

Title	クロマチンに結合して存在するアルカリ性プロテアーゼと中性プロテアーゼの精製と性質
Author(s)	萩原, 秀昭
Citation	大阪大学, 1981, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/32730">https://hdl.handle.net/11094/32730</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名・(本籍)	萩原秀皓
学位の種類	理学博士
学位記番号	第 5188 号
学位授与の日付	昭和 56 年 3 月 25 日
学位授与の要件	理学研究科 生物化学専攻 学位規則第 5 条第 1 項該当
学位論文題目	クロマチンに結合して存在するアルカリ性プロテアーゼと 中性プロテアーゼの精製と性質
論文審査委員	(主査) 教授 堀尾 武一 (副査) 教授 藤井 節郎 教授 中川 八郎 助教授 山下 仁平

### 論文内容の要旨

ラットの種々の正常組織および種々の癌組織の細胞核には、クロマチンに結合して、従来から知られている中性プロテアーゼ (至適 pH7-8) に加えて、アルカリ性プロテアーゼ (至適 pH10) が存在することを発見した。

1. 精製：両プロテアーゼは 0.5 M NaCl を含む 0.2 M  $\text{H}_2\text{PO}_4$  (pH 1.5) によって最も効率よくクロマチンから抽出される (酸抽出液)。中性プロテアーゼはヒストンを、また、アルカリ性プロテアーゼはカゼインをそれぞれよく分解する。さらに、両酵素 (等電点 11) 共に、Soybean trypsin inhibitor (STI) によって阻害される。この性質を利用して、ローダミン肉腫のクロマチンの酸抽出液から、アルカリ性プロテアーゼは STI-Sepharose、カゼイン-Sepharose およびヒストン-Sepharose を上記の順番に用いる affinity chromatography によって約 75% の純度に精製された (精製度 1,400 倍, 収率 4%)。一方、中性プロテアーゼは、STI-Sepharose によってほぼ単一に精製された (精製度 920 倍, 収率 12%)。

2. 性質：種々の阻害剤および合成基質に対する挙動から、両プロテアーゼはキモトリプシン様酵素であると結論された。[ $^3\text{H}$ ] DFP (diisopropyl fluorophosphate) を用いた affinity label によって、中性プロテアーゼの分子量は約 27,000、また、アルカリ性プロテアーゼの分子量は約 18,000 と測定された。免疫学的実験結果から、両プロテアーゼは互いに抗原性を異にすること、牛膵臓のトリプシンおよびキモトリプシンとも抗原性を異にすることがしめされた。

3. 役割：a) 遠心分画法を用いて両プロテアーゼの細胞内局在性を調べた結果、アルカリ性プロテアーゼは核に特異的に存在するのに対して、中性プロテアーゼは核およびミクロゾーム分画にも見出

された。b) アルカリ性プロテアーゼは、増殖性の盛んな組織の核により多く含まれた。c) 中性プロテアーゼは HI 以外の 4 種のヒストンを、また、アルカリ性プロテアーゼは HI と非ヒストン蛋白質をよく分解した。生体内ではヒストンは代謝回転をほとんどしていないことをしめす報告が多いので、中性プロテアーゼは *in vivo* ではほとんど活性を発現し難い状態にあると思われる。d) ローダミン肉腫のクロマチンには、分子量 6 万 4 千、等電点 7 の非ヒストン蛋白質が多量に存在する。この蛋白質がクロマチンに結合しているプロテアーゼによって部分分解を受け、既報の分子量 6 万、等電点 5 の非ヒストン蛋白質に変る時、クロマチン標品はトキソホルモン活性（肝カタラーゼ低下活性）をしめした。すなわち、アルカリ性プロテアーゼは癌組織の核内でトキソホルモンの前駆体を部分分解することによってトキソホルモンを生成すると思われる。e) 担癌ラットの肝臓では、肝臓に特異的な分子量 3 万～4 万の非ヒストン蛋白質の含量の低下が見られた。この時、肝臓細胞核にアルカリ性プロテアーゼ活性の増加が認められた。以上の結果から、アルカリ性プロテアーゼは、非ヒストン蛋白質の含量を減少させることによって、クロマチンの活性発現に影響する可能性がある。

### 論文の審査結果の要旨

高等動物の細胞核には、DNA に加えて、多量の蛋白質が存在する。その蛋白質はヒストンと非ヒストン蛋白質に大別される。従来の報告によると、細胞内において、ヒストンはほとんど代謝されないのに反して、非ヒストン蛋白質は代謝回転する。他方、細胞核には、ヒストンを加水分解するプロテアーゼ（中性プロテアーゼ）が存在することが知られているが、非ヒストン蛋白質の加水分解を触媒するプロテアーゼの存在は知られていなかった。

萩原君の研究業績は、ラットの種々の組織の細胞核には、非ヒストン蛋白質を加水分解するプロテアーゼ（アルカリ性プロテアーゼ）が、クロマチンに強固に結合して、存在することを発見したことに基く。

正常組織細胞では、比較的増殖速度の早いものほど、アルカリ性プロテアーゼ活性が高く、また増殖速度の著しく早い癌細胞の核にはアルカリ性プロテアーゼ活性が著しく高い。

萩原君はローダミン肉腫から、中性プロテアーゼに加えて、アルカリ性プロテアーゼをほぼ完全に精製し、両者の性質を明確にした。中性プロテアーゼは約 2.7 万の分子量をもつキモトリプシン様プロテアーゼで、至適 pH 約 8 であり、ヒストンをよく加水分解する。他方、アルカリ性プロテアーゼは約 1.8 万の分子量をもち、至適 pH 約 9.5 であり、非ヒストン蛋白質をよく加水分解する。後者のプロテアーゼは阻害剤に対する挙動からはキモトリプシン様であるが、合成基質に対する挙動からは非キモトリプシン様である。更に、クロマチンに結合した状態における両プロテアーゼの作用が詳細に研究されている。

以上のように萩原君の研究業績は、細胞核における蛋白質、特に非ヒストン蛋白質の代謝回転に対して酵素化学的な解析手段を与えるものである。よって、萩原君の研究業績は理学博士の学位論文として十分に価値あるものと認められる。