



Title	Elucidation of amidating reaction mechanism by frog amid-ating enzyme, peptidylglycine $\alpha$ -hydroxylating monooxyge-nase, expressed in insect cell culture
Author(s)	鈴木, 健二
Citation	大阪大学, 1991, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/37345">https://hdl.handle.net/11094/37345</a>
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、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について <a href="#">ご参照ください</a> 。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏名・(本籍)	鈴 木 健 二
学 位 の 種 類	医 学 博 士
学 位 記 番 号	第 9 5 9 4 号
学位授与の日付	平成 3 年 3 月 14 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当
学位論文題目	Elucidation of amidating reaction mechanism by frog amidating enzyme, peptidylglycine $\alpha$ -hydroxylating monooxygenase, expressed in insect cell culture (バキュロウイルス-昆虫細胞系を用いて発現させたカエルアミド化酵素の反応機構解析)
論文審査委員	(主査) 教 授 谷口 直之 (副査) 教 授 吉川 寛 教 授 田川 邦夫

## 論 文 内 容 の 要 旨

### (目 的)

既知のペプチドホルモンの約半数はC末端がアミド化されており、多くの場合この構造がホルモンの作用にとって必須であることが知られている。このアミド化ペプチドはC末端にグリシン残基が付加された前駆体ペプチドからペプチドC末端アミド化酵素(PAM)の触媒作用によって生成されと考えられている。本酵素はその重要性にもかかわらず、種々の臓器における含量が非常にわずかででありまた精製が困難であったため、その性質や詳細な反応機構の解明は遅れている。Xenopus laevis皮膚のPAM(AE-I)をバキュロウイルス-昆虫細胞系を用いて高率に発現させ、その精製酵素を用いて反応機構を検討した。

### (方法ならびに結果)

Xenopus laevis皮膚のpoly(A)<sup>+</sup>RNAより岡山-Berg法によりcDNAライブラリーを作成し、AE-Iの103番ヒスチジンから112番イソロイシンに対応するオリゴヌクレオチド(CATCACATGCTTCTATTTGGATGCAATAT)をプローブとしてスクリーニングし、AE-IのcDNAクローンを得た。これをバキュロウイルスのトランスファーベクターpAcYM1に組み込み、ウイルスDNAとSf細胞に共感染させた。Sf細胞内で相同組み換えにより作られた組み換えウイルスをプラーク法によりスクリーニングし、以下の実験に用いた。

組み換えウイルスを感染させたSf細胞とその培養上清のPAM活性を測定すると、90%以上が培養液中に分泌されていた。これはカエルAE-Iの分泌シグナルが昆虫細胞においても同様に機能していることを示している。発現の時間経過をとると培養上清の総PAM活性は感染後2日目から増加し5日

目で最大となった。一方比活性は感染後3日目が最大で、カエル皮膚粗抽出物の50-100倍であった。

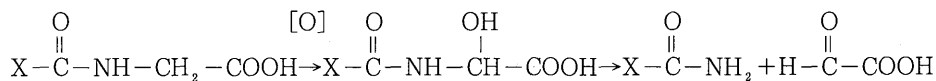
組み換えアミド化酵素(rPAM)をウイルス感染後3日目の昆虫細胞培養上清から、S Sepharose 及び Mono Qの2種類のカラムクロマトグラフィーによりSDS-PAGE上で単一なバンドにまで精製した。SDS-PAGE及びゲルろ過法により決定された精製酵素の分子量(43kd)は、カエル皮膚AE-Iの分子量(39kd)と一致しなかった。カエル皮膚AE-Iは22アミノ酸残基からなるシグナルペプチドの切断に続いてN末16残基及びC末19残基のプロペプチドプロセッシングを経て生成することが知られているが、精製rPAMのN末端アミノ酸配列を解析したところ、カエル皮膚AE-Iの23番目フェニルアラニン以下25アミノ酸と完全に一致した。分子量の違い(4kd)は、このプロペプチドプロセッシングの有無に起因するものと思われる。

PAMを精製するにあたって、従来のJonesらの活性測定法を用いると陽イオン交換カラムクロマトグラフィーにおける活性の回収率は非常に低くまた活性溶出パターンは43kd蛋白の位置と一致しなかった。そこで酵素反応停止後に生成物をアルカリ処理したところPAM活性は鋭いピークとして溶出され、43kdの蛋白のピークとも一致した。このことからアミド化反応は2段階反応で、PAM(AE-I)の生成物がBradburyらが提唱したようにアミド化ペプチドではなく水酸化体ではないかと考え、酵素反応生成物の構造解析を試みた。ヒトカルシトニン(h-CT)のC末側部分ペプチド(Ala-Ile-Gly-Val-Gly-Ala-Pro-Gly)を合成しこれを基質として反応生成物をHPLCにて単離した。生成物のアミノ酸配列はC末端のグリシンを除いて完全に一致し、このC末端グリシンが何等かの修飾を受けていることが示唆された。FAB-MASS分析から生成物の分子量は656と決定されたが、この値は基質の分子量640に比べて16大きく、また<sup>1</sup>H-NMR解析からも水酸化グリシンの存在が示唆された。以上、PAM反応によりC末グリシン化ペプチドが水酸化されることが明かとなった。

rPAMを用いてh-CTの生成を試みた。組み換えウイルスを感染させた細胞培養上清はh-CT前駆体からh-CTへの変換を触媒したが、精製rPAMではh-CTは生成しなかった。このことからアミド化反応にはPAMに加えて第二段階を触媒する酵素が関与していること、さらにこの新しい酵素は昆虫細胞培養液中に存在することが示された。

#### (総括)

カエルアミド化酵素(AE-I)は、



のような二段階反応の最初の反応のみを触媒すること、二番目の反応を触媒する酵素が昆虫細胞培養液中に存在することが明かとなり、これらふたつの酵素を用いてh-CT前駆体をアミド化することに成功した。

## 論文審査の結果の要旨

本論文は生理活性ペプチド（ホルモンや神経伝達物質）の生合成において重要な役割を演じているペプチドC末端アミド化酵素の反応機構解明に関するものである。本酵素は生体内含量が非常に僅かであったため、その重要性が指摘されていたにもかかわらずその酵素的実態は十分明らかにされていなかった。本論文では、遺伝子工学的手法を用いてcDNAより酵素を高率に発現しその酵素学的検討を行った。その結果、本酵素が触媒する反応は従来より信じられてきたペプチドC末端アミド化反応ではなくグリシン残基の水酸化反応であること、更にこの水酸化反応の生成物（ヒドロキシグリシン化ペプチド）は新たな別の酵素によってアミドとグリオキシル酸へと解裂することが明かとなった。即ちアミド化ペプチドは二種類の酵素による二段階反応を経て生じることが明らかにされた。

本論文は生化学的な問題を遺伝子工学的手法により解決し生理活性ペプチドの生合成過程に新たな知見を与えるものであり、医学博士の学位を授与するに値するものと考えられる。