

ラット脳からのピューロマイシン感受性アミノペプチダーゼの単離・精製と諸性質の検討

○山本 好男¹⁾、大久保 岩男²⁾、西 克治¹⁾ (¹⁾ 滋賀医大・法医学、²⁾ 同・生化学第二)

【目的】ピューロマイシン感受性アミノペプチダーゼ(PSA)は、種々の哺乳類の肝臓、腎臓、肺や胎盤等に存在する蛋白分解酵素の一つであり、enkephalin や Met-Lys-bradykinin などの生理活性物質の N 末端の Ala や Met 等のアミノ酸を一残基遊離することによって、これらの生理活性物質を不活化することが知られている。また、PSA は細胞質や細胞分裂時の核、分裂時の微小管に局在すること、PSA による細胞周期を制御するタンパク質やペプチドの分解が阻害された結果アポトーシスが起ること、PSA の欠損が無痛症や性行動・生殖機能の形成あるいは維持に異常をきたすことなどが報告されている。

今回、私共は、細胞質加水分解酵素の存在意義を明らかにする目的で、PSA をラット脳から精製し、精製酵素の物理化学的諸性質を検討したので報告する。

【材料および方法】ラット脳をワーリングブレンダーでホモジナイズし、105,000×g にて遠心し、上清を得た。次いで、硫安分画 (40-70% 飽和)、Q-Sepharose、MatrexRed A、Superdex 200、Hydroxy apatite などのカラムを用いて、PSA を単離・精製した。得られた精製酵素について、基質特異性、インヒビター、金属イオンの影響、N 末端のアミノ酸配列などを含む生化学的諸性質の検討を行った。さらに cDNA 構造解析結果を比較検討した。

【結果および考察】ラット脳より精製された PSA の分子量はゲル濾過法で約 100,000、PAGE および SDS-PAGE 上で分子量約 98,000 の単一バンドを示し、native な状態での本酵素は単量体であると考えられた。また、基質特異性や本酵素活性が 1,10-phenanthroline, PCMBs, AEBSF, DFP, amastatin, puromycin などのインヒビターで強く阻害を受け、さらには Zn^{2+} , Cd^{2+} , Hg^{2+} などの金属イオンで阻害されたことから、本酵素は metalloenzyme と serine protease の両方の性質を有することが明らかになった。

N 末端のアミノ酸配列は、マウスやヒトにおいて cDNA 解析により決定されている PSA との間に高い相同性が示され、僅かにマウス PSA とは第 12 番目が、ヒト PSA とは第 11 および 12 番目のアミノ酸残基に違いがみられた。さらに、活性中心のアミノ酸配列は HEXXH(-18 残基)H であり、アミノ酸配列上に、核移行シグナルが一カ所ともう一カ所なりうる配列があり、微小管結合部位が二カ所、cAMP/cGMP 依存性キナーゼによってリン酸化される可能性のある部位が一カ所、カゼインキナーゼによってリン酸化される可能性のある部位が 8 箇所存在することが明らかになった。