The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Thiol Protease Inhibitorの精製および性質の解明
Author(s)	平戸, 政行
Citation	大阪大学, 1984, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/33946
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

【28】

氏名・（本籍）	平戸政行（ひらど まさゆき）
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 6408 号
学位授与の日付	昭和 59 年 3 月 24 日
学位授与の要件	医学研究科 生理系専攻 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	Thiol Protease Inhibitorの精製および性質の解明
論文審査委員	（主査） 教授 藤井 節郎 （副査） 教授 坂本 幸哉 教授 中川 八郎

論文内容の要旨

（目　的）

近年，proteaseが生体内の蛋白質の代謝回転のみでなく，種々の生命現象に重要な役割を果たしている事が明らかになり，これらの制御因子としてのprotease inhibitorの意義が注目されている。特に，最近，組織内のlysosome 顆粒に存在するprotease の中で，最も強い活性を占めるthiol protease 群（cathepsin B, H, L等）が，分離，精製され，その性質が明らかになるとともに，癌の転移，筋ジストロフィー等の病態との関連性などが示唆され，この方面でのprotease の役割が注目されている。

それに対して，これらのthiol protease の制御因子および制御機構については，十分な知識が得られていない。そこで，我々は，これらのthiol protease に対するinhibitor を，肝，血清および初乳より初めて完全精製し，その酵素学的ならびに蛋白質化学的性質の解明を行なった。

（方法ならびに成績）

Wistar 系雄ラットを用いて，thiol protease inhibitor（TPIと略す）の組織および細胞内分布をcathepsin H の阻害活性で調べたところ，肝，腎，肺など全ての組織の細胞質画分に広く分布していることが分った。これらのうち組織に存在するTPIとして肝のものを，体液に存在するTPIとして血清中のものについて，その性質を検討した。

ラット肝のTPIは，肝をde Duve らの方法に従い細胞分画し，細胞質画分をpH処理後，Sephadex G－50，DEAE－Sephadex，Sephadex G－75 によるchromatographyにより，SDS－PAGE で単一にまで精製した。このものは，分子量12,400，pI 5.0の熱に安定な蛋白質で，papain，cathepsin B，C，HおよびLなどのthiol proteaseのみを特異的に阻害した。また，その酵素阻害様式は，非拮抗阻

害を示し，Ki 値は，4.1×10^{-8}M (cathepsin H) であった。

一方，ラット血清中には，高分子型TPI (Mr. 103, 000, pI 4.8)と低分子型TPI(Mr. 16, 000, pI 9.2) の存在が認められたが，後者は，今まで報告のない新しいタイプのinhibitor であり，低分子量で，高い等電点を持ち，thiol type cathepsin を強く阻害する事が特徴である。なお，ラット血清中には，低分子型TPI の量が少なく，精製が困難であるため，多量に入手可能なウシ血液を用いて，これらのTPIを精製した。

ウシ血清の高分子型TPI は，硫安分画後，DEAE－Sephadex，Papain－Sepharose，Sephadex G－150による chromatography で，一方，低分子型 TPI は硫安分画後，Sephadex G－50，CM－Sephadex，Heparin－Sepharose，Sephadex G－75による chromatography で，各々，SDS－PAGE で単一にまで精製した。高分子型 TPI は，分子量73,000，pI 4.4 で papain に対して強い阻害を示し,cathepsin B，Hに対しては弱い阻害しか示さなかった。一方，低分子型TPI は，分子量15,500，pI 8.6で，thiol type cathepsin および papain に対して同等の強い阻害活性を示した。なお，高分子型TPI と低分子型TPI は異なる免疫原性を示した。

さらに，我々は，この新しいタイプの inhibitor が，ウシ初乳中に多量に存在する事を見出した。分娩後，TPI 量は，1～3日目が最高値を示し，次第に減少して通常乳では殆んど検出できなかった。ウシ初乳中のTPIは，初乳(1日目)を pH 処理後，硫安分画し，Sephadex G－50，CM－Sephadex および YMC－pack A 303，ODS 300を用いた逆相chromatography により，2種(peak－1，peak－2)の inhibitor をSDS－PAGE で単一にまで精製した。これらは，両者ともに分子量10,500, pI 10.0～10.3の塩基性蛋白で，血清の低分子型TPI 同様に，thiol type cathepsin に対して強い阻害を示し，阻害様式は，非拮抗阻害を示した。また，Ki 値は，cathepsin Hに対して，$5 \sim 6 \times 10^{-8}$M，cathepsin Bに対して，$1 \sim 2 \times 10^{-7}$Mであり，thiol protease と1：1の complex formation を行ない阻害する事が判明した。peak－1，peak－2のアミノ酸組成は，ほぼ同じであり，peak－1のN－末端のアミノ酸配列を，PTH法で分析したところ，Arg－Leu－Leu－Gly－Gly－Leu－Met－Glu－Ala－Asp－Val－Asn－Glu－Glu－Gly－Val－Gln－Glu－Ala－Leu－X－Phe－Ala－Val－ の配列を示し，N末端の近傍に非常に疎水性の高いアミノ酸が並んだ特徴的な構造を示した。

（総　括）

ラットの各組織の細胞質画分に，lysosome 顆粒に存在する thiol type cathepsin の inhibitor が存在する事を見出し，肝の thiol protease inhibitor を初めて完全精製し，その性質を明らかにした。また，ラットおよびウシ血清中に低分子，塩基性の新しいタイプの thiol protease inhibitor が存在する事を見出した。さらに，ウシ初乳中にも，この新しいタイプの inhibitor (Mr. 10,500, pI 10.0～10.3) が多量に存在する事が判明した。精製された血精および初乳のこれらの inhibitorは，いずれもthiol type cathepsin を強く阻害し，その阻害様式は，非拮抗阻害を示した。さらに初乳の inhibitor は，アミノ酸組成およびN－末端アミノ酸配列が，今までに報告のない特異なものであった。

以上のように，性質の異なる thiol prntease inhibitor が，その分布を異にして存在する事が明らかになった事は，これらの inhibitor の生理的意義を考える上で重要であると思われる。

論文の審査結果の要旨

本論文は細胞内チオールプロテアーゼに対する内在性インヒビターの存在をラット肝，ウシ血清及び初乳中で始めて明らかにし，精製を行ない性質を明らかにしたものである。

従来，細胞内，特にリソゾーム中のカテプシン系酵素の生理的意義については細胞内機能あるいは構造蛋白質の代謝回転という点で注目されてきたが，最近，種々の生命現象，特に，癌あるいは筋ジストロフィーなどの病態との関連性が急速に着目されつつある。従がって，この時期，本インヒビターを精製し，種々の性質を明らかにしたことは，細胞内プロテアーゼの活性発現及び制御機構を解析する上でも，さらに，それら機構の乱れから生じる疾病の生化学的解明の上からも重要な知見であり，医学博士の学位論文として十分価値あるものと認める。