の MCA 基質を 5 $\mu$ l 加え、37 $^{\circ}$ C で 1-10 分反応させた後、反応停止液として、100mM モノクロロ酢酸を含む酢酸ナトリウム緩衝液 pH4.3 を 2.5ml 加えた。この溶液の励起波長 370nm、蛍光波長 460nm での蛍光強度を測定し、活性を測定した。活性の単位は、1nmol の 4-アミノ-7-メチルクマリンを 1 分間に遊離する酵素の量を 1 ユニットとした。

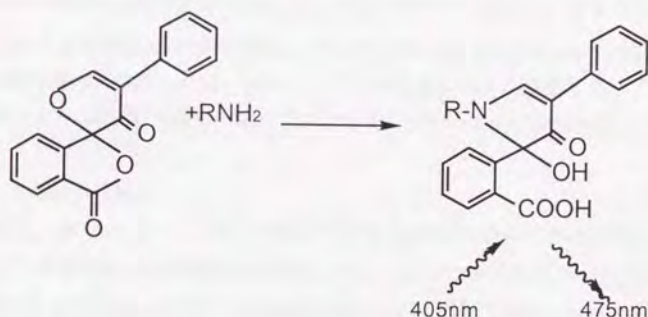
なお、MATE の活性測定には緩衝液として 0.1M グリシン-水酸化ナトリウム緩衝液 pH9.5 (グリシン緩衝液) を用いている。またアミノペプチダーゼ M 及びジペプチジルペプチダーゼ IV の活性測定は、それぞれ Ala-MCA 及び Gly-Pro-MCA を用い、0.1M トリス-塩酸緩衝液 pH8.0 で測定した。

#### フルオレスアミンを用いた中性プロテアーゼ活性の高感度測定

中性プロテアーゼ活性は、Sogawa らの方法 (19) を改変した方法により行った。基質溶液は、各種蛋白を 1% の濃度で、0.1M ほう酸-炭酸ナトリウム緩衝液 pH8.0 に溶解し、

80℃で2時間熱変性をさせたものである。活性を測定するために、基質溶液と酵素の混合液250μlを37℃で18時間反応させた後、5%トリクロロ酢酸溶液を750μl加えて反応を停止させた。この溶液を室温で30分放置した後、12,000rpmで10分間遠心し、分解されない蛋白質を沈澱させた。この上清を200μl取り、0.1Mほう酸-水酸化ナトリウム緩衝液 pH8.5を2.0ml加え、次いで0.3mg/mlのフルオレスアミンを含むアセトン溶液0.5mlを激しく攪拌しながら加えた。この反応溶液の、励起波長405nm、蛍光波長475nmでの蛍光強度を測定し活性を測定した。ただし今回の実験においては、蛋白質基質に対する活性は非常に弱かったために、この測定方法は積極的に用いておらず、ユニットの定義もしていない。ただしエンケファリナーゼ活性はこの方法で検出できる。

フルオレスアミンは第一級アミンと反応し、強い蛍光物質を生成する。この蛍光を測定することで上清中の切断ペプチドのアミノ末端を定量することが本測定の原理である。



#### ペプチド基質分解活性と切断位置の測定

ペプチド基質に対する活性測定は、Takahashiらの方法(20)に従った。基質1nmolと酵素0.1ユニットを、10mM EDTAを含む20μlの0.07M トリス-塩酸緩衝液pH8.0中で2.5時間もしくはそれ以上の時間反応させた。反応により生じたペプチド断片は、アプライドバイオシステム 130Aセパレーションシステム及びAquapore OD-300 C<sub>18</sub>カラム(2.1 X 30 mm)を用い分取した。溶出は0.1%トリフルオロ酢酸系で、アセトニトリル濃度を0から70%まで直線的に上げることで行った。220nmの吸収に基づきピークを分取し、凍結乾燥後、アプライドバイオシステム 420A / 130A-920A アミノ酸組成分析器にかけ、アミノ酸組成及び

量から、切断位置及び切断率を算出した。

### SDS-PAGE

SDS-PAGEは、12.5%のゲルを用いLaemmliの方法(21)に従って行った。泳動後は通常は和光の銀染色キットを用いて染色し、写真撮影時にはクマシーブリリアントブルーを用いた。

### 蛋白質の定量

蛋白質の定量は、280nmの吸光度測定、及びSmithらによるBCA法(22)を用いた。蛋白量の標準として、ウシ血清アルブミンを使用した。

### N末端アミノ酸配列の決定

脱塩後凍結乾燥した精製酵素500ユニットを、50 $\mu$ lの0.2M塩化ナトリウムを含む20mM酢酸ナトリウム緩衝液pH4.5に溶解し、プロトコルに従ってProSpin PVDF膜に吸着させた。この膜を純水で洗浄した後(メタノールを加えると膜から遊離する)、直接アプライドパイオシステム477A/120A プロテインシークエンサーにかけ分析を行った。

### 部分アミノ酸配列の決定

本実験は、キリンビール基盤研究所の岩松明彦氏により行われた(28)。精製酵素1,000ユニットをSDS-PAGE後PVDF膜に転写し、膜上でS-カルボキシメチル化を行った後、*Acromobacter* Protease I 及びEndopeptidase Asp-Nを用いて*in situ* digestionを行い、遊離したペプチド断片をHPLCで分取後、島津PSQ-1プロテインシークエンサーにより配列を解析した。



## 酵素の精製方法

特に断らない限り、以下の操作はすべて4℃で行った。

ブタ小腸は解体後軽く水で内部を洗浄し、氷冷して実験室に持ち帰った。はさみで不用な脂肪分を取り除き、およそ30cmの長さに切り分けた後、スライドガラスを用いて小腸内部の粘膜をはぎ取った。これを集めて-20℃で保存し、必要に応じて解凍して用いた。

解凍した粘膜組織約1,600g（二頭分）に二倍量の0.25Mしょ糖溶液を加え、ワーリングブレンダーを用いて細胞を破碎し（10,000 rpm X 20 sec X 10 回）、粗ホモジネイトを得た。これを10,000 X g, 30 min 遠心し、上清を得た。この上清を90,000 X g, 120 min 遠心し沈澱を回収した。この沈澱を0.1Mほう酸-炭酸ナトリウム緩衝液pH8.0（ほう酸緩衝液）で、ポッターエルベジエム型ガラス-テフロンホモジナイザーを用いて（中速で 2ストローク）ホモジナイズし体積を400mlとした。これを90,000 X g, 120 min 遠心し、沈澱を得た。これを1M塩化カリウムを含むほう酸緩衝液で同様にホモジナイズし、90,000 X g, 120 min 遠心して沈澱を回収した。この操作で、膜に静電的に緩く結合した蛋白質や、小胞内に蓄積された可溶性蛋白質は除去されたものとした。最終的に得られた沈澱をほう酸緩衝液でホモジナイズし、体積を400mlに合わせてミクロソーム画分とした。また、Ca<sup>2+</sup>を用いた選択的沈澱法を用いる際は、以下の操作を行った。10,000 X g, 30min 遠心して得られた上清に対し、終濃度0mMになるように塩化カルシウムを加え、1時間攪拌した後、再び10,000 X g, 30min の遠心を行った。この操作により、小胞体などの画分は沈澱するが、トランスゴルジや刷子縁膜など酸性糖に富む画分は上清に残る。MATE活性は大部分が上清に存在するため、これを用いさらに90,000 X g, 120 min 遠心し沈澱を回収した。

この溶液に10%デオキシコール酸ナトリウム水溶液（w/v）を60ml加え、ほう酸緩衝液を加えて体積を600mlに、界面活性剤濃度を1%になるように調製した。これを一晚攪拌して膜蛋白質を可溶化し、90,000 X g, 120 min 遠心後、上清を回収した。これを0.05%ルブロールPXを含むほう酸緩衝液に対して透析し、界面活性剤を交換し、可溶化画分として、以下のカラムクロマトグラフィーに用いた。

## カラムクロマトグラフィー

### (a).DE52

透析後の可溶性画分を150mlずつ四等分し、計4回の操作を行った。

可溶性画分を、0.05%ルブロールPXを含むほう酸緩衝液で平衡化したDE52カラム（2.6 X 28cm）に吸着させた。同緩衝液で洗った後、塩化ナトリウム濃度を0-0.3Mまで直線的に上げることで溶出を行った（Fig.2-1(a））。

### (b).ブチルトヨパール

上で得られた活性画分（およそ0.2Mの塩化ナトリウムを含む）に、硫酸アンモニウムを直接、20%飽和濃度になるまで加えた。これを0.02%ルブロールPX及び20%飽和硫酸アンモニウムを含むほう酸緩衝液で平衡化したブチルトヨパールカラム（2.6 X 28 cm）に吸着させた。カラムを同緩衝液で洗った後、硫酸アンモニウム濃度を20-0%飽和まで直線的に下げていくことで溶出を行った（Fig.2-1(b））。活性画分（およそ10%飽和の硫酸アンモニウムを含む）を回収した後、硫酸アンモニウムを直接、30%飽和濃度になるまで加えた。これを0.02%ルブロールPX及び30%飽和硫酸アンモニウムを含むほう酸緩衝液で平衡化したブチルトヨパールミニカラム（5ml）に吸着させ、0.1%ルブロールPXを含むほう酸緩衝液で溶出することで濃縮を行った。

### (c).ゲルろ過Bio-Gel P-150

濃縮した活性画分（およそ7ml）を、0.02%ルブロールPX及び0.2M塩化ナトリウムを含むほう酸緩衝液で平衡化したBio-Gel P-150ゲルろ過カラム（2.5 X 82 cm）に添加し、同緩衝液で溶出を行った（Fig.2-1(c））。活性画分を回収し、0.02%ルブロールPXを含む20mM トリス塩酸緩衝液pH8.0（トリス緩衝液）に対し透析した。

### (d).FPLC Mono Q

透析後の活性画分を、0.02%ルブロールPXを含むトリス緩衝液で平衡化したFPLC Mono Qカラム（0.5 X 5cm）に吸着させた。同緩衝液でカラムを洗った後、塩化ナトリウム濃度を0-0.5Mまで直線的に上げていくことで溶出を行った（Fig.2-1(d））。



#### (d'. ヒドロキシアパタイト

MATEは精製後半になると透析により失活する事があるため、改良法ではFPLC Mono Qの代わりにヒドロキシアパタイトを用いている。Bio-Gel P-150の活性画分をそのまま、0.02%ルブロールPX及び0.2M塩化ナトリウムを含むほう酸緩衝液で平衡化したヒドロキシアパタイトカラム (1 ml) に添加し、同緩衝液で十分に洗った後、0.02%ルブロールPX及び0.2M 塩化ナトリウムを含む10mM リン酸ナトリウム緩衝液pH7.5 (リン酸緩衝液) で溶出を行った。この操作により、FPLC Mono Q と同程度の精製度が得られる。

#### (e). ベンズアミジン-セファロース

活性画分 (およそ0.25Mの塩化ナトリウムを含む) を、0.02%ルブロールPX及び0.2M塩化ナトリウムを含むトリス緩衝液 (もしくはリン酸緩衝液) で平衡化したベンズアミジン-セファロースカラム (1ml) に吸着させた。同緩衝液で十分洗った後、50mMベンズアミジンを含む同緩衝液で特異的に溶出を行った。活性画分は必要に応じて NAP-25脱塩カラム (ファルマシア) でベンズアミジンを除き、最終精製標品とした。

### <cDNAクローニング>

#### 一般的手法

アルカリ法によるプラスミド調製、制限酵素反応、アガロース電気泳動など基本的な操作は、Maniatisらの成書に従った (62)。DNAライゲーションは宝酒造のキットの指示に従った。

#### RT-PCR

mRNAの調製はQuickPrep Micro mRNA purification Kitの指示に従い、およそ0.1gの組織から行った。この一部もしくは全部を用い、First Strand cDNA Synthesis Kitの指示に従って、Oligo(dT)<sub>12-18</sub> プライマーを用いて逆転写により1st strand cDNA を合成し、反応液をそのまま鋳型として用いた。PCRはPromegaの指示に従い、添付の緩衝液に2mM MgCl<sub>2</sub>を加え、0.2mM dNTP / 2μM プライマーの条件で行った。増幅条件は以下のように行った。



94°C	1 min	
X °C	1 min	5 cycles
72°C	1 min	
	↓	
94°C	1 min	
55°C	1 min	30 cycles
72°C	1 min	

X°Cの部分、37°Cから50°Cまで変化させた。増幅した断片は電気泳動後アガロースゲルより切り出し、GeneClean II を用いてキットの指示に従い精製を行った。なおプライマーのデザインはTable 3-1 に示す。

なおcDNA合成のコントロールとして、ブタ小腸ではコレシストキニン、ラット小腸及び肝臓ではグルタチオン-S-トランスフェラーゼPのプライマーを用い、正しく増幅されることを確認した。

#### 塩基配列の決定

目的の断片はM13mp19にサブクローニング後、ssDNAを鋳型としてAutoRead Sequencing KitおよびA.L.F.DNAシーケンサー（ファルマシア）を用いて塩基配列決定を行った。

#### 全RNAの調製及びmRNAの精製

cDNAライブラリー作製用には、RT-PCRに比較して大量のmRNA を必要とするため、まずAGPC（Acid-Guanidinium-Phenol-Chloroform）法を用いてブタ小腸全RNAを抽出した（63）。

ホルムアミド電気泳動により、18S及び28S rRNA のバンドを確認することで、精製の目安とした。さらにQuickPrep Micro mRNA purification Kit 添付のOligo(dT)-cellulose を用いてmRNA を精製した。

#### cDNAライブラリーの構築

二重鎖cDNA合成は、TimeSaver cDNA Synthesis Kitの指示に従い行った。*EcoRI*アダプターの付加されたcDNAを、cDNA rapid Cloning Module -  $\lambda$ gt10の指示に従いベクターとラ

イゲーションを行い、GigaPack II Gold を用いてパッケージングを行った。また16個クローンを選んで、 $\lambda$ gt10 forward & reverse primers を用いてPCRを行い、インサートの長さを3 kbまで見積もった。

### ライブラリーのスクリーニング

ライブラリーファージをNM514に感染させ、150 mm のプレートに、一枚あたり $4 \times 10^4$  プラークを形成させ、Hybond N ニトロセルロースメンブレンに転写後ベーキングによって固定化した。これを24枚（合計 $1 \times 10^6$  プラーク）用いた。

プローブは $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$  ATP 5MBqを用いてT4 ポリヌクレオチドキナーゼにより末端をラベルした後、NICKカラムを用いATPを除去した。プローブのデザインはTable 3-1 に示す。

メンブレンを6 X SSC / 0.1 % SDS / 1 X Denhardt's Solution / 0.1 mg/ml Salmon Sperm DNA の条件で、40°C、3時間プレハイブリダイゼーションを行った後、5' 末端を $^{32}\text{P}$ ラベルしたプローブを加え、40°Cで終夜ハイブリダイゼーションを行った。洗浄は6 X SSC / 0.1 % SDS、40°Cの条件で行った。シグナルの得られたプラークに対しては、90 mm のプレートに、一枚あたり $1 \times 10^3$  プラークを形成させ、同一条件で二次スクリーニングを行った。

## 2-4 結果

Table 2-1に示した通り、5段階のカラムクロマトグラフィー (Figs.2-1 a-d.) によりブタ小腸から新規の膜結合性トリプシン様酵素を精製することができた。酵素活性は界面活性剤による可溶化でおよそ二倍に上昇しており、この段階から十万倍以上の精製度が必要であった。この操作により、小腸の代表的な膜結合プロテアーゼであるアミノペプチダーゼM、ジペプチジルペプチダーゼIV、エンケファリナーゼの活性は完全に除去された。また本酵素は、トリプシノーゲン活性化能も持たなかったことから、エンテロペプチダーゼ活性も除去された (データ省略)。

Table 2-1 精製のまとめ

ブチルトヨパール活性画分においては、高濃度の硫酸アンモニウムを含んでいるために、BCA法では蛋白質の定量を行うことができなかった。また見かけの活性も阻害されている。

Step	Total activity	Protein	Specific activity	Purification	Yield
	units	mg	units/mg	-fold	%
Microsomal membrane	3,370	5,400	0.62	-	-
Solubilization	7,700	4,860	1.58	1.0	100
DE52	4,880	1,170	4.17	2.6	63
Butyl-Toyoparl	1,960	N.D.	N.D.	N.D.	25
Bio-Gel P-150	2,440	1.52	1,610	1020	32
FPLC Mono Q	1,620	0.665	2,410	1530	21
Benzamidine-Sepharose	1,030	<0.005	>206,000	>130,000	13

N.D., not determined.



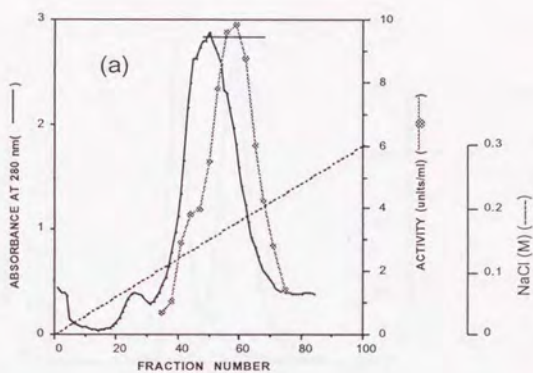


Figure 2-1(a) DE52カラムクロマトグラフィー

カラムサイズは2.6 X 28 cm、流速は60ml / h、10ml / fractionで分画した。図の棒線で示した画分を活性画分とした。

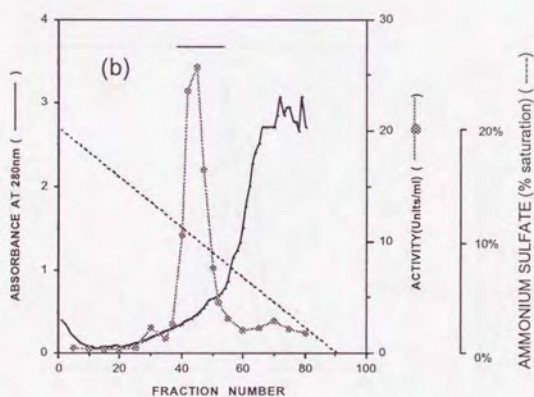


Figure 2-1(b) プチルトヨパールカラムクロマトグラフィー

カラムサイズは2.6 X 28cm、流速は40ml / h、11ml / fractionで分画した。図の棒線で示した画分を活性画分とした。

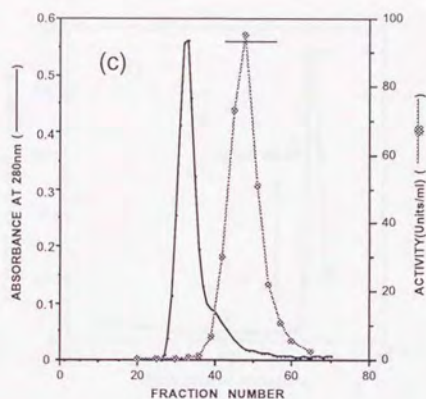


Figure 2-1(c) Bio-Gel P-150ゲルろ過

カラムサイズは2.5 X 82 cm、流速は20ml / h、2.7ml / fractionで分画した。棒線で示した画分を活性画分とした。

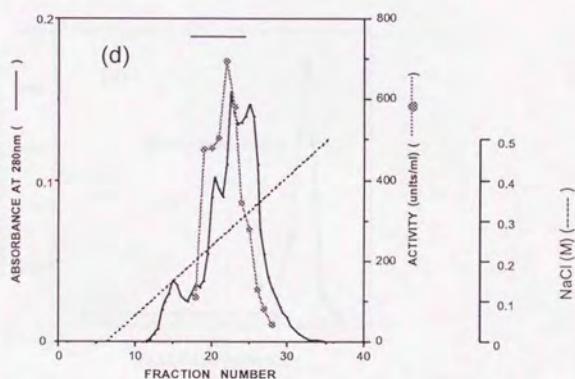


Figure 2-1(d) FPLC Mono Qカラムクロマトグラフィー

カラムサイズは0.5 X 5cm、流速は0.5 ml / min、0.5ml / fractionで分画した。棒線で示した部分を活性画分とした。

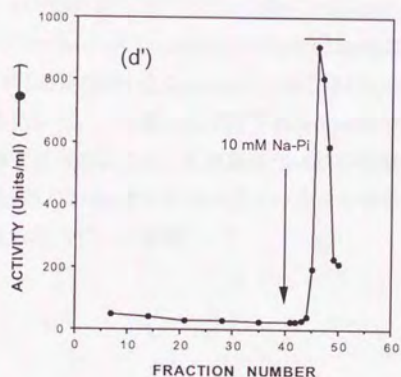


Figure 2-1(d') ヒドロキシアパタイトカラムクロマトグラフィー

カラムサイズは1 ml、流速は10ml/h、1ml / fraction で分離した。棒線で示した画分を活性画分とした。なお吸光度は測定していない。

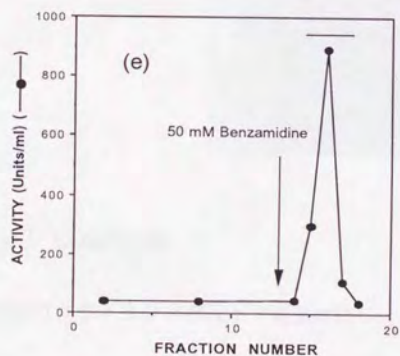


Figure 2-1(e) ベンズアミジン-セファロース アフィニティークロマトグラフィー

カラムサイズは1ml、流速は5 ml/h、1ml / fraction で分画した。棒線で示した画分を活性画分とした。なお吸光度は測定していない。



また、MATEの還元及び非還元状態におけるSDS-PAGEをFig.2-2 に示す。還元剤（ジチオスレイトール、DTT）非存在下では約50kの位置に単一のバンドが現れている。またBio-Gel P-150及びFPLC Superose 12 の二種類のゲルろ過カラムにおいても、およそ50kの位置に溶出した。一方還元剤存在下 SDS-PAGEでは約32kの位置にバンドが現れている。後に考察で述べるように、本酵素は S-S結合で繋がれたホモダイマーであると考えている。またFPLC Mono Pクロマトフォーカシングの結果より、本酵素の等電点はおおよそ4.5と推定された（データ省略）。

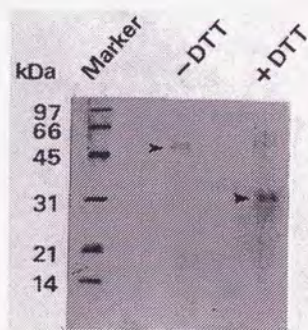


Figure 2-2 SDS-PAGE

酵素をDTT存在下及び非存在下で電気泳動し、クマシーブリリアントブルーにより染色した。

- レーン1. 分子量マーカー
- レーン2. 非還元状態
- レーン3. 還元状態

Table 2-2に各種阻害剤の効果を示す。本酵素はDFP、BPTI、SBTI、ロイペプチン、アンチバインなどに強く阻害された。またCa<sup>2+</sup>を含め金属には非依存的であった。

Table 2-2 プロテアーゼ活性に対する各種阻害剤の効果

酵素0.05ユニットを0.5 ml のグリシン緩衝液中で、各種阻害剤と室温で30分間反応させた後、残存活性をBoc-Gln-Ala-Arg-MCAを用いて測定した。何も試薬を加えないときの活性を100%とした。

Reagent	Concentration	Inhibition
		%
TLCK	1.0 mM	34
TPCK	1.0 mM	12
Soybean trypsin inhibitor	0.2 mg/ml	78
Bovine pancreas trypsin inhibitor	0.2 mg/ml	99
Leupeptin	0.1 mM	91
Antipain	0.1 mM	88
DFP	1.0 mM	95
Benzamidine	1.0 mM	58
pCMB	1.0 mM	0
E-64	1.0 mM	0
EDTA	10.0 mM	0
o-Phenanthroline	10.0 mM	20
Phosphoramidon	0.1 mM	0
Pepstatin A	0.1 mM	0
Ca <sup>2+</sup>	1.0 mM	39
Zn <sup>2+</sup>	1.0 mM	27

Table 2-3 では各種MCA基質に対する基質特異性を示した。これによればP<sub>1</sub>siteにArgを持つ基質を良く加水分解しているのに対し、Lysを持つ基質に対しては活性が弱い。またキモトリプシンの基質やエキソペプチダーゼの基質には全く作用しなかった。このことから本酵素は、トリプシン様活性を持ち特にArgに特異的であると推測できる。さらにP<sub>2</sub>及びP<sub>3</sub>siteも活性に大きな影響を与えていることが予想される。調べた限りでは、P<sub>2</sub>siteにAlaやGly、Serなどの小さな残基が、P<sub>3</sub>siteには逆にGln、Pheなどの大きな残基が高い親和性を持つと考えられる。

Table 2-3 各種MCA基質に対する活性

各種MCA基質 (10mM in DMSO) 5 $\mu$ lを、0.5mlのグリシン緩衝液中で0.05ユニットの酵素と37°Cで10分間反応させた。Boc-Gln-Ala-Arg-MCAに対する活性を100%とした相対活性を示す。

Substrate	Relative activity	Substrate	Relative activity
	%		%
Boc-Gln-Ala-Arg-MCA	100	Z-Arg-Arg-MCA	2
Boc-Gln-Gly-Arg-MCA	77	Bz-Arg-MCA	1
Boc-Phe-Ser-Arg-MCA	61	Boc-Val-Leu-Lys-MCA	5
Boc-Leu-Gly-Arg-MCA	57	Boc-Glu-Lys-Lys-MCA	1
Boc-Gln-Arg-Arg-MCA	45	Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-MCA	0
Boc-Leu-Thr-Arg-MCA	30	Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA	0
Boc-Leu-Lys-Arg-MCA	23	Ala-MCA	0
Boc-Gly-Arg-Arg-MCA	6	Gly-Pro-MCA	0



基質特異性をより詳細に検索するために、ペプチド基質の切断を調べた結果をTable 2-4に示す。基本的には合成基質と変わらない結果であり、切断はすべて Arg残基のC端側で起こっているが、特に生理的な中性pHにおいては、Arg-ArgやArg-Lysといった塩基性アミノ酸対の間を切断する傾向が見られるが、VIPのLys-Lys結合は全く切断を受けなかった。。またArg-Proの結合は切断されず、またArg周辺に酸性アミノ酸がある場合（インシュリンB鎖のGlu-Arg-Gly、またセクレチンのArg-Glu）も、長時間の反応後も切断を受けなかった。

またデータには示さなかったが、蛋白質基質に対する活性は非常に弱く、測定した基質（ヒストン、卵白リゾチーム、 $\gamma$ -グロブリン、カゼイン及びウシ血清アルブミン）いずれにもほとんど作用しなかった。長時間反応させ非常に高感度な検出方法（19）を用いたにもかかわらず、活性を検出するのが困難なことから、本酵素が生体内で蛋白質を非特異的に分解する可能性は低いと推察される。さらに、序論で述べた*S.cerevisiae*のprepro- $\alpha$ -factorも本酵素は切断できなかった。

合成基質Boc-Gln-Ala-Arg-MCA及びペプチド基質BAM-12Pに対する反応のpH依存性をFigure 2-3に示す。合成基質に対しては緩衝液の種類によらず至適pHは9.5であったが、より低いpHでも活性が検出された。しかし分泌小胞内部の生理的pHである5.5付近ではほとんど活性が見られなかった。BAM-12Pの総切断活性に対しても同様の結果が得られたが、Table 2-5に示すように、pHが下がるほど切断が塩基性アミノ酸対の間に特異的となる。

Table 2-4. 各種生理活性ペプチドに対する活性

方法の項で示した通りに、1.0nmolの各種ペプチドと0.1ユニットの酵素を反応させ、反応断片のアミノ酸組成を分析することで切断位置及び割合を算出した。矢印は切断の起こった位置を、数字は2.5時間の反応で切断された割合を示す。

Cta: cysteine acid, <Glu: pyroglutamic acidを示す。

---

BAM-12P	88 12
Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Arg-Arg-Val-Gly-Arg-Pro-Glu	
Dynorphin A	98
Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Ile-Arg-Pro-Lys-Leu-Lys-Trp-Asp-Asn-Gln	
Vasoactive Intestinal Peptide (VIP)	90
His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn-NH <sub>2</sub>	
Neurotensin	80
<Glu-Leu-Tyr-Glu-Asn-Lys-Pro-Arg-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu	
$\alpha$ -Neoendorphin	70
Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Lys-Tyr-Pro-Lys	
Progastrin-related peptide	51 9
Gly-Trp-Met-Asp-Phe-Gly-Arg-Arg-Ser-Ala-Glu-Asp-Glu-Gln	
Secretin	2 4
His-Ser-Asp-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Glu-Leu-Ser-Arg-Leu-Arg-Glu-Gly-Ala-Arg-Leu-Gln-Arg-Leu-Leu-Gln-Gly-Leu-Val-NH <sub>2</sub>	
Oxidized insulin B chain	
Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cta-Gly-Ser-His-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-Tyr-Leu-Val-Cta-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Pro-Lys-Ala	

---

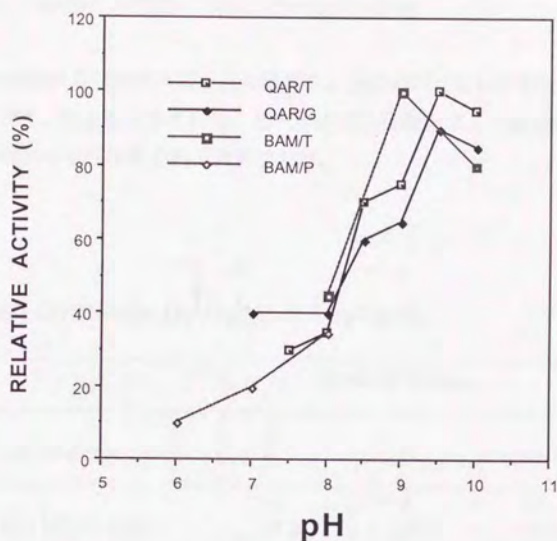


Figure 2-3. プロテアーゼ活性のpH依存性

合成基質Boc-Gln-Ala-Arg-MCA及びペプチド基質BAM-12Pに対して、pHと活性の関係を調べた。以下に基質と緩衝液の組み合わせを記す。

QAR/T : Boc-Gln-Ala-Arg-MCA / 0.1M トリスー塩酸緩衝液

QAR/G : Boc-Gln-Ala-Arg-MCA / 0.1M グリシンー水酸化ナトリウム緩衝液

BAM/T : BAM-12P / 0.1M トリスー塩酸緩衝液

BAM/P : BAM-12P / 0.1M リン酸カリウム緩衝液



Table 2-5. BAM-12Pの加水分解に対するpHの影響

0.1nmolの基質及び0.02ユニットの酵素を、方法の項に記したのと同様の条件で1時間反応させ、HPLCによる分析を行い、ピークの溶出位置とアミノ酸分析から切断位置を、ピーク面積から切断率をそれぞれ算定した。



Extent of cleavage			
pH (Buffer)	A	B	Total
	%	%	%
10.0 (0.1 M Tris-HCl)	53.2	25.3	78.5
9.0 (0.1 M Tris-HCl)	48.1	46.0	94.1
8.0 (0.1 M Tris-HCl)	41.0	4.9	45.9
8.0 (0.1 M KPB)	31.1	4.0	35.1
7.0 (0.1 M KPB)	17.7	1.6	19.3
6.0 (0.1 M KPB)	6.9	1.5	8.4

KPB: potassium phosphate buffer.

精製酵素をPVDF膜に吸着させ、直接N末端配列の決定を試みたが、明確な結果は得られなかった。予備的実験より本酵素は、通常の洗浄処理によって膜から遊離してしまうことが判明しており、回収率の著しい低下が見られた。また界面活性剤の存在によるノイズも高く、高精度な解析は難しかったため、以下の配列がcaろうじて得られた： Xaa-Val-Xaa-Gly-Glu。一方酵素消化断片についてはいくつかの部分配列を決定することができた (Table 2-6)。この内3つはそれぞれ、トリプシン様セリンプロテアーゼの保存領域 CR3 (活性中心Asp)、CR5、およびCR6 (活性中心Ser) に相当すると考えられる (24)。そこで他のトリプシン様プロテアーゼとの配列比較を行った (Table 2-7)。

Table 2-6 得られた部分アミノ酸配列

大文字は確定、小文字は未確定残基を示す。AP: *Acromobacter* Protease I, DN: Endopeptidase Asp-N。

Peak Name	Sequence	Homology
AP-1	(K) CIP	
AP-4	(K) LTYRcLnXl	
AP-5	(K) MrqApL q t d	
AP-7	(K) AIWVT d q	
DN-2	DSRGFRY	
DN-3	DSGGPLSSVE	CR6 (Active site Ser)
DN-5,7	DRMMC VGYL	CR5
DN-9	DqPVEYSpXVrXip1	(CR7?)
DN-11	dIALXLt	CR3 (Active site Asp)

Table 2-7 他の酵素との相同性の比較

# : Active site Asp, \* : Active site Ser.

Enzyme	CR3	CR5	CR6	Ref.
	#		*	
MATE	DIALXLTL	DRMMC VGYL	DSGGPLSSVE	(17)
Trypsin	DIMLIKLS	SSMICVGFL	DSGGPVVCNG	(25)
Chymotrypsin	DITLLKLA	DVMT CAGAS	DSGGPLVCQK	(26)
Elastase	DIALLKLA	TSMICAGGD	DSGGPLNCQA	(27)
Tryptase	DIALLELE	DDMLCAGNT	DSGGPLVCVK	(28)
Chymase	DIMLLKLE	GPLLCAGVA	DSGGPLLCAG	(29)
Enteropeptidase	DIAMMHLE	ENMMCAGYE	DSGGPLMCLE	(30)
tPA	DIALQLK	DNMLCAGDT	DSGGPLVCLN	(31)
Urokinase	DIALLKIR	TKMLCAADP	DSGGPLVCSL	(32)
Plasminogen	DIALLKLS	STELCAGHL	DSGGPLVCFE	(33)
Prothrombin	DIALMKLK	WYMFCAGYK	DSGGPFVMKS	(34)
Factor X	DI AVLRLK	QNMFCAGYD	DSGGPHVTRF	(35)
Pancreatic kallikrein	DLMLLRLT	DFMLCVGHL	DSGGPLMCDG	(36)
Plasma kallikrein	DIALIKLQ	QRMVCAGYK	DSGGPLVCKH	(37)
Tissue kallikrein	DLMLLHLS	DLMLCAGEM	DSGGPLICNG	(38)
Granzyme A	DLKLLQLT	MNMVCAGSL	DSGSPLLCGE	(39)
Hepsin	DIALVHLS	PKMFCAGYP	DSGGPFVCE	(40)



Table 2-8 に示すように、得られた部分アミノ酸配列の一部は酵素の活性中心を含む保存領域に対応している。したがって、この情報を基にPCRにより断片増幅を試みた。プライマーとしては、実際のアミノ酸配列に対応したものとしてCR5-A / CR-6Aを、また配列は得られていないもののトリプシンファミリーに高度に保存されている領域である活性中心ヒスチジン部位に対応したCR-2Sを用いた (Table 2-9)。

Table 2-8 部分アミノ酸配列のアライメント

得られた部分アミノ酸配列の内に対応部位が特定できたものについて、ラットトリプシン(25)のアミノ酸配列に対応させた。PCRにおけるプライマーの増幅方向は矢印で、また Furieらの定義による保存領域CR1-CR7は下線で、活性中心残基は#で示した。

	CR1		CR2	#	
Try 1	<u>IVGGYTCPEH</u>	<u>SVPYOVSLNS</u>	<u>GTHFCGGSLI</u>	<u>NDOWVVSAAH</u>	<u>CYKSRIQVRL</u>
MATE					
			#	CR3	
Try 51	<u>GEHNIDVLEG</u>	<u>DEQFINAAKI</u>	<u>IKHPNYSSWT</u>	<u>LNNDIMLIK</u>	<u>LSSPVKLNARV</u>
MATE				DIALXL t	
		CR4		(DN-11) CR5	
Try 101	<u>APVALPSACA</u>	<u>PAGTQCLISG</u>	<u>WGNTLSNGVN</u>	<u>NPDLLOCVDA</u>	<u>PVLSOADCEA</u>
MATE					
			# CR6		CR7
Try 151	<u>AYPGEITSSM</u>	<u>ICVGFLEGGK</u>	<u>DSCOGDSGGP</u>	<u>VVCNGQLOGI</u>	<u>VSWGYGCALP</u>
MATE	<-DRM MCVGYL		<-DSGGP LSSVE		
	(DN5,7)		(DN3)		
Try 201	<u>DNPGVYTKVC</u>	<u>NEVGWIQDTI</u>	AAN		

Table 2-9 プライマーおよびプローブ

Iはイノシン、Nは4塩基のミクスチャーを示す。

CR2-S	5'-AAA TGG ATC CTN ACN GCN GCN CA(TC) TG-3'	26mer
	<i>Bam</i> HI	
CR5-A	5'-AAA AGG TAC CCN AC(GA) CAC ATC ATN C(TG)(GA) TC-3'	29mer
	<i>Kpn</i> I	
CR6-A	5'-GCA CTG CAG NGG NCC NCC NGA (GA)TC NCC -3'	27mer
	<i>Pst</i> I	
Probe	5'-A(AG)(AG) TAI CCI AC(AG) CAC ATC ATI CG(AG) TC-3'	26mer
λgt10 primers		
forward	5'-GCT GGG TAG TCC CCA CCT TT-3'	20mer
reverse	5'-CTT ATG AGT ATT TCT TCC AGG TA-3'	24mer

このプライマーを組み合わせ、まずRT-PCRにより特異的断片の増幅を試みた。しかしブタ小腸およびラット小腸からは、条件を様々に変化させたが特異的な増幅は見られなかった。一方コントロールとして用いたラット肝臓からは、CR2-SとCR-6Aの組み合わせにより特異的な断片が増幅した。その内二種類について塩基配列を決定したところ、一つはセリンプロテアーゼであるトロンビン、もう一つはチトクロームCオキシダーゼポリペプチドIIIであり、いずれも既知の酵素であった（データ省略）。

RT-PCRでは限界があると判断し、方法をブランクハイブリダイゼーションによるcDNAライブラリーのスクリーニングに変更した。使用可能なブタ小腸 cDNAライブラリーは入手不可能だったため、新しく構築を試みた。

2gのブタ小腸粘膜から、AGPC法により約2mgの全RNAを抽出、その内0.6mgを用いて、Oligo(dT)-Celluloseによる精製を二回行い、3μgのpoly(A)<sup>+</sup> RNAを得た。これを用いてcDNA合成およびEco RI アダプター付加を行い、0.13μgのds cDNAを得た。この操作を二回繰り返し、合計0.25μgのds cDNAを得た。

cDNA 50ngずつを、それぞれλgt10 / Eco RI アーム1μgとライゲーション後、*in vitro* パッ

ケーシングを行った。力値および平均インサート長をTable 2-10 に示す。

Table 2-10 構築したcDNAライブラリー

Source	Pig upper intestinal mucosa
Vector	$\lambda$ gt10
Primer	Oligo(dT)
Independent clone	$8.0 \times 10^5$ clones
Insert size	0.4-3.0 kb (Ave. 1.6 kb) (estimated by PCR)

オリゴヌクレオチドプローブとしては、部分アミノ酸配列の中でも最も縮重の少ない、CR5領域に基づいて合成した (Table 2-9)。なおPCRプライマーと異なりイノシンを導入している。

上記のライブラリーおよびプローブを用いて、 $1 \times 10^6$  clones を緩い条件でスクリーニングしたが、陽性ブランクは得られなかった。また別のプローブでは高バックグラウンドのため解析ができなかった。さらに条件を検討しスクリーニングを行っている。

なお、作製したライブラリーDNAを鋳型にPCRも行ったが、有意な増幅断片は得られなかった。



## 2-5 考察

Table 2-1に示した通り、ブタ小腸粘膜から本酵素を均一に単離するには、十三万倍以上の精製度が必要であったことから本酵素は非常に微量にしか存在しないと考えられる。小腸には膵臓分泌蛋白質であるトリプシンその他の消化酵素が多量に含まれているため、膜蛋白質画分の調製を念入りに行う必要があった。実際合成基質を用いたみかけの活性の回収率は、粗ホモジネイトから比較するとかなり低くなっているが、その大部分は可溶性の別の酵素の共存によるものと考えられるので考慮していない。ただし本酵素が膜との親和性が弱いために解離している可能性も否定できない。これに関しては、将来特異的な抗体を用いるなどして解析する必要がある。なお可溶性画分及び塩化カリウム抽出画分をゲルろ過にかけて活性の現れる分子量を推定したところ、両者とも本酵素とは異なり、分子量100k以上の位置にピークが現れ（データ省略）、また DE52やアフィニティカラムに対する吸着は弱かった。界面活性剤による可溶化で酵素活性が二倍程度に上昇しているが、この理由に関しては詳しく調べていない。しかしこの見かけの活性化は界面活性剤添加だけでは起こらず、その後の超遠心による不溶性画分の除去が必要であることから、何らかの阻害物質の除去によると推測できる。今回用いた精製方法について述べると、疎水性クロマトでは本酵素は、アミノペプチダーゼM、ジペプチジルペプチダーゼIVを含む主要な膜蛋白質よりも若干早く溶出することから、これらよりやや疎水性は弱いものの、膜結合性という性質を持つ裏付けになると思われる。しかしゲルろ過の結果から分かるように、前記の膜結合酵素群が糖鎖を持ち分子量100k以上であるのに比べて、本酵素は分子量50kと小さく、またコンカナバリンA及びヘパリンとの結合も見られなかった（データ省略）。最終段階では阻害剤アフィニティクロマトであるベンズアミジナーセファロースを用いたが、この際も酵素と阻害剤の親和性は決して高くない（50%阻害濃度は約0.5mM）ために、濃縮し体積を減らさないと吸着しなかった。しかしトリプシン様酵素であるという性質と矛盾はなく、作業仮説を満たす酵素が精製できた。

本酵素はゲルろ過および非還元状態 SDS-PAGEで分子量50k、還元状態 SDS-PAGEでは32kと異なる数値を示す。この理由として本酵素が単一のポリペプチドから構成されていないということが上げられるが、具体的な分子構成については明らかでない。後述するようにトリプシン様酵素の多くは還元状態で分子量約30k弱を示すので、本酵素も32kのバンドが主要な分子であると推測される。その他にバンドが見られないことから非還元状態では二量体を形成している可能性がある。その場合には60k付近にバンドが出るべきである

が、ここでは10k程度小さい位置に現れており、正確に二量体であるとは言い難い。ただしウシおよびラットトリプシンを同様に電気泳動すると、非還元状態ではみかけの分子量がそれぞれ5kおよび10k程度小さくなったことから（ウシ血清アルブミンでも同様の現象が観察された）分子内S-S結合のために非還元状態では泳動度が大きくなっている可能性がある。同様な結果が、細胞障害性T細胞から発見されたトリプシン様セリンプロテアーゼであるグランザイムAについても報告されている。この酵素は非還元状態 SDS-PAGEで分子量60k、還元状態 SDS-PAGEで35kを示すが、cDNAクローニングの結果からホモダイマーを形成すると推定されている（41）。本酵素の直接N末端分析において、未確定ながら単一の配列が得られていることから、この仮説が指示される。詳細は cDNAクローニングによる一次構造の決定により明らかになるであろう。

Table 2-7 に示すように、本酵素の部分アミノ酸配列を、トリプシンおよび近縁のセリンプロテアーゼの配列と比較したところ、非常に高い相同性を示しながらも、明らかに一次構造の異なる全く新規の蛋白質であることが判明した（25-40）。特にこれまで生化学的にプロセシングプロテアーゼ候補であるとされてきた、カリクレインファミリー及びトリプターゼファミリーのいずれにも属さないことを記しておく。なおここでは代表的な酵素との比較のみ示したが、データベース検索により既知の蛋白質すべてと相同性比較も行ったところ、やはり同一の配列を持つ蛋白質は見つからなかった。

さらにこれまでに精製のみが行われたプロテアーゼに対しても、生化学的特性に関する比較を行いたい。Kexin Family を除いた  $\text{Ca}^{2+}$  非依存性のArg特異的プロテアーゼについては、これまでに数多くの報告がなされているが、その多くは脳や肝臓から精製されたもので、小腸からの報告は少ない。近年ラット小腸から精製された arginine-selective endoprotease（42、43）は、塩により抽出可能で、また分子量（65k）や至適pH（7.5）など多くの性質が異なる。その他にも、詳しい性状が明らかで比較しうるプロテアーゼに関してはTable 2-11 に一覧表をまとめたが、本酵素はいずれとも異なる、まったく新しいプロテアーゼであると結論出来る。



Table 2-11 これまでに報告されたCa<sup>2+</sup>非依存的Arg特異的プロテアーゼ

/は切断部位を示す。分子量については、一次構造が既知の酵素についてはアミノ酸残基数を、未知の酵素についてはSDS-PAGEの結果を記した。

Source	<i>M<sub>r</sub></i>	Specificity	Substrate	membrane	Ref.
<b>Serine</b>					
Rat Liver Plasma Membrane	30k	R/		bound	44,45
Bovine Adrenal Chromaffin Granule	31k	R/R, RR/	Proenkephalin	bound	46
Pig Anterior Pituitary Lobe -> Identical with Plasma Kallikrein	38+88k	K/, R/	Proenkephalin	free	47
Rat Intestinal Mucosa Secretory Granules	65k	R/	Prosomatostatin	free	42,43
Human T4+ Lymphocytes ->Member of Trypsin Family	32,28k	R/	HIV-1 gp120	bound	48
Mouse Submandibular Gland ->Member of Glandular Kallikrein Family	140+97a.a.	KR/	Prorenin	free	49
Rat Liver Microsome	32k	RR/		bound	50
Rat Liver Microsome	32k	R/?	CYP2E1	bound	51
Pig Ovarian follicles	45+32k	RR/, R/	tPA	free	52
<b>Metallo</b>					
Bovine Neurohypophysis	58,52k	KR/	Procytocin	free	53
Rat brain & Testis ->Member of Pitrylsin Family	1161a.a.	/RK	Prosomatostatin	free	54
Rabbit Liver Microsome ->Homologous to EC 3.4.24.15	704a.a.	RXXR/	VitaminK-dependent protein	bound	55
Bovine Pituitary	54k	R/	Prodynorphin B	free	56
EL-4 cells	130k	RR,RK	Dynorphin	free	57
<b>Aspartic</b>					
Bovine Pituitary Secretory Granules ->Homologous to Yeast Aspartic Protease 3 (Yap3)	70k	KR/	POMC	free	58
<b>Cysteine</b>					
(Cathepsins B, H, L, S)	30k	R/		free	59



本酵素は代表的な蛋白質基質に対しては、変性非変性を問わずほとんど作用しない。一方各種生理活性ペプチドの中には、VIPなど非常に効率よく切断されるものが存在される。従ってMATEの生理機能として、このようなペプチドの分解が考えられる。しかしながら、これらペプチドが生体内でどのように代謝されるのかは不明であり、この結果を即 *in vivo* に結びつけることはできない。また小腸には、同様に生理活性ペプチドの不活性化に関与するとされる酵素として、アミノペプチダーゼM、ジペプチジルペプチダーゼIV、エンケファリナーゼなどが多量に存在している。これら酵素は *in vitro* で様々な生理活性ペプチドを切断することが示されている。速やかな分解が必要とされる場合には、広い特異性を持ったプロテアーゼが多量に存在する方が有効であり、微量で高い特異性を持つMATEがこの機能を中心的に担っているとは考えにくい。同様の理由で、食物の消化・吸収に関与する可能性も高くないと思われる。

近年になり、kexin familyの一員であるPC6が小腸からクローニングされた(60,61)。本研究ではこの酵素の活性は検出できていないが、おそらく分泌小胞などに局在し機能しているものと推測される。一方、本酵素は分泌小胞内のpHであると考えられるpH5.5付近では全く活性を持たないことから、少なくとも小胞内で作用する酵素ではないと推測できる。またkexin familyの代表的基質である*S.cerevisiae*のprepro- $\alpha$ -factorを本酵素は切断できず、一方PC6はArg-Lysの塩基対は認識しないと推測される。このように二者は生化学的性質のみならず、生理機能についてもそれぞれ別個の作用を持つと考えられる。

ペプチド基質の切断結果から推定される配列特異性、また器官特異性に一致する生理的基質候補として、生理活性ペプチドであるコレシストキニン(CCK)が挙げられる。第三章において、この可能性を考察する。

保存領域を利用してRT-PCRにより関連分子をクローニングするという手法は近年主流となっており、多くの成功例が報告されている。トリプシンファミリーに属する酵素についても、いくつかの報告がなされている。Wiegandらはヒト脳からトリプシンアイソフォームcDNAを単離し(64)、Przetakらはヒト腹水cDNAライブラリーからグランザイム3をクローニングした(65)。これらはいずれも、トリプシンファミリーの保存領域である活性中心HisおよびSer付近の配列を基にしている。本研究においても同様の方法を採用し、実際ラット肝臓からはファミリーの一員であるトロピン cDNA断片を増幅することができた。しかしながら、ブタおよびラット小腸からは特異的断片の増幅は見られな

かった。また通常行われるオリゴヌクレオチドを用いたc DNAライブラリーのスクリーニングによっても、陽性クローンを得ることはできなかった。蛋白質レベルでは非常に発現の少ない分子であるために、mRNAの存在量も非常に低いことが予想され、通常の方法ではクローニングは困難であると考えられる。また、本酵素の活性は現在のところ小腸においてしか検出されていないが、一般にトリプシン様酵素は前駆体として合成されることから、他の組織では発現はしているものの活性化が起こっていないという可能性がある。これを検出するには特異的抗体による解析が必要であることから、今回行わなかったペプチド抗体作製についても試みる必要がある。さらに入手可能な他の組織のライブラリーについてもスクリーニングを行う予定である。

予備的実験（第四章において述べる）から、ブタ小腸粘膜の細胞膜に、トリプシン様活性を示す分子が存在している可能性がある。本酵素との異同は明らかでないが、このように細胞表面に発現する分子の場合、培養細胞を用いた発現クローニングの手法が適用可能であり、各種受容体分子のクローニングにおいては大きな成功を収めている。受容体の場合はリガンド結合（および細胞内の変化）を検出するが、膜結合性プロテアーゼの場合は特異的インヒビターの結合を検出すればよく、ラベル可能な特異的インヒビターが存在すれば、この手法により未知の細胞膜結合性プロテアーゼを同定できる可能性がある。第四章において予備的に、本手法の適用の可能性について考察を行った。

### 第三章

#### 小腸膜結合性新規プロテアーゼの 生理機能に関する考察 -コレシストキニンプロセシング酵素の 可能性について-



### 3-1 序

第二章で述べたとおり、我々はブタ小腸粘膜より新規膜結合性プロテアーゼ MATE を同定、完全精製することに成功した。合成基質及びペプチド基質を用いた解析より、本酵素は塩基性アミノ酸対に高い特異性を示し、そのC端側ではなく間を切断することが示唆された。特に生理的なpHで特異性が高くなることから、生体内でもおそらくこれに類似した特異性を持つことが予想される。また  $\text{Ca}^{2+}$  による選択的沈殿実験より、MATE は小胞体やシスゴルジ、分泌顆粒といった画分ではなく、酸性糖に富むトランスゴルジ、あるいは刷子縁膜に存在することが予想される。

ここで当初の作業仮説に立ち返ってみたい。本研究より明らかになった MATE の配列特異性を、小腸で発現しているペプチド前駆体配列と比較してみたところ、コレシストキニン (CCK) という生理活性ペプチドのプロセッシング部位によく合致していた。CCK は脳及び小腸で比較的多量に発現しているペプチドである。小腸における CCK の役割は良く知られており、膵酵素の分泌促進、腸管蠕動、胆嚢収縮などの消化促進的作用を持つ。脳における機能は不明だが、脳内投与により実験動物の摂食を抑制することから、小腸と同様に消化吸収を司る可能性がある。

CCK は脳と小腸で同一の前駆体が発現するが、異なるプロセッシングを受けることが知られている (66) (Fig. 3-1)。CCK58 / CCK39 / CCK8 は単一 Arg の C 端側における切断により生じる。一方 CCK33 は、塩基性アミノ酸対 Arg-Lys の間で切断を受けたものである。初期の研究より、脳では CCK8 が、小腸では CCK33 が主要な分子種とされた (67)。その中でも小腸の主要分子種である CCK33 のプロセッシング部位は、合成基質およびペプチド基質から推測される MATE の配列特異性と良く合致する一方で、kexin family を含めた既知のプロセッシングプロテアーゼの特異性では説明できない。また合成基質による結果から推測する限り、CCK58 / CCK39 の単一 Arg 部位も MATE により切断される可能性がある。一方 CCK8 プロセッシング部位は、単一 Arg が酸性アミノ酸に囲まれている。この部位を特異的に認識するプロテアーゼは脳から精製されている (68) が、同報告中で本活性は小腸粘膜には存在しないことが述べられている。この配列は MATE によってはおそらく切断されない。

CCK 前駆体にはこれ以外にも複数の Arg / Lys 残基が存在しているが、切断は特定の Arg 残基に特異的である。したがって CCK プロセッシングを担う酵素は、高い基質特異性を持

つ(Arg特異的)プロテアーゼであると推測されるが、MATEはこの条件を満たしている。

これまでも脳および小腸におけるCCKプロセシングの報告はなされているが、いずれも粗抽出液に対する抗体反応に基づいたものであり、抽出効率の差や非特異的分解に関する考慮が不十分であると考えられる。正確なプロセシングメカニズムの解析や関与するプロテアーゼの同定を行うためには、純粋な基質を用いることが必要であるが、そのような研究はまだ成されていない。

本章では、MATEとCCKプロセシングの関連を主に基質の立場から解析する。まず前半では、小腸の主要分子種であり、MATEの基質特異性に最も良く合致する、CCK33のプロセシング部位に相当する合成ペプチドを用いて、MATEが実際にこの部位を切断できること、及びその速度定数を示す。またCCK前駆体内部には複数のArg残基が存在するが、その内限られた部位のみが切断を受けるということは、周辺部位のみならず前駆体全体の構造なども重要な影響を与えていると考えられる。そこで後半では、RT-PCRによりブタ小腸からクローニングしたCCK前駆体を、大腸菌発現系を用いて生成する試みを報告する。CCKが生物活性を持つためには、C末端のアミド化が必須であるが、この反応は大腸菌では再現できない。しかし過去の研究より、プロセシングを受けていながらもC末端がアミド化されずGlyのままの型が、実際にはかなりの量(約半分程度)存在しているとされる(69)。そこで末端のアミド化はプロテアーゼ活性には影響を与えないと推測した。

Tyrの硫酸化についても同様であることから、ここではC末端Gly型の大量発現を試みた。

発現方法としては、T7プロモーターを用いて単独で発現させる方法、およびマルトース結合蛋白質MBPとの融合蛋白質として発現させる方法の二種類を行った。

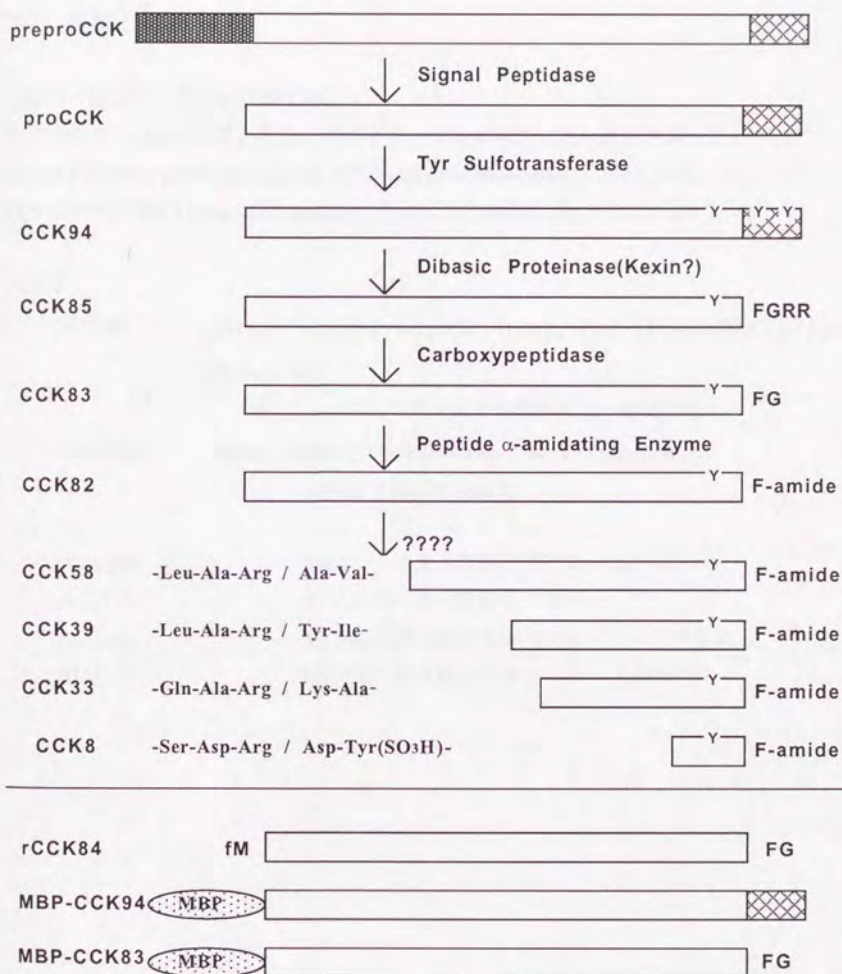


Figure 3-1 CCKプロセシングのモデル

Eberlein らによる図を改変した(66)。fM: formyl Met



### 3-2 試薬と材料

基本的な試薬は、第二章に準ずる。

発現ベクターpAR2113は、東北大学理学部の藤井義明先生より御供与頂いた。

Protein fusion and purification system はNew England Biolabs.社より購入した。

CCK部分ペプチドはBio-Synthesis Inc.(TX) により合成された。

#### 大腸菌

MV1190  $\Delta(lac-pro AB), \Delta(srl-rec A) 306:: Tn10, sup E, thi- [F', lac I^q, lacZ \Delta M15 pro AB, tra D 36]$

プラスミド調製など一般的用途

BL21(DE3) *hsdS gal* ( $\lambda cIts 857 ind1 Sam 7 nin 5 lac UV5-T7 gene 1$ )

組み換え蛋白質発現用

#### ベクター

M13mp19 DNAシーケンス用サブクローニング

pAR2113 T7プロモーター用発現ベクター

pMAL-p MBP融合蛋白質用発現ベクター (ペリプラズム)

pMAL-cRI MBP融合蛋白質用発現ベクター (細胞内)

### 3-3 方法

#### CCK部分ペプチドの切断

酵素反応およびHPLCによるペプチド断片の分離は、第二章に準じた。また、基質濃度を変化させて、速度定数を測定した。比較として、本酵素により効率よく切断される合成基質（Boc-Gln-Ala-Arg-MCA / Boc-Gln-Arg-Arg-MCA）およびペプチド基質（BAM-12P / Dynorphin A 1-13）を用いた。

#### RT-PCRによるブタpreproCCKのcDNAクローニング

ブタ小腸からのcDNAの合成は、第二章に準ずる。これを鋳型として、既知の配列（70）をもとにCCK-NおよびCCK-Cプライマー（Table 3-1）を用い、以下の条件でPCRを行った。

94°C	1 min	
65°C	1 min	30cycles
72°C	1 min	

増幅した約400bpの断片を抽出し、*Xho* Iおよび*Bcl* Iで切断後、M13mp19の*Sal* Iおよび*Bam* HI部位にサブクローニングし、塩基配列を確認した（Table3-2）。

Table 3-1 プライマー

CCK-N	5'-TAT <u>CTC GAG</u> GCC ATG AAC GGC GGC TTG-3'	27mer
	<i>Xho</i> I	
CCK-C	5'-CGC <u>TGA TCA</u> GGG CGG GGT CTT CTA-3'	24mer
	<i>Bcl</i> I	
CCKXP-N2	5'-GGC ACC <u>CAT ATG</u> CAA CCA GTA CCT CCT GCG-3'	30mer
	<i>Nde</i> I	
CCKXP-C	5'-ACT <u>TGA TCA</u> GCC AAA ATC CAT CCA G-3'	25mer
	<i>Bcl</i> I	
CCKMAL-N2	5'-ACC <u>GAA TTC</u> CAG CCG GTG CCT CCT-3'	24mer
	<i>Eco</i> RI	



Table 3-2 RT-PCRによりクローニングしたpreproCCK

Pro25における1塩基変異が認められた (CCC->CCT)。

CTCGAAGCC  
Sal I+Xho I

ATG AAC GGC GGC TTG TGC CTG TGT CTG CTG ATG GCG GTC CTG GCG  
1 MET Asn Gly Gly Leu Cys Leu Cys Val Leu Met Ala Val Leu Ala  
Signal peptide (C)  
GCA GGC ACC CTG GCG CAG CCG GTG CCT CCT GCG GAC TCC GCG GTC  
16 Ala Gly Thr Leu Ala/Gln Pro Val Pro Pro Ala Asp Ser Ala Val  
CCC GGG GCA CAG GAG GAG GAG GCG CAC CGG CGG CAG CTG AGG GCG  
31 Pro Gly Ala Gln Glu Glu Glu Ala His Arg Arg Gln Leu Arg/Ala  
->CCK58  
GTG CAA AAG GTA GAC GGC GAG TCC CGA GCG CAC CTG GGC GCG CTG  
46 Val Gln Lys Val Asp Gly Glu Ser Arg Ala His Leu Gly Ala Leu  
CTG GCC AGA TAC ATC CAG CAG GCT CGA AAA GCA CCT TCT GGC CGA  
61 Leu Ala Arg/Tyr Ile Gln Gln Ala Arg/Lys Ala Pro Ser Gly Arg  
->CCK39 ->CCK33  
GTA TCT ATG ATT AAG AAT CTG CAG AGC CTG GAC CCC AGC CAC AGA  
76 Val Ser Met Ile Lys Asn Leu Gln Ser Leu Asp Pro Ser His Arg  
ATA AGT GAC CGG GAC TAC ATG GGC TGG ATG GAT TTT GGC CGG GCG  
91 Ile Ser Asp Arg/Asp Tyr Met Gly Trp Met Asp Phe Gly Arg Arg  
->CCK8 dibasic & amidation  
106AGT GCA GAG GAG TAT GAA TAT ACC TCC TAG AAGACCCGCGCTGATCA  
Ser Ala Glu Glu Tyr Glu Tyr Thr Ser stop  
Bam HI + Bcl I

#### CCK前駆体発現ベクターpAR-rCCK84の構築

M13mp19にクローニングしたpreproCCK (M13-preproCCK) を鋳型として、CCKXP-N2 およびCCKXP-Cプライマー (Table 3-1) を用い、以下の条件でPCRを行った。

94°C	1 min	
55°C	1 min	30cycles
72°C	1 min	

増幅した約300bpの断片を抽出し、*Nde* Iおよび*Bcl* Iで切断後、pAR2113の*Nde* I および *Bam* HI部位に組み込んだ (pAR-rCCK84, Fig.3-2)。得られたトランスフォーマントについては、*Xba* Iおよび*Hin* d III で切り出した断片をM13mp19にサブクローニング後、塩基配列を確認した (Table 3-3)。なおpAR-rCCK95の構築も試みたが、トランスフォーマントは得られなかった。

#### rCCK84の発現

pAR-rCCK84 およびpAR2113 が導入されたBL21 (DE3) を、NZCYM培地で終夜培養した。それぞれについて、培養液50μl を NZCYM+ 0.1 mg/ml アンピシリン培地 5 ml に加え、37°Cで2時間培養後、1 mM IPTG を加え、1時間ごとに菌体を破碎、SDS-PAGEにより蛋白質の発現を調べた。

PreproCCKに対し、Signal peptide をすべて取り除き、N末端3残基のアミノ酸についてコドン三文字目をGからAに変更することで、合成量の増加を計った(71) (下線)。

51



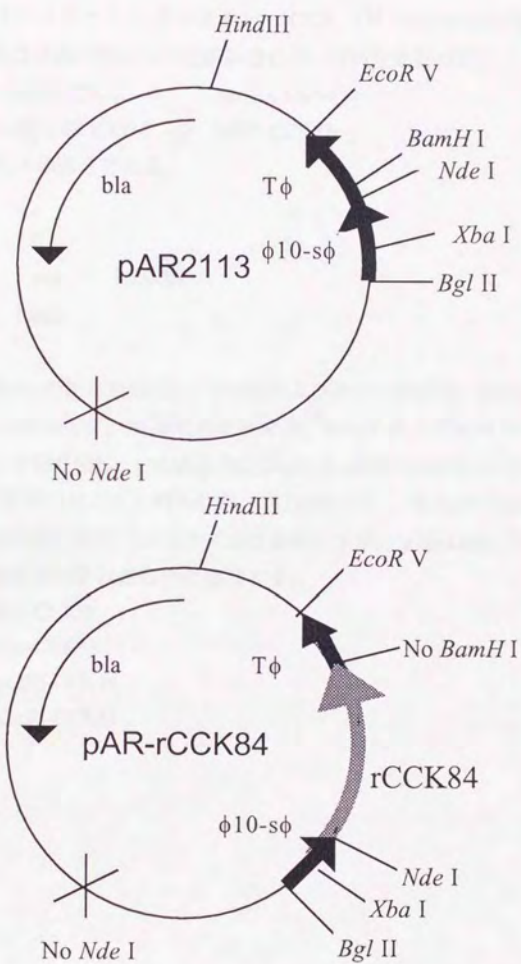


Figure 3-2 発現ベクター-pAR-rCCK84

#### MBP-CCK前駆体融合蛋白質発現ベクターの構築

M13mp19にクローニングしたpreproCCK (M13-preproCCK) を鋳型として、CCKMAL-N2に以下のプライマーを組み合わせ、でPCRを行った。

CCKMAL-N2 + CCK-C ---> MBP-CCK94

CCKMAL-N2 + CCKXP-C ---> MBP-CCK83

温度条件は以下の通りである。

94℃	1 min	
50℃	1 min	30cycles
72℃	1 min	

増幅した約300bpの断片を抽出し、*EcoRI*および*Bcl I*で切断後、M13mp18の*EcoRI*および*Bam HI*部位に組み込んだ。塩基配列を確認後、*EcoRI* および*Hind III* (マルチクローニングサイト由来) で切り出し、pMAL-p およびpMAL-cRIの*EcoRI* および*Hind III*に組み込み、以下の4種類の発現ベクターを構築した。(Table 3-4)。なおpMALpはシグナルペプチドを持っており融合蛋白質はペリプラズムに蓄積するが、pMALc-RIはシグナルペプチドを欠いており、融合蛋白質は細胞内に蓄積する。

1. pMALp-CCK94
2. pMALp-CCK83
3. pMALcRI-CCK94
4. pMALcRI-CCK83

Table3-4 pMALp / pMALcRI - CCK94 / 83

ベクターの種類およびCCKの長さにより、合計4種類の発現ベクターを構築した。

**pMALp**

malE...GTA CCC GGC CGG GGA TCC ATC GAG GGT AGG CCT GAA TTC  
Ile Glu Gly Arg/Pro Glu Phe

**pMALcRI**

malE...CCG TCC TCT CTC GTG ATC GAG GGA AGG ATT TCA GAA TTC  
Ile Glu Gly Arg/Ile Ser Glu Phe  
*Eco RI*

CAG CCG GTG CCT CCT GCG GAC TCC GCG GTC CCC GGG GCA CAG GAG  
1 Gln Pro Val Pro Pro Ala Asp Ser Ala Val Pro Gly Ala Gln Glu  
  
GAG GAG GCG CAC CGG CGG CAG CTG AGG GCG GTG CAA AAG GTA GAC  
16 Glu Glu Ala His Arg Arg Gln Leu Arg/Ala Val Gln Lys Val Asp  
  
GGC GAG TCC CGA GCG CAC CTG GGC GCG CTG CTG GCC AGA TAC ATC  
31 Gly Glu Ser Arg Ala His Leu Gly Ala Leu Leu Ala Arg Tyr Ile  
  
CAG CAG GCT CGA AAA GCA CCT TCT GGC CGA GTA TCT ATG ATT AAG  
46 Gln Gln Ala Arg/Lys Ala Pro Ser Gly Arg Val Ser Met Ile Lys  
  
AAT CTG CAG AGC CTG GAC CCC AGC CAC AGA ATA AGT GAC CGG GAC  
61 Asn Leu Gln Ser Leu Asp Pro Ser His Arg Ile Ser Asp Arg Asp

**CCK83**

TAC ATG GGC TGG ATG GAT TTT GGC TGA TCCTCTAGAGTCGAC...  
76 Tyr Met Gly Trp Met Asp Phe Gly Stop  
*Bam HI + Bcl I*

**CCK94**

TAC ATG GGC TGG ATG GAT TTT GGC CGG CGC AGT GCA GAG GAG TAT  
76 Tyr Met Gly Trp Met Asp Phe Gly Arg Arg Ser Ala Glu Glu Tyr  
  
GAA TAT ACC TCC TAG AAGACCCGCCCCTGATCCTCTAGAGTCGAC...  
91 Glu Tyr Thr Ser stop  
*Bam HI + Bcl I*



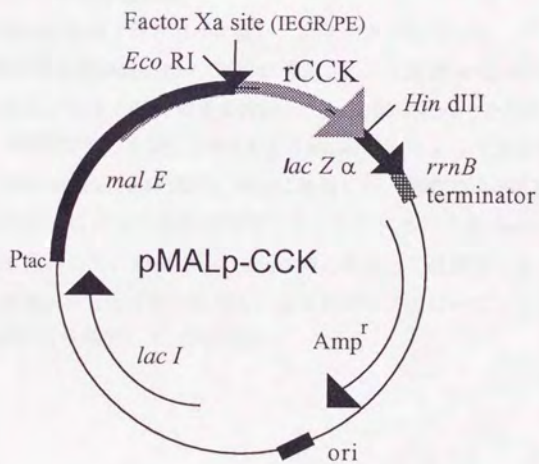
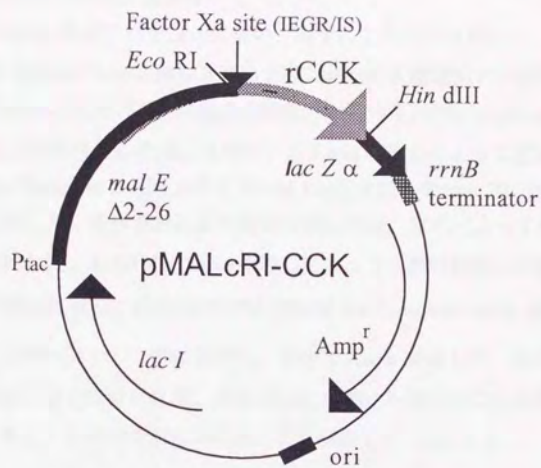


Figure 3-3 発現ベクターpMAL-pRI / pMAL-c

#### pMALcRI-CCK83/CCK94の少量発現

New England Biolab.社のプロトコルに従い、以下のように行った。

pMALcRI-CCK94およびpMALcRI-CCK83が導入された大腸菌MV1190の終夜培養液0.4mlをLB+Amp培地40mlに加え37℃で培養を開始し、A600が0.4になった時点で0.5mM IPTGを加えた。さらに2時間培養した後、3,000 X g, 3 minの遠心によって菌体を回収し、Lysis Buffer (10mM Na-Phosphate Buffer pH7.0, 30mM NaCl, 0.25% Tween 20, 10mM EDTA, 10mM EGTA) 5mlに懸濁した。液体窒素により急速凍結した後、氷水によって解凍し、超音波によって菌体を破砕した。3,000 X g, 3 minの遠心によって可溶性画分と不溶性画分を分離した。可溶性画分50μlに対し、Column buffer (10mM Na-Phosphate buffer pH7.0, 0.5M NaCl) で平衡化したアミロースレジン50μlを加え、水中で10min 懸濁した。遠心により上清を除き、Column buffer 1mlで洗浄した後、SDS-PAGE buffer を加え95℃に加熱することで吸着蛋白質を遊離させた。各画分をSDS-PAGEにより展開した (Fig. 3-4)。

#### pMALp-CCK83/CCK94の少量発現

New England Biolab.社のプロトコルに従い、以下のように行った。

pMALcRI-CCK94およびpMALcRI-CCK83が導入された大腸菌MV1190の終夜培養液0.4mlをLB+Amp培地40mlに加え37℃で培養を開始し、A600が0.4になった時点で0.3mM IPTGを加えた。さらに2時間培養した後、3,000 X g, 3 minの遠心によって菌体を回収し、30mM Tris-HCl pH8.0, 20% sucrose, 1mM EDTA 10mlに懸濁した。室温で10 min 攪拌した後、再び3,000 X g, 3 minの遠心によって菌体を回収した。これに氷冷した5mM MgSO<sub>4</sub> 10mlを加え、氷中で10 min 攪拌した。3,000 X g, 3 minの遠心によって浸透圧ショック画分と菌体画分を分離した。浸透圧ショック画分に対し、上と同様にアミロースレジンをを用いた精製を行い、SDS-PAGEにより展開した (Fig.3-5)。

### 3-4 結果

CCK33を生成するプロセシング部位に相当するペプチド Tyr-Ile-Gln-Gln-Ala-Arg-Lys-Ala-Pro-Serは、MATEによって効率よく切断された (Table 3-4)。 $K_M$ は4.8 $\mu$ Mであり、他の合成基質やペプチド基質よりも高い親和性を示した。一方酵素の反応効率を表す  $k_{cat} / K_M$  は各基質間で大きな差はなく、比較的大きな値を示した。

Table 3-4 MATEによるCCK部分ペプチドの切断

10mM Tris-HCl (pH8.0) 1mM EDTA 緩衝液中でペプチドと酵素0.5ユニットを1時間反応させ、トリフルオロ酢酸を終濃度 0.1%になるように加え反応を停止させた。280nmにおけるHPLCのピーク面積より切断率を計算し、Lineweaver-Burkプロットにより速度定数を算出した。合成基質については第二章の方法に準じた。なお酵素濃度については、分子量を32K、またTable 2-1より50 $\mu$ g=1.6 nmol = 10,000ユニット、すなわち0.08 pmol = 0.5ユニットと仮定し求めた。

Peptide	Sequence	$K_M(\mu\text{M})$	$k_{cat} (\text{s}^{-1})$	$k_{cat} / K_M (\text{M}^{-1}\text{s}^{-1})$
CCK33 peptide	YIQQARKAPS	4.8	3.4	$7.1 \times 10^5$
Dynorphin A (1-13)	YGGFLRRIAPKLK	43	25	$5.8 \times 10^5$
BAM-12P	YGGFMRRVGRPE	50	22	$4.4 \times 10^5$
Boc-QAR-MCA		27	28	$1.0 \times 10^6$
Boc-QRR-MCA		27	18	$6.5 \times 10^5$



RT-PCR法を用いて、ブタブレプロ CCKをクローニングすることに成功した。6クローンについてすべて同一の塩基配列が得られた (Table 3-2)。この配列をGubler らの結果と比較すると、Pro25において、CCCからCCTへの塩基置換があったが、複数のクローンについて同一の配列が得られたことから、PCRにおける変異ではなく種間差であると解釈し、これを鋳型として組み換え体rCCK84を作製した (Table 3-3)。なお大腸菌における発現の効率化のため、Looman らの結果に基づき、N末端3アミノ酸についてコドンの三文字目をGからAに置換し、Fig.3-2に示す発現ベクターを構築した。しかし現在のところ、誘導など様々な条件を検討したが、rCCK84の発現は検出できていない。

一方マルトース結合蛋白質MBPとの融合蛋白質については、細胞内発現ベクターpMALcRIでは僅かな発現しか見られず、アミロースレジンにも吸着しなかった (Fig.3-4)。一方ペリプラズム分泌ベクターpMALpでは、CCK83/CCK94ともに十分な発現蛋白質が得られ、浸透圧ショック画分に効率よく回収されたが、アミロースレジンへの吸着率は高くなかった (Fig.3-5)。しかしこの融合蛋白質は2本のバンドに分離しており、その分子量はCCK83/CCK94ともに同一で、46Kおよび48Kであった。なお *lon* および *ompT* プロテアーゼ欠損株であるBL21(DE3)においても同様の結果が得られた。

またpMALpにより発現した融合蛋白質は、トリプシン、キモトリプシン、Factor XaおよびMATEのいずれによっても切断を受けなかったため、プロテアーゼによる分解を受けにくい構造をとっていることが予想された。現在塩酸グアニジンを用いて融合蛋白質を変性させる条件検討を行っている。

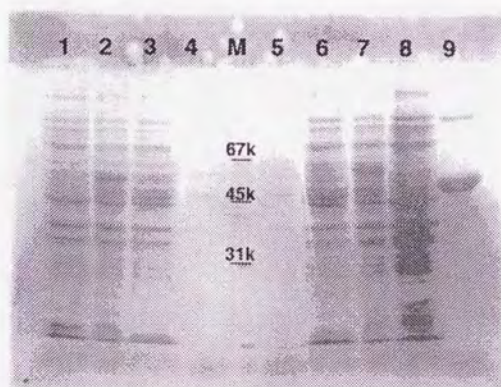


Figure 3-4 pMALcRI-CCK83 / CCK94の発現

Lanes 1, 8: - IPTG

2, 7: +IPTG

3, 6: 可溶性画分

4, 5: アミロースレジン吸着画分

M: 分子量マーカー

1 - 4: pMALcRI-CCK83

5 - 8: pMALcRI-CCK94

9: pMALcRI / アミロースレジン吸着画分 (MBP- $\beta$ -Gal- $\alpha$ )

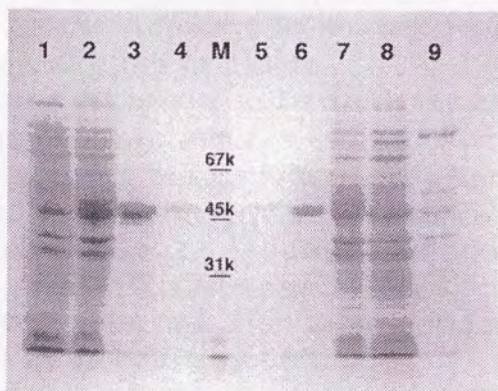


Figure 3-5 pMALp-CCK83 / CCK94の発現

Lanes 1, 8: - IPTG

2, 7: +IPTG

3, 6: 浸透圧ショック画分

4, 5: アミロースレジン吸着画分

M: 分子量マーカー

1 - 4: pMALp-CCK83

5 - 8: pMALp-CCK94

9: pMALp / アミロースレジン吸着画分 (MBP-β-Gal-α)



### 3-5 考察

本研究の結果より、MATEはCCK33のプロセシング部位に高い親和性を示し、かつ効率よく切断することから、CCKプロセシングプロテアーゼとして機能する可能性が示唆された。また、生体内においてこの反応は、dibasic signalの切断およびC末端のアミド化といった、ゴルジ以前に起こる修飾に引き続いて起こることが報告されているが、本酵素がトランスゴルジもしくは刷子縁膜に局在するという結果と矛盾しない。なお本研究では行わなかったが、合成基質の結果より類推すれば、CCK58 / CCK39のプロセシング部位も、単一Argながら切断される可能性がある。一方で、CCK前駆体の中には生理的には切断されない塩基性アミノ酸も存在することから、切断部位周辺のみならず全体的な構造も重要な因子であると推測される。

CCKのプロセシングに関する研究はこれまでに多数なされている。初期の研究では、脳および小腸において異なるプロセシングを受けるとされていた。(67) これによれば最小のCCKであるCCK8は、脳においてはCCK58から直接生成するのに対し、小腸においてはまずCCK33を経由するとされる。近年Reeve Jr. らは、小腸においてもCCK8はCCK58から生成すると報告しており(72)、その他にも様々なグループが報告をしているが、結果については一致を見ていない。これらはいずれも部位特異的抗体を用いた検出系を用いていることから、抗原部位を保持しているペプチドしか検出できず、CCK前駆体の動向を正確に反映しているとは言いがたい。組織からの抽出効率もフォームにより異なることが指摘されており、また特に消化酵素の豊富に存在する小腸においては、組織破砕時における非特異的な分解の影響も無視できないと考えられる。

このような点について詳細に検討を加えるには、純化した基質を用いて生化学的に解析することが必要であるが、これまでそのような試みはほとんどなされていなかった。そこで本研究では、前駆体を大腸菌の系を用いて発現する試みを行った。しかし細胞内発現の系では、単独および融合蛋白質とも十分な発現量が得られなかった。対象として用いたMBP- $\beta$ -Gal- $\alpha$ は大量に発現しかつアミロースレジンに効率よく吸着したことから、CCK前駆体部分が細胞内で安定に存在できないという可能性が考えられる。一方ペリプラズム分泌系では融合蛋白質そのものは効率よく発現・分泌されたが、分子量が46kおよび48kと、予想される数字(52k / MBP-CCK83, 53k / MBP-CCK94)よりも小さくなっていた。CCK83およびCCK94ともに同じ分子量を示したことから、以下の可能性が考えられる。

第一に、CCK前駆体の一部が分泌されるまでの間に特異的に切断されている可能性が考えられるが、その部位は今のところ同定できていない。また細胞内では大量に発現したMBP- $\beta$ -Gal- $\alpha$ は、逆に分泌系ではほとんど発現が見られなかったことから、細胞内においてMBP-CCK前駆体が発現しなかったのは、分泌蛋白質であるためだと推測される。

また第二の可能性として、コドン頻度の問題が挙げられる。今回用いた CCK前駆体においては、Argコドンに一部AGG/AGAが用いられているが、これらは大腸菌内でtRNAが非常に少なく、その結果翻訳が停止する可能性がある。仮に CCK58プロセシング部位 (AGG) あるいはCCK39プロセシング部位 (AGA) において翻訳が停止すると、融合蛋白質の分子量はそれぞれ45kおよび47Kとなって、観察されるバンドに近い数字となる。実際にこのようなことが起こるかどうかは不明だが、シグナルペプチドを持つ pMALpにおいては、翻訳停止中に強制的に分泌される可能性が否定できない。もしこれが原因であれば、部位特異的変異によりコドンを置き換えることで解決できよう。

またこれまでのところ発現蛋白質はプロテアーゼ耐性になっており、現段階では CCK前駆体部分を切り放すことには成功していない。このように現在の系では完全長の前駆体を大腸菌から得ることはできないため、更なる検討を行っている。

前駆体の発現実験に際しては、 $[^{35}\text{S}]\text{Met}$ を用いた*in vitro* 翻訳系もよく用いられるが、この系ではアミノ酸配列分析に足る量の基質が得られない。Azaryanらは本研究と同様の手法で、生理活性ペプチド前駆体POMCの大腸菌における発現を行い、プロセシングプロテアーゼによる作用を解析している(58)。

Roseらは、ラット大脳皮質においてCCK8を分解するセリンプロテアーゼの性質を解析している(73)。この酵素は阻害剤効果よりエラスターゼ様特異性を持っていると推測される。またViereckらはラット脳シナプトソームより、CCK33からCCK8を生成する酵素を精製した(68)。本酵素は分子量90kのセリンプロテアーゼであり、CCK内のArgを切断するが、トリプシンやカリクレイン用の合成基質は切断しない。また論文で、本活性は小腸には存在しないとされており、前述のReeve Jr.らの結果と異なっている。またこの酵素はMATEとも性質を異にしている。KoningsらはCCK発現培養細胞においてkexin family およびエンケファリナーゼの存在を同定、それぞれCCKのdibasic signal プロセシングおよび分解に関与する酵素と推測している(74)。またこれ以外にもCCKの分解についてはいくつかの報告があるが、一般に基質として入手可能なフォームはCCK8とCCK33のみであること



から、Fig.3-1 に示したような多様なフォームを産出する単一Argプロセッシングプロテアーゼの生化学的研究はこれまで皆無といってよく、本研究は高い意義を持つと考えられる。また同一の前駆体を用い統一的な研究を行うことで、脳-小腸間のプロセシングの異同に関する新たな知見が得られると予想される。



## 第四章

### 総合的考察および展望

これまでに述べてきたように、本研究では、ブタ小腸粘膜ミクロソーム画分より新規の膜結合性プロテアーゼを同定、完全精製を行った。その生化学的特性について解析を行うとともに、cDNAクローニングを試みた。また生理的機能に関する一考察として、生理活性ペプチドであるコレシストキニンの小腸特異的プロセッシングに関与する可能性を示した。本章ではさらに、予備的なデータを加えた総合的な考察を行う。

完全精製した酵素は第二章に述べたような特性を示したが、この結果を細胞レベルで検証するのは困難であった。Ca<sup>2+</sup>を用いた選択的沈殿法の結果から、本酵素はミクロソーム画分の中でも小胞体などではなく、酸性糖に富んだトランスゴルジ、または細胞表面である刷子縁膜画分に存在すると予想される。後者の仮説が正しければ、細胞けんだく液を用いて本酵素の活性測定が可能であると考え、小腸粘膜細胞をピペッティング及びコラゲナーゼ処理（基質特異性を考慮しトリプシン処理は行わなかった）により遊離させ、ハンクス+イーグル最小アミノ酸培地にけんだくし各種活性測定を行った。

この結果、トリプシン様酵素の基質に対して非常に強い活性が検出された。いくつかの合成基質に対する活性の相対値は精製した本酵素と類似していたが、至適pHは8.0であった。pH9.5における活性量は、本酵素の予想存在量と大きく離れるものではなかったが、pH8.0における活性量はその十倍にのぼった。しかしながらこの測定系では、他の膜結合プロテアーゼであるアミノペプチダーゼMやジペプチジルペプチダーゼIVなども検出されることから、単一のトリプシン様酵素活性を特異的に検出できているとは断定できず、様々な酵素の複合活性としてみかけの活性が現れている可能性があるため、詳細な解析は行わなかった。阻害剤効果からも、複数の酵素の関与が示唆された。またこのトリプシン様活性は洗浄により失われることはなく、バブインやEDTAなどでは可溶化できず、低濃度のTriton X-100により一部可溶化した。

第二章で考察したとおり、現在の調製方法では、消化酵素の混入を防ぐため膜画分の調製を厳格に行っており、みかけのトリプシン様活性の大部分が可溶画分として除去されるが、これらはゲルろ過では分子量100k以上の位置に溶出し、DE52及びアフィニティーカラムに吸着しないことから、本酵素とは異なると考えられ、既知の酵素との関連も不明である。細胞けんだく液で観察された活性が何に由来するのかは定かではないが、本酵素以外に異なるトリプシン様プロテアーゼが存在する可能性も考えられる。しかし過去の論文からはそのような報告は得られていない。一つの可能性として、細胞分画により破壊される何らかの複合体が細胞膜（刷子縁膜）に存在し、その中に本酵素が含まれていると考え

ることもできるが、現在の段階では推測の域を出ない。特異的抗体による組織染色によりその詳細が明らかになるであろう。

細胞膜上に存在するプロテアーゼの機能については様々な報告がなされており、基質の分解への関与のみならず、レセプターとしての機能が示唆されている例もあり、中でもトリプシン様プロテアーゼについては、興味深い結果が報告されている。例えばCD4<sup>+</sup>リンパ球上に存在するトリプターゼ様プロテアーゼが、HIVウイルスのレセプターとして機能する報告がなされている(48)。またトリプシンインヒビターの一種であるKazal 型 (Pancreatic Secretory Trypsin Inhibitor, PSTI) は、各種細胞に結合し細胞増殖や分化を引き起こすという研究が多数なされており(75-78)、これらの細胞上結合因子として、トリプシン様プロテアーゼの存在が示唆されている。

膵臓から消化管に分泌され、小腸細胞に結合し、CCKの合成を誘導する分子として、Monitor Peptide が同定された。この分子はPSTIに高い相同性を持っている(79)。ラット小腸におけるMonitor Peptide の結合蛋白がクロスリンク法により同定されたが、この分子はSDS-PAGEから計算される相対分子量が、非還元状態で50k、還元状態で32kと、本酵素に酷似していた(80)。この結合はPSTIにより阻害されるが、阻害中心の変異体には阻害されないことから、結合蛋白はトリプシン様の活性中心を持つと推測された。そこで細胞表面におけるMonitor Peptide の結合蛋白と本酵素の異同判別のため、各種蛋白性トリプシンインヒビターと本酵素の相互作用を検討した。

PSTIは市販されていなかったため、既報(81)を元にブタ及びラット膵臓から精製を行い、酸加熱処理、CM52、HPLCにより、ブタからはPSTIを単一ピークとして精製した。この他にも、Kunitz 型トリプシンインヒビター (BPTI)、卵白トリプシンインヒビター (オボムコイド) などについて、トリプシンを比較対象として阻害定数の算定を試みた。



Table 4-1 各種トリプシンインヒビターの50%阻害濃度

基質として0.1mM Boc-Gln-Ala-Arg-MCA を用い、10 mM Tris-HCl pH 8.0 緩衝液中で、あらかじめ基質と阻害剤を混和しておき、酵素を加えることで反応を開始した。阻害剤濃度を変化させ、50%阻害濃度を外挿により求めた。

Inhibitor	IC <sub>50</sub> vs. MATE	IC <sub>50</sub> vs. Trypsin
Soybean Trypsin Inhibitor (SBTI)	9 X 10 <sup>-7</sup>	2 X 10 <sup>-10</sup>
Ovomucoid	no inhibition	2 X 10 <sup>-10</sup>
Bovine Pancreas Trypsin inhibitor (BPTI)	6 X 10 <sup>-7</sup>	4 X 10 <sup>-10</sup>
Pancreas Secretory Trypsin Inhibitor (PSTI)	no inhibition	1 X 10 <sup>-9</sup>

Table 4-1 に示すように、本酵素はトリプシンと比較して、検討したすべてのトリプシンインヒビターに対して結合定数が千倍程度弱く、特にオボムコイド及びPSTI には全く阻害されないという結果が得られた。このことより、本酵素がMonitor Peptide の結合蛋白であるという結論を得るには至らなかった。また同実験を細胞けんかく液についても行ったが、精製酵素のような明確な結果を得ることはできなかった。

このように、生理作用を示唆するような確実なデータは今のところ得られていない。CCKプロセッシングについても、細胞内外の局在などが明らかでない現段階では、*in vitro* で前駆体を切断できるという点しか判明しておらず、総合的な研究の進展を待たねばならない。

しかしながら、*in vivo* の検証を行う上で、ブタという実験動物は必ずしも最適とは言えず、飼育系の確立した小動物の方が whole body での解析には有利である。この点をふまえて我々は、ラット小腸よりMATEに相当する酵素を単離する試みを行った。

ブタと同様の基質および方法を用いて、ラット小腸粘膜ミクロソーム画分より、トリプシン様プロテアーゼの精製を行った。しかし精製された酵素は、分子量、基質特異性およびN末端アミノ酸配列が、トリプシンと一致した。この酵素はCa<sup>2+</sup>選別沈澱法により凝集する小胞体画分から回収された点でMATEとも異なる。またこれとは別個に、熱変性力ゼ

インを基質とするプロテアーゼをやはりミクロソーム画分より精製したが、これは分子量、基質特異性およびN末端アミノ酸配列がキモトリプシンと同一であった。トリプシンおよびキモトリプシンはいずれも膵臓から消化管に分泌される酵素であり、ミクロソーム画分より回収された理由は不明であるものの、混入の危険性が高いことは明らかである。Jeohnらはブタ胃粘膜ミクロソーム画分よりgastric trypsinを単離し、翻訳後修飾により膜画分への親和性が増す可能性を示唆している(82)。ラット小腸においてもトリプシンが細胞内膜画分に存在する可能性は否定できないが、組織量に比して大量の酵素が存在することから、生理的条件を反映していないと考え、これ以上の解析を行わなかった。

Table 4-2 ラット小腸ミクロソーム画分から精製された二種のセリンプロテアーゼ

	Trypsin-like	Chymotrypsin-like
Substrate	Boc-Gln-Gly-Arg-MCA	Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-MCA Heat-denatured casein
Purification steps	cfig, solubilization DE-52, benzamidine	cfig, solubilization DE-52, hydroxyapatite
SDS-PAGE	20k ( $-\beta$ -ME) 28k ( $+\beta$ -ME)	28k ( $+/- \beta$ -ME)
Purification fold	215-fold	295-fold (Casein) 1,770-fold (MCA)
N-terminal sequence	IVGGYT?PEHSVPYQVSLN?	IVNGEDAIPGS?PWQVSLQ?
Identical with:	Rat anionic trypsin I	Rat chymotrypsin

このようにラット小腸からMATEを精製する試みは成功しなかったため、cDNA レベルの解析を行うことにした。しかしRT-PCRの結果からは、第二章に示したとおり、ラット小腸からも特異的断片を増幅することはできなかった。またライブラリーのスクリーニングに関しては今回行っていないが、ブタと異なりラット小腸cDNAライブラリーは市販されていることから、今後行うべき課題であると考えている。

本研究では、酵素の存在量が非常に微量であるということが大きな障害となっている。しかし小腸上皮は多様な細胞が集まっていることが知られており、その中の特定の細胞群にのみ発現しているという可能性も否定できない。したがって、均一な細胞集団の得られる培養細胞系は非常に有効である。また培養細胞を用いることによって、種々の薬剤処理を用い、細胞内輸送や翻訳後修飾の解析を行えることから、生理機能についてより詳細な研究が可能である。さらに本章冒頭で述べたように、生理的に重要な作用を示す細胞膜結合性プロテアーゼを、阻害剤結合を利用して発現クローニングする際にも培養細胞系は必須であり、今後の課題としたい。



## 第五章

## 引用文献

## 第一章

可能な限り総説を引用した。

- (1) Barrett, A. J. *Methods in Enzymol.* **244**, 1-15 (1995). "Classification of Peptidases".
- (2) Seemüller, E., Lupas, A., Stock, D., Löwe, J., Huber, R. and Baumeister, W. *Science* **268**, 579-582 (1995). "Proteasome from *Thermoplasma acidophilum*: A Threonine Protease".
- (3) Davie, E.W., Fujikawa, K. & Kisiel, W. *Biochemistry* **30**, 10363-10370 (1991). "The Coagulation Cascade: Initiation, Maintenance, and Regulation".
- (4) Reid, K.B.M. & Porter, R.R. *Annu.Rev.Biochem.* **50**, 433-464 (1981). "The Proteolytic Activation Systems of Complement".
- (5) Reid, I.A., Morris, B.J. & Ganong, W.F. *Annu.Rev.Physiol.* **40**, 377-410 (1978). "The Renin-angiotensin System".
- (6) Tschantz, W. R. & Dalbey, R. E. *Methods in Enzymol.* **244**, 285-300 (1995). "Bacterial Leader Peptidase I".
- (7) Isaya, G. & Kalousek, F. *Methods in Enzymol.* **248**, 556-578 (1995). "Mitochondrial Intermediate Peptidase".
- (8) Ciechanover, A. *Cell* **79**, 13-21 (1994). "The Ubiquitin-Proteasome Pathway".
- (9) Jentsch, S. and Schlenker, S. *Cell* **82**, 881-884 (1995). "Selective Protein Degradation: A Journey's End within the Proteasome".
- (10) Klausner, R.D. & Sitia, R. *Cell* **62**, 611-614 (1990). "Protein Degradation in the Endoplasmic Reticulum".
- (11) Martin, S. J. and Green, D. R. *Cell* **82**, 349-352 (1995). "Protease Activation during Apoptosis: Death by a Thousand Cuts?".
- (12) Steiner, D.F., Smekens, S.P., Ohagi, S. & Chan, S.J. *J.Biol.Chem.* **267**, 23435-23438 (1992). "The New Enzymology of Precursor Processing Endoproteases".
- (13) Barr, P.J. *Cell* **66**, 1-3 (1991). "Mammalian Subtilisins: The Long-sought Dibasic Processing Endoproteases".
- (14) Marx, J. *Science* **252**, 779-780 (1991). "How Peptide Hormones Get Ready to Work".
- (15) Schwartz, T.W. *FEBS Lett.* **200**, 1-10 (1986). "The Processing of Peptide Precursors 'Proline-directed Arginyl-cleavage' and Other Monobasic Processing Mechanisms".
- (16) Devi, L. *FEBS Lett.* **280**, 189-194 (1991). "Consensus Sequence for Processing of Peptide Precursors at Monobasic Sites".

- (17) Tsuchiya, Y., Takahashi, T., Sakurai, Y., Iwamatsu, A. and Takahashi, K. *J. Biol. Chem.* **269**, 32985-32991 (1994). "Purification and Characterization of a Novel Membrane-bound Arginine-specific Serine Proteinase from Porcine Intestinal Mucosa".

## 第二章

- (18) Yanagida, M., Tamanoue, Y., Sutoh, K., Takahashi, T. & Takahashi, K. *Biomed. Res.* **12**, 113-120 (1991). "Microsomal Membrane-bound Serine Proteinase from Rat Liver: Partial Purification and Specificity toward Arginyl Peptide Bonds".
- (19) Sogawa, K., Ichihara, Y. & Takahashi, K. *J. Biochem. (Tokyo)* **90**, 1243-1248 (1981). "Comparison of Some Characteristics of Membrane-bound Neutral Proteinase Activity in the Microsomal Fractions of Rat Kidney and Small Intestine".
- (20) Takahashi, K., Tamanoue, Y., Yanagida, M., Sakurai, Y., Takahashi, T. & Sutoh, K. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **175**, 1152-1158 (1991). "Specific Cleavages of Arginyl Peptide Bonds at Basic Amino Acid Pairs by a Serine Proteinase from the Microsomal Membranes of Rat Liver".
- (21) Laemmli, U.K. *Nature* **227**, 680-685 (1970). "Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4".
- (22) 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. & Klenk, D.C. *Anal. Biochem.* **150**, 76-85 (1985). "Protein Measurement using Bicinchoninic Acid".
- (23) Iwamatsu, A. *Electrophoresis*, **13**, 142-147 (1992). "S-carboxymethylation of proteins transferred onto polyvinylidene difluoride membranes followed by *in situ* protease digestion and amino acid microsequencing".
- (24) Furie, B., Bing, D.H., Feldmann, R.J., Robinson, D.J., Burnier, J.P. & Furie, B.C. *J. Biol. Chem.* **257**, 3875-3882 (1982). "Computer-generated Models of Blood Coagulation Factor Xa, and Thrombin Based upon Structural Homology with Other Serine Proteases".
- (25) MacDonald, R. J., Stary, S. J. and Swift, G. H. *J. Biol. Chem.* **257**, 9724-9732 (1982). "Two Similar but Nonallelic Rat Pancreatic Trypsinogen".
- (26) Bell, G. I., Quinto, C., Quiroga, M., Valenzuela, P., Craik, C. S. and Rutter, W. J. *J. Biol. Chem.* **259**, 14265-14270 (1984). "Isolation and Sequence of a Rat Chymotrypsinogen B Gene".



- (27) Fletcher, T. S., Shen, W.-F. and Largman, C. *Biochemistry* **26**, 7256-7261 (1987). "Primary Structure of Human Pancreatic Elastase 2 Determined by Sequence Analysis of the Cloned mRNA".
- (28) Vanderslice, P., Ballinger, S. M., Tam, E. K., Goldstein, S. M., Craik, C. S. and Caughey, G. H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 3811-3815 (1990). "Human Mast Cell Trypsin: Multiple cDNAs and Genes Reveal a Multigene Serine Protease Family".
- (29) Benfay, P. N., Yin, F. H. and Leder, P. *J. Biol. Chem.* **262**, 5377-5384 (1987). "Cloning of the Mast Cell Protease, RMCP II".
- (30) Matsushima, M., Ichinose, M., Yahagi, N., Kakei, N., Tsukada, S., Miki, K., Kurokawa, K., Tashiro, K., Shiokawa, K., Shinomiya, K., Umeyama, H., Inoue, H., Takahashi, T. and Takahashi, K. *J. Biol. Chem.* **269**, 19976-19982 (1994). "Structural Characterization of Porcine Enteropeptidase".
- (31) Pennica, D., Holmes, W. E., Kohr, W. J., Harkins, R. N., Vehar, G. A., Ward, C. A., Bennett, W. F., Yelverton, E., Seeburg, P. H., Heyneker, H. L. and Goeddel, D. V. *Nature* **301**, 214-221 (1983). "Cloning and Expression of Human Tissue-type Plasminogen Activator cDNA in *E.coli*".
- (32) Verde, P., Stoppelli, M. P., Galeffi, P., Nocera, P. D. and Blasi, F. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 4727-4731 (1984). "Identification and Primary Sequence of an Unspliced Human Urokinase Poly(A)<sup>+</sup> RNA".
- (33) Malinowski, D. P., Sadler, J. E. and Davie, E. W. *Biochemistry* **23**, 4243-4250 (1984). "Characterization of a Complementary Deoxyribonucleic Acid Coding for Human and Bovine Plasminogen".
- (34) Degan, S. J. F., MacGillivray, R. T. A. and Davie, E. W. *Biochemistry* **22**, 2087-2097 (1983). "Characterization of the Complementary Deoxyribonucleic Acid and Gene Coding for Human Prothrombin".
- (35) Leytus, S. P., Foster, D. C., Kurachi, K. and Davie, E. W. *Biochemistry* **25**, 5098-5102 (1986). "Gene for Human Factor X: A Blood Coagulation Factor Whose Gene Organization Is Essentially Identical with That of Factor IX and Protein C".
- (36) Fukushima, D., Kitamura, N. and Nakanishi, S. *Biochemistry* **24**, 8037-8043 (1985). "Nucleotide Sequence of Cloned cDNA for Human Pancreatic kallikrein".
- (37) Chung, D. W., Fujikawa, K., McMullen, B. A. and Davie, E. W. *Biochemistry* **25**, 2410-2417 (1986). "Human Plasma Prekallikrein, a Zymogen to a Serine Protease That Contains

Four Tandem Repeats".

- (38) Ashley, P. L. and MacDonald, R. J. *Biochemistry* **24**, 4512-4520 (1985). "Kallikrein-Related mRNAs of the Rat Submaxillary Gland: Nucleotide Sequences of Four Distinct Types Including Tonin".
- (39) Gershenfeld, H. K., Hersherberger, R. J., Shows, T. B. and Weissman, I. L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 1184-1188 (1988). "Cloning and Chromosomal Assignment of a Human cDNA Encoding a T Cell- and Natural Killer Cell-specific Trypsin-like Serine Protease".
- (40) Leytus, S. P., Loeb, K. R., Hagen, F. S., Kurachi, K. and Davie, E. W. *Biochemistry* **27**, 1067-1074 (1988). "A Novel Trypsin-like Protease "Hepsin" with a Putative Transmembrane Domain Expressed by Human Liver and Hepatoma Cells".
- (41) Masson, D., Nabholz, M., Estrade, C. and Tschopp, J. *EMBO J.* **5**, 1595-1600 (1986). "Granules of Cytolytic T-lymphocytes Contain Two Serine Esterases".
- (42) Beinfeld, M. C., Bourdais, J., Kuks, P., Morel, A. and Cohen, P. *J. Biol. Chem.* **264**, 4460-4465 (1989). "Characterization of an Endoprotease from Rat Small Intestinal Mucosal Secretory Granules Which Generates Somatostatin-28 from Prosomatostatin by Cleavage after a Single Arginine residue".
- (43) Bourdais, J., Pierotti, A. R., Boussetta, H., Barre, N., Devilliers, G. and Cohen, P. *J. Biol. Chem.* **266**, 23386-23391 (1991). "Isolation and Functional Properties of an Arginine-selective endoprotease from Rat Intestinal Mucosa".
- (44) Tanaka, K., Nakamura, T. and Ichihara, A. *J. Biol. Chem.* **261**: 2610-5 (1986). "A Unique Trypsin-like Protease Associated with Plasma Membranes of Rat Liver".
- (45) Guenet, L., Gueble-Val, F., Blayau, M., Le Treut, A. and Le Gall, J. Y. *Biochim. Biophys. Acta* **881**: 258-67 (1986). "Partial Purification and Characterization of a Serine Endopeptidase From Rat Liver Plasma Membranes".
- (46) Shen, F.-S., Roberts, S. F. and Lindberg, I. *J. Biol. Chem.* **264**, 15600-15605 (1989). "A Putative Processing Enzyme for Proenkephalin in Bovine Adrenal Chromaffin Granule Membranes".
- (47) Metters, K. M., Rossier, J., Paquin, J., Chrétien, M. and Seidah, N. G. *J. Biol. Chem.* **263**, 12543-12553 (1988). "Selective Cleavage of Proenkephalin-derived Peptides (<23,300 Daltons) by Plasma Kallikrein".
- (48) Kido, H., Fukutomi, A. and Katunuma, N. *J. Biol. Chem.* **265**, 21979-21985 (1990). "A Novel Membrane-bound Serine Esterase in Human T4<sup>+</sup> Lymphocytes Immunologically



Reactive with Antibody Inhibiting Syncytia Induced by HIV-1".

- (49) Kim, W.-S., Nakayama, K., Nakagawa, T., Kawamura, Y., Haraguchi, K. and Murakami, K. *J. Biol. Chem.* **266**, 19283-19287 (1991). "Mouse Submandibular Gland Prorenin-converting Enzyme Is a Member of Glandular Kallikrein Family".
- (50) Tamanoue, Y., Takahashi, T. and Takahashi, K. *J. Biochem. (Tokyo)* **113**, 229-235 (1993). "Purification and Characterization of Two Isoforms of Serine Proteinase from the Microsomal Membranes of Rat Liver".
- (51) Zhukov, A., Werlinder, V. and Ingelman-Sundberg, M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **197**: 221-8 (1993). "Purification and Characterization of Two Membrane Bound Serine Proteinases from Rat Liver Microsomes Active in Degradation of Cytochrome P450".
- (52) Hamabata, T., Okimura, H., Yokoyama, N., Takahashi, T. and Takahashi, K. *J. Biol. Chem.* **269**, 17899-17904 (1994). "Purification, Characterization, and Localization of Folipin, a Novel Serine Proteinase from the Fluid of Porcine Ovarian Follicles".
- (53) Plevrakis, I., Clamigrand, C., Créminon, C., Brakch, N., Rhoam, M. and Cohen, P. *Biochemistry* **28**, 2705-2710 (1989). "Procytocin / Neurophysin Convertase from Bovine Neurohypophysis and Corpus Luteum Secretory Granules: Complete Purification, Structure-Function Relationships, and Competitive Inhibitor".
- (54) Pierotti, A. R., Prat, A., Chesneau, V., Gaudoux, F., Leseney, A.-M., Foulon, T. and Cohen, P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 6078-6082 (1994). "N-Arginine Dibasic Convertase, a Metalloendopeptidase as a Prototype of a Class of Processing Enzymes".
- (55) Kawabata, S., Nakagawa, K., Muta, T., Iwanaga, S. and Davie, E. W. *J. Biol. Chem.* **268**, 12498-12503 (1994). "Rabbit Liver Microsomal Endopeptidase with Substrate Specificity for Processing Proproteins Is Structurally Related to Rat Testes Metalloendopeptidase 24.15".
- (56) Berman, Y. L., Juliano, L. and Devi, L. A. *J. Biol. Chem.* **270**, 23845-23850 (1995). "Purification and Characterization of a Dynorphin-processing Endopeptidase".
- (57) Csuha, E., Safavi, A. and Hersh, L. B. *Biochemistry* **34**, 12411-12419 (1995). "Purification and Characterization of a Secreted Arginine-Specific Dibasic Cleaving Enzyme from EL-4 Cells".
- (58) Azaryan, A. V., Schiller, M. R. and Hook, V. Y. H. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **215**, 937-944 (1995). "Chromaffin Granule Aspartic Proteinase Processes Recombinant Pro-opiomelanocortin (POMC)".
- (59) Kirschke, H. and Wiederanders, B. *Methods in Enzymol.* **244**, 500-511 (1995). "Cathepsin S



and Related Lysosomal Endopeptidases".

- (60) Nakagawa, T., Hosaka, M., Torii, S., Watanabe, T., Murakami, K. and Nakayama, K. *J. Biochem. (Tokyo)* **113**, 132-135 (1993). "Identification and Functional Expression of a New Member of the Mamalian Kex2-like Processing Endoprotease Family: Its Striking Structural Similarity to PACE4".
- (61) Nakagawa, T., Murakami, K. and Nakayama, K. *FEBS Lett.* **327**, 165-171 (1993). "Identification of an Isoform with an Extremely Large Cys-rich Region of PC6, a Kex2-like Processing Endoprotease".
- (62) Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd Edition*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989).
- (63) Chomczynski, P. and Sacchi, N. *Anal. Biochem.* **162**, 156-159 (1987). "Single-step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-PhOH-choloroform Extraction".
- (64) Wiegand, U., Corbach, S., Minn, A., Kang, J. and Müller-Hill, B. *Gene* **136**, 167-175 (1993). "Cloning of the cDNA encoding Human Brain Trypsinogen and Characterization of Its Product".
- (65) Przetak, M. M., Yeast, S. and Schmidt, B. F. *FEBS Lett.* **364**, 268-271 (1995). "Cloning of cDNA for Human Granzyme 3".

### 第三章

- (66) Eberlain, G. A., Eysselein, V. E., Davis, M. T., Lee, T. D., Shively, J. E., Grandt, D., Niebel, W., Williams, R., Moessner, J., Zeeh, J., Meyer, H. E., Goebell, H. and Reeve Jr., J. R. *J. Biol. Chem.* **267**, 1517-1521 (1992). "Pattern of Prohormone Processing: Order Revealed by a New Procholecystokinin-derived peptide".
- (67) Rehfeld, J. F. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 3019-3023 (1987). "Procholecystokinin Processing in the Normal Human Anterior Pituitary".
- (68) Viereck, J.C. and Beinfeld, M. C. *J. Biol. Chem.* **267**, 19475-19481 (1992). "Characterization of Cholecystokinin 8-generating Endoprotease Purified from Rat Brain Synaptosomes".
- (69) Rehfeld, J. F., Bardram, L. and Hilsted, L. *Gastroenterology*, **103**, 424-430 (1992). "Ontogeny of Procholecystokinin in Rat Duodenum, Jejunum, and Ileum".

- (70) Gubler, U., Chua, A. O., Hoffman, B. J., Collier, K. J. and Eng, J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 4307-4310 (1984). "Cloned cDNA to Cholecystokinin mRNA Predicts an Identical Preprocholecystokinin in Pig Brain and Gut".
- (71) Looman, A. C., Bodlaender, J., Comstock, L. J., Eaton, D., Jhurani, P., de Boer, H. A. and van Knippenberg, P. H. *EMBO J.* **6**, 2489-2492 (1987). "Influence of the Codon Following the AUG Initiation Codon on the Expression of a Modified *lacZ* gene in *Escherichia coli*".
- (72) Reeve Jr., J. R., Eysslein, V. E., Eberlein, G. A., Chew, P., Ho, F.-J., Huebner, V. D., Shively, J. E., Lee, T. D. and Liddle, R. A. *J. Biol. Chem.* **266**, 13770-13776 (1991). "Characterization of Canine Intestinal Cholecystokinin-58 Lacking Its Carboxy-terminal Nonapeptide: Evidence for Similar Post-Translational Processing in Brain and Gut".
- (73) Rose, C., Camus, A. and Schwartz, J. C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 8326-8330 (1988). "A Serine Peptidase Responsible for the Inactivation of Endogenous Cholecystokinin in Brain".
- (74) Konings, P. N. M., Mania-Farnell, B., Beinfeld, M. C., Oakes, M. G., Day, R., Seidah, N. G. and Davis, T. P. *Neuropeptides* **25**, 19-30 (1993). "Processing, Release and Metabolism of Cholecystokinin in SK-N-MCIXC Cells".

#### 第四章

- (75) McKeehan, W. L., Sakagami, Y., Hoshi, H. and McKeehan, K. A. *J. Biol. Chem.* **261**, 5378-5383 (1986). "Two Apparent Human Endothelial Cell Growth Factors from Human Hepatoma Cells Are Tumor-associated Proteinase Inhibitors".
- (76) Ogata, N. *J. Biol. Chem.* **263**, 13427-13431 (1988). "Demonstration of Pancreatic Secretory Trypsin Inhibitor in Serum-free Culture Medium Conditioned by the Human Pancreatic Carcinoma Cell Line CAPAN-1".
- (77) Hamilton, I., Reynolds, G. W., Scott, G. K. and Sharfe, N. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **371**, 79-83 (1990). "Effects of Human and Ovine Pancreatic Secretory Trypsin Inhibitors on the Proliferation of Normal Human Fibroblasts".
- (78) Niinobu, T., Ogawa, M., Murata, A., Nishijima, J. and Mori, T. *J. Exp. Med.* **172**, 1133-1142 (1990). "Identification and Characterization of Receptors Specific for Human Pancreatic Secretory Trypsin Inhibitor".
- (79) Iwai, K., Fukuoka, S., Fushiki, T., Tsujikawa, M., Hirose, M., Tsunasawa, S. and Sakiyama, F. *J. Biol. Chem.* **262**, 8956-8959 (1987). "Purification and Sequencing of a Trypsin-sensitive Cholecystokinin-releasing Peptide from Rat Pancreatic Juice".

- (80) Yamanishi, R., Kotera, J., Fushiki, T., Soneda, T., Saitoh, T., Oomori, T., Satoh, T. and Sugimoto, E. *Biochem. J.* **291**, 57-63 (1993). "A Specific Binding of the Cholecystokinin-releasing Peptide (Monitor Peptide) to Isolated Rat Small-intestinal Cells".
- (81) Greene, I. J., DiCarlo, J. J., Sussman, A. J., Bartelt, D.C. and Roark, D. E. *J. Biol. Chem.* **243**, 1804-1815 (1968). "Two Trypsin Inhibitors from Porcine Pancreatic Juice".
- (82) Jeohn, G.-H., Serizawa, S., Iwamatsu, A. and Takahashi, K. *J. Biol. Chem.* **270**, 14748-14755 (1995). "Isolation and Characterization of Gastric Trypsin from the Microsomal Fraction of Porcine Gastric Antral Mucosa".



## 第六章

### 謝辭

指導教官をお引き受け頂き、本研究の遂行に大きなお力添えを頂いた、鈴木紘一先生（東京大学分子細胞生物学研究所 生体超高分子分野 教授）に感謝いたします。

本研究の大部分は、東京大学大学院理学系研究科生物化学専攻 高橋研究室において行われました。本研究を全面的に支援して頂き御指導下さった、高橋健治先生（東京薬科大学生命科学部 教授）に感謝いたします。

蛋白質関連の研究においては、高橋孝行先生（北海道大学理学部 教授）に全面的なご支援を賜りました。アミノ酸分析については櫻井康子先生（生物化学専攻 山本研究室）の、また部分アミノ酸配列の決定には岩松明彦先生（キリンビール基盤技術研究所）のご協力を頂きました。

DNA関連の研究においては、井上英史先生（東京薬科大学生命科学部 助教授）および村松友成先生（国立がんセンター生物物理部 室長）の貴重な御指導およびご意見を仰ぎました。

生化学を含めた総合的な考察においては、田之倉優先生（東京大学生物生産工学センター 教授）および小島正樹先生（東京薬科大学生命科学部 助手）に有意義な御指導を頂きました。

本研究の遂行において、Dr. S.B.P.Athauda（スリランカ・ペラデニヤ大学医学部 講師）、孔光勲先生（韓国中央大学校 助教授）、玉野上佳明先生（工業技術院生命工学工業技術研究所）、金龍泰先生（青山学院大学理工学部 助手）、全光昊先生（米国 NIH）の諸先生方には常に素晴らしい手本となって頂きました。

一瀬雅夫先生、松嶋成志先生、矢作直久先生、塚田真子先生（東京大学医学部第一内科）には、協同研究者として公私にわたるご支援を頂きました。

佐々木宏先生（東京大学生物生産工学センター 助手）、秦野賢一氏を始め、生物化学専攻同期の友人諸兄、また生物化学専攻 高橋研究室時代の学生の皆様には、活発な討論の機会と大学内外での交流の場を与えて頂きました。

配属を快く御承諾頂き、異なる視点から有意義なご教示を下さいました、石浦章一先生、反町洋之先生を始め、東京大学分子細胞生物学研究所 生体超高分子分野の皆様には御礼を申し上げます。

大学院生活を支えてくれた、家族と多くの友人に心より感謝いたします。



