

## 学 位 論 文 要 旨

氏名 BUI THI TO NGA

題 目 : Identification and characterization of the interactive proteins with Cytotoxic

T-lymphocyte antigen-2 $\alpha$

CTLA-2 $\alpha$  と相互作用するタンパク質の同定とその性質の研究

---

### 論文要旨 :

The papain family is the largest family among the cysteine protease class, the members of which include a wide range of enzymes from both prokaryotes and eukaryotes, encompassing bacteria, plants, vertebrates and invertebrates (Bettie, 1995). The proteinases of this family are implicated in a number of degradative, invasive and pathological processes. Therefore, cysteine proteinases of the papain family represent attractive targets for the development of therapeutic inhibitors because of their involvement in abnormal physiological processes. Cytotoxic T-lymphocyte antigen-2 $\alpha$  (CTLA-2 $\alpha$ ) is a potent inhibitor of cathepsin L-like cysteine proteases. Cysteine proteinases such as cathepsin L and cathepsin B are synthesized as inactive proenzymes. The N-terminal proregions of these proteases, which are removed during the activation process, act as potent inhibitors of mature enzymes. Since the proregion can fold independently, interest in novel inhibitor proteins from this region is increasing. The proregion is a part of the enzyme but CTLA-2 $\alpha$  is expressed independently and has been designated as a member of the I29 peptidase inhibitor family (<http://merops.sanger.ac.uk>). Recombinant CTLA-2 $\alpha$  is known to be a potent, competitive inhibitor of cathepsin L-like cysteine proteases. One of the essential amino acid residues of CTLA-2 $\alpha$  that is necessary for its inhibitory potency is cysteine 75 (C75), which is located in the vicinity of the C-terminal region and interacts with the active-site cleft of the enzyme.

Previous studies show that CTLA-2 $\beta$ , an isoform of CTLA-2 $\alpha$  was expressed in early pregnant uteri, suggesting that CTLA-2 $\beta$  is a regulator of embryo implantation. In the mouse brain,

CTLA-2 $\alpha$  mRNA was found to be preferentially localized within neuronal populations. The CTLA-2 $\alpha$  protein has also been detected in neuronal dendrites and axons suggesting that CTLA-2 $\alpha$  is involved in memory establishment in mouse brain. Studies also show that CTLA-2 $\alpha$  is involved in the formation of regional immunity in the eye. Retinal pigment epithelium-derived CTLA-2 $\alpha$  has the ability to generate T reg. In most of those studies, CTLA-2 $\alpha$  has been proposed to act as cathepsin L inhibitors on the above described physiological mechanisms. A recent study revealed that CTLA-2 $\alpha$  induced cAMP/PKA-promoted apoptosis in murine T-lymphoma cells and cardiac fibroblasts. This inducing mechanism was not related to the ability of CTLA-2 $\alpha$  to inhibit cathepsin L and indicated that CTLA-2 $\alpha$  performs various physiological functions that have yet to be identified.

Therefore, the objective of this study was to identify and characterize the proteins that interact with CTLA-2 $\alpha$ . In this study, cathepsin L, cathepsin C, and tubulointerstitial nephritis antigen-related protein 1 (TINAGL1) were identified as novel interactive proteins of CTLA-2 $\alpha$  by the yeast two-hybrid screening system. The direct interactions and co-localization of these proteins with CTLA-2 $\alpha$  were confirmed using co-immunoprecipitation and immunofluorescence staining, respectively. The disulfide-bonded CTLA-2 $\alpha$ /cathepsin L complex was isolated from mouse tissue. The cysteine residue has also been shown to bind covalently to the catalytic subunit of cathepsin L through a disulfide bond in the process of inhibition *in vitro* and *in vivo*.

CTLA-2 $\alpha$  was found to be specific and consistently expressed on the maternal side of the mouse placenta. Double immunofluorescence analysis showed that CTLA-2 $\alpha$  was co-localized with cathepsin L, cathepsin C, and TINAGL1 in placenta. A simple cell-based fluorescence assay revealed that CTLA-2 $\alpha$  exhibited inhibitory activity towards cathepsin C in live cells, which indicated that CTLA-2 $\alpha$  is a novel endogenous inhibitor of cathepsin C. The simultaneous expression of CTLA-2 $\alpha$  with its interactive proteins was also examined in different developmental stages of the placenta using fluorescence immunohistochemistry

## 学位論文審査の結果の要旨

氏名	BUI THI TO NGA
審査委員	主査：山口大学・教授・山本芳実
	副査：鳥取大学・教授・山野好章
	副査：山口大学・教授・音井威重
	副査：山口大学・教授・佐藤宏
	副査：山口大学・准教授・西垣一男
題目	Identification and characterization of the interactive proteins with Cytotoxic T-lymphocyte antigen-2 $\alpha$ (CTLA-2 $\alpha$ と相互作用するタンパク質の同定とその性質の研究)
<p>審査結果の要旨：</p> <p>CTLA-2 (Cytotoxic T-lymphocyte antigen-2)は、新規なシステインプロテアーゼ阻害タンパク質である (MEROPS peptidase data base, I29)。活性化されたマウス T 細胞にその mRNA の存在が最初に報告されたが、現在までに胎盤、脳、眼等免疫特権と見なされる組織にその特異的発現が報告されている。近年、網膜色素上皮細胞から分泌される本タンパクが制御性 T 細胞誘導活性を示す事、T リンパ球では cAMP/PKA 依存性アポトーシスを誘導する事等、その生理的役割が徐々に明らかになってきている。本タンパク質はカテプシン L (CtsL) 様酵素に選択的阻害活性を示し、現在までその生理的機能はカテプシン L 阻害活性から説明されている。一方、上記アポトーシスにはカテプシン L 阻害は関与しないと報告されている。この事実は、本タンパク質にはカテプシン L 以外のターゲットが存在する事を示唆し、その発見が待たれていた。本研究はその最初の包括的、詳細な研究である。</p> <p>第 1 章では、カテプシン L 以外のターゲットタンパク質の同定を試みた。最初に Yeast Two-Hybrid 法を用いてマウス cDNA library から CTLA-2<math>\alpha</math> と相互作用するタンパク質をスクリーニングした。その結果、カテプシン L に加えて、カテプシン C (Cts C, Dipeptidyl peptidase D) と TINAGL1 (tubulointerstitial nephritis antigen-related protein 1) を新たに見いだした。カテプシン C は、免疫系の細胞で多くのセリンプロテアーゼの活性化に関与するリソゾーム酵素として知られている。TINAGL1 は、副腎皮質帯状分布に関係して見いだされるカテプシン B 様分泌タンパク質である。申請者はさらにマウス胎盤や培養細胞を用いて、CTLA-2<math>\alpha</math>/CtsL, CTLA-2<math>\alpha</math>/CtsC, CTLA-2<math>\alpha</math>/TINAGL1 複合体の単離を行った。</p>	

第 2 章では、複合体の形成メカニズムの解析を行った。まず精製 CTLA-2 $\alpha$  と精製マウス CtsL を用いて、in vitro での複合体の形成メカニズムの解析を試みた。CTLA-2 $\alpha$  にはシステイン残基が 1 つ存在するが、これにより単量体/2 量体の平衡が存在する。複合体形成時にはこの 2 量体から生じた SH 基が酵素の活性基に存在する SH 基とジスルフィド結合を形成する事により、活性阻害を引き起こす事を明らかにした。さらに申請者は、組織中の CTLA-2 $\alpha$ /CtsL, CTLA-2 $\alpha$ /CtsC 複合体形成においても同様なメカニズムの存在する事を示した。最後に、強制発現させた培養細胞を用いて、CTLA-2 $\alpha$  はカテプシン C 阻害活性をもつ事を示した。

第 3 章では、CTLA-2 $\alpha$  とこれらのターゲットタンパクの共局在性を調べた。細胞で発現された CTLA-2 $\alpha$  は、一部は細胞外に分泌されるとともに、細胞内ではリソゾームに局在する事が示された。これは、CTLA-2 $\alpha$  が細胞の内外でリソゾーム系酵素 (CtsL, CtsC) や TINAGL1 と共局在可能である事を示す。次に CTLA-2 $\alpha$  を多く発現するマウス胎盤組織を用いて、免疫組織化学的に共局在性を調べた。CTLA-2 $\alpha$  は主として基底脱落膜 (decidua basalis) と子宮筋層腺 (metrial gland) に局在しているが、これらの領域にカテプシン L、カテプシン C、TINAGL1 も局在している事を免疫二重染色で明らかにした。これは、CTLA-2 $\alpha$  の胎盤における新規な生理活性の存在を強く示唆するものである。

以上のように、申請者の研究課題は独創性にすぐれ、その成果は、国際的にも十分に評価されている。よって、本論文は博士(獣医学)の学位を授与するにふさわしいと判断した。