

学位論文題名

# Studies on the Physiological Roles of Prolyl Oligopeptidase in Mammals

(プロリルオリゴペプチダーゼの生理機能に関する研究)

## 学位論文内容の要旨

プロリルオリゴペプチダーゼ(POP)は細菌から哺乳類のさまざまな組織にまで広く分布する酵素で、ペプチド中の-Pro-X-結合を特異的に切断する。POPはこれまでにたくさんの組織から精製され性状解析がおこなわれてきた。また、cDNA クローニングも多く種でなされており分子生物学的解析も多数報告されている。しかしながら、その生理的機能は多くの示唆があるにもかかわらずよくわかっていない。本研究では POP の生理的機能の解明を目的として、哺乳類の卵巣、脳、精巣における発現の様子とゲノム構造の解析を行い、POP 遺伝子欠損細胞を作製した。

第1章 ラット POP cDNA クローニングと過排卵を誘導した卵巣における発現  
以前、ブタ卵巣における解析によって POP が卵胞成長初期の顆粒膜細胞に強く発現していることを示したが、この章では、性周期のより広い範囲における POP の発現の様子を調べるために、過排卵を誘導したラットの卵巣を用いて実験を行った。ライブラリーから得られたラット POP cDNA クローンは他の種の POP と相同性が高く、その組み換えタンパク質の性質はこれまでに報告されている POP とよく一致した。ノーザン解析とサザン解析の結果、ラット POP の組織分布は非常に広くその遺伝子はシングルコピーであると推察された。未成熟ラットに PMSG と hCG を投与して過排卵を誘導して POP の発現を調べたところ、黄体期に mRNA と活性がともに上昇することがわかった。この結果は黄体期での POP の機能を示唆している。

### 第2章 出生後のマウス脳における POP の発現と分布

ノーザンブロット解析の結果、マウス POP は脳と卵巣で発現が高いことがわかった。POP は以前から脳において学習と記憶とのかかわりが示唆されていることもあるので、第2章では脳におけるその発現の様子を調べた。生後2週から8週のマウス脳における POP mRNA の発現と活性を測定した。その結果、POP は2週齢でもっとも強く発現しており成熟するにつれて次第に発現量が減少することがわかった。*in situ hybridization* の結果、すべての週齢において海馬と小脳で特に強い発現が観察された。海馬においては CA1-CA3 領域の錐体細胞と歯状回の顆粒細胞が、小脳においてはプルキンエ細胞と顆粒細胞層が POP mRNA を発現していた。2週齢においてはこれらの他に視床と大脳皮質の神経細胞

胞が POP を発現していることがわかった。脳における POP mRNA の分布は今回初めて明らかになったもので、その機能を探るうえで有用な情報を与えたと言える。

### 第3章 マウス精巣と精子における POP の発現と分布

第3章では、雄性生殖器官における POP の役割を知るために、マウス精巣と精子における発現の様子を調べた。性的成熟が起こる2週齢から8週齢のマウスより精巣を摘出して POP mRNA の発現とその活性を測定した。その結果、活性はこの期間でほとんど変化がなかったのに対し、mRNA の発現は2週齢で最も強く、成熟するにつれて次第に減少した。*in situ hybridization* 法を用いてその分布を調べたところ、4週齢までは精細管内のすべての細胞でシグナルが検出されたが、6週齢以降では精細管ステージ I-VIII の精細胞に限定されていた。一方、精巣上体からとりだした精子の不溶性画分で POP タンパクが検出されることから、mRNA の発現がなくなってもタンパク質は働いていることが示唆された。POP の特異的阻害剤の存在下で（精子を活性化すると）精子運動の低下がみられることから、精子運動とのかかわりが示唆された。

### 第4章 マウス POP 遺伝子の構造解析

第4章では POP 遺伝子欠損細胞作製に不可欠なゲノム構造の解析を行った。ライブラリーのスクリーニングと LA-PCR より明らかとなったマウス POP 遺伝子は全長約 92kb で 15 個のエクソンより成っていた。エクソン 1-3 と 10-15 は POP の触媒ドメインをコードしており、3-10 はプロペラドメインをコードしていた。同じファミリーに属する DPP IV とは遺伝子構造上あまり類似点はなかった。FISH 法とゲノミックサザンブロット解析の結果、POP はマウスの第 10 染色体の B2-B3 バンド上に位置するシングルコピーの遺伝子であることがわかった。プロモーター領域は GC に富んだ領域を有しており TATA box や CAAT box が無いというハウスキープ遺伝子にみられる構造をしていた。プロモーター領域を段階的に欠失させてリポーター遺伝子につなぎその活性の変化を調べた結果、プロモーター活性に重要なのは翻訳開始点から約 130 塩基にわたる部分であることがわかった。

### 第5章 POP 欠損 ES 細胞の作製

前章で明らかにしたゲノム構造をもとにエクソン 13-15 をネオマイシンあるいはピューロマイシン耐性遺伝子に置換するターゲティングベクターを作製した。エクソン 13-15 には POP の活性中心を形成する 3 つのアミノ酸がすべて含まれている。トランスフェクションと薬剤による選択の結果、ヘテロの欠損クローンが 2 つ、ホモの欠損クローンが 1 つ得られた。このホモの欠損クローンでは POP 活性、POP mRNA の発現がともに失われていた。これによって、細胞レベルおよび個体レベルで POP 遺伝子の機能を解析する基盤が確立された。

以上、本研究によってこれまでの研究で欠落していた生殖器官および脳における POP の役割に関する新しい知見がもたらされたばかりでなく、ノックアウトマウス作製による POP 遺伝子の機能解析への道筋が整えられた。よって、本研究の成果は POP の生理機能解明に大きく貢献するものと考えられる。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 高 橋 孝 行

副 査 教 授 鈴 木 範 男

副 査 教 授 山 下 正 兼

学 位 論 文 題 名

## Studies on the Physiological Roles of Prolyl Oligopeptidase in Mammals

(プロリルオリゴペプチダーゼの生理機能に関する研究)

プロリルオリゴペプチダーゼ (POP) は細菌から哺乳類のさまざまな組織にまで広く分布する酵素で、ペプチド中の-Pro-X-結合を特異的に切断する。POPはこれまでにたくさんの組織から精製され、性状解析が行われてきた。また、cDNAクローニングも多くの種でなされており分子生物学的解析も多数報告されている。しかし、その生理的機能は今なお不明である。

先ず初めに、ラット卵巣のcDNAライブラリーからPOP cDNAをクローン化し、その構造を決定した。ラットPOPのアミノ酸配列は他の種のPOPと相同性が高く、その組み換えタンパク質の性質はこれまでに報告されているPOPと類似していることを示した。ノーザン解析とサザン解析の結果、ラットPOPの組織分布は非常に広くその遺伝子はシングルコピーであると推察された。未成熟ラットにPMSGとhCGを投与して過排卵を誘導してPOPの発現を調べ、黄体期にmRNAと活性がともに上昇することを明らかにした。この結果から、黄体期でのPOPの機能が示唆された。

次に、ノーザンブロット解析から、マウスPOPは脳と卵巣で発現が高いことを示した。そこで、生後2週から8週のマウス脳におけるPOP mRNAの発現と活性を測定したところ、POPは2週齢でもっとも強く発現しており成熟するにつれて次第に発現量が減少することが判明した。in situ hybridization 解析によって、すべての週齢において海馬と小脳で強く発現していることが明らかにされた。海馬においてはCA1-CA3領域の錐体細胞と歯状回の顆粒細胞が、小脳においてはプルキンエ細胞と顆粒細胞層がPOP mRNAを発現していた。2週齢においてはこれらの他に視床と大脳皮質の神経細胞がPOPを発現していることがわかった。脳におけるPOP mRNAの分布は、この研究によって初めて明らかにされた。

雄性生殖器官におけるPOPの役割を知るために、マウス精巣と精子における発現の様子を調べた。性的成熟が起こる2週齢から8週齢のマウスより精巣を摘出してPOP mRNAの発現とその活性を測定したところ、活性はこの期間でほとんど変化がなかったのに対し、mRNAの発現は2週齢で最も強く、成熟するにつれて次第に減少した。in situ hybridization 解析から、4週齢までは精細管内のすべての細胞でシグナルが検出されたが、6週齢以降では精細管ステージI-VIIIの精細胞に限定されていた。一方、精巣上体からとりだした精子の不溶性画分でPOPタンパクが検出されることから、mRNAの発現がなくなってもタンパク質は働いていることが示唆された。POPの特異的阻害剤の存在下で（精子を活性化すると）精子運動の低下がみられることから、精子運動とのかかわりが示された。

本論文では、さらにPOP遺伝子のゲノム構造解析を行った。マウスPOP遺伝子は全長約92kbで15個のエクソンより成り、エクソン1-3と10-15はPOPの触媒ドメインをコードしており、3-10はプロペラドメインをコードしていた。FISH法とゲノミックサザンブロット解析の結果から、POPはマウスの第10染色体のB2-B3バンド上に位置するシングルコピーの遺伝子であること、またプロモーター解析から、プロモーター活性に重要なのは翻訳開始点から約130塩基にわたる部分であることを示した。

上で明らかにしたゲノム構造をもとにエクソン13-15をネオマイシンあるいはピューロマイシン耐性遺伝子に置換するターゲッティングベクターを作製した。エクソン13-15にはPOPの活性中心を形成する3つのアミノ酸がすべて含まれている。トランスフェクションと薬剤による選択の結果、ヘテロの欠損クローンが2つ、ホモの欠損クローンが1つ得られた。このホモの欠損クローンではPOP活性、POP mRNAの発現がともに失われていた。これによって、細胞レベルおよび個体レベルでPOP遺伝子の機能を解析する基盤が確立された。

以上のように、本研究によってこれまでの研究で欠落していた生殖器官および脳におけるPOPの役割に関する新しい知見がもたらされたばかりでなく、ノックアウトマウス作製によるPOP遺伝子の機能解析への道筋が整えられた。よって、本研究の成果はPOPの生理機能解明に大きく貢献するものと期待される。これらの成果の大部分は、すでに国際的学術専門誌に公表されており、申請者の研究が世界的レベルで評価を受けていることは明らかである。

よって申請者は、北海道大学博士（理学）の学位を授与される資格あるものと認める。