



Title	ラット歯髄におけるエンケファリンの産生機序に関する薬理学的および生化学的研究
Author(s)	魏, 尔清
Citation	大阪大学, 1991, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/37247">https://hdl.handle.net/11094/37247</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"&gt;https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> >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

【1】

氏名・(本籍)	魏 尔 清
学位の種類	学 術 博 士
学位記番号	第 9707 号
学位授与の日付	平成3年3月26日
学位授与の要件	歯学研究科 歯学基礎系専攻 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	ラット歯髄におけるエンケファリンの産生機序に関する薬理学的および生化学的研究
論文審査委員	(主査) 教 授 猪木 令三 (副査) 教 授 松浦 英夫    助教授 加藤 幸夫    助教授 脇坂 聡

論 文 内 容 の 要 旨

1981年、工藤らは歯髄中にエンケファリン (enkephalin, EK) およびその前駆体タンパクが存在することを報告した。その後、歯髄における EK の産生および遊離は in vivo の実験では侵害刺激により促進され、in vitro の実験では発痛物質であるブラジキニン (bradykinin, BK) により増強されることが明かにされた。この EK 産生は BK が歯髄の EK 産生酵素を活性化し、前駆体タンパクから EK を産生することによって考えられてきた。本研究では、ラットの切歯歯髄を用いて、EK 産生酵素の分離、精製および同定を行い、また、EK 前駆体のタンパクの分離、精製を行って、歯髄における産生機序を薬理、生化学的に検討した。

1) EK 前駆体タンパクの歯髄細胞内分布およびその性質

De Duve らの方法に従い、歯髄組織の細胞下分画を行い、それぞれ核、ミトコンドリア、ライソソーム、マイクロソームおよび上清画分を得た。各画分を trypsin および carboxypeptidase B (CP-B) で連続消化処理し、産生された met-EK-like peptides 量により EK 前駆体タンパクの量を測定した。核、マイクロソームおよび上清画分は酵素処理により著明に EK の産生が増大した。核画分には他の成分が混入する可能性があるため、この前駆体タンパクはマイクロソームおよび上清画分に分布していると考えられた。これらの画分に含まれるタンパクには Sephadex G-100 クロマトグラフィーにより、分子量58,000の共通のタンパクおよび低分子の EK 配列を含むタンパクがあることが認められた。前駆体タンパクを豊富に含有する上清あるいはマイクロソーム画分、または部分精製した前駆体タンパクは内因性基質として EK 産生活性の検討に用いられた。

## 2) EK 産生酵素の歯髄細胞内分布、特性、および酵素の分離精製

まず、合成基質  $N\alpha$ -benzoyl-DL-arginine- $\beta$ -naphthylamide (BANA) を用いて、BANA 分解活性を指標とし、全歯髄組織における酵素活性を検討した。酵素活性は BK およびその CP-B の分解産物 des-Arg<sup>9</sup>-BK により用量依存的に増強された。ライソソーム膜安定化剤である hydrocortisone および lidocaine は BK および des-Arg<sup>9</sup>-BK の BANA 分解活性に対する増強作用を著明に抑制し、一方、膜不安定化剤 retinol はこの活性化作用を増強した。これらの結果は BK により活性化される EK 産生酵素がライソソームと密接な関係があることを示唆した。

そこで、EK 産生酵素の細胞内分布を検討した。各細胞下画分のうち、ライソソーム画分において BK, des-Arg<sup>9</sup>-BK および Arg によって BANA 分解活性が著明増強されることが認められた。上清画分を EK 前駆体タンパク源として用いた結果、ライソソーム画分に著明な EK 産生活性が認められた。また、このライソソーム画分にはライソソーム・マーカー酵素が豊富に含まれることを確認した。この結果より、EK 産生酵素はライソソームに分布していることが明かになった。

このライソソーム酵素の性質を種々なプロテイナーゼ阻害剤を用いて検討した。システイン・プロテイナーゼ阻害剤 E-64 は酵素活性抑制作用を示し、セリン・プロテイナーゼ阻害剤 FOY-305 および アスパルチック・プロテイナーゼ阻害剤 pepstatin は抑制作用を示さなかったことから、EK 産生酵素はライソソーム・システイン・プロテイナーゼであることが明らかになった。ライソソーム・システイン・プロテイナーゼの中には、カテプシン H, B および L などが含まれているので、これらの酵素の分離精製を行った。CM Sephadex C-50 イオン交換クロマトグラフィーにおいて、溶出液 NaCl の濃度 (0.05, 0.1, 0.5M) よりそれぞれカテプシン H, B および L が溶出された。部分精製した EK 前駆体タンパクを基質として用いた結果、カテプシン B の EK 産生活性が確かめられた。これらの酵素は基質特異性、至適 pH、阻害剤特異性などにより同定された。カテプシン B の特異的な合成基質は Z-Phe-Arg-MCA および Z-Arg-Arg-MCA であり、至適 pH は 6.0、特異的阻害剤は E-64 および leupeptin であることが明らかになった。

以上のように分離されたカテプシン B はさらに Sephadex G-75 を用いるゲル濾過により精製された。精製度 400 倍前後のこのカテプシン B は SDS-PAGE 電気泳動によりほぼ均質なものであり、分子量 23,600 前後であることが明らかになった。逆相 HPLC による解析から、精製されたカテプシン B は、met-EK 配列を含むペプチド BAM-12P の “Arg<sup>6</sup>-Arg<sup>7</sup>” を切断して、met-EK-Arg<sup>6</sup> を産生したが、この met-EK-Arg<sup>6</sup> をさらに分解しないことが確かめられた。この結果は、カテプシン B がエンドペプチデースとして作用することを示している。

## 3) EK 産生に対する BK および Ca<sup>++</sup> の活性化作用

BK の EK 産生に対する活性化作用は既に明らかにされているが、本研究はこの活性化をさらに詳細に検討した。全歯髄組織において、BK の BANA 分解活性に対する増強作用は B<sub>1</sub> 受容体拮抗剤 des-Arg<sup>9</sup>-[Leu<sup>8</sup>]-BK によって拮抗され、B<sub>2</sub> 受容体拮抗剤 [Thi<sup>5,8</sup>, D-Phe<sup>7</sup>]-BK は拮抗作用を示さなかった。この結果より、全歯髄組織における BK の EK 産生酵素活性化作用は B<sub>1</sub> 受容体を介するものと考えられた。

また、マイクロソーム画分をEK前駆体タンパク源として用いた実験では、インタクトなライソソームではdes-Arg<sup>9</sup>-BKはEK産生活性に対する増強作用を示したが、繰り返して凍結溶解により得られたライソソーム可溶性成分および分離されたカテプシンBではこの増強作用を示さなかった。一方、BK, des-Arg<sup>9</sup>-BKおよびArgの全歯髄組織の酵素活性に対する増強作用はEGTAにより抑制された。しかし、分離された酵素に対してはEGTAは直接の増強作用を示し、Ca<sup>++</sup>は増強作用を示さなかった。以上の結果により、BKによるEK産生酵素活性化においてはインタクトなライソソーム構造が必要であり、この活性化にはCa<sup>++</sup>が不可欠であると考えられた。

以上を要約すると、①EK前駆体タンパクは、主としてマイクロソームおよび上清画分に分布し、主な前駆体タンパクは分子量約58,000であり、その他、いくつかのより低分子のEK配列を含むタンパクの存在が確かめられた。②EK産生酵素は主としてライソソーム画分に分布し、この酵素は分子量23,600のカテプシンBであると同定され、また、このカテプシンBはエンドペプチデースとしての活性を持つことが明らかになった。③BKはそのB<sub>1</sub>受容体を介してカテプシンBを活性化し、この活性化にはインタクトなライソソーム構造およびカルシウムイオンが不可欠であることが確かめられた。以上の結果により、炎症歯髄において、ライソソームのカテプシンBはカルシウムイオンの存在下でBKにより活性化され、EK前駆体タンパクをそのエンドペプチデース活性によって限定分解し、EKを産生すると考えられた。

### 論文審査の結果の要旨

内因性オピオイドペプチドであるエンケファリン(EK)は生体組織における重要な鎮痛・抗炎症物質として知られている。本論文は、ラット歯髄を用いて、EK産生酵素を中心とし、EK産生の機序の解明を試みたものである。

すなわち、EK前駆体タンパクおよびEK産生酵素の歯髄細胞内分布、酵素の分離精製および分解特性、ならびにEK産生に対する発痛物質ブラジキニン(BK)の促進作用の機序などを検討した結果、炎症部位において、ライソソームのカテプシンBは、カルシウムイオンの存在下でBKにより活性化され、EK前駆体タンパクをそのエンドペプチデース活性によって限定分解し、生理活性を有するEKを産生するという新たな知見が得られている。

本論文の成績は、組織炎症発現時の生体内疼痛制御機構を解明する上に重要な意義を持つものと考えられる。

以上、本論文は学術博士の学位授与に十分値するものと認める。