The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	家兎多核白血球のカルシウム依存性中性プロテアーゼ
Author(s)	張, 士文
Citation	大阪大学, 1983, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/33798
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

【26】

氏名・（本籍）	張（ちょう）　士（し）　文（ぶん）
学位の種類	医　学　博　士
学位記番号	第　6111　号
学位授与の日付	昭和58年6月1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	**家兎多核白血球のカルシウム依存性中性プロテアーゼ**
論文審査委員	（主査） 教　授　川島　康生 （副査） 教　授　藤井　節郎　　教　授　垣内　史朗

論　文　内　容　の　要　旨

（目　　的）

多核白血球には酸性域で活性化されるカテプシン以外に，中性域で活性化されるプロテアーゼが，顆粒分画に存在している。これらのプロテアーゼはコラゲンや，血管基底膜等の細胞外基質を分解し，炎症反応に於いて重要な役割を担っていると考えられている。カルシウム依存性中性プロテアーゼ（CANP）はカルシウムで活性化され，中性域に至適 pH を有するチオールプロテアーゼであり，細胞質分画に主として存在することが知られている。CANP はリゾソームの関与しない細胞内蛋白の分解を行っていると考えられているが，その生理的役割はいまだ確立されていない。また CANP は骨格筋，心筋，赤血球，血小板を始めとして，生体のすべての組織細胞中に存在すると推定されているが，多核白血球から分離精製を行った報告は見られない。我々は血小板を始め流血細胞をモデルとして，CANP の生理的役割の解明にとりくんで来た。今回多核白血球を家兎より調整し，二種の CANP を部分精製し，その性質について検討を加え，また白血球 CANP の内因性基質を確認した。

（方法ならびに成績）

CANP 活性の側定は熱変性カゼインを基質として，酸可活性ペプチドを Sogawa らの方法に順じてフルオルレスカミンを用いて測定した。Ca^{++}（2 mM）とならびに EDTA（2 mM）存在下に測定を行い，その差を CANP 活性とした。家兎腹腔内へ 0.1％グリコーゲンを含む滅菌生理食塩水を注入し 14～16時間後に腹腔内洗浄を行って，多核白血球を集めた。塩化アンモニウムにて赤血球を破壊し，Ca^{++} free phosphate buffered saline にて洗浄し，洗浄白血球液を得た。セリンプロテアーゼ阻害剤を加えたのち，白血球を sonicator にて破砕した。その 105,000×g 上清を 0～70％硫安分画したのち，DEAE－

Sepharose CL−6B クロマトグラフィーを行った。二つのCANP活性のピーク（CANP−Ⅰ，−Ⅱ）が得られ，同時に大部分のinhibitor分画と分離された，各々ピークをuetrogel AcA−34を用いてゲルろ過を行い最終部分精製標品を得た。標準蛋白質とゲルろ過して，推定された分子量はCANP−Ⅰ，Ⅱとも約14万であった。白血球ホモジネート及び0〜70%分画には過剰のinhbitorが存在するため，CANP活性は検出されず。最終段階にて完全にinhibitorとCANPは分離された。CANP−Ⅰと−Ⅱの総活性比は3：8で，CANP−Ⅱは優位であった。CANP−Ⅰと−ⅡはCa^{++}感受性が大きく異なり，50%活性発現に必要なCa^{++}濃度は各々15μMと1.6mMであった。また，Ca^{++}以外の二価陽イオンはCANP−Ⅰの活性化はSr^{++}(2mM)のみが有効であったが，CANP−Ⅱに対してはすべて無効であった。至適pHはCANP−Ⅰ，−ⅡともにpH 6.5〜8.0の中性域に存在しpH 7.5にて最大活性を示した。CANP−Ⅰ，−ⅡともにSH基を修飾するヨードアセタマイド及びN−マレイマイドより活性阻害を受け，チオールプロテアーゼインヒビターであるロイペプチン，アンチパイン及びエポキシコハク酸誘導体（E−64）によって阻害された。しかしセリンプロテアーゼインヒビター（PMSF, DFP, SBTI），酸性プロテアーゼインヒビター（pepstatin A）は影響を与えなかったが，TLCKにより軽度の活性阻害が見られた。白血球ホモジネートに対し，Ca^{++}もしくはCANP単独添加しても細胞蛋白の分解は観察されなかったが，Ca^{++}(100μM）存在下に白血球CANP或いは血小板CANPを添加すると270K，200Kと125Kの蛋白の分解が観察された。200K蛋白は血小板のmyosin heavy chain（MHC）と電気泳動上の移動度が一致し，270K蛋白はStosselらの報告した家兎肺マクロファージのactin binding protein（ABP）の分子量が一致している。

（総　括）

細胞内の局在，各種inhibitorの影響，EDTA及び二価イオンの影響，基質の局在等において，白血球の顆粒内中性プロテアーゼと今回存在を確認した白血球CANPとは明らかに区別されうる。ABFはactin，myosin及びmyosin cofactorと共存在に白血球ゲル及び凝集の際のinitiatorとして働き，phagocytosisは膜分画より動員されるABP量を増加させることが知られている。白血球において物理的力を生じさせる収縮性蛋白質のturn overをCANPが担っているものと考えられた。

論文の審査結果の要旨

本論文は家兎多核白血球より中性域に至適pHをもつCa^{++}依存性プロテアーゼ（CANP）二種の部分精製を行ったものである。これら二種のCANPの一方は低Ca^{++}要求性（μM)である。他は高Ca^{++}要求性（mM）であった。又この白血球CANPにより白血球のアクチン結合蛋白（270K），ミオシン重鎖（200K)と125K蛋白が分解されることから，これらも内因性基質と推定している。白血球に二種のCANPが存在することを始めて明らかにし，又本酵素の生理的役割解明の糸口となりうる内因性基質を明らかにした点において学位論文として価値あるものと考えられる。