

Title	ウシ血小坂Ca <sup>2+</sup> 依存性中性プロテアーゼ (CANP) とその内在性阻害物質について
Author(s)	左近, 賢人
Citation	大阪大学, 1982, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/33542">https://hdl.handle.net/11094/33542</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)	左 近 賢 人
学位の種類	医 学 博 士
学位記番号	第 5 8 5 8 号
学位授与の日付	昭和 57 年 12 月 21 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	ウシ血小板 $Ca^{2+}$ 依存性中性プロテアーゼ (CANP) とその 内在性阻害物質について
論文審査委員	(主査) 教授 神前 五郎 (副査) 教授 垣内 史郎 教授 藤井 節郎

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 〔目 的〕

種々の生理的刺激に対応して血小板は形態変化、分泌放出・凝集反応を起こし止血機構において重要な役割を果している。これら血小板反応は刺激後生じる細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の上昇を介して起こると考えられている。骨格筋、肝臓等の細胞質において、 $Ca^{2+}$  イオンで活性化される中性プロテアーゼ ( $Ca^{2+}$  activated neutral protease: CANP) が見い出され、筋繊維代謝、kinase 等酵素の活性化、細胞構築蛋白の分解等の生理的意味付けがなされてきた。同様の  $Ca^{2+}$  依存性プロテアーゼ存在の可能性は血小板においても Phillips らにより示されたが報告も少なく、また活性化に非生理的な高濃度 (mM) の  $Ca^{2+}$  イオンを必要とすることからその生理的意義は疑問視されていた。この  $Ca^{2+}$  依存性プロテアーゼの血小板反応における何らかの役割を明らかにするため、ウシ血小板より本酵素を部分精製し酵素学的検討を行なった。

#### 〔方法ならびに成績〕

1. CANP 活性の測定 CANP 活性は 0.5 % 熱変性カゼインを基質として 4 mM  $CaCl_2$  存在下 25 °C, pH 7.5, 30 分間反応させ、トリクロル酢酸を含む停止液にて反応を止めた後、遠沈し上清中のペプチドをフルオレスカミンを用いた蛍光法 (励起波長: 405nm, 放射波長: 475nm) で測定し求めた。1 時間に 1 nmol の  $\alpha$  amino group を遊離する酵素量を 1 単位とした。

2. CANP の部分精製と酵素学的性質 ウシ洗浄血小板を 5 mM EDTA, EGTA 存在下に破壊し、その 105,000 × g 遠心上清を得た。これを硫酸分画し、25-35% 飽和沈澱分画を DEAE Sepharose CL-6B にかけて、0-0.5 M NaCl の直線的塩勾配で溶出すると 0.2 M と 0.3 M に明らかに 2 つの

CANP 活性が分離溶出された。便宜上それぞれ  $\mu$ -CANP, m-CANP と名付けた。またこのイオン交換クロマトにより総 CANP 活性が1.7倍増加したことから内在性インヒビターの存在が示唆された。 $\mu$ CANP, m-CANP はさらに Sephadex G-150 を用いて精製を行なった。Sephadex G-150 のゲル濾過より分子量はそれぞれ  $1.35 \times 10^5$ ,  $1.2 \times 10^5$  と推定された。

$\mu$ , m-CANP は共に  $\text{Ca}^{2+}$  イオン非存在下 (1 mM ECTA) では活性が認められないが  $\text{Ca}^{2+}$  イオンの添加により活性が認められる。至適 pH は共に中性 (pH 7.0) である。Iodoacetamide, leupeptin, antipain 等 SH プロテアーゼ阻害剤で阻害されるが, DFP, PMSF, SBTI 及び pepstatin A 等のセリン, 酸性プロテアーゼ阻害剤で阻害されないことから,  $\mu$ , m-CANP とともに  $\text{Ca}^{2+}$  依存性中性 (チオール) プロテアーゼであると考えられた。しかし, 50% 活性発現には  $\mu$ -CANP は  $6 \times 10^{-6}$  M, m-CANP は  $6 \times 10^{-4}$  M の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を必要とし  $\text{Ca}^{2+}$  新和性に著しい差異が認められた。その他両酵素間には他の 2 価イオン ( $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ : 4 mM) で  $\mu$ -CANP は活性化されるが m-CANP はされない, 熱安定性では  $\text{Ca}^{2+}$  イオン非存在下 60°C 20 分で  $\mu$ -CANP は 75% 残存活性が認められるが, m-CANP は完全に失活する等の差異が認められた。

[内在性インヒビターの部分精製とその性質]

ウシ洗浄血小板の 105,000  $\times$  g 遠沈上清を透析し, DEAE Sepharose CL-6B クロマトにかけ 0-0.6 M NaCl の直線内塩勾配にて溶出すると 0.1 M にて  $\mu$ , m-CANP に対する阻害活性が認められた。この阻害分画を Sepharose CL-6B クロマトにかけたところ,  $\mu$ , m-CANP に対する阻害活性は同位置に溶出され, 分子量は  $3.5-4.0 \times 10^5$  と推定された。

部分精製されたインヒビターは  $\mu$ , m-CANP 活性を濃度依存的に阻害したが, m-CANP をより強く阻害した。また, 高濃度 (10 mM) の  $\text{Ca}^{2+}$  イオン存在下でも阻害活性は変らなかった。しかし trypsin,  $\alpha$ -chymotrypsin, plasmin, thrombin, papain, ficin 等他のセリン, SH プロテアーゼを阻害しなかった。

種々の量のインヒビターの存在下  $\mu$ , m-CANP の量とその活性を調べたところ, 活性直線はインヒビター量に応じて平行移動したことから測定条件下 ( $\text{Ca}^{2+}$  存在下) では, インヒビターは  $\mu$ , m-CANP と量論的に結合し複合体を形成することにより CANP 活性を阻害すると推測された。しかし, CANP とインヒビターは 1 mM EGTA 存在下, Sephadex G-200 クロマトにより分離溶出された。

[総括]

ウシ洗浄血小板に 2 種の  $\text{Ca}^{2+}$  存在性中性プロテアーゼ (CANP) を認めた。これら CANP は共に至適 pH が 7.0 のチオールプロテアーゼであり, 特に  $\mu$ -CANP は生理的に到達しうる濃度 ( $\mu$ M) の  $\text{Ca}^{2+}$  イオンで活性化されることから血小板反応において何らかの役割を果しうる可能性が示唆された。さらに CANP に特異的と思われる内在性インヒビターを認めた。このインヒビターは  $\text{Ca}^{2+}$  イオンをキレートすることにより CANP 活性を阻害するのではなく,  $\text{Ca}^{2+}$  イオン存在下 CANP に結合し複合体を形成することにより CANP 活性を阻害すると考えられ, 血小板内 CANP 活性の調節に重要であると思われた。

## 論文の審査結果の要旨

ウシ血小板に2種の  $\text{Ca}^{2+}$  依存性中性プロテアーゼ ( $\mu$ , m-CANP) を認め、特に  $\mu$ -CANP は  $\mu\text{M}$  の  $\text{Ca}^{2+}$  イオンで活性化されることから血小板反応において何らかの役割を果しうることを明らかにした。又、ウシ血小板には CANP に特異的と思われる内在性インヒビターを認め、このインヒビターは  $\text{Ca}^{2+}$  イオン存在下 CANP に結合し、複合体を形成することにより CANP 活性を阻害することを明らかにした。血小板 CANP 活性の調節に重要であると考えられる。

この CANP の生理的意義はなお不明であるが、血小板の機能を解明する上に重要な研究であると評価する。