Osaka University Knowledge Archive

Title	Purification and Characterization of Endogenous Protein Activator of Human Platelet Proteasome.
Author(s)	湯川, 真生
Citation	大阪大学, 1993, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38546
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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

【 90 】

氏　　名	湯　川　真　生（ゆかわ まさお）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学位記番号	第　11012　号
学位授与年月日	平成 5 年 12 月 15 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文名	Purification and Characterization of Endogenous Protein Activator of Human Platelet Proteasome. **（ヒト血小板プロテアソームに対する内在性アクチベータ蛋白の精製と検討）**
論文審査委員	（主査） 教授　森　武貞 （副査） 教授　祖父江憲治　　教授　岡本　光弘

論文内容の要旨

［目　的］

プロテアソーム（高分子量多機能プロテアーゼ）は真核細胞に存在し，非ライソゾーム系蛋白分解の主役として，細胞内恒常性の維持等の細胞機能に関与することが近年明らかにされつつある。我々は血小板におけるプロテアソームの生理的意義を明らかにする目的でヒト血小板からプロテアソームを精製したが，その際にプロテアソームに対する内在性アクチベータが存在することを発見した。

本研究は，プロテアソームとその内在性アクチベータを血小板細胞質画分より精製し，プロテアソームの 3 つのペプチダーゼ活性に対するアクチベータの影響を酵素学的に検討することにより，内在性アクチベータによるプロテアソームの活性化機序を解析したものである。

［方　法］

＜プロテアソーム及びその内在性アクチベータの精製＞

濃厚血小板30単位（1.2×10^{11}）の細胞質画分より硫安分画（45－75%），ゲル濾過（Sephacryl S300HR），ヘパリンセファロースクロマトラフィー，イオン交換クロマトグラフィー（DEAE MemSep1000）を用いて，プロテアソームを精製した。ヘパリンセファロースの通り抜けフラクションから，DEAE MemSep1000，HPLC（TSKG 3000SW）を用いて，内在性アクチベータを精製した。

＜内在性アクチベータの物理化学的性質の検討＞

精製した内在性アクチベータを56℃でインキュベートして耐熱性を，また pronase CB（pronase 固着ビーズ）とインキュベートしてプロテアーゼ処理の影響を，それぞれ検討した。

＜プロテアソーム及び内在性アクチベータの酵素学的検討＞

蛍光合成基質を用いて，プロテアソームの 3 つのペプチダーゼ活性（キモトリプシン様活性：Suc-LLVY-MCA，トリプシン様活性：Boc-LTR-MCA，ペプチジルグルタミルボンド分解（PGPH）活性：CBz-LLE-2NA）について，精製した内在性アクチベータの存在下，非存在下にキネティクスを検討した。解析は基質濃度－反応速度曲線の

S-v plot, double reciprocal plot, Hill plot によった。

［成　績］

HPLC（TSKG3000SW）においてアクチベータ活性は170kDa にピークを示した。また，SDS-PAGE による検討ではアクチベータ活性に一致する32KDa の蛋白のバンドが認められ，活性のピークのフラクションでは単一バンドが得られた。これを精製アクチベータとして以後の検討に用いた。

精製した内在性アクチベータは56℃30秒のインキュベーションで完全に失活し，pronase CB とのインキュベーションでも50％失活した。

プロテアソームのキモトリプシン様活性は double reciprocal plot で上に凹の曲線を，Hill plot で直線（Hill coefficient＝1.54）を呈し，２つ以上の活性部位間の正の協同性を示したが，アクチベータはこの協同性をなくし，Vmax を上昇させた。アクチベータによる活性化はアクチベータの濃度に依存し，飽和した。トリプシン様活性は Michaelis-Menten の式に従い，アクチベータは Vmax を上昇させ，Km 値を低下させた。PGPH 活性は複雑で既知のキネティクスでは解析できなかったが，アクチベータは低い基質濃度でこれを活性化し，高い基質濃度ではむしろ阻害した。

［総　括］

ヒト血小板よりプロテアソームの内在性アクチベータを精製した。分子量は170kDa で，32kDa のポリペプチドより構成されるマルチマーと考えられ，熱に対して極めて不安定であった。

内在性アクチベータはプロテアソームに結合することによってアロステリックエフェクターとして働くと考えられ，３つのペプチダーゼ活性をすべて活性化することから，細胞内においてプロテアソームの生理的制御因子として機能していると考えられる。

論文審査の結果の要旨

本研究は，プロテアソームの内在性アクチベータを発見してこれを精製し，プロテアソームに対するアクチベータの影響を酵素学的に検討することにより，内在性アクチベータによるプロテアソームの活性化機序を解析したものである。

内在性アクチベータは血小板細胞質画分より発見され，硫安分画（45－75％），ゲル濾過（Sephcryl S300 HR），ヘパリンセファロースクロマトグラフィー，イオン交換クロマトグラフィー（DEAE MemSep1000），HPLC（TSK G3000ＳＷ）を用いて精製された。分子量170kDa で，32kDa のポリペプチドのマルチマーと考えられ，熱に極めて不安定であった。プロテアソーム活性はアクチベータにより濃度依存的に活性化され，飽和することからアクチベータはプロテアソームに直接結合して活性化すると考えられた。プロテアソームは４ケ所の活性部位に３種類のエンドペプチダーゼ活性を持ちアロステリックな活性を示すと報告されているが，本研究ではアクチベータは２つあるペプチジルグルタミルペプチド分解活性部位のうち基質に対する親和性の低いほうの活性部位を塞ぐように結合してプロテアソームのアロステリシティを失わせると考えられ，３種類のエンドペプチダーゼ活性を全て活性化した。

プロテアソームは最近その重要な生理機能がつぎつぎに明らかになっているが，その細胞内での活性制御機構は不明である。従って内在性アクチベータの発見は画期的であり，この活性化機序の解明は今後のプロテアソームの研究に大きく寄与するもので，学位に値する業績と考える。