

新規カルボキシペプチダーゼgp180の構造と機能

著者	黒木 和之
著者別表示	Kuroki Kazuyuki
雑誌名	平成8(1996)年度 科学研究費補助金 基盤研究(C) 研究成果報告書
巻	1995-1996
ページ	15p.
発行年	1997-03
URL	http://doi.org/10.24517/00049899

KAKEN

1996

34

新規カルボキシペプチダーゼ gp180 の構造と機能

課題番号 (07680679)

平成8年度科学研究費補助金(基盤研究C)研究成果報告書

平成9年3月

研究代表者 黒木 和之
(金沢大学 がん研究所)

はしがき

研究組織

研究代表者： 黒木和之（金沢大学がん研究所助教授）
研究分担者： 原田文夫（金沢大学がん研究所教授）

研究経費：	平成7年度	1 2 0 0千円
	平成8年度	<u>9 0 0千円</u>
	計	2 1 0 0千円



8000-55159-4

金沢大学附属図書館

研究発表

(1) 学会誌等

Kuroki, K., Eng, F., Ishikawa, T., Turck, C., Harada, F. and Ganem, D. (1995)
gp180, a host cell glycoprotein that binds duck hepatitis B virus particles, is encoded a
member of the carboxypeptidase gene family. *J. Biol. Chem.*, 270, 15022-15028.

(2) 口頭発表

Kuroki, K., Eng, F., Ishikawa, T., Harada, F. and Ganem, D.,
Expression of gp180 in LMH cells leads to DHBV binding but is not sufficient for
productive infection. *The Molecular Biology of Hepatitis B Viruses* (San Diego,
California), 平成7年7月24日

黒木和之、石川隆、村上啓二、木戸敬治、原田文夫、
ヒトおよびマウスカルボキシペプチダーゼ gp180 cDNA の単離と解析。
日本分子生物学会、平成8年8月27日

研究目的

カルボキシペプチダーゼは、メタロプロテアーゼに分類され、標的タンパク質の COOH 末端の塩基性アミノ酸 (Arg, Lys) を切断することにより、そのタンパク質の maturation や activation に機能する。したがって、ホルモンなど目的タンパク質の生理活性、調節機構を知る上で、たいへん重要な機能酵素である。

我々は、ダック B 型肝炎ウイルス (DHBV) の感染機構を研究する過程で、DHBV 粒子と特異的に結合する分子量 18 万の宿主膜結合糖タンパク質 (gp180) を発見した [Kuroki et al., J. Virol., 68, 2091-2096 (1994)]。最近、我々は、この gp180 の全領域をカバーする約 7 kb の cDNA および genomic DNA を得ることができたので、その塩基配列決定、アミノ酸一次構造の推定、ホモロジー検索等を行ってきた。その結果、gp180 はこれまでに報告されているカルボキシペプチダーゼと高いホモロジーがあることからこの酵素群に分類されると考えている。しかし、(1) カルボキシペプチダーゼのドメインが 3 個タンデムに gp180 上に並んでいて、膜貫通領域を 3 番目のドメインの C 末端にもつ、(2) 3 つのドメイン間で、substrate binding site や catalytic site のアミノ酸配列が異なるなど、これまで知られていない、たいへんユニークなアミノ酸一次構造をとっていることがわかった

gp180 の構造上の特徴は、(1) 合目的に、3 種のカルボキシペプチダーゼを一つのペプチドに持つことで協調的に発現される必然性がある、(2) gp180 は前駆体であり、3 番目のカルボキシペプチダーゼは COOH 末端近くの 21 アミノ酸からなる疎水性領域を介して膜に結合し機能するが、proteolytic cleavage によって 1、2 番目のカルボキシペプチダーゼはプラズマあるいはオルガネラなど機能するための特異的な局在性を持って分布するようになる、(3) 進化の過程で単一の遺伝子が triplicate し、それぞれが基質特異性をもつようになる、など生化学、分子生物学上たいへん意味のある仮説を我々に提示している。

本研究の目的は、上記の仮説をもとに新発見のカルボキシペプチダーゼ gp180 の構造とその機能の特異性について理解すること、また生物種間の普遍性について論ずることである。

研究成果

ヒトおよびマウスのダックカルボキシペプチダーゼgp180ホモログの単離。

ダック gp180 cDNA をプローブにしてヒト肝臓 cDNA ライブラリー (CLONTECH、USA) 1×10^6 クローンをスクリーニングした結果、不完全長の 2 個のクローン (pH1 と pH2) が得られた (図 1、A) (石川隆ら)。

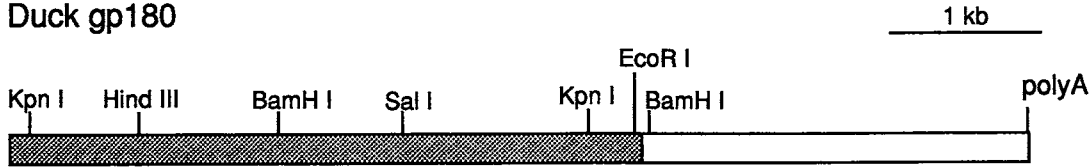
我々は、さらに完全長の gp180 cDNA を得るため、cDNA ライブラリーの作製、スクリーニングを行った。ヒト (pH1 と pH2 cDNA) とダック gp180 で相同性の高い部位を選び作製した primer 1 と 2 を用いた RT-PCR により、ヒト HepG2 細胞株に、またマウス肝臓についても 0.8 kb の産物が確認されたので (図 1、B)、これらの細胞より cDNA ライブラリーを作製した。

HepG2 およびマウス肝臓 cDNA ライブラリー (それぞれ 1.3×10^6 クローン) を図 1 (B) の gp180 DNA (0.8 kb) をプローブとしてスクリーニングした結果、最終的にそれぞれ 18 個の独立したクローンを得た。これらのうち、HepG2 で 3 つ (pH10、pH19 および pH22)、マウスで 2 つ (pM5 および pM11) のクローンが gp180 の全コーディング領域を含んでいた (図 2)。

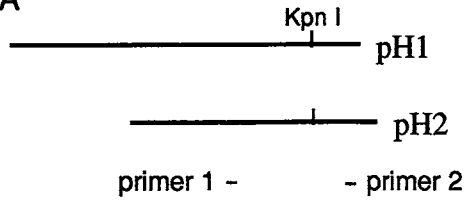
HepG2 では、今回得られた 13 個の gp180 cDNA クローンを 3' 末端の塩基配列の違いから 4 つのグループに分けることができた。マウス肝臓では、2 つのグループに分かれた。ヒト gp180 mRNA のノーザンブロット法による解析から、9、7.5、5 kb のメジャーなバンドが確認されているので (石川隆ら、私信)、gp180 mRNA には、termination site の異なる産物が混在しているものと思われる。

(A)

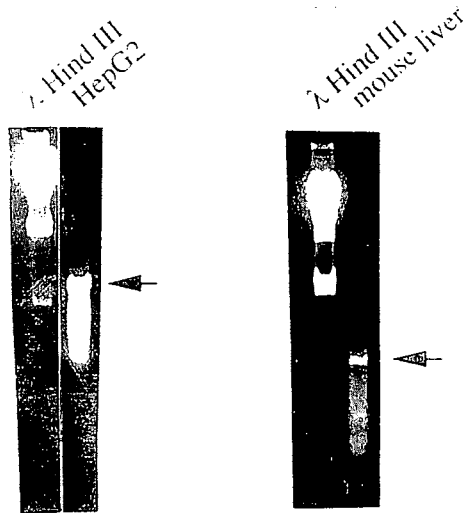
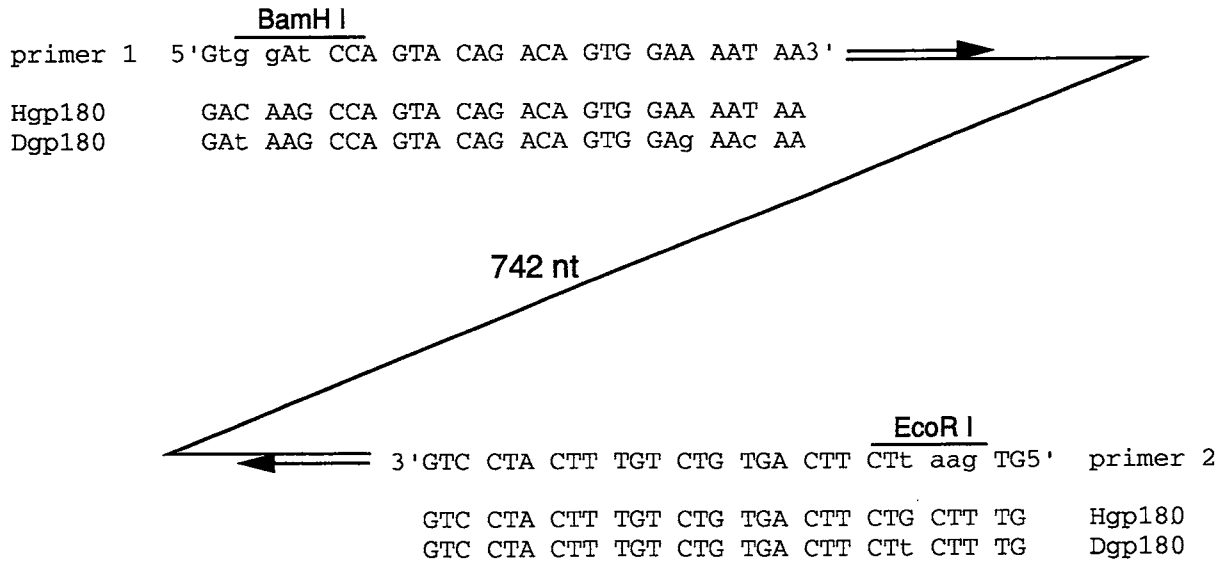
Duck gp180



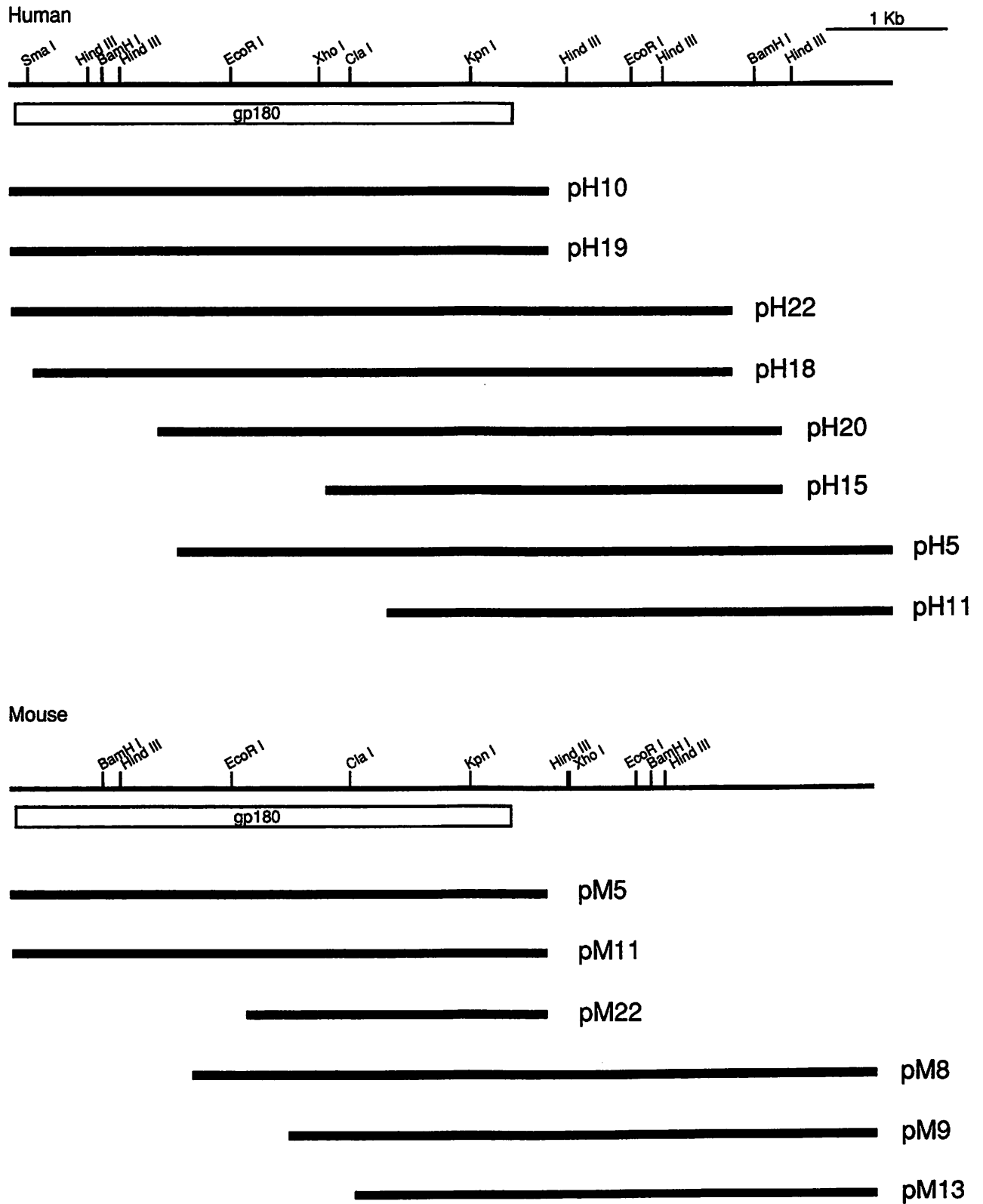
Human gp180 cDNA



(B)



(図 1) ヒトおよびマウス gp180 の検出。



(図 2) ヒトおよびマウス gp180 cDNA のクローニング。

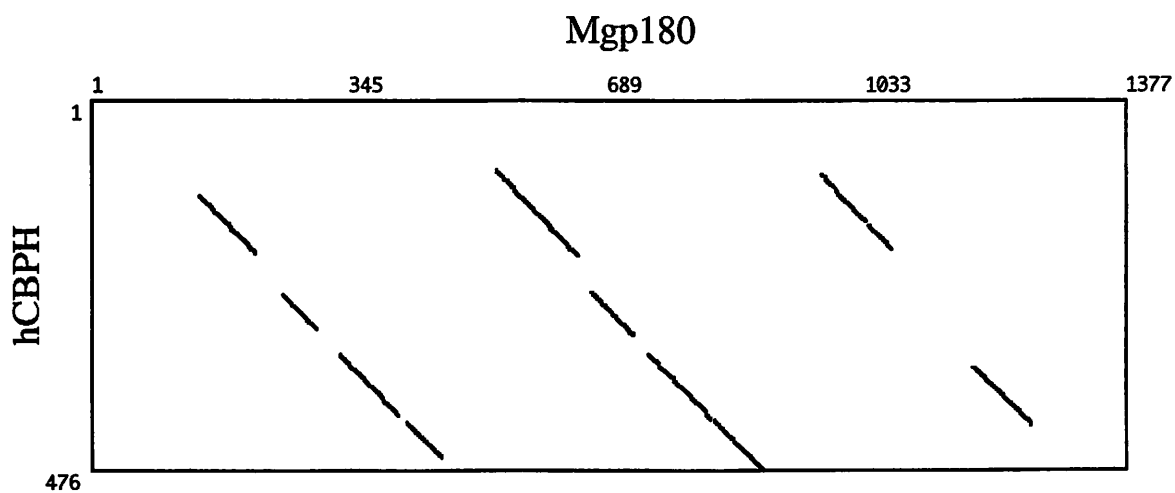
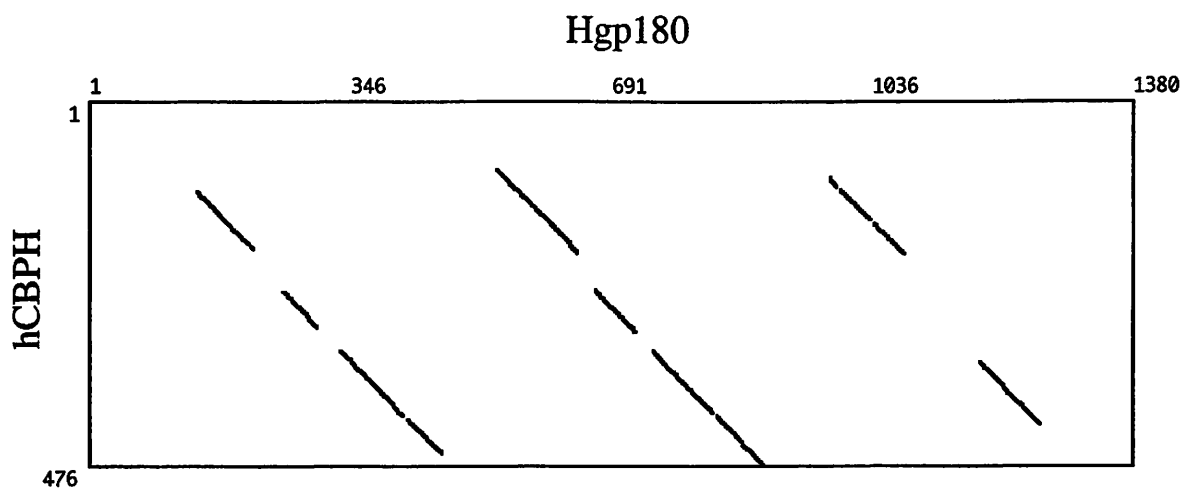
ヒトおよびマウスのカルボキシペプチダーゼgp180の全アミノ酸配列。

図3は、クローン pH10 のヒト gp180 cDNA の塩基配列および推定されるアミノ酸配列を示している。この cDNA は 4,330 塩基からなっており、その解析の結果、ヒト gp180 は、1,380個のアミノ酸から構成されることが推定された。ヒト gp180 には、15個の potential N-linked glycosylation sites があり、予想される 1つの transmembrane 領域 (タイプ I) と 55個のアミノ酸からなる cytoplasmic domain をもつ。また、その N 末端には、putative signal peptide を持ち、5' noncoding region には、stop codon (in frame) がある。DDBJ accession number は、D85390。

図4は、クローン pM5 のマウス gp180 cDNA の塩基配列および推定されるアミノ酸配列を示している。この cDNA は 4,370 塩基からなっており、その解析の結果、マウス gp180 は、1,377個のアミノ酸から構成されることが推定された。マウス gp180 には、15個の potential N-linked glycosylation sites があり、予想される 1つの transmembrane 領域 (タイプ I) と 55個のアミノ酸からなる cytoplasmic domain をもつ。また、その N 末端には、putative signal peptide を持ち、5' noncoding region には、stop codon (in frame) がある。DDBJ accession number は、D85391。

ヒトおよびマウスのgp180もカルボキシペプチダーゼドメインを3個もつ。

ダック gp180は、カルボキシペプチダーゼHのサイズの約3倍で、カルボキシペプチダーゼとホモロジーのある3個のドメインがN末端からC末端にかけて配列している。ヒトやマウスの gp180 もカルボキシペプチダーゼHのサイズの約3倍であることがわかったので、ヒトカルボキシペプチダーゼH (hCBPH) とヒトカルボキシペプチダーゼ gp180 (Hgp180) 、および hCBPH とマウスカルボキシペプチダーゼ gp180 (Mgp180) についてアミノ酸配列ホモロジー解析 (checking size は50、matching は15、DNASIS、日立ソフト) を行った。ヒトおよびマウスの gp180 は、ダック同様、カルボキシペプチダーゼドメインを3個タンデムに配列していた (図5)。



(図 5) gp180 はカルボキシペプチダーゼドメインをタンデムに 3 個もつ。

ヒト、マウスおよびダック gp180 のアミノ酸配列の比較。

カルボキシペプチダーゼ gp180 の構造と機能について理解を深めるため、ヒト、マウスおよびダック gp180 の全アミノ酸配列を比較した (図6)。

いずれの生物種においてもカルボキシペプチダーゼドメインAおよびBは、カルボキシペプチダーゼ活性に重要なアミノ酸残基が完全に保存されている。しかし、ドメインCは、ともに不完全であった。

全アミノ酸配列のホモロジーは、

ヒトとマウスで	90.9 %、	マウスとダックで	76.6 %
---------	---------	----------	--------

ドメインAのみでは、

ヒトとマウスで	87.4 %、	マウスとダックで	65.2 %
---------	---------	----------	--------

ドメインBのみでは、

ヒトとマウスで	92.6 %、	マウスとダックで	80.9 %
---------	---------	----------	--------

ドメインCのみでは、

ヒトとマウスで	91.5 %、	マウスとダックで	81.7 %
---------	---------	----------	--------

cytoplasmic 領域では、

ヒトとマウスで	100 %、	マウスとダックで	94.5 %
---------	--------	----------	--------

あった。

いずれの生物種においてもドメインAおよびBはカルボキシペプチダーゼ活性をもつが、ドメインCには活性がないと推測される。しかし、ドメインCは、ドメインA、Bと同様、生物種間でホモロジーが高いことから未知の機能を持つものと思われる。ドメインAがドメインBやCに比べてホモロジーが低いのは、N末端シグナルペプチド部分の配列が生物種により大きく異なっていることによる。他方、Cytoplasmic 領域は、非常によく保存されており、gp180 の機能と密接に関わっているものと推測される。

Human	1	MASGRDERPPWRLGRLRLLLNC-----LLLLGSSRAAAHIKKAETTTTTSAGAEAAEGQPDYRYHEELESALREAAAAGLPGLARLFSIGRSVEG	91
Mouse	1	MASGRDERPPWRLGRLRLPPPLLLLLLLRSSQAQAAHIKKAETTTTVG-GTEAAEGQPDHYHEAALGEALAAAAGPPGLARLFSIGRSVEG	96
Duck	1	MAGAARGLLMAALSLSL-----LLPELRAAHIKKAEEAAAAGGGGGVGGELR---YLHAAELGQALRDLVAEAPPGLARLFSIGRSVEG	80
Human	92	RPLWVLRITAGLGSLIPEGDAGPD-----AAGPDAAGPLLPGRPOVKLVGNMHDGDETVSRQVLIYLARELAAGYRRGDPRLVRLNTTVDVY	177
Mouse	97	RPLWVLRITAGLGPPPTA-----AAGLDAAGPLLPGRPOVKLVGNMHDGDETVSRQVLIYLARELASGYRRGDPRLVRLNTTVDVY	176
Duck	81	RPLWVLRITAGLPELPEARQDGEKKKKEEEEEEGEBGGCCALPGRPOVKLVGNMHDGDEPLARPLLLLAQELVIRGHWAGDERLGRLLNTTDLV	177
Human	178	LLPSLNPDGFERAREGDCGFGDGGPSGA---SGRNSRGRDLNRSFPDQFSTGEPPLDEVPEVRALIEWIRRNKPVLSGNLHGGSVASVYFPDSS	270
Mouse	177	LLPSLNPDGFERAREGDCGLGDGSPGPT---SGRNSRGRDLNRSFPDQFSTGEPPLDEVPEVRALIDWIIRRNKPVLSGNLHGGSVASVYFPDSS	269
Duck	178	LLPSLNPDGFERAREGDCGGGGGGGGEGGEGPGRNSRGRDLNRSFPDQFSGSAQ-PDLEPVPEVRALIAMRRRNKPLLSGNLHGGSVASVYFPDSS	273
Human	271	PEHKATGIYSKTSDEDFVRYLAKAYASNHPIKMTGEPHCPGDEDETFKDGITNGAHYDVEGGHODYNYVWANCPEITLSECKYPPASQLRQWE	367
Mouse	270	PEHKTTGLYSKTSDEDFRYLAKAYASNHPIKMTGEPHCPGDEDETFKDGITNGAHYDVEGGHODYNYVWANCPEITLSECKYPPASQLRQWE	366
Duck	274	PTHRPTGVYSKTSADDFVRYLAKAYASHPIKMTGEPHCPGEEGETFDGITNGAHYDVEGGHODYNYVWANCPEITLSECKYPPASELQQWE	370
Human	368	NNRESLITLIEKVHIGVKGFVKDSITGSGLENATISVAGIHNHNTTGRGDFYRLLVPGTYNLTAVLTGYNPLTVNIVVKEGPATEVDFSLRPTVT	464
Mouse	367	NNRESLITLIEKVHIGIKGFVKDSITGSGLENATISVAGIHNHNTTGRGDFHLLVPGTYNLTALSTGYNPLTIHNIIVKQEPATEKDFSLRPTVM	463
Duck	371	NNRESLITLIEKVHIGVKGFVRDAITGAGLENATIVVAGIAHNITAGKFGDYRLLVPGTYNLTAVVHGYPVTKENIEVKEADATVDFSLQPTVV	467
Human	465	SVIPDTEAVSTASTVAIPNI-----LSGTSSSYQIQPKDFHHHHPDMEIFLRRPANEYPNITRILYSLGKSVESRELYVMEISDNPGVHEPGE	555
Mouse	464	SVNPGSTEAVTTPGTAVVPI-----PPGTPSSHQIQPKDFHHHHPDMEIFLRRPANEYPNITRILYSLGKSVESRELYVMEISDNPGVHEPGE	554
Duck	468	APDFNLTQFATPAPPSTLTPSVAQVEPPATTSLHQAVQVDFRHHHFSDFMEIFLRRYANEYPSITRILYSLGKSVELRELYVMEISDNPGIHEAGEP	564
Human	556	EFKYIGNMHGNEVVGRELLNLIIEYLKINFGTDEPVTDLVQSTRIHIMPSPKPDGVEKSGQEGDSISVIGRNNNSNFDLNRNFPDQFVQITDPTQPET	652
Mouse	555	EFKYIGNMHGNEVVGRELLNLIIEYLKINFGTDEPVTDLVQSTRIHIMPSPKPDGVEKSGQEGDSISVIGRNNNSNFDLNRNFPDQFVPIETPTQPET	651
Duck	565	EFKYIGNMHGNEVVGRELLNLIIEYLKINFGTDEPVTDLVQSTRIHIMPSPKPDGVEKSGQEGDRGGTVGRNNNSNFDLNRNFPDQFVQVTDPTQPET	661
Human	653	IAVSMWKSYPFVLSANLHGGSLVVNYPFDDDEQGLATYSKSPDDAVFQOIALSYSKENSQHPQGRPKQNYPNEYFPHGITNGASWYVPGGQDW	749
Mouse	652	IAVSMWKAYPFVLSANLHGGSLVVNYPYDNEQGVATYSKSPDDAVFQOIALSYSKENSQHPQGRPKQNYLNEYFPHGITNGASWYVPGGQDW	748
Duck	662	IAVSMWLKTYPFVLSANLHGGSLVVNYPFDDDEQGIAYSKSPDDAVFQOIALSYSKENKHYQGSFKDLYPTEYFPHGITNGAQWYVPGGQDW	758
Human	750	NYLQTNCFEVTIELGCVKYPLEKELPNFWEQNRRLSIQFMKQVHGVRGFLDADTDRGILNATISVAEINHPTVTTYKTGDYRLLVPGTYKITASA	846
Mouse	749	NYLQTNCFEVTIELGCVKYPFENELPKYWEQNRRLSIQFMKQVHGVRGFLDADTDRGILNATLSVAEINHPTVTTYKAGDYRLLVPGTYKITASA	845
Duck	759	NYLNTNCFEVTIELGCVKYPKAEELPKYWEQNRRLSIQFIRQVHRHIGVFLDADTDRGILNATISVADINHPTVTTYKDGDYRLLVPGTYKITASA	855
Human	847	RGYNPVTKRVTVKSEGAIQVNFTLVRSSDTSNDSKGGKASSSTNDASVPTTEFETLIKDLAENGLSMLRSSLNLAALALRYHSYKDLSEFL	943
Mouse	846	RGYNPVTKRVTVRSEGAQVNFTLVRSSADANESKGRGHSSTSDTSDPTSKFEALIKHLAENGLEGFMLSSSSDLA--LYRYHSYKDLSEFL	940
Duck	856	RGYDPVTKTEVDKSGGVQVNFPL--SRTDAKVEEGKVPVNL--TPDSDPNEKEFETLIKDLAENGLERLLASSGKVSF--YRYRYPKDLSEFL	946
Human	944	RGLVWNYPHITNLTNLGQSTYRHIWSLEISNKNPNSPEEPKIRFVAGIHNAPVGTTELLLAELFLANIKNPAVTLQVDRTRIVIVPSLNPDG	1040
Mouse	941	RGLVWNYPHITNLTNLGQSVYRHIWSLEISNKNPNSPEEPKIRFVAGIHNAPVGTTELLLAELFLANIKRNPVTLQVDRTRIVIVPSLNPDG	1037
Duck	947	RGLVLYPHITNLTNLGQSVFRQIWSLEISNKNPNSPEEPKIRFVAGIHNAPVGTTELLLAELFLANIKNSAVTKLIDRTRIVIVPSLNPDG	1043
Human	1041	RERAQEKDTSKIGOTNARGKDLDTDFTNASQ-----PETKAIENLIQKQDFSLSVALDGGSLVTVYPDKPVQTVENKETLKLHLASLYANNHP	1131
Mouse	1038	RDGAQEKDTSKIGHTNAHGKDLDTDFTNASQ-----PETKAIENLIQKQDFSLSIALDGGSLVTVYPDKPVQTVENKETLKLHLASLYANNHP	1128
Duck	1044	REIAQERDTSKILGHANAHRDLDTDFTSNYSWYSGTREPETKAIENLILKQDFSLSVALDGGSLVTVYPPDKPAQTVENKETLKLHLASLYANNHP	1140
Human	1132	SHHGQGPSFNKSDENIPGVMRGAEWHSGLGSHKDYSVTYGHPEITVYTSYFPPSAAQLPALWAENKXSLLSHLVEVHKVGHGFKDKTKGPIS	1228
Mouse	1129	SHHGQGPSFNNSDENIPGVMRGAEWHSGLGSHKDYSVTYGHPEITVYTSYFPPSAAQLPALWAENKXSLLSHLVEVHKVGHGFKDKTKAGKGPIS	1225
Duck	1141	LMLHGQGPSFNKSDENIPGVIRGSEWHSGLGSHKDFSVTFGRPEITVYTSYFPPSAGQLPGLWADHRKXSLLSHLVEVHKVGHGFKDQKSGKATS	1237
Human	1229	KAVIVLNEGIVQTKEGGYFHVLLAPGVHNIADYQOQQSQQVVFVHDAASSVIVFDNRIIFGLPRELVTVSGATMSALILTAIIWIIQSI	1325
Mouse	1226	KAVIVLNEGIVQTKEGGYFHVLLAPGVHNIADYQOQQQVVFVHDAASSVIVFDNRIIFGLPRELVTVSGATMSALILTAIIWIIQSI	1322
Duck	1238	KATIVLNEGLRVYTKEGGYFHVLLAPGLHNIADYQOQHKMKVLRHDAASSVIVFDNRIIFGLPRELVTVVAGASMSALVLTAAIIWIIQSI	1334
Human	1326	KSNRHKDGFHRLRQHHDYEDEIRHMSTGSKKSLLSHEFQDETDEETLYSSKH	1380
Mouse	1323	KSNRHKDGFHRLRQHHDYEDEIRHMSTGSKKSLLSHEFQDETDEETLYSSKH	1377
Duck	1335	KSNRHKDGFPTLRQHHDYEDEIRHMSTGSKKSLLSHEFQDETDEETLYSSKH	1389

(図 6) ヒト、マウスおよびダック gp180 のアミノ酸配列の比較。

カルボキシペプチダーゼの Zn binding site は★、substrate binding site は○、catalytic site は●で示した。3個のカルボキシペプチダーゼドメインは、右端にA、BおよびCで示した。カルボキシペプチダーゼドメインA、Bには、カルボキシペプチダーゼ活性に重要なアミノ酸残基が完全に保存されている。しかし、ドメインCでは不完全であった(ドメイン間のアミノ酸配列の比較から各 site に相当する位置のアミノ酸は、★○●で示し、カルボキシペプチダーゼ活性に重要なアミノ酸残基を下段に記した)。

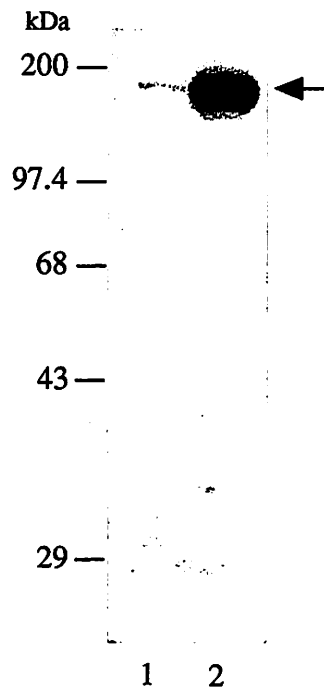
抗ヒトカルボキシペプチダーゼ gp180 モノクローナル抗体の作製。

我々は、カルボキシペプチダーゼ gp180 の細胞内局在性、プロセッシングの可能性について検討するため、抗ヒト gp180 モノクローナル抗体を作製した。

モノクローナル抗体の作製には、マウスを immunize する抗原としてヒト gp180 の transmembrane および cytoplasmic 領域を除いたカルボキシペプチダーゼ ABC ドメインに His タグを付加したりコンビナント蛋白を用いた。

これまでに、1 種のモノクローナル抗体が得られている。この抗体は、ヒト gp180 のカルボキシペプチダーゼドメインAを特異的に認識していた。

我々は、ヒト gp180 の細胞内プロセッシングの可能性について検討するため、この抗体を用いて、ヒト培養細胞株 293T 細胞のライセートのウエスタンブロット解析を行った (図7)。ヒト gp180 は、抗マウス IgG conjugated HRP/ECL 法により検出した。分子量 180 kDa の単一バンドのみが認められることから、gp180 は細胞内でプロセッシングを受けず mature form として存在するものと思われる。我々は、ヒト培養細胞株 HeLa、HepG2 細胞についても同様の結果を得た。また、カルボキシペプチダーゼ gp180 の細胞内局在性については、現在、進めている。



(図7) 抗ヒトカルボキシペプチダーゼ gp180 モノクローナル抗体によるヒト gp180 の検出。
(1) 293T細胞
(2) ヒト gp180 発現プラスミドを導入した293T細胞