

氏名	鈴木 幸雄 すずき ゆきお
学位の種類	医学博士
学位記番号	医博第509号
学位授与の日付	昭和53年11月24日
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当
研究科・専攻	医学研究科内科系専攻
学位論文題目	腹腔マクロファージ細胞内の中性プロテアーゼ及び阻害物質の研究

論文調査委員 (主査) 教授 早石 修 教授 大島 駿作 教授 村地 孝

論文内容の要旨

マクロファージは生体内で異物を貪食し消化する機能を有し、また免疫・炎症のような生体防衛反応にも関与することが知られている。マクロファージのこのような生物学的役割から、この細胞に特異的な細胞内プロテアーゼの存在が予想される。しかしマクロファージを高純度かつ生化学的研究に供する程度の量を得ることが困難なため、この分野の研究は遅れている。著者はラット腹腔マクロファージを用い細胞内にキモトリプシン様中性プロテアーゼ及びこの酵素に特異的なインヒビターが存在することを見出し、これらの細胞内局在を明らかにすると共に、両者の部分精製を行ない、性質を調べた。

1. ラット腹腔に0.1%グリコーゲンを投与し4日後、腹腔に浸出した細胞を採取した。細胞は凍結融解を6回繰り返して破壊した。これを超遠心し、その残渣を1M KClによって抽出を行なうことにより水抽出、KCl抽出及び残渣画分に分別した。凍結融解液中の中性プロテアーゼ活性の約50%がKCl抽出画分に回収されたが、カテプシンD活性はこの画分にはほとんど回収されなかった。本酵素のカゼイン及び尿素変性ヘモグロン基質に対する至適pHは8.5であった。活性はDFP、キモスタチンによって強く、HgCl₂、PCMBによって部分的に阻害された。EDTA、ロイペプチン、アンチパイン、ペプスタチンでは阻害されなかった。

2. 本酵素は0.25MのKCl、KBr、KI、NaCl、NaBr、NaI、MgCl₂によってほぼ同程度に活性化された。この活性化が塩によるインヒビターの解離に起因するかどうかを調べる目的で酵素標品を1M KCl存在下でSephadex G-75カラムを用いてゲル濾過した。その結果、分子量約26,000の流出位置に活性のほとんどが回収され、280nmの吸収はほとんど高分子画分(分子量75,000以上)に回収された。分離した酵素画分の活性はもはや塩の添加によって増強されず、一方、塩を添加しない活性測定系で、この酵素活性は分離した高分子画分によって阻害された。高分子画分はトリプシン、パピインの活性を阻害しなかったが、キモトリプシンを部分的に阻害した。

3. マクロファージを0.5%トリトンX-100を含む0.25Mショ糖液中でホモゲナイズし、遠心分離

することにより核画分と核以外の細胞成分に分画した。その結果、本プロテアーゼ活性は核画分にほとんど回収され、この画分の活性は塩によって活性化された。さらにこの核画分から得たクロマチン画分についても同様の結果が得られた。これらの結果から本プロテアーゼ及び阻害物質は共にクロマチンに局在する考えられる。

4. 上記のクロマチン画分を 2M NaCl と 5 M 尿素存在下でヒドロキシアパタイトゲルカラムにかけ、酵素とインヒビターを分離した。この阻害物質画分をプロナーゼ消化とフェノール抽出によって蛋白質を除去してもその阻害能は変化しなかった。除蛋白後の画分の UV 吸収比 (A_{280}/A_{260}) は 0.61 を示した。

除蛋白後の阻害物質画分を種々のヌクレアーゼ (DNase 1, ヌクレアーゼ P 1, 蛇毒ホスホジエステラーゼ) 消化したが阻害能は変化しなかった、しかしウシ由来のポリ (ADP-リボース) グリコヒドロラーゼとインキュベートするとその阻害能は著しく低下した。牛胸腺核由来のポリ (ADP-リボース) (平均重合度30) は、マクロファージクロマチンより分離した中性プロテアーゼ活性を有意の程度に阻害した。このような阻害は DNA 一重鎖 DNA, RNA, ポリ(A), ポリ(U), ポリ(C), ADP-リボース (単量体) では認められなかった。

以上の結果は、ラット腹腔マクロファージのクロマチンにはキモトリプシン様中性プロテアーゼが結合し、この内因性の酵素に特異的なポリ (ADP-リボース) 様阻害物質が酵素と共に結合して存在することを示している。これらの知見はこのプロテアーゼがクロマチン蛋白質を分解する役割を担い、阻害物質はこれを制御する因子であることを示唆している。

論文審査の結果の要旨

マクロファージの示す特異な機能の生化学的側面を研究する目的で、細胞内プロテアーゼに関する研究を行い、次の知見を得た。

1. ラット腹腔に0.1%グリコーゲンを投与し4日後腹腔に浸出したマクロファージ細胞から、その1M KCl 抽出画分として、pH 8.5 に至適 pH を持つキモトリプシン様プロテアーゼを部分精製した。

2. 精製の過程で、本酵素が未知の阻害物質と結合して存在すること、及び、両者の結合は中性塩の存在下で解離し、ゲル漏過により互いに分別しうることを知った。

3. プロテアーゼ及びその特異的阻害物質は、マクロファージ細胞の核、特に、クロマチン画分に局在することを確かめた。

4. クロマチンより部分精製した阻害物質は、その紫外吸収特性、諸種の分解酵素に対する感受性、及び既知類縁物質添加試験等の結果から、ヌクレオチド様化合物、特に、ポリ (ADP リボース) 近縁物質であると推定した。

以上の結果は、マクロファージのクロマチンにプロテアーゼとそれに特異的な内因性阻害物質が共存するという生体制御機構上極めて興味ある新知見を明らかにしたもので、

本論文は医学博士の学位論文として価値あるものと認める。