



Title	Purification, characterization, and amino-acid sequencing of two pancreatic secretory trypsin inhibitors in rat pancreatic juice
Author(s)	宇田, 憲市
Citation	大阪大学, 1994, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/38600">https://hdl.handle.net/11094/38600</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=" <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> ">大阪大学の博士論文について</a>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	宇田憲市
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第11103号
学位授与年月日	平成6年2月25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, characterization, and amino-acid sequencing of two pancreatic secretory trypsin inhibitors in rat pancreatic juice (ラット脾液中における二種の胰分泌性トリプシンインヒビターの精製、性状及びアミノ酸配列の決定)
論文審査委員	(主査)教授 森武貞 (副査)教授 岡本光弘 教授 谷口直之

### 論文内容の要旨

#### <目的>

脾分泌性トリプシンインヒビター(PSTI)は、脾臓房細胞より脾液中に分泌される分子量約6.2KDのKazal型トリプシンインヒビターである。従来、PSTIは脾臓にのみ存在し、その役割は脾内で活性化する微量のトリプシンと結合してその活性を阻害することにあるとされてきた。一方、教室では PSTI測定のためRIA系を確立し、血清 PSTIが急性脾炎、種々の悪性腫瘍、手術、重症外傷、敗血症において急性相反応物質と相關すること、更に、血清 PSTIは脾全摘後でも正常範囲にあり、これに感染等の合併症を引き起こすと血清 PSTIが急性相反応物質の一つとして鋭敏に上昇することを見いだし報告してきた。

本研究は、PSTIが炎症時に急性相反応物質として働き脾外臓器で産生されることを確かめるために、ラット脾液より PSTIを精製し、その生化学的性質とヒト PSTIとの違いを調べることを目的とした。

#### <方法ならびに成績>

##### 1. ラット脾液より PSTI の精製

Wistar系ラットの脾管にカニュレーションを行い脾液を採取し PSTIの存在を確認後、凍結乾燥した。乾燥標品を0.1M酢酸アンモニウム緩衝液(pH 4.0, 2 mM PMSF, 1 mM EDTA)に溶解し、酢酸にてpH 4.0に調整後、10,000×g, 30分間遠心した。その上清を酢酸アンモニウム緩衝液(pH 4.0)にて平衡化した Sephadex G-50カラムでゲル濾過した。trypsin inhibitory assayにて得たトリプシン阻害活性の画分をさらにSP-Sephadex C-50カラムによるイオン交換クロマトグラフィーにかけ、0-0.6M NaCl濃度勾配法にて溶出した。PSTIは0.28M, 0.33M NaCl濃度のところで二峰性に溶出された。それぞれをPSTI-I, PSTI-IIと命名し、PSTI-I, -IIを各々別々に集め、0.1%TFA-acetonitrile系によるreverse phase HPLCにかけ、acetonitrile濃度勾配にて溶出した。PSTI-Iは22%, PSTI-IIは約22%で溶出された。PSTI-Iはさらにreverse phase HPLCにかけ、PSTI-I, PSTI-IIを精製した。

精製したラット PSTIは SephadexG-50ゲル濾過後の PSTI量は67.1mg, 2回 reverse phase HPLC後の PSTI-I量は2.66mgであり、1回 reverse phase HPLC後の PSTI-II量は1.17mgであった。収率は SephadexG-

50ゲル濾過後よりPSTI-Iは22.5%, PSTI-IIのそれは6.9%であった。PSTI-I, -IIの精製倍率はそれぞれの約3千倍と約2千倍であった。

## 2. PSTI-I, PSTI-IIの性質

ラットPSTIはアミノ酸分析よりアミノ酸残基数は61個, 56個より成っていた。PSTI-IのN末端より5アミノ酸残基除くアミノ酸組成では, PSTI-Iと-IIではアミノ酸残基数が40個同じであった(71%)。PSTI-I, PSTI-IIのヒトPSTIとアミノ酸配列の相同性はそれぞれ約60%であった。

酵素阻害活性の検討ではヒト, ウシのキモトリプシン, エラスターーゼ, ヒトのプラスミン, トロンビンに阻害活性を持たず, ヒト, ウシ, ラットのトリプシンに対してのみ阻害活性を示し, その阻害モル比は1:1であった。これらトリプシンに対するKi値はPSTI-I, -IIともほぼ同値であった。ラットPSTI-I, -IIの酵素阻害活性の至適pHは両者とも7.5であった。

### <総括>

1. ラット臍液より, ゲル濾過, イオン交換クロマト, 及びPSTI-Iは2回の, PSTI-IIは1回の逆相高速液体クロマトによってPSTI-I, -IIを精製した。
2. ラット臍液中には従来知られている哺乳動物と異なり, アミノ酸残基数が61個, 56個よりなる二種類のPSTIが存在し, 異なる遺伝子から発現されたペプチドであった。
3. ラットPSTIはヒト, ウシのキモトリプシン, エラスターーゼ, ヒトのプラスミン, トロンビンに阻害活性を持たず, ヒト, ウシ, ラットのトリプシンに対してのみ阻害した。トリプシンに対するKi値はPSTI-I, -IIともほぼ同値であった。
4. ラットPSTI-I, -IIの酵素阻害活性の至適pHは両者とも7.5であった。

## 論文審査の結果の要旨

本論文は, ラット臍液より臍分泌性トリプシンインヒビター(PSTI)を精製し, その生化学的性状, アミノ酸配列を決定したものである。

その結果, 従来より知られている哺乳動物と異なりラット臍液中にはアミノ酸残基数が61個と56個から成る二種のPSTIが存在し, 異なる遺伝子の産物であることを明かとした。

二種のPSTIはヒトPSTIと同様, トリプシンにのみ阻害活性を示しそのKi値は両者ともほぼ同じであった。また, 二種のPSTIのアミノ酸配列より, 両者間の相同性は約70%であり, ヒトPSTIとの相同性は約65%であった。

急性相反応物質としてのヒトPSTIの生理的機能を解明する上で重要な知見を得たもので, 学位論文として価値のあるものと認める。