

氏名(本籍)	荒木久澄(京都府)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博士第429号
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位授与年月日	平成15年3月27日
学位論文題目	Purification, molecular cloning, and immunohistochemical localization of dipeptidyl peptidase II from the rat kidney and its identity with quiescent cell proline dipeptidase (ラット腎臓からのdipeptidyl peptidase IIの精製、クローニング、免疫組織学的局在およびquiescent cell proline dipeptidaseとの相同性について)
	審査委員 主査 教授 堀池喜八郎 副査 教授 岡田裕作 副査 教授 堀江 稔

## 論文内容要旨

### 【目的】

Dipeptidyl peptidase II (DPP II)はタンパクやペプチドのN端からXaa-AlaまたはXaa-Proのdipeptideを酸性条件下(pH4.5-6.0)で遊離するserine proteaseである。Dpp IIはライソソーム分画に限局して存在し、哺乳類の筋肉、腎臓、卵巣、脳、肺、マクロファージ、肥満細胞、血清、精漿などにも含まれることが分かっている。また、本酵素はsubstance P、casomorphin、bradykinin fragment、thyroliiberin fragmentの分解に関わっていることも報告されている。

しかし、その全アミノ酸配列、ヌクレオチド配列は不明であり、各組織のmRNA量、タンパク質発現量も不明である。申請者は、DPP IIの構造を明らかにするためにラット腎臓よりDPP IIを精製し、分子量、基質特異性、部分アミノ酸配列等の生化学的特性を検討し、さらにラットDPP IIの全長cDNAの構造決定、DPP IIの発現、組織局在を明らかにするためのNorthern blot analysis、免疫組織染色を行った。また、その諸性質を1999年に新規酵素として報告されたquiescent cell proline dipeptidase (QPP) との間の生化学的諸性質と比較検討した。

### 【方法】

ラット腎臓をホモジナイズし、その12,000×g上清をQ-Sepharose、Matrex Gel Red A、Zinc Chelate Cellulofine、Phenyl Cellulofine、Superdex 200、Resource Qに順次かけ、DPP IIを精製した。精製酵素の分子量はSDS-PAGEおよびゲル濾過法により測定した。精製酵素を用いて基質特異性、至適pH、pH安定性、至適温度、温度安定性、各種ペプチダーゼインヒビターや二価金属による酵素活性の阻害についても検討した。また、精製酵素のN末端および内部アミノ酸配列の一部を決定した。さらに、ラット腎臓cDNA libraryからhuman QPP cDNAをプローブに用いてスクリーニングし、得られたラットDPP II cDNAの塩基配列からその全一次構造を決定した。また、そのラットDPP II cDNAを用いてラット各臓器のNorthern blot analysisを行った。さらに抗ブタDPP II抗体を用いてラット各臓器における免疫組織染色を行った。

### 【結果】

- (1)ラット腎臓よりDPP IIは回収率10.5%、精製倍率131.3倍で精製された。
- (2)精製ラット腎DPP IIはSDS-PAGEで還元条件下で分子量54kDa、非還元条件下で52kDaであった。この結果はTOF-MSによる分子量54,053.8とほぼ一致した。また、native PAGEでは105kDaであり、これはLys-Ala-MNAを用いた活性染色のバンドと一致した。
- (3)精製ラット腎DPP IIは至適pH5.5を有し、pH3.5~10.0のpHに安定であり、50°C、30分の加熱に耐えた。また、Lys-Ala-MCA、Gly-Pro-MCA、Ala-Pro-AFC、Ala-Ala-βNAに活性を示し、その他の基質には活性を示さなかった。
- (4)DFP、PCMBs、Hg<sup>2+</sup>で強く阻害され、PMSF、AEBSFに中程度阻害された。
- (5)クローニングしたラットDPP II cDNAは1,720bpで、start codon、coding region 1500bp、stop

codon、poly A tailを含み、それより推定されるアミノ酸配列は、精製したラットDPP IIの部分アミノ酸配列と一致した。

(6)推定されたラットDPP IIのアミノ酸配列には6カ所のN-glycosylation siteがあり、human QPPにも見られるleucine zipper motif, serine proteaseの活性中心のconsensus配列が見られた。

(7)ラット腎DPP IIの生化学的諸性質をhuman QPPと比較検討すると同じ結果が得られた。また、ヌクレオチド79.4%、アミノ酸で78.9%の相同性があった。

(8)Northern blot analysisでは腎臓に最も発現が多く、次いで、精巣、心臓、脳、肺の順であった。

(9)免疫組織染色では、腎の遠位尿細管・集合管、子宮の円柱上皮・粘膜固有層・腺上皮、精巣のLydig細胞に強く染まった。

#### 【考察】

精製されたDPP IIは分子量54kDaのサブユニット2つから成るhomodimerであることが分かった。また、至適pH、pH安定性、温度安定性などの生化学的諸性質もDPP IIとして以前に報告されたものと矛盾していなかった。DPP IIはX-Pro, X-Alaの基質を特異的に分解した。これには、QPPの基質として使われているAla-Pro-AFCも含まれていた。

ラットDPP IIはDFPに強力に阻害され、AEBSFとPMSFにも中等度阻害された。このこととserine proteaseの活性中心のconsensus配列(G-X-S-X-G)が存在することよりDPP IIはserine proteaseであると結論づけた。しかし、cysteine proteaseの阻害剤PCMBsと $Hg^{2+}$ にも阻害を受けたことから、SH基がDPP IIの活性制御に深く関わっていることが示唆された。

新規酵素として報告されたQPPとDPP IIの諸性質が酷似していることからQPPとDPP IIはsuperfamilyもしくは同一酵素だという仮定の下にcDNA構造、アミノ酸配列を決定したが、精製したラットDPP IIの部分アミノ酸配列とhuman QPP cDNAをプローブとして単離したcDNAより推測されるアミノ酸配列は一致した。このことよりこのcDNAはラットDPP IIであることが確定した。ラットDPP IIとhuman QPPはヌクレオチドで78.9%、アミノ酸で78.9%と高相同性を示した。ラットDPP IIとマウスQPPではヌクレオチド93.5%、アミノ酸92.8%とさらに高い相同性を示した。QPPにみられるleucine zipper motif, serine proteaseの活性中心のconsensus配列、cysteineの位置もすべて一致した。生化学的諸性質の一致、一次構造の相同性、homodimerを形成することからQPPとDPP IIは同一酵素であると考えられた。

免疫組織染色では、DPP IIは各組織に広く存在することが明らかになったが、特に腎の遠位尿細管・集合管、子宮の円柱上皮・粘膜固有層・腺上皮、精巣のLydig細胞に強く染まった。Northern blot analysisでも各臓器での発現はあるが、mRNA量は腎臓に圧倒的に多く、次いで精巣に特に多かった。このことより、DPP IIは腎臓、子宮、精巣で発現が多く、特に腎臓では遠位尿細管、集合管のタンパク質やペプチド分解において重要な働きをしている可能性が示唆された。

#### 【結論】

ラット腎よりDPP IIを精製し、ラット腎cDNAライブラリーよりDPP II cDNAを単離した。生化学的諸性質とアミノ酸配列の相同性よりDPP IIはQPPと同一酵素であると結論づけた。また、Northern blot analysisと免疫組織染色よりラット腎で発現が多く、主に遠位尿細管、集合管でのタンパク質、ペプチド分解に深く関わっていることが示唆された。

## 学位論文審査の結果の要旨

Dipeptidyl Peptidase II (DPP II)はペプチドN末端のXaa-AlaやXaa-Proを認識し遊離するリソソーム酵素であり、substance P、casomorphin、bradykininやthyroliberinの断片などの分解に関与している。

本研究は、ラット腎臓のDPP IIを単一標品にまで精製し、酵素化学的性質、一次構造、その塩基配列、機能発現、組織局在を検討したものである。主要な結果として次のことが挙げられる。1) DPP IIはセリンペプチダーゼである。2) mRNA発現や免疫組織化学的解析から、腎臓の遠位尿細管や集合管で強く発現している。さらに、3) DPP IIは休止期リンパ球(T細胞)のquiescent cell proline dipeptidaseと同一である。

これらの成果はペプチダーゼの制御機構や生理活性ペプチドの分解機構の解明に寄与するところ大であり、本論文は博士(医学)の学位論文に値する。

なお、本学位授与申請者は、平成15年2月5日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められた。