

学位論文題名

Biochemical studies on the yet-uncharacterized human kallikreins, kallikrein 8 and kallikrein 14, in search of their physiological substrates.

(生理的基質の探索を目指した機能未知ヒトカリクレイン8及びカリクレイン14に関する生化学的研究)

学位論文内容の要旨

ヒトゲノムの解読が完了した現在、その発展として、個々の遺伝子によってコードされるタンパク質の機能解明研究が盛んになっている。タンパク質分解酵素に属するカリクレインファミリーは、従来は3種類のみであると考えられていたが、新たに12種類のカリクレインが同定された。これらの新規カリクレインの多くについてはタンパクレベルの解析は今後の課題であり、従って、機能解明は進んでいない。しかし、最近の遺伝子発現レベルの研究によれば、カリクレインが種々の癌のマーカーとして有用であるという知見が蓄積しつつある。

本研究は、機能が明らかになっていないカリクレインの生化学的解析を進め、生理機能と癌の進行におけるカリクレイン分子の役割を解明することを目的とした。ヒトカリクレイン8及びカリクレイン14のリコンビナントタンパク質を作製し、酵素学的特性を明らかにするとともに、生理機能を探るために種々の基質に対する作用について解析した。

第1章 ヒトカリクレイン8の生化学的解析とその細胞外マトリックスタンパク分解への関与

最近、カリクレイン8は卵巣癌の新しいマーカーになり得るという報告がなされ、医学的観点から注目を集めている。そこで、活性をもつカリクレイン8のリコンビナント酵素タンパクを、大腸菌発現系を用いて作製した。4-methylcoumaryl-7-amide (MCA) を含む種々のペプチド合成基質に対する作用を速度論的解析により調べたところ、本酵素はP1部位にアルギニンをもつペプチド結合を好んで切断する特異性を示すことが明らかになった。しかしP1部位にリジンをもつペプチド合成基質 Boc-Val-Leu-Lys-MCA も僅かに切断されたことから、アルギニン特異的という厳格な切断特性を有する酵素ではないと考えられた。本酵素は、カリクレイン8遺伝子の配列から、トリプシン様セリンプロテアーゼに分類されるタンパク分解酵素と推論された。事実、これを裏付けるように、プロテアーゼ阻害剤の Diisopropyl fluorophosphate (DFP)、アンチパイ

ン、アプロチニン、ロイペプチン、soybean trypsin inhibitor (SBTI)、ベンザミジンにより、カリクレイン8の酵素活性は強く阻害された。次に、カリクレイン8のタンパク質に対する作用を調査した。細胞外マトリックス(ECM)タンパクであるフィブロネクチン、ゼラチン及び4型コラーゲンが分解された。またフィブリノーゲンと高分子量キニノーゲンも分解された。さらに、カリクレイン8は、一本鎖の組織型プラスミノゲン・アクチベーター(tPA)を2本鎖型へと特異的に変換する活性を示した。これらの結果から、本カリクレインはECMタンパクの分解に関わる可能性が強く示唆された。特に、tPA変換活性を有することから、癌化した組織においては、tPA/プラスミン系の作動を誘起し、生じたプラスミンとともに、ECM分解を促進するものと考えられる。すでに報告があるように、癌組織でカリクレイン8が高発現することによって、癌細胞の転移を容易にすることが考えられる。

## 第2章 ヒトカリクレイン14の生化学的及び酵素学的解析

最近、カリクレイン14は乳癌及び卵巣癌の新しいマーカーとして利用できるという報告がなされ、注目を集めている。そこで、活性をもつリコンビナントカリクレイン14タンパク質を作製した。本酵素はP1部位にアルギニンをもつMCA合成基質を切断した。さらに、ヒトカリクレイン8と同様に、P1部位にリジンをもつペプチド合成基質 Boc-Val-Leu-Lys-MCAも僅かに切断された。本酵素は、プロテアーゼの阻害剤(DFP、アンチパイン、アプロチニン、ロイペプチン、SBTI、ベンザミジン)により強く阻害された。カリクレイン14は、ECMタンパクであるフィブロネクチン、ゼラチン、1型コラーゲン及び4型コラーゲンを分解した他、血漿タンパクであるフィブリノーゲンと高分子量キニノーゲンも分解した。さらに、カリクレイン14は、Insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3)を特異的に分解する活性を示した。これらの結果から、本カリクレインはECMタンパクの分解に関わる可能性が強く示唆された。カリクレイン14によるIGFBP-3分解は、IGF-1の作動を可能にして癌細胞の細胞分裂を促進すると考えられる。すでに報告があるように、癌組織でカリクレイン14が高発現することが知られており、本酵素が癌の進行に関わっている可能性が考えられる。

以上、本研究によって、ヒトカリクレイン8及びカリクレイン14の生化学的、酵素学的特性が明らかにされた。さらに、それぞれのカリクレインの生理的基質となり得るタンパク質が明らかにされた。本研究の成果に基づき、これらのカリクレインが癌組織において高発現するというこれまでの知見と合わせて、カリクレイン8とカリクレイン14が癌細胞の分裂や浸潤・転移のプロセスを促進するという仮説を提唱した。本研究は、機能不明であったカリクレイン分子2種の正体と生理機能を明らかにするとともに、癌組織の動態との関連性を明らかにした。よって本研究は、生物科学の発展に大きく貢献するものである。

# 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 助 教 授 木 村 敦

## 学 位 論 文 題 名

Biochemical studies on the yet-uncharacterized human kallikreins, kallikrein 8 and kallikrein 14, in search of their physiological substrates.

(生理的基質の探索を目指した機能未知ヒトカリクレイン 8 及び  
カリクレイン14に関する生化学的研究)

ヒトゲノムの解読が完了した現在、その発展として、個々の遺伝子によってコードされるタンパク質の機能解明研究が盛んになっている。タンパク質分解酵素に属するカリクレインファミリーは、従来は3種類のみであると考えられていたが、新たに12種類のカリクレインが同定された。これらの新規カリクレインの多くについてはタンパクレベルの解析は今後の課題であり、従って、機能解明は進んでいない。しかし、最近の遺伝子発現レベルの研究によれば、カリクレインが種々の癌のマーカーとして有用であるという知見が蓄積しつつある。

本研究は、機能が明らかになっていないカリクレインの生化学的解析を進め、生理機能と癌の進行におけるカリクレイン分子の役割を解明することを目的とした。ヒトカリクレイン 8 及びカリクレイン 14 のリコンビナントタンパク質を作製し、酵素学的特性を明らかにするとともに、生理機能を探るために種々の基質に対する作用について解析した。

## 第 1 章 ヒトカリクレイン 8 の生化学的解析とその細胞外マトリックスタンパク分解への関与

最近、カリクレイン 8 は卵巣癌の新しいマーカーになり得るという報告がなされ、医学的観点から注目を集めている。そこで、活性をもつカリクレイン 8 のリコンビナント酵素タンパクを、大腸菌発現系を用いて作製した。4-methylcoumaryl-7-amide (MCA) を含む種々のペプチド合成基質に対する作用を速度論的解析により調べたところ、本酵素は P1 部位にアルギニンをもつペプチド結合を好んで切断する特異性を示すことが明らかになった。しかし P1 部位にリジンをもつペプチド合成基質 Boc-Val-Leu-Lys-MCA も僅かに切断されたことから、アルギニン特異的という厳格な切断特性を有する酵素ではないと考えられた。本酵素は、カリクレイン 8 遺伝子の配列から、トリプシン様セリン

プロテアーゼに分類されるタンパク分解酵素と推論された。事実、これを裏付けるように、プロテアーゼ阻害剤の Diisopropyl fluorophosphate (DFP), アンチパイン, アプロチニン, ロイペプチン, soybean trypsin inhibitor (SBTI), ベンザミジンにより、カリクレイン 8 の酵素活性は強く阻害された。次に、カリクレイン 8 のタンパク基質に対する作用を調査した。細胞外マトリックス(ECM)タンパクであるフィブロネクチン, ゼラチン及び4型コラーゲンが分解された。またフィブリノーゲンと高分子量キニノーゲンも分解された。さらに、カリクレイン 8 は、一本鎖の組織型プラスミノゲン・アクチベーター(tPA)を2本鎖型へと特異的に変換する活性を示した。これらの結果から、本カリクレインは ECM タンパクの分解に関わる可能性が強く示唆された。特に、tPA 変換活性を有することから、癌化した組織においては、tPA/プラスミン系の作動を誘起し、生じたプラスミンとともに、ECM 分解を促進するものと考えられる。すでに報告があるように、癌組織でカリクレイン 8 が高発現することによって、癌細胞の転移を容易にすることが考えられる。

## 第2章 ヒトカリクレイン 14 の生化学的及び酵素学的解析

最近、カリクレイン 14 は乳癌及び卵巣癌の新しいマーカーとして利用できるという報告がなされ、注目を集めている。そこで、活性をもつリコンビナントカリクレイン 14 タンパク質を作製した。本酵素は P1 部位にアルギニンをもつ MCA 合成基質を切断した。さらに、ヒトカリクレイン 8 と同様に、P1 部位にリジンをもつペプチド合成基質 Boc-Val-Leu-Lys-MCA も僅かに切断された。本酵素は、プロテアーゼの阻害剤 (DFP, アンチパイン, アプロチニン, ロイペプチン, SBTI, ベンザミジン) により強く阻害された。カリクレイン 14 は、ECM タンパクであるフィブロネクチン, ゼラチン, 1型コラーゲン及び4型コラーゲンを分解した他、血漿タンパクであるフィブリノーゲンと高分子量キニノーゲンも分解した。さらに、カリクレイン 14 は、Insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3)を特異的に分解する活性を示した。これらの結果から、本カリクレインは ECM タンパクの分解に関わる可能性が強く示唆された。カリクレイン 14 による IGFBP-3 分解は、IGF-1 の作動を可能にして癌細胞の細胞分裂を促進すると考えられる。すでに報告があるように、癌組織でカリクレイン 14 が高発現することが知られており、本酵素が癌の進行に関わっている可能性が考えられる。

以上、本研究によって、ヒトカリクレイン 8 及びカリクレイン 14 の生化学的、酵素学的特性が明らかにされた。さらに、それぞれのカリクレインの生理的基質となり得るタンパク質が明らかにされた。本研究の成果に基づき、これらのカリクレインが癌組織において高発現するというこれまでの知見と合わせて、カリクレイン 8 とカリクレイン 14 が癌細胞の分裂や浸潤・転移のプロセスを促進するという仮説を提唱した。本研究は、機能不明であったカリクレイン分子 2 種の正体と生理機能を明らかにするとともに、癌組織の動態との関連性をも明らかにした。よって本研究は、生物科学の発展に大きく貢献するものである。一部の成果は、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。