



Title	ミエロペルオキシダーゼ前駆体の成熟酵素へのプロセッシング
Author(s)	許, 淑珍
Citation	大阪大学, 1988, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/36377
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

【7】

氏名・(本籍)	ほう 許	すく 淑	じん 珍
学位の種類	理	学	博 士
学位記番号	第	8 3 3 3	号
学位授与の日付	昭 和 63 年 9 月 26 日		
学位授与の要件	理学研究科生物化学専攻 学位規則第5条第1項該当		
学位論文題目	ミエロペルオキシダーゼ前駆体の成熟酵素へのプロセッシング		
論文審査委員	(主査) 教 授	畠中 寛	
	(副査) 教 授	堀尾 武一	教 授 中川 八郎 助教授 山田 道之

論 文 内 容 の 要 旨

ミエロペルオキシダーゼ (MPO) は白血球の殺菌作用に関与するヘム蛋白質である。成熟酵素は59 kDa サブユニット 2 分子と15kDa サブユニット 2 分子から構成されている。[35S] メチオニンのパルス・チェース実験によりMPOは前駆体として合成され、これが二種類のサブユニットにプロセッシングを受け成熟酵素として細胞内顆粒に蓄積することが知られている。前駆体の一部は細胞外にも分泌されている。本研究においては、MPO前駆体並びに成熟酵素の一次構造の解析により、MPOのプロセッシングを解明することを目的とした。

HL-60細胞のcDNAライブラリーを作成し、これを合成プローブを用いスクリーニングし、cDNA クローンを単離した。得られたcDNAはMPO 59kDa サブユニットのC末端の158アミノ酸残基をコードする部分鎖cDNAであった。このcDNAとHL-60細胞のpoly(A)⁺RNAとのハイブリダイゼーションによって選択したmRNAをin vitroで翻訳させると、主な翻訳生成物は74kDa MPOポリペプチドであり、抗-59kDa サブユニット抗体、抗-15kDa サブユニット抗体のいずれとも特異的に反応した。これらの結果から、MPO前駆体上で、前駆体のN末端側から15kDa サブユニット、59kDa サブユニットの順序で、サブユニットが配列していることが判明した。

一方、細胞外に分泌されている前駆体の部分精製を行ったところ、標品に酵素活性が存在することが解った。そこで、細胞外に分泌されるMPOを精製し、その性質を明らかにした。酵素はHL-60細胞培養上清から硫酸分画、CM-セファロースカラム、モノクローナル抗体カラムのクロマトグラフィーにより単一蛋白質に精製した。標品は、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動で単一バンドを示し、約84kDaであった。ショ糖密度勾配遠心法で求めた分子量は約7万9千であった。N末端のアミノ酸配

列は, Ser-Ser-Gly-X-Ala-Tyr-Gln-Asp-Val-Gly-Val-Thr-X-Pro-Gluであった。酸化型, 還元型酵素の可視部吸収スペクトルは細胞内酵素のそれと同じであった。cDNAの塩基配列からMPOのアミノ酸配列が推定されている。これを参照すると, 細胞外酵素は591アミノ酸残基で構成されていることが明らかとなった。15kDa, 59kDa サブユニットのN末端のアミノ酸配列の決定により, 15kDa, 59kDa サブユニットはそれぞれ108アミノ酸残基, 466アミノ酸残基を含むことが判明した。以上の研究成果から, 細胞外酵素である前駆体の11-118残基に15kDaのサブユニットが, 125-590残基に59kDa サブユニットが存在することが明らかになった。

論文の審査結果の要旨

ミエロペルオキシダーゼ (以下MPO) は前駆体として合成され, これがプロセッシングをうけ15kDa, 59kDaのサブユニットとなり, 成熟酵素として細胞内の顆粒に蓄積される。前駆体の一部は細胞外にも分泌される。許君は, 本論文において, MPO前駆体ならびに成熟酵素の一次構造の解析からMPO前駆体における二種類のサブユニットの配列位置を明らかにした。

HL-60細胞のcDNAライブラリーからMPO cDNAをクローニングし, その塩基配列を決定した。得られたcDNAは59kDa サブユニットのC末端158アミノ酸残基をコードする部分鎖cDNAであった。このcDNAを用いてmRNAを分離し, それをin vitroで翻訳させ, 合成させたMPOポリペプチドは二つのサブユニットを含んでいた。これらの結果は, MPO前駆体のN末端側から15kDa, 59kDa サブユニットの順にサブユニットが配列していることを示している。

一方, HL-60細胞培養上清から細胞外MPOを単一蛋白質として精製した。SDS-ポリアクリルアミド電気泳動により, 約84kDaに相当する一本のバンドが得られ, これは細胞外に分泌されている前駆体と同じ大きさであった。蔗糖密度勾配遠心法で求めた酵素の分子量は約8万であった。従って, 細胞外MPOは1分子の前駆体様ポリペプチドから出来ていることが判明した。細胞外酵素ならびに細胞内酵素のサブユニットのN末端アミノ酸配列を決定した。これらのアミノ酸配列を, cDNAから推定されるアミノ酸配列とを参照すると, 細胞外酵素は591アミノ酸残基, 成熟酵素の15kDa, 59kDa サブユニットはそれぞれ108アミノ酸残基, 466アミノ酸残基で構成されていることが明らかになった。

以上の研究成果は, MPO前駆体上の二種類のサブユニットの位置を同定し, プロセッシングにより切断, 除去される部位を明確にしたものであり今後のMPOプロセッシング機構の研究に重要な知見を提供する。以上の理由に基き, 本論文は理学博士の学位論文として十分価値あるものと認める。