The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	ヒト腎に存在する中性エンドペプチダーゼの精製と性質
Author(s)	石田, 雅俊
Citation	大阪大学, 1982, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/33287
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【2】

氏名・(本籍)	石田雅俊（いしだ まさとし）
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 5598 号
学位授与の日付	昭和57年3月25日
学位授与の要件	医学研究科 外科系専攻 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	**ヒト腎に存在する中性エンドペプチダーゼの精製と性質**
論文審査委員	(主査) 教授 神前 五郎 (副査) 教授 山野 俊雄 教授 和田 博

論文内容の要旨

〔目 的〕

elastaseの人工基質であるsuccinyl trialanine para—nitroanilide(Suc(Ala)$_3$— pNA)を水解する、elastaseと異なる酵素活性が慢性関節リウマチ患者の関節液中や閉塞性黄疸患者の血清中及び胆汁中に高値を示し、またその活性はEDTAで失活する金属酵素であることが知られている。先に我々はSuc(Ala)$_3$- pNA水解酵素活性がヒト腎に高いことを見出したので，本研究ではヒト腎より本酵素の精製を試み、その性質を明らかにすることを目的とした。

〔方法ならびに成績〕

酵素の基質として主に5mM Suc(Ala)$_3$- pNA, 50mM Tris-HCl buffer(pH 8.0、20mM $CaCl_2$、4％methyl pyrrolidoneを含む）を使用した。

法医解剖にて得た比較的新鮮なヒト腎は結合識を除去後細切し、生理食塩水にて洗滌脱血後，5mM Tris-HCl buffer pH 8.0、0.25 M sucrose中でWaring Blendorにて3分間ホモジェナイズし，8,000×g遠沈上清を20—40％飽和硫安塩析した。沈渣を蒸留水にて透析することにより生じた沈殿を，40,000×gにて遠沈して集め，0.5％ sodium deoxycholateを含む20mM Tris-HCl buffer（pH 8.0）に浮遊後，1晩抽出し，40,000×gにて遠沈した。上清にBrij 35を0.1％になるように加え，10mM acetate buffer(pH 6.0）にて透析後，DEAE-cellulose column(pH 6.0）に吸着させ，10mM—250 mM acetate buffer(pH 6.0）の直線濃度勾配にて溶離した。本操作により，酵素活性の急激な低下が認められたが，同時に分画されるleucine aminopeptidase(LAP)画分を活性測定時に加えると，Suc(Ala)$_3$- pNA水解活性が回復した。この結果から基質を水解してp-nitroanilineを生成

する反応は未知のエンドペプチダーゼとLAPとの共同作用によると考えられた。このエンドペプチダーゼと考えられる活性画分と基質との反応生成物を沪紙電気泳動にて調べた結果でもAla-pNAが認められ，本酵素が基質の2番目と3番目のAla-Ala結合を切断していることが確認された。以下その画分を等電点電気泳動(pH 4～6)を2回，更にSephacryl S—300によるゲル沪過を行い，ディスク電気泳動後ゲルスライスより抽出し，高純度の酵素標品を得た。なお精製中，LAP分離後の酵素標品の酵素活性測定には部分精製されたヒト腎LAPを加え，生成したp-nitroanilineを410 nmのabsorbanceの増加を測定することにより行った。また本酵素の諸性質の検討には，生成したAla-pNAを高速液体クロマトグラフィーにより定量するか，あるいはbufferとして50mM borate buffer (pH 8.0)を用いニンヒドリン法により直接定量した。

本酵素の至適pHは8.0であり，Sephacryl S－300を用いたゲル沪過による分子量は約10万，等電点電気泳動による等電点は5.3～5.4であった。陽イオンの活性に対する影響は5 mMの濃度で行った。Ca^{2+}は1.6～2.0倍活性化し，Mg^{2+}とK^{+}がやや活性の上昇をもらしたが，Zn^{2+}, Mn^{2+}, Fe^{2+}は活性を抑制した。安定性に関しては，pH 6～10で37℃において1時間では活性の低下は認められず，50℃15分でやや低下し，60℃15分で完全に失活した。安定性に対してCa^{2+}は無関係であった。

また各種阻害剤の影響を調べると，EDTA, o-phenanthroline, phosphoramidonにより阻害されたので，金属酵素であると考えられた。

基質特異性を知るため，インスリンB鎖，アンギオテンシンIに作用させて切断個所を見たところ，本酵素は疎水性アミノ酸のN末端側をよく水解するエンドペプチダーゼであることがわかった。

また小規模にて細胞分画を行うと活性の80%が小胞体画分に存在した。

〔総　括〕

腎に存在し，Suc(Ala)$_3$-pNAを水解するelastase以外の酵素活性は，今回精製した酵素により，基質がSuc(Ala)$_2$とAla-pNAに水解され，後者が更にLAPにより，Alaとp-nitroanilineに水解され，p-nitroanilineの発色を見ていることが明らかになった。

本酵素は膜結合性の金属エンドペプチダーゼであり，至適pH 8.0，分子量は約10万，等電点は5.3～5.4であった。また本酵素は疎水性アミノ酸のN末端側をよく水解した。現在閉塞性黄疸の診断に用いられているγ-glutamyl transpeptidase, alkaline phosphatase, LAPも膜結合性で，胆管酵素といわれ，腎にその活性が最も高い。本酵素も胆汁中にも存在し，閉塞性黄疸患者の血清中に上昇することからこれらの酵素と同様胆管酵素の一種で，今後その測定が閉塞性黄疸の診断や病態解明に利用されると考えられる。

論文の審査結果の要旨

本研究においてヒト腎に存在するsucinyl trialanine p-nitroanilideを水解するelastase様活性が従来未報告のendopeptidaseとleucine aminopeptidaseとの共同作用によることが見い出された。

さらに本研究ではこのendopeptidaseを精製し，蛋白質化学的，酵素化学的性質を明らかにした。この結果，本酵素の生理学的役割の解明及び臨床診断への応用が可能となった。

以上より本研究が充分評価しうる研究であると認める。