

ウイルスエンベロープ蛋白質および細菌毒素の前駆体のプロセッシング酵素

Processing endoproteases for precursors of viral envelope proteins and bacterial toxins

研究代表者 筑波大学生物科学系助教授 中山和久
Assoc. Prof., Institute of Biological Sciences, University of Tsukuba
Kazuhisa NAKAYAMA

Many secretory and membrane proteins are synthesized as larger, inactive precursors, which undergo limited endoproteolysis at site marked mainly by pairs of basic amino acids, such as Lys-Arg and Arg-Arg, to yield final bioactive products. We have recently found that some precursors, such as those for growth factors, blood clotting enzymes, receptors, viral envelope glycoproteins, and bacterial exotoxins, have not only the basic pair but also an Arg residue at the fourth residue upstream of the cleavage site, namely, Arg-X-Lys/Arg-Arg (RXXK/RR) consensus sequence. Lines of experimental evidence have suggested that furin, a mammalian homologue of the yeast Kex2 processing endoprotease, is involved in the cleavage at RXXK/RR sites. In this study, we have identified a cell line that has mutations of furin and thereby lacks endogenous processing activity toward RXXK/RR sites. Using this cell line, we have demonstrated that a wide variety of precursors are cleaved by furin at RXXK/RR sites.

研究目的

多くの分泌タンパク質や膜タンパク質は、細胞内で分子量の大きな不活性型前駆体として合成されたのち、細胞表面に達するまでの過程で、前駆体中の塩基性アミノ酸対 (Lys-Arg, Arg-Arg) 部位に特異的なエンドプロテアーゼ (プロセッシング酵素) による限定切断を受けることにより成熟する。また、種々の動物ウイルス (例: ヒト免疫不全ウイルス (HIV)、インフルエンザウイルス) のエンベロープ糖タンパク質も、塩基性アミノ酸対部位で宿主細胞内のプロテアーゼによる切断を受け成熟する。成熟エンベロープ糖タンパク質は宿主細胞膜上の受容体との結合に必須であり、ウイルスの感染性を規定している。さらにある種の細菌外毒素 (例: ジフテリア毒素、緑膿菌外毒素) も、細菌より1本鎖型の前駆体として分泌されたのち、宿主細胞膜上あるいは細胞内のプロテアーゼにより切断され、2本鎖型になってはじめて細胞毒性を示す。

最近我々は、種々の前駆体タンパク質の切断部位近傍のアミノ酸配列を比較することにより、配列上のある共通性を見いだした。すなわち、種々の増殖因子 (例: 神経成長因子)、血液凝固系プロテアーゼ (例: 第IX因子)、受容体 (例: インスリン受容体) ウイルスエンベロープ糖タンパク質 (例: HIV gp160)、細菌外毒素 (例: ジフテリア毒素) の前駆体は、切断部位に塩基性アミノ酸対を持つのに加えて、切断部位の上流4位 (-4位) にArg残基を持つこと、つまりArg-X-Lys/Arg-Arg (RXXK/RR) というコンセンサス配列を有することである (図1)。この共通性は、これらの多様な機能を持ったタンパク質の前駆体が、共通のプロセッシング酵素により切断され成熟する可能性を示唆する。これらの中には、AIDSの原因ウイルスであるHIVの糖タンパク質gp160も含まれることから、この切断機構を解明することは急務の課題である。また、この切断の特異的な阻害剤が見いだされれば、ウイルス感染や細菌感染の治療薬となる可能性がある。本研究では、この切断に関与するプロセッシング酵素を同定し、その性質を探ることを目的とする。

Precursor	Sequence around Cleavage Site					Precursor	Sequence around Cleavage Site													
	-6	-4	-1	▼	+1		-6	-4	-1	▼	+1									
Hormones & Growth Factors						Receptors														
Human Pro-PTHrP	G	S	L	R	R	A	V	Human Insulin Pro-receptor	F	R	P	S	R	K	R	R	S	L		
Aplysia Pro-ELH	E	S	H	S	R	R	S	V	Human IGF-1 Pro-receptor	F	R	P	E	R	K	R	R	D	V	
Porcine Pro-ET-1	W	R	P	R	R	S	K	R	C	S	Human HGF Pro-receptor	L	T	E	K	R	R	R	S	T
Human Pro-TGF β1	L	Q	S	S	R	H	R	R	A	L	Human Pro-LRP	T	T	S	M	R	H	R	Q	I
Human Pro-activin A	H	P	H	R	R	R	R	G	L	Human Pro-GPIIb	A	H	H	K	R	D	R	Q	I	
Mouse Pro-NGF	N	R	T	H	R	R	S	S	S	Mouse Pro-E-cadherin	F	G	L	R	R	Q	K	R	D	W
Porcine Pro-BDNF	N	M	S	M	R	V	R	H	S	Chicken Pro-N-cadherin	S	H	L	K	R	Q	R	D	W	
Human Pro-PDGF	E	S	L	A	R	G	R	S	L	Viral Envelope Glycoproteins										
Plasma Proteins									HIV-1 gp160	R	V	V	Q	R	E	K	R	A	V	
Human Pro-albumin				R	G	V	F	R	D	A	HTLV-1 gp46/p20	T	L	G	S	R	S	R	A	V
Human Pro-factor VII	G	V	L	H	R	R	R	A	N	Human CMV gB	L	T	H	N	R	T	R	R	S	T
Human Pro-factor IX	K	I	L	N	R	P	R	Y	N	SV5 Fo	I	P	T	R	R	R	R	F	A	
Bovine Pro-factor X	R	V	L	Q	R	A	R	A	N	Mumps Virus Fo	P	S	G	R	R	H	K	R	F	A
Human Pro-prothrombin	S	L	L	Q	R	V	R	A	N	Measles Virus Fo	A	S	S	R	R	H	K	R	F	A
Human Pro-protein C	K	K	K	S	H	L	R	D	T	NDV Fo	S	G	G	R	R	Q	R	R	F	I
Bovine Pro-protein S	Q	V	L	I	R	R	R	A	N	Avian Influenza A Virus HA0	P	S	K	K	R	Q	K	R	G	L
Human Pro-vWF	P	L	S	H	R	R	R	S	L	Bacterial Toxins										
Human Pro-C3	Q	P	A	A	R	R	S	S	V	Diphtheria Toxin	C	A	G	N	R	V	K	R	S	V
Human Pro-C4	E	K	K	T	R	R	R	N	V	Anthrax Toxin PA	S	S	N	S	R	K	R	S	T	
Human Pro-C5	K	E	I	L	R	P	R	T	L	Pseudomonas Exotoxin A	F	T	R	H	R	Q	P	R	G	W

図1 RXK/RR部位で切断されるタンパク質前駆体の切断部位近傍のアミノ酸配列の比較。

切断部位は矢じりで、塩基性アミノ酸は白ぬきで示した。

研究経過

RXKR/R配列を認識して切断するプロセシング酵素の候補として、酵母のプロセシング酵素であるKex2プロテアーゼの哺乳動物の類似体の一つfurinが考えられた。しかしfurinは、それまで調べられたすべての組織および細胞で発現しているために、本当にfurinがRXK/RR配列を持つ前駆体の切断に関与しているのかは不確かであった。しかし我々は、ヒトの結腸がん細胞株LoVoではインスリン受容体や肝細胞増殖因子(HGF)受容体が前駆体のままで合成されることに気づいた(論文1)。これらの前駆体は、本来RXK/RR部位で切断されて成熟型の受容体になることから、furinになんらかの異常がある可能性が考えられた。そこでこのLoVo細胞からfurinのcDNAを単離しその塩基配列を調べたところ、2種類の突然変異を見いだした(図2)(論文3、18)。一つは、Homo Bと呼ばれるプロテアーゼ活性に必須な領域をコードする部分に1塩基の欠失が存在し、429番目のアミノ酸からが野性型のfurinとはまったく異なってしまうタイプである(429FS変異)。もう一方は、Homo B領域の547番目のアミノ酸をコードする部分に1塩基の置換が存在し、本来存在するはずのTrp残基がArgに置き変わったタイプである(W547R変異)。これら2つの変異型furinには、RXK/RR部位での前駆体切断活性がなかったことから、これらのfurinの変異がLoVo細胞の前駆体切断活性の欠失の原因であることが確かめられた(論文3、18)。

細胞にタンパク質前駆体のcDNAや遺伝子を導入することにより、LoVo細胞ではHGF受容体(論文1)、ジフテリア毒素(論文4)、ニューカッスル病ウイルスFoタンパク質(論文8)、インフルエンザウイルスHAタンパク質(論文12)の前駆体が切断されないことから、furinは少なくともこれらの前駆体タンパク質のRXK/RR部位での切断に関与することが示唆された。しかし予想外であったのは、HIVのgp160はこの細胞内でも切断されることであった(論文8)。この切断には、furin以外のプロテアーゼの関与が考えられる。

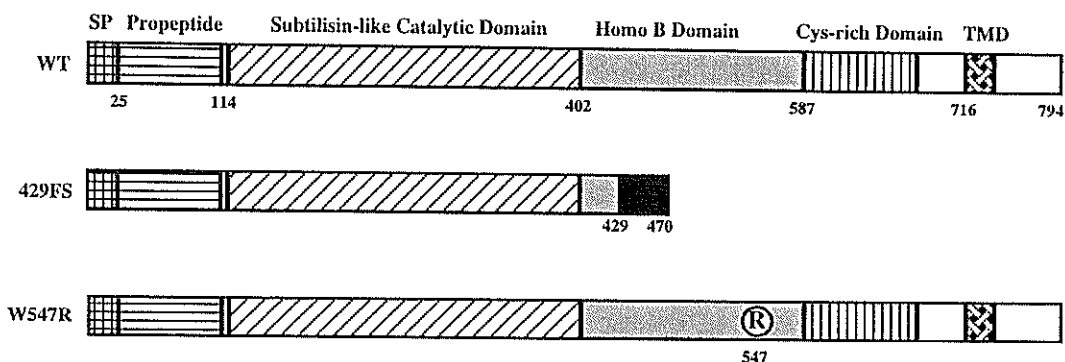


図2 野性型furinおよびLoVo細胞由来の2種類の変異体の構造の模式図。

SP, シグナルペプチド; TMD, 膜貫通領域。

研究成果

本研究でfurinの欠損細胞LoVoを発見したことにより、これまでアッセイ系のなかったfurinの細胞内での前駆体切断活性の測定が可能になった。また、furinが図1に挙げたうちのいくつかの前駆体の切断に関与することが証明された。

今後の課題と発展

furin欠損細胞LoVoを使って、今後様々な前駆体の切断にfurinが関与することが予想される。LoVo細胞にfurinの変異に関する我々の最初の報告(論文3)以来、世界中の研究者がこの細胞に注目し研究に用いはじめ、現につい最近、furinがいくつかの前駆体(TGF- β 、エンドセリン、緑膿菌外毒素、炭疽菌毒素など)の切断に関与することが証明された。我々はもう一方で、組換え型のfurinを精製しその性質を調べている。この精製したfurinとLoVoのアッセイ系を組み合わせて用いて、将来的なウイルス感染や最近感染の治療薬をめざしたfurinの阻害剤の開発も可能と考えられる。今後残された問題の1つとして、世界的に注目されるHIV gp160の切断がfurin以外のどの様なプロテアーゼで行われるかがある。

発表論文リスト

1. Komada, M., K. Hatsuzawa, S. Shibamoto, F. Ito, **K. Nakayama** and N. Kitamura (1993) Proteolytic processing of the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor by furin. *FEBS Lett.*, **328**, 25-29.
2. Yanagita, M., H. Hoshino, **K. Nakayama** and T. Takeuchi (1993) Processing of mutated proinsulin with tetrabasic cleavage sites to mature insulin reflects the expression of furin in non-endocrine cell lines. *Endocrinology*, **133**, 639-644.
3. Takahashi, S., K. Kasai, K. Hatsuzawa, N. Kitamura, Y. Misumi, Y. Ikehara, K. Murakami and **K. Nakayama** (1993) A mutation of furin causes the lack of precursor-processing activity in human colon carcinoma LoVo cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **195**, 1019-1026.

4. Tsuneoka, M., **K. Nakayama**, K. Hatsuzawa, M. Komada, N. Kitamura and E. Mekada (1993) Evidence for involvement of furin in cleavage and activation of diphtheria toxin. *J. Biol. Chem.*, **268**, 26461-26465.
5. Creemers, J.W.M., P.J.G. Kormelink, A.J.M. Roebroek, **K. Nakayama** and W.J.M. Van de Ven (1993) Proprotein processing activity and cleavage site selectivity of the Kex2-like endoprotease PACE4. *FEBS Lett.*, **336**, 65-69.
6. Brennan, S.O and **K. Nakayama** (1994) Furin has the proalbumin substrate specificity and serpin inhibitory properties of an in situ hepatic convertase. *FEBS Lett.*, **338**, 147-151.
7. 中山和久 (1994) 生理活性ペプチドおよびタンパク質前駆体のKex2様プロセッシング酵素ファミリー. 生物物理, **3**, 125-130.
8. Ohnishi, Y., T. Shioda, **K. Nakayama**, S. Iwata, B. Gotoh, M. Hamaguchi and Y. Nagai (1994) A furin-defective cell line is able to process correctly the gp160 of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.*, **68**, 4075-4079.
9. Takahashi, S., K. Hatsuzawa, T. Watanabe, K. Murakami and **K. Nakayama** (1994) Sequence requirements for endoproteolytic processing of precursor proteins by furin: transfection and in vitro experiments. *J. Biochem.*, **116**, 47-52.
10. **Nakayama, K.** (1994) Purification of recombinant, soluble forms of furin produced in Chinese hamster ovary cells. In *Methods in Enzymology, Vol. 244, Proteolytic Enzymes: Serine and Cystine Peptidases* (1994) (Barrett, A.J., ed.) Academic Press, pp. 167-175.
11. Brennan, S.O. and **K. Nakayama** (1994) Cleavage of proalbumin peptides by furin reveals unexpected restrictions at the P₂ and P'₁ sites. *FEBS Lett.*, **347**, 80-84.
12. Horimoto, T., **K. Nakayama**, S.P. Smeekens and Y. Kawaoka (1994) Both proprotein-processing endoproteases, PC6 and furin, activate hemagglutinin of virulent avian influenza viruses. *J. Virol.*, **68**, 6074-6078.
13. Hosaka, M., K. Murakami and K. Nakayama (1994) PACE4A is a ubiquitous endoprotease that has similar but not identical substrate specificity to other Kex2-like processing endoproteases. *Biomed. Res.*, **15**, 383-390.
14. 中山和久 (1995) 哺乳動物のKex2様プロセッシング酵素ファミリー. 細胞工学, **14**, 443-448.
15. Torii, S., T. Banno, T. Watanabe, Y. Ikehara, K. Murakami and **K. Nakayama** (1995) Cytotoxicity of brefeldin A correlates with its inhibitory effect on membrane binding of COP coat proteins. *J. Biol. Chem.*, **270**, 11574-11580.
16. Kasai, K., S. Takahashi, K. Murakami and **K. Nakayama** (1995) Strain-specific presence of two TGN38 isoforms and absence of TGN41 in mouse. *J. Biol. Chem.*, **270**, 14471-14476.
17. 中山和久 (1995) 生理活性ペプチドおよびタンパク質前駆体のプロセッシングに関与するKex2様エンドプロテアーゼファミリー. 生化学 **67**, 995-1009.
18. Takahashi, S., T. Nakagawa, K. Kasai, T. Banno, S.J. Duguay, W.J.M. Van de Ven, K. Murakami and **K. Nakayama** (1995) A second mutant allele of furin in the processing-incompetent cell line, LoVo. *J. Biol. Chem.*, **270**, in press.