

論文内容の要旨

申請者氏名 Murwantoko

マウス HtrA1 は、微生物から植物、動物まで広範な生物において高度に保存されている HtrA セリンプロテアーゼファミリーに属する蛋白質である。このファミリーを特色付ける構造は、トリプシン様のプロテアーゼドメインとその C-末側に蛋白質相互作用に関する PDZ ドメインを持つことであり、PDZ ドメインは、プロテアーゼ活性の調節や特異的基質の認識に関っていると考えられている。微生物の HtrA はペリプラズムに存在し、熱により変性した蛋白質を、その露出した C-末端の数アミノ酸残基を PDZ ドメインが認識して結合し切断する。同時に、この結合により蛋白質分解能が活性化されて細胞膜の RseA 蛋白質を切断することで σE 因子を介して一群のストレス応答遺伝子を発現させる。一方、哺乳動物の HtrA1 は細胞膜外に分泌される蛋白質である。この遺伝子の機能については不明な点が多い。この論文では、マウスの HtrA1 の PDZ ドメインに結合する因子を探索し、これらの因子の結合の様式と蛋白質分解活性へ及ぼす効果を検討している。

まず、申請者は酵母の Two-hybrid Assay により、マウスの脳と胎生 17 日目の胎児の cDNA ライブラリーから、HtrA1 の PDZ ドメインに結合する蛋白質の遺伝子を 11 種単離した。このうち最も高頻度に単離されたのがタイプ I, II, III の繊維形成性コラーゲンの C-末プロペプチド (C-Pro) であった。HtrA1 PDZ ドメインは、C-Pro の C-末 4 アミノ酸を認識していた。単離されたほかの全ての蛋白質も C-末の 4 アミノ酸が PDZ との結合に必須であった。C-末の配列を総合して、HtrA1 の PDZ が認識するコンセンサス配列は、 $\Phi-X-\Phi-[V/L/F/A]-COOH$ であると推定された。次に、固相結合測定法により、固定化された各種 PDZ 結合蛋白質への HtrA1 PDZ の結合を確認するとともに、Kd 値を測定した。さらに、酵素学的な解析のため、大腸菌を用いて活性を保持した N-末欠損型の HtrA1 (ΔN -HtrA1) 調製し、 ΔN -HtrA1 が C-pro を分解すること、また有効に基質として認識されるためには、PDZ ドメインが C-Pro の C-末端 4 アミノ酸へ結合することが必要であることを明らかにした。

次に、PDZ への結合が HtrA1 の蛋白質分解活性に及ぼす効果を検討するため、コンセンサス配列を基に種々の PDZ 結合オリゴペプチドを合成し、表面プラスモン共鳴法を用いて結合定数を測定するとともに、プロテアーゼ活性への効果を検討した。その結果、ペプチドの PDZ への結合は、結合の親和性に相関して HtrA1 のプロテアーゼ活性を上昇させることを明らかにした。

以上の結果から、申請者は、コラーゲンの C-pro が HtrA1PDZ の生理的な結合蛋白質の候補であること、PDZ への結合は、蛋白質分解活性の促進と基質の認識の両方の機構により、HtrA1 の酵素活性を制御することを明らかにした。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 Murwantoko

マウスは4種の HtrA 遺伝子を保有している。このうち、HtrA2 はミトコンドリアに局在し、移入蛋白質の品質管理を行うことによりミトコンドリアの機能維持に必須な役割を果たし、その遺伝子の変異により神経筋変性疾患を引き起こすことが知られている。HtrA1 は細胞膜外へ分泌される蛋白質であり、がん細胞の悪性化に際し発現が低下するガン抑制遺伝子の候補であり、また変形性関節炎で発現が上昇する遺伝子としても単離されている。HtrA1 が蛋白質分解活性に依存して TGF- β シグナルを抑制することがこれらの作用の本質ではないかと提唱されている。HtrA1 の作用機序を解明するためには、HtrA1 の活性である蛋白質分解の基質特異性と活性制御機構を明らかにすることが必要である。申請者は、多くの HtrA が PDZ ドメインにより基質を認識すること、また、PDZ ドメインに結合する蛋白質によりその活性が制御されることに鑑み、PDZ ドメインに結合する蛋白質を酵母の Two-Hybrid assay により単離した。その結果、細胞外基質の主成分である3種のコラーゲンの C-末プロペプチド (C-Pro) を単離した。C-Pro は、コラーゲンの3量体の形成開始を指示し調節するとともに、細胞の分泌経路内での沈殿を防いで分泌を促進し、また、細胞外で繊維形成部分から切断されてそれ自身が TGF- β と関連した種々の生理活性を持つことが知られている。申請者らは、HtrA1 の PDZ ドメインの C-Pro への結合が、C-Pro が基質として認識されることを助けるとともに、HtrA1 の蛋白質分解活性を上昇させることを証明した。また、C-Pro は、構造の類似した HtrA2 の PDZ では認識されず、HtrA1 に特異的に結合することを証明し、C-Pro が HtrA1 の生理的な結合因子であり、蛋白質分解活性化因子であり同時に基質として機能している可能性を提唱している。

HtrA1 はガンの転移や関節炎など、コラーゲンをはじめとする細胞外基質の分解と合成の異常にかかわる病態に関連した遺伝子として頻りに単離されている。この蛋白質の基質と活性化因子の候補を単離したことは、この蛋白質の活性を制御することにより、これらの疾患を克服する糸口を得たことになる。

以上のように、本論文は HtrA1 の酵素学的性質を解明しその生理機能を理解するための重要な知見を得たもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士 (バイオサイエンス) の学位論文として価値あるものと認めた。