



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

氏 名・(本籍)	石 田 雅 俊
学 位 の 種 類	医 学 博 士
学 位 記 番 号	第 5 5 9 8 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 5 mM Suc(Ala)₃-pNA, 50 mM Tris-HCl buffer(pH 8.0, 20 mM CaCl₂, 4 % methylpyrrolidone 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織を除去後細切し、生理食塩水にて洗滌脱血後、5 mM 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% 飽和硫酸塩析した。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 20 mM 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、10 mM acetate buffer(pH 6.0) にて透析後、DEAE-cellulose column(pH 6.0) に吸着させ、10 mM—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 によるゲル濾過を行い、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 を用いたゲル濾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。Ca²⁺ は 1.6~2.0 倍活性化し、Mg²⁺ と K⁺ がやや活性の上昇をもちしたが、Zn²⁺、Mn²⁺、Fe²⁺ 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 Ca²⁺ 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ことが考えられる。

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 succinyl 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だされた。

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。