

氏名	矢嶋隆一
学位(専攻分野)	博士(理学)
学位記番号	論理博第1346号
学位授与の日付	平成10年11月24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	神経ペプチド・プロセシング酵素活性の高感度測定法の開発とその応用： ラット坐骨神経内軸索輸送について

(主査)

論文調査委員 教授 大野 惇吉 教授 井上 丹 教授 伊藤 維昭

## 論文内容の要旨

本申請論文は、神経ペプチド前駆体をプロセシングする酵素の高感度な活性測定法を確立し、さらに、ラット坐骨神経におけるそれらの酵素の軸索輸送について調べその生理的意義の解明を試みたものである。神経ペプチドの前駆体蛋白質は、1) 特異的エンドペプチダーゼによる塩基性アミノ酸対部位での切断、2) Carboxypeptidase H (CPH) によるC末端塩基性アミノ酸の除去、3) さらに、C末端にアミド構造を持つ神経ペプチドでは、Peptidylglycine  $\alpha$ -amidating monooxygenase (PAM) によるC末端グリシンの酸化的開裂を伴うアミド化等の修飾を受けて生理活性ペプチドとなる。神経ペプチドはシナプス小胞に内包され軸索輸送により神経終末へ運ばれてから情報伝達物質として分泌される。しかし、ラット坐骨神経では、神経ペプチドの生合成酵素が存在し機能しているのかどうかほとんど分かっていなかった。

## 1 生理活性ペプチド・プロセシング酵素の活性測定法

①PAM活性の測定法—PAMの合成基質としてN-Dansyl-D-Tyr-Val-Gly-OHを用いる。反応生成物のN-Dansyl-D-Tyr-Val-NH<sub>2</sub>を逆相HPLCで分離し蛍光定量してPAM活性を測定する。このHPLC—蛍光法は、蛍光を検出する方法であるため高感度であり、かつ10分以内に分析することが可能なPAM活性の測定法である。N-Dansyl-D-Tyr-Val-NH<sub>2</sub>を絶対量1 pmolレベルで定量できる。②CPH活性の測定法—合成基質N-Dansyl-Gly-ArgまたはN-DansylGly-LysからCPH反応でDansyl-Glyが生成する。このDansyl-GlyをHPLCで分離しその蛍光を測定して定量する。これによりCPHの活性を評価する。本HPLC-蛍光法は、短時間(5分以内)で高感度(100fmol) Dansyl-Glyの分離定量を可能にした。③エンドペプチダーゼ活性の測定法—本研究では、塩基性アミノ酸対に特異的なエンドペプチダーゼ活性を測定するための合成基質としてBoc-Gly-Arg-Arg-MCAを用いた。酵素活性は、反応で生成する7-Amino-4-methylcoumarin (AMC) を分離することなく、その蛍光を測定することによって評価する。

## 2 PAMのラット坐骨神経内における軸索輸送

軸索の二重結紮法およびPAM活性の測定から、活性型PAMが順行性に軸索輸送されていることが明らかになった。その流速は100mm/dayであった。ラット坐骨神経におけるPAMの分子量は70kDaで至適pHの値は5.2であることが分かった。一方、活性型PAMが神経終末から細胞体へ逆行性に軸索輸送されている証拠は得られなかった。これらの結果から、ラット坐骨神経のPAMは速い軸索流によって順行性に輸送されていて、輸送途中または神経終末で生理活性神経ペプチドのプロセシング酵素として機能していると考えられる。

## 3 CPHのラット坐骨神経内における軸索輸送

ラット坐骨神経にCPHの活性が見出されたが、それは、下垂体のCPH活性に比較して1/60程度と低かった。しかし、その結果から、CPHが軸索内で主に順行性に輸送されていることが明らかになった。CPHの軸索流速はPAMのそれ(100mm/day)とほぼ同じであることが分かった。一方、CPHの逆行性輸送を示唆するCPH活性のわずかな蓄積が終末側結紮部位に見られた。ラット坐骨神経におけるCPHの分子量は約50kDaで至適pHは5.5である。これらの結果は、ラット坐

骨神経において、活性型CPHが速い順行性軸索流によって輸送されていること、そして軸索輸送中に神経ペプチド前駆体のプロセッシングに関与していることを示唆している。

#### 4 エンドペプチダーゼのラット坐骨神経内における軸索輸送

ラット坐骨神経に神経ペプチドの前駆体を塩基性アミノ酸対で切断するエンドペプチダーゼが存在し機能している可能性がある。Boc-Gly-Arg-Arg-MCAを加水分解するエンドペプチダーゼの軸索輸送について検討したところ、Boc-Gly-Arg-Arg-MCA加水分解活性を示す酵素が軸索内を順行性および逆行性の両方向に輸送されていることがわかった。その中には、Boc-Gly-Arg-Arg-MCAを加水分解する活性を示す酵素が少なくとも3種類は存在した。それらの主体をなす酵素の分子量は約25kDaであり、他の酵素の分子量は70kDa以上であった。分子量25kDaの酵素は、Kex2ファミリーのセリンプロテアーゼとは異なる。この酵素はチオールプロテアーゼである可能性がある。これらの結果から、Boc-Gly-Arg-Arg-MCA加水分解酵素の活性にはラット坐骨神経に特異的なプロセッシング酵素が部分的に関与していて、それが軸索輸送されている可能性が示唆された。

以上、本申請論文では、本研究で確立した高感度な酵素活性の測定法により、ラット坐骨神経において生理活性ペプチドをプロセッシングする酵素のPAM、CPHそしておそらく塩基性アミノ酸対を限定切断するプロテアーゼが軸索輸送されていることが初めて明らかとなり、これらのプロセッシング酵素がラット坐骨神経内で神経ペプチドの成熟に関与している可能性が示される。

### 論文審査の結果の要旨

神経細胞における情報伝達物質としての神経ペプチドは、その前駆体蛋白質が、塩基性アミノ酸対に特異的なエンドペプチダーゼによる限定切断を受けた後、Carboxypeptidase H (CPH) によるC末端塩基性アミノ酸の除去、さらに、C末端にアミド構造を持つ神経ペプチドでは、Peptidylglycine  $\alpha$ -amidating monooxygenase (PAM) によるC末端グリシンの酸化開裂を伴うアミド化等の修飾を受けて生合成される。神経ペプチドはシナプス小胞に内包され軸索輸送により神経終末へ運ばれてから神経刺激に応じて分泌される。神経伝達物質としては、ペプチド系の他にアミン系、アミノ酸系が知られているが、これらの濃度は局在部位によって大きく異なっている。例えば、それら3種類の脳内における組織重量あたりの量を比較してみると、アミン系のnmolオーダー、アミノ酸系の $\mu$ molオーダーに比べてペプチド系はpmolオーダー以下であり非常に低濃度である。従って、神経細胞内の神経ペプチドを生合成するプロセッシング酵素も微量と考えられ、プロセッシング酵素の活性を評価のためには高感度の活性測定法が必要となる。本申請論文では、酵素の活性測定に蛍光検出系を応用し高感度化を達成している。特に、PAMとCPHの活性測定にはHPLC-蛍光法を確立し、合成基質からの酵素反応生成物をpmolオーダーで定量できることを示した。これにより、神経細胞における微量のプロセッシング酵素の活性評価を可能としている。PAMは、 $\text{Cu}^{2+}$ 、分子状酸素およびアスコルビン酸依存性の、ペプチジルグリシンを基質としてアミド化を触媒する酵素で反応特異性が高い。本論文では、合成基質としてN-Dansyl-D-Tyr-Val-Gly-OHを用い、酵素反応生成物のN-Dansyl-D-Tyr-Val-NH<sub>2</sub>を逆相HPLCで分離蛍光定量しPAM活性を測定している。本方法は、PAMの反応特異性および特異的基質から考えてPAM反応に競合する酵素反応は見当たらず、ほとんどすべての生体材料からのサンプルに適応できる迅速かつ簡便なPAM活性測定法と言える。本論文におけるCPH活性測定法は、合成基質としてN-Dansyl-Gly-ArgまたはN-Dansyl-Gly-Lysを用い、酵素反応で生成するDansyl-GlyをHPLCで分離し蛍光定量することを基本にしている。逆相HPLCでの分離条件が検討された結果、生成物を多量に存在する基質よりも速く溶出させることが可能となった。これによって、短時間（5分以内）で高感度（100fmol）な生成物の分離定量ができるCPH活性の測定法が開発された。本論文では、精製酵素分画に対して塩基性アミノ酸対に特異的なエンドペプチダーゼ活性を測定するために合成基質としてBoc-Gly-Arg-Arg-MCAを用い、酵素反応で生成するAMCを分離することなく、その蛍光定量から酵素活性を評価している。方法自体は基質と生成物の分離操作を必要としない簡便で高感度なエンドペプチダーゼ活性測定法である。

神経ペプチドやそのプロセッシング酵素が、in vivoで、神経伝達の機構にどのような関与しているのか、どのような生理的作用・意義を持つのか、古典的な神経伝達物質（アセチルコリンやアミン）を含む神経細胞においてどのような機能的関連があるのかなど、ほとんど分かっていない。本論文の研究対象であるラット坐骨神経は、下肢の運動・感覚神経であり、遠

心性の運動神経（単極ニューロン）と求心性の感覚神経（双極ニューロン）より構成されている。運動神経はアセチルコリンを伝達物質とし、感覚神経はサブスタンスPを伝達物質としている。さらに、本研究でラット坐骨神経にコレシストキニン（CCK）が共存し軸索輸送されていることが明らかにされた。しかし、そのCCKがどのような生理的役割を演じているのかは全く分かっていない。サブスタンスPやCCKのようなペプチドアミドがラット坐骨神経に存在することから、これらの生理活性ペプチドのプロセッシング酵素がラット坐骨神経に発現していると考えてよい。しかし、それらに関する研究報告は行われていなかった。本申請論文は、ラット坐骨神経においてこれらのプロセッシング酵素の活性が存在することを証明し、かつ活性の担体酵素が速い順行性軸索輸送を受けていることを初めて明らかにした。さらに、ラット坐骨神経のPAMとCPHの至適pHは約5.5であり、分泌顆粒（シナプス小胞）内のpHに一致していることを示した。従って、これらの酵素が小胞に内包されて軸索輸送されていること、そして、その途中で神経ペプチドを生合成している可能性を示した。

よって、本申請論文は、博士（理学）の学位論文として価値あるものと認めた。なお、平成10年9月22日、主論文に報告されている研究業績を中心とし、これに関連した研究分野についての口頭試問を行った結果、合格と認めた。