The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	人血小板Ca2+依存性中性プロテアーゼ（CANP）-その内因性基質と低Ca2+要求性CANP（μ-CANP）の精製
Author(s)	辻仲，利政
Citation	大阪大学，1983，博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/33450
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

【54】

氏名・(本籍)	辻(つじ) 仲(なか) 利(とし) 政(まさ)
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 5936 号
学位授与の日付	昭和58年3月17日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位論文題目	**人血小板Ca^{2+}依存性中性プロテアーゼ(CANP)-その内因性基質と低Ca^{2+}要求性CANP(μ-CANP)の精製**
論文審査委員	(主査) 教授 神前 五郎
	(副査) 教授 吉田 博 教授 垣内 史朗

論文内容の要旨

〔目　的〕

Ca^{2+}依存性中性プロテアーゼ(CANP)は，Ca^{2+}で活性化され中性域にその至適pHを有するチオールプロテアーゼである。生体の各組織の細胞内に広く存在し，筋繊維代謝，酵素のCa^{2+}依存性の活性化因子，および細胞構築蛋白の分解等の作用が報告されてきたが，これらの報告されたCANPは非生理的濃度のCa^{2+}(mMのレベル)をその活性化に必要としていた(m-CANP)。その後生理的濃度(μMのレベル)のCa^{2+}により活性化されるCANP(μ-CANP)が心筋細胞，肝細胞，赤血球等で知られるようになり，生理的役割を担っている可能性が考えられるようになった。CANPの血小板における生理的役割を明らかにするため，人血小板よりCa^{2+}感受性の異なる二つ(μ-, m-)のCANPを部分精製し，その内因性基質を調べた。次いで人血小板のCANPの大部分を占める低Ca^{2+}要求性CANP(μ-CANP)を精製し，その酵素学的性質について検討を加えた。

〔方法ならびに成績〕

1．内因性基質についての検討—人洗浄血小板を破砕し105,000g上清を得た。これを硫安分画し，0～70%飽和沈澱分画をDEAE-Sepharose CL-6Bにかけ，0～0.6M NaClの直線濃度勾配にて溶出した。NaCl濃度0.2Mでμ-CANP，0.3Mでm-CANPが溶出され，それぞれの活性分画を引き続きSephadex G-150を用いて部分精製を行った。部分精製したμ-, m-CANPの50%活性発現にはそれぞれ6μM，900μMのCa^{2+}濃度を必要とした。内因性基質として，人血小板よりcytoskeletal proteins(CSPs)，plasma membrane，およびtubulinを準備し，また他の天然基質として牛脳よりmicrotubular proteinsを準備した。μ-, m-CANPともmembrane glycoproteinおよびtubulin

を分解しなかった。CSPsはTriton x-100処理血小板の沈渣に移行する細胞構築に関与する蛋白群であり，主にactin binding protein (ABP), actin, myosin heavy chainにより構成されている。さらに可溶分画に存在する230K proteinがわずかに混入している。ABP, 230K protein, と牛脳のmicrotubules associated proteins (MAPs) は，50μMCa^{2+}存在下μ-CANPのみにより分解され，2mMCa^{2+}存在下μ-，m-CANPの両方により分解された。

2．低Ca^{2+}要求性CANPの精製—人洗浄血小板を破砕し105,000g上清を得た後硫安分画し，30—45%飽和沈澱分画をSephacryl S-300にてゲルろ過を行った。CANP活性分画をDEAE-Sepharose CL-6Bにかけ，0—0.35M NaClの直線濃度勾配にて溶出すると，NaCl濃度0.175Mでμ-CANP，0.275Mでm-CANPが溶出された。Dithiothreitol (DTT) を含むpH 7.5のトリス塩酸バッファーをpH 6.9のDTTを含まないものへと変換後，μ-CANP分画をDEAE-Sephadex A—25にかけ0—0.25M NaClの直線濃度勾配にて溶出した。CANP活性はNaCl濃度0.125Mの所に溶出された。この最終活性分画は，ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて単一バンドを示し，SDS存在下にて80Kと25Kの二つのバンドが観察された。Sephadex G-150を用いて分子量測定を行った結果，105Kと計測された。以上より各血小板μ-CANPは80Kと25Kの二つのサブユニットで構成されていると考えられた。精製酵素標品の回収率は14%で，比活性上昇は475倍であった。精製μ-CANPは25μM Ca^{2+}により50%活性化され，Ca^{2+}以外の2価陽イオン（Sr^{2+}, Ba^{2+}, Mn^{2+}, Mg^{2+}, Ni^{2+}）によっても100μMで活性化された。しかしZn^{2+}とCu^{2+}はCANP活性を阻害した。Iodoacetic acid等のアルキル化剤，Leupeptin, Antipain, およびエポキシコハク酸誘導体（E—64）等はμ-CANP活性を阻害した。

〔総　括〕

人血小板には，Ca^{2+}感受性の異なる二つ（μ-, m-）のCANPが存在している。内因性基質であるABP, 230K proteinおよび天然基質である牛脳MAPsは，μ-, m-CANPにより，それぞれμM, mMレベルのCa^{2+}濃度にて分解された。とくにμ-CANPは，細胞内での生理的機能を営んでいる可能性が示唆された。しかしこの生理的重要性の高いμ-CANPの精製の報告は極めて少く，血小板からは今回が始めての報告である。人血小板よりのμ-CANPの精製はin vivoでのCANPの役割を解明する糸口になると思われる。

論文の審査結果の要旨

人血小板に，Ca^{2+}感受性の異なる二つのCANPを見い出し，これらのCANPがおのおのの至適Ca^{2+}濃度にて細胞構築性タンパクの分解に関与することが判明した。生理的Ca^{2+}濃度で活性化される低Ca^{2+}要求性CANPを，血小板から初めて均一に精製しその諸性質について検討を加えた。価値ある研究であると思う。