



Title	ヒト血小板のCa ²⁺ 依存性中性蛋白分解酵素に対する内在性阻害蛋白質の精製と性質
Author(s)	芝, 英一
Citation	大阪大学, 1984, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/34787
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）	しば 芝	えい 英	いち 一
学 位 の 種 類	医	学	博 士
学 位 記 番 号	第	6 6 7 6	号
学位授与の日付	昭 和 59 年 12 月 27 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	ヒト血小板の Ca^{2+} 依存性中性蛋白分解酵素に対する内在性阻害蛋白 質の精製と性質		
論 文 審 査 委 員	(主査)		
	教 授	森	武貞
	(副査)		
	教 授	坂本	幸哉
	教 授	垂井	清一郎

（目 的）

Ca^{2+} 依存性中性蛋白分解酵素 (Ca^{2+} -activated neutral protease : 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。CANP の生理的役割は未だ十分に解明されていないが, 内因性基質として筋蛋白質, ある種の酵素, 細胞構築蛋白が報告され, また骨格筋, 心筋, 赤血球より CANP に対する特異的阻害蛋白質 (CANP-INH) が精製されている。教室の左近,¹⁾ 辻仲²⁾ は, 血小板の細胞質中に, Ca^{2+} 感受性の異なる二種の CANP, すなわち, μM レベルの Ca^{2+} 濃度で活性される μ -CANP と mM レベルの Ca^{2+} 濃度で活性化される m -CANP が存在すること, また血小板には内在性の CANP-INH が存在することを明らかにした。本研究はヒト血小板 CANP に対する CANP-INH の調節機構を明らかにするために, ヒト血小板より CANP-INH を精製し, その諸性質について検討を加えたものである。

（方法ならびに成績）

1. CANP-INH 活性の測定

CANP-INH 活性は, 試料と一定量の CANP を 25°C で 10 分間インキュベートし, 0.5 % 熱変性カゼインを基質として, 2 mM CaCl_2 存在下 20°C , pH 7.5 の条件で, 20 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, 遠心し, 上清のペプチドをフルオレスカミンを用いた蛍光法で測定した。既知の量の CANP の阻害活性より CANP-INH 活性を表現した。

2. CANP-INH の精製

ヒト洗浄血小板 (5.0×10^{11}) を破壊し, $105,000 \times g$ の遠心上清を得た。CANP-INH がきわめて

耐熱性蛋白であることを利用し、80°C15分間の熱処理を加え、変性蛋白を遠心にて除去した。この上清のO-70%硫酸飽和沈澱分画を、DEAE-Sepharose CL-6B カラムにかけ、O-0.4 M NaClの直線塩濃度勾配で溶出した。NaCl濃度0.2 MでCANP-INH活性が溶出されたが、CANP活性は熱処理によって失活し、検出されなかった。CANP-INH活性を有する分画に2回目の熱処理(95°C, 15分間)を加え、変性蛋白を遠心にて除去後、上清を凍結乾燥し、緩衝液にて溶解した。これを透析し、Ultrogel AcA34にてゲル濾過を行なったところ、CANP-INH活性は、二つのピークに分離され、それぞれ分子量250 Kと60Kに相当した。しかしSDS-PAGEにかけると、二つの分画はいずれも63Kの単一バンドを示し、血小板CANP-INHは四量体および単量体として存在することが示唆された。

3. CANP-INHの諸性質

CANP-INHによるCANP活性阻害に対する Ca^{2+} の影響を明らかにするため、一定量の精製された μ -CANP³⁾に種々の濃度の Ca^{2+} 存在下でCANP-INHを加え、CANP活性の阻害を調べた。過剰の Ca^{2+} を添加してもCANP-INHによる阻害は解消されず、また μ M濃度の Ca^{2+} 存在下でも阻害が認められた。次いで精製CANP-INHが他のプロテアーゼに与える影響を検討したが、 α -キモトリプシン、プラスミン、パパイン、フィシンを阻害せず、CANPを特異的に阻害するものと考えられた。精製CANP-INHの精製 μ -CANPに対する阻害形式を、基質として0.0375%, 0.075%の熱変性カゼインを用い、Dixon plotにて解析したところ、阻害形式は非競合的であり、 K_i 値は 3.2×10^{-8} Mであった。また部分精製したm-CAPに対してもmM濃度の Ca^{2+} 存在下で阻害を示した。

(総括)

ヒト血小板よりCANP-INHを均一に精製した。CANP-INHは63Kの単量体と63K $\times$ 4の四量体で存在していることを示すデータがえられ、従来のCANP-INHの分子量に関する報告(ニワトリ骨格筋で68K, ヒト赤血球とウシ心筋で250-400 K)の相異を説明することが可能となった。ヒト血小板CANP-INHはCANPに特異的で、 μ Mレベルの Ca^{2+} 濃度でも μ -CANPを阻害した。したがってCANP-INHは細胞内でCANP活性を調節する役目をもつものと考えられる。またCANP-INHのCANPに対する阻害は Ca^{2+} をキレートして阻害するものではなく、その阻害形式は、Dixon plotにより非競合的阻害を示し、 K_i 値は 3.2×10^{-8} Mであった。

文 献

- 1) M. Sakon, et al. *Experientia*, 38 : 1099, 1982.
- 2) T. Tujinaka, et al. *Thromb. Res.*, 28 : 149, 1982.
- 3) T. Tujinaka, et al. *Biochem. Int.*, 6 : 71, 1983.

論文の審査結果の要旨

本研究は、ヒト血小板より初めて Ca^{2+} 依存性中性蛋白分解酵素(CANP)に対する内在性阻害蛋白質(CANP-INH)を均一に精製し、その性質を調べたものである。その結果血小板CANP-INHは主とし

て tetramer として存在するが, monomer としても存在していること, CANP-INH の μ -CANP に対する阻害は, 生理的細胞内 Ca^{2+} 濃度で働くことなどが明らかにされた。これらの知見は, CANP ならびに CANP-INH の生理作用を考えるうえで重要であり, 学位に価する。