



Title	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
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、 ＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed >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)	辻	仲	利	政
学位の種類	医	学	博	士
学位記番号	第	5	9	36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—人洗浄血小板を破碎し105,000g上清を得た。これを硫酸分画し、0~70%飽和沈澱分画をDEAE-Sephrose 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6 μM 、900 μM 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230 K proteinがわずかに混入している。ABP, 230 K protein, と牛脳のmicrotubules associated proteins (MAPs) は, $50\mu\text{M Ca}^{2+}$ 存在下 μ -CANPのみにより分解され, 2mM Ca^{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—人洗浄血小板を破碎し105,000g上清を得た後硫酸分画し, 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-Sephadex 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 $25\mu\text{M Ca}^{2+}$ 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 $100\mu\text{M}$ 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, 230 K 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。