

# Structure and function of the mammalian subtilisin/Kex2-like processing endoproteases, PC6 and furin

著者	中川 寅
内容記述	Thesis (Ph. D. in Agriculture)--University of Tsukuba, (B), no. 1455, 1998.10.31
発行年	1998
その他のタイトル	哺乳動物のサチライシン/Kex2様プロセシング酵素 PC6およびfurinの構造と機能
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2241/3940">http://hdl.handle.net/2241/3940</a>

氏名(本籍)	なか がわ つとむ 中 川 寅(兵庫県)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	博乙第1,455号
学位授与年月日	平成10年10月31日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	Structure and Function of the Mammalian Subtilisin/Kex2-like Processing Endoproteases, PC6 and Furin (哺乳動物のサチライシン/Kex2様プロセシング酵素PC6およびfurinの構造と機能)
主査	筑波大学教授 農学博士 村上和雄
副査	筑波大学教授 Ph.D. 多比良和誠
副査	筑波大学教授 農学博士 祥雲弘文
副査	筑波大学助教授 医学博士 中山和久

## 論文の内容の要旨

生理活性を有する多くのペプチド(ペプチドホルモン, 神経ペプチド)や蛋白質(増殖因子, 受容体, 血中プロテアーゼ, ウイルスエンベローブ糖蛋白質)は, 分子量の大きな不活性前駆体として合成され, Lys-ArgやArg-Argのような塩基性アミノ酸対部位での限定切断を経て成熟する。サチライシン様の触媒領域をもつ酵母のカルシウム依存性セリンプロテアーゼKex2は, このような限定切断を触媒するプロセシング酵素である。近年, 哺乳動物において, furin, PC2, PC1/3, PC4, PACE4の5種類のKex2様プロテアーゼがcDNAクローニングにより相次いで同定され, その構造と機能ならびに組織分布が調べられている。著者は, Kex2様プロセシング酵素に関する以下のことを明らかにした。

### (1) 新奇Kex2様プロテアーゼPC6の同定と機能発現

消化管は, 消化管ホルモンと呼ばれる多様な生理活性ペプチドを生産している。これらも他の多くのペプチドホルモンと同様に不活性前駆体として合成された後, 塩基性アミノ酸対部位での限定切断を経て成熟する。このことから, 著者は, 消化管ホルモン前駆体の限定切断にKex2様プロテアーゼが関与すると考えた。さらに著者は, 既知のKex2様プロテアーゼの組織分布や基質特異性を考え合わせた上で, 新奇なKex2様プロテアーゼが存在すると予測した。この予測に基づき, cDNAクローニングによりマウス小腸および脳から新奇Kex2様プロテアーゼ(PC6と命名)を同定し, その構造を明らかにした。また, 動物培養細胞を用いたモデル基質との共発現実験から, PC6が消化管ホルモン前駆体のプロセシング酵素として機能する可能性を示唆した。

### (2) Furinの細胞内局在化シグナルの同定

膜貫通蛋白質であるfurinは, 細胞内で主としてトランスゴルジネットワーク(TGN)に局在し, 前駆体蛋白質のArg-X-Lys/Arg-Argコンセンサス配列部位での限定切断を触媒する。細胞表面へ漏出した一部のfurinは, エンドサイトーシスにより再びTGNへとリサイクルされる。このようなfurinの細胞内局在に関して, その細胞質領域の重要性が示されている。TGN蛋白質であるTGN38やマンノース6リン酸受容体がTGNに局在する上で, Tyr残基を含む配列やSer残基を含む配列が重要な役割をもつことが知られている。著者は, furinの細胞質領域にこれらに類似した配列を見い出した。そこで, これらの部位にアミノ酸変異を導入したfurinを作製し, その役割を調べた。その結果, furinがTGNに局在する上で, このTyr残基は細胞表面からのリサイクルに, Ser残基はTGNへの保持に各々関与していることが明らかとなった。

### (3) プロセシング活性欠損細胞株 LoVo の furin の構造と機能

ヒト結腸癌細胞株 LoVo におけるプロセシング活性の欠損は、furin 遺伝子の一塩基欠失に由来する furin のフレームシフト変異によることが知られている。著者は、LoVo 細胞のもう一方の furin 対立遺伝子にもアミノ酸変異を伴う一塩基置換が存在することを明らかにし、プロセシング活性の欠損が、両 furin 対立遺伝子の変異によると結論付けた。LoVo 細胞におけるこれら furin の変異は、いずれも HomoB 領域に存在していた。HomoB 領域は触媒領域の C 末端に続く領域で、Kex2 様プロテアーゼファミリー間で高く保存されているが、機能は不明であった。著者は、これらの LoVo furin の細胞内局在と分子型の解析から、HomoB 領域が furin の自己触媒的活性化に重要であることを明らかにした。

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

サチライシン/Kex2 様プロセシング酵素に関する研究領域は、近年急速な発展を見せている。哺乳動物において、furin、PC2、PC1/3、PC4、PACE4 の 5 種類の Kex2 様プロテアーゼが相次いで固定され、その構造と機能が精力的に調べられているものの、未だ不明な点が多い。

著者は本研究で、Kex2 様プロテアーゼおよび前駆体蛋白質に関する知見を整理・検討し、新奇な Kex2 様プロテアーゼの存在を予測した。その予測に基づいて研究を遂行した結果、新奇 Kex2 様プロテアーゼ PC6 を世界に先駆けて同定することに成功している。第 6 番目になる新たな Kex2 様プロテアーゼの同定は、前駆体蛋白質の複雑なプロセシング機構、ひいては多様な生体機能の調節機構を解明する上で意義が大きい。著者はまた、furin を対象としてその細胞内局在化や、furin 自身の前駆体からの活性化に着目して研究を行い、furin の活性調節機構についての示唆に飛んだ考察を展開している。ヒト結腸癌細胞株 LoVo はプロセシング活性を欠損していることから、当研究領域でしばしば用いられる。著者は、LoVo のプロセシング活性欠損が両 furin 対立遺伝子の突然変異に起因することを明確に示しており、当細胞株の有用性に明確な根拠を与えるものとして高く評価できる。

よって、著者は博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。