

氏 名	ろ ぎ とも ひろ 櫓 木 智 裕
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	論 農 博 第 2445 号
学位授与の日付	平 成 14 年 11 月 25 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	Physiological function of the novel human aminopeptidases belonging to oxytocinase sub-family. (オキシトシナーゼ・サブファミリーに属するヒトアミノペプチダーゼの生理機能)
論文調査委員	(主 査) 教 授 加 藤 暢 夫 教 授 清 水 昌 教 授 天 知 輝 夫

論 文 内 容 の 要 旨

胎児・胎盤系から産生されるホルモンは妊婦尿中や血中に移行してくるため、母体尿中エストリオールや母体血中胎盤性ラクトゲン等は胎児および胎盤の成育の指標として臨床応用されてきた。一方、胎盤由来の各種アミノペプチダーゼも妊婦血中に増加してくることから胎児・胎盤系機能の指標として注目されはじめている。胎盤性ロイシンアミノペプチダーゼ(P-LAP)は胎盤アミノペプチダーゼの中で妊婦血中活性が特に高く、臨床上、血中活性が正常妊娠、陣痛発来、切迫早産、および妊娠中毒症と密接に関係している可能性が示唆されている。また、P-LAPが胎児産生のペプチドホルモンを分解・不活性化することによって、子宮や胎児・胎盤血管の収縮を防ぎ、妊娠時の恒常性の維持に機能していると考えられている。

本論文は、遺伝子レベルでP-LAP cDNAのクローニングとプロモーター領域の解析を、また、CHO細胞で大量発現させた可溶性型組換えP-LAPの生理活性ペプチドに対する反応性の検討を、さらに、組換えP-LAPで作製した抗体による免疫化学的解析をそれぞれ行い、P-LAPを臨床応用に供することを目的として、本酵素の生理的役割を多角的に検討したもので、得られた結果は以下の通りである。

1) ヒト胎盤cDNAライブラリーからP-LAPタンパク質をコードする4084 bpのcDNAをクローニングした。得られた塩基配列によりP-LAPは944アミノ酸残基からなる、分子量108 kDaのタンパク質と推定された。さらに、M1 zinc metallopeptidaseファミリーの構造的特徴である、亜鉛結合モチーフ、HEXXH X₁₈E配列およびN末端側に膜貫通領域として働く疎水性に富んだ領域を有していた。P-LAPがM1 zinc metallopeptidaseとしての特徴を持つこと、およびP-LAP活性が妊婦血中に検出されることから、P-LAPは膜タンパク質としてつくられ、妊娠の進行に伴い血中に遊離することが明らかとなった。また、ノーザン解析の結果、胎盤、心臓、骨格筋にはクローニングしたcDNAに相当する3.6 kbと、それより大きな10.5 kbの2種類のmRNAが検出され、脳においては10.5 kbのmRNAのみが検出された。一方、肺、肝臓、腎臓では当該mRNAは確認されなかったことから発現は組織特異的に制御されているものと判定した。

P-LAP遺伝子プロモーター領域の解析により、転写因子AP-2とIkaroがP-LAP遺伝子プロモーター領域に結合することを確認し、その結合部位を同定した。さらに、ルシフェラーゼをレポーター遺伝子としたプロモーター活性の測定により、P-LAP遺伝子の転写にはAP-2が主な活性を担い、最大の転写活性を発揮するためにはIkaroが協調的に働くことが必要であることを示した。

2) トリプシンIIのシグナル配列と活性本体を含むP-LAPタンパク質の細胞外領域との融合タンパク質をCHO細胞で発現させ、母体の血中に遊離しているのと同じ可溶性型P-LAPタンパク質を分泌生産させ、その基質特異性を検討した。その結果、P-LAPの生理活性ペプチドの中では、vasopressinおよびoxytocinのみを分解し、calcitoninおよびendothelinは分解しないことを明らかにした。

3) 組換えP-LAPで作製した抗体により、胎盤以外の組織におけるP-LAPタンパク質の発現を免疫化学解析により検討した。P-LAPタンパク質は、脳と神経系クローン細胞であるPC12細胞では膜画分に広く存在し、その発現量は神経成長因子の存在下で著しく増大した。さらに、forskolinで刺激すると、細胞内小胞中のP-LAPタンパク質はPC12細胞の細

胞膜へ移動した。また、P-LAPはMet-enkephalinを分解したが、N末側5アミノ残基が共通な α -endorphinは分解しなかった。さらにdynorphin A (1-8)を切断したが、これとN末端の8アミノ酸残基が共通であるdynorphin A (1-17)は切断しなかった。これらの結果から、P-LAPが脳内での神経細胞の制御に重要な役割を果たしていることが明確となった。

論文審査の結果の要旨

妊婦血中に増加してくる胎盤由来の各種アミノペプチダーゼは胎児・胎盤の成育を示す新たな指標として注目されつつある。胎盤性ロイシンアミノペプチダーゼ (P-LAP) は胎盤アミノペプチダーゼの中で妊婦血中活性が特に高く、胎児産生のペプチドホルモンを分解・不活性化することによって、子宮や胎児・胎盤血管の収縮を防ぎ、妊娠時の恒常性の維持に働いていると考えられている。しかし、P-LAPが臨床応用されるには、本酵素の生理・病理的意義の詳細を明らかにする必要がある。

本論文は、P-LAPの臨床応用を目指し、P-LAP cDNAのクローニングとプロモーター領域の解析、CHO細胞で大量発現させた可溶性型組換えP-LAPの生理活性ペプチドに対する反応性の検討、さらに、組換えP-LAPで作製した抗体による免疫化学的解析を行ったもので、評価すべき点は以下の3点である。

1) ヒト胎盤cDNAライブラリーからP-LAPタンパク質をコードするcDNAをクローニングし、本酵素の一次構造を明らかにした。P-LAPは、亜鉛結合モチーフであるHEXXH X₁₈E配列とN末端側に膜貫通領域として働く疎水性に富んだ領域とを有することから、M1 zinc metalloproteinaseファミリーに属することを示した。さらに、妊婦血中に遊離する事実に基づいて、P-LAPは一旦膜タンパク質として作られ、生理的条件下で血中に遊離することを明らかにした。また、ノーザン解析および遺伝子プロモーター領域の解析により、P-LAPの発現は組織特異的に制御されており、P-LAP遺伝子の転写にはAP-2が主な活性を担い、最大の転写活性を発揮するためにはIkarsが協調的に働く必要があることを示した。

2) CHO細胞を用いて、母体血中に遊離するものと同じ可溶性型P-LAPタンパク質を分泌生産させて得た組換えP-LAPが、vasopressinおよびoxytocinを基質として利用し、calcitoninおよびendothelinを分解しないことを示した。P-LAPは従来、胎盤後血から極く微量得られるに過ぎなかったが、この組換えP-LAPの大量生産によって、本酵素の生理活性ペプチドに対する反応性の検定および本酵素に対する抗体の作製が可能になった。

3) P-LAPタンパク質は、神経細胞の膜画分に広く存在するが、その発現量および細胞内小胞から細胞表面への移行は、神経成長因子によって制御されていることを示した。さらに、神経ペプチドに対する反応性から、P-LAPが脳内で神経細胞の制御に重要な役割を果たしていることを明確にし、妊娠以外においても生理的役割を果たしていることを示した。

以上のように本論文は、ヒト由来P-LAPのタンパク質特性、触媒機能、および生理的役割を多角的に検討し、当該酵素の臨床応用への可能性を示したものであり、細胞生化学、細胞生理学、応用酵素学に貢献するところが大きい。

よって、本論文は博士(農学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成14年9月12日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士(農学)の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。