

## 脳 Ca 依存性中性プロテアーゼの研究

京都大学医学部脳神経外科学教室 (主任 半田 肇教授)

西 浦 巖

〔原稿受付：昭和53年7月27日〕

### Studies on a $\text{Ca}^{2+}$ -dependent Neutral Protease in Brain

IWAO NISHIURA

Department of Neurosurgery, Faculty of Medicine, Kyoto University  
(Director : Prof. Dr. HAJIME HANDA)

Intracellular neutral and acid protease activities in normal brain and brain tumors were measured. As compared with normal brain tissues, the malignant glioma tissue showed 2- to 8-fold increase in specific activity of  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent neutral protease. We partially purified this protease from rat brain and found that it required for the activity  $\text{Ca}^{2+}$  absolutely and cysteine obligatorily.  $\text{Sr}^{2+}$  and  $\text{Mn}^{2+}$  were 64% and 20% as effective as  $\text{Ca}^{2+}$ , but other cations including  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  had no effect. The  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent neutral protease showed a molecular weight of  $8.4 \times 10^4$ . The pH optimum of the protease was 7.5 to 8.0. The  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent protease converted an inactive protein kinase M in the brain to an active protein kinase M. On the other hand, S-100 protein, a brain specific acidic protein, inhibited this protease activity. These results suggest that the  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent neutral protease, S-100 protein and protein kinase M have a close relation with one another. The  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent neutral protease was inhibited by leupeptin, an exogeneous actinomycete protease inhibitor. Leupeptin was then found to inhibit very strongly the cell growth of G203 glioma *in vitro*, suggesting that leupeptin could be used for a therapeutic purpose. Recently we found another endogeneous inhibitor of  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent neutral protease which is different from S-100 protein in its mechanism of inhibition. Further exploration is necessary to elucidate the precise role of this  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent protease and its inhibitors in biological system.

#### I. 結 言

最近、細胞内プロテアーゼが生体内代謝や種々の生

命現象に重要な役割を果していると考えられるようになった。脳の酸性および中性プロテアーゼの存在はすでに報告されている<sup>15)20)</sup>。一方、プロテアーゼが悪性

Key words :  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent neutral protease, Glioma, Protein kinase, S-100 protein, Protease inhibitor  
Present address : Department of Neurosurgery, Faculty of Medicine, Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto 606, Japan.

腫瘍の侵襲機構に重要な役割を果していると言われてい。すなわち、腫瘍細胞の転移や浸潤がカテプシン B または D あるいは中性プロテアーゼによって促進されるということが示唆されている<sup>12)28)</sup>。

脳腫瘍と正常脳組織とのプロテアーゼの pH 依存曲線を比較したところ、pH 6~9 の比活性変化と腫瘍の悪性度との緊密な関連性を示唆する結果をえた。そこで pH 8 に至適 pH を有する Ca 依存性プロテアーゼに研究の主眼を置いて本研究を行った。最近になって本プロテアーゼはサイクリックヌクレオチド非依存性の蛋白質リン酸化酵素と密接な関係を有することが明らかにされた<sup>9)</sup>。本論文では(1)種々の脳腫瘍におけるこのプロテアーゼの活性変化を調べ、(2)本酵素を部分精製し、(3)部分精製プロテアーゼと脳特異蛋白である S-100 蛋白<sup>16)</sup> との関係、(4)放線菌由来の外來性プロテアーゼインヒビター、ロイペプチン<sup>2)</sup> の本酵素に対する作用、(5) glioma 細胞の増殖とロイペプチンによる増殖抑制、(6)本プロテアーゼと内在性インヒビターとの関係について実験的研究を行った。

## I. 実験材料ならびに実験方法

### 1. 材料

マウス脳、ラット脳、G203 glioma および手術時摘出脳腫瘍を酵素源として用いた。摘出組織を3倍量の 0.25M 蔗糖、5mM の EGTA (ethylene glycol bis ( $\beta$ -amino-ethyl ether)-N, N, N', N'-tetraacetic acid) および 5mM の 2-メルカプトエタノールを含む 20mM トリス・塩酸緩衝液 (pH 7.5) でホモジェナイズした。ホモジェネートを 105,000g 60分間超遠心後、その上清を用いて酵素活性を測定した。ウシヘモグロビン、カゼインは Merck 社製品を、大豆トリプシンインヒビター (lot-94c-8190)、ウシ酸化インシュリン B 鎖およびウマ骨格筋ミオグロビンは Sigma 社製品を用いた。キモスタチン、ロイペプチン、アンチパイニン、ペプスタチンは微生物化学研究所より恵与された<sup>2)</sup>。抗 S-100 蛋白ウサギ抗血清は Rönnebäck 博士より恵与された。他の材料は市販品を購入して用いた。

### 2. 酵素活性測定法

中性領域の蛋白分解酵素活性はカゼインを基質として Kunitz<sup>13)</sup> の変法を用いて測定した。1% 基質、5mM 塩化カルシウム、10mM システインと 0.5ml の酵素液を含む反応液 (全量 1.6ml) を 37°C、30分温置

後トリクロロ酢酸 (終濃度 2.33%) を加えて反応を停止した。濾液の吸光度を Ross ら<sup>23)</sup> の Lowry 変法を用いて測定した。すなわち濾液上清 0.2ml に試薬を加えて全量 3.25ml にした後、750nm の吸光度増加を測定した。酵素反応の対照として塩化カルシウム無添加のものを用いた。なお、酸性領域の蛋白分解酵素活性の測定には、アルカリ、尿素変性ヘモグロビンを基質として用いた<sup>1)</sup>。

蛋白質の定量はウシ血清アルブミンを標準液として用い、Lowry ら<sup>14)</sup> の方法に従って測定した。

### 3. G 203 glioma およびその培養細胞

G203 glioma<sup>10)</sup> は群馬大学病理学教室より恵与されたものを継代皮下移植して用いた。G203 glioma 組織をトリプシン処理後 20% 仔牛血清を含む Eagle 培地で培養して得た細胞を用いた。

### 4. 蛋白質リン酸化酵素活性測定法

蛋白質リン酸化酵素活性は井上ら<sup>8)</sup> の方法に従い仔牛胸腺ヒストン中への <sup>32</sup>P の取込み量で測定した。

## III. 実験結果と考察

### 1. 正常ラット脳プロテアーゼ活性の pH 依存性

尿素変性ヘモグロビン水解活性で示された酸性領域の pH 依存曲線は pH 4.5 に最大活性を示した (第 1 図 A)。この活性は酸性プロテアーゼの特異的インヒビター、ペプスタチン (0.1mg/ml) を加えることによりほぼ完全に抑制された。このことは酸性領域の大部分の酵素活性がカテプシン D または E に由来することを示している。一方、中性領域のカゼイン水解活性は第 1 図 B に示すように、pH 8 に肩が見られたが、この pH 8 活性はペプスタチン存在下での測定によってその存在が一層明らかにされた。ヘモグロビン水解活性と同様に pH 7 以下におけるカゼイン水解活性はペプスタチンによって抑制されることからカテプシン D または E によるものと考えられた。以上により pH 8 に至適 pH を有する中性プロテアーゼの存在を認めた。この活性はカルシウムおよびシステインを活性化因子として必要とすることが以下で明らかとされた。

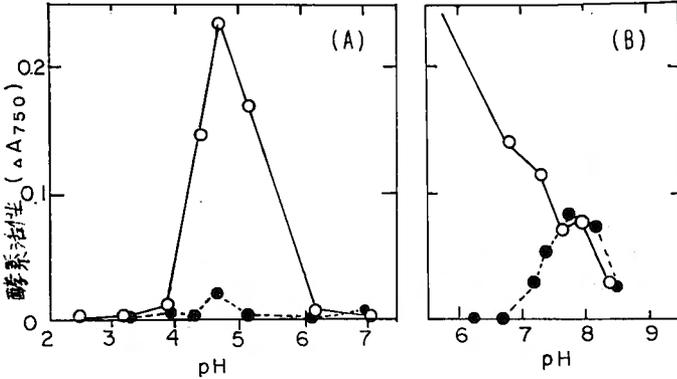
すでにいくつかの酸性および中性プロテアーゼの報告<sup>15)20)</sup>が見られるが、本研究では上述の如くラット脳ホモジェネートを用い、ペプスタチンの適用を含むより簡便な方法でこの存在を再確認することができた。

### 2. 脳腫瘍プロテアーゼの pH 依存性

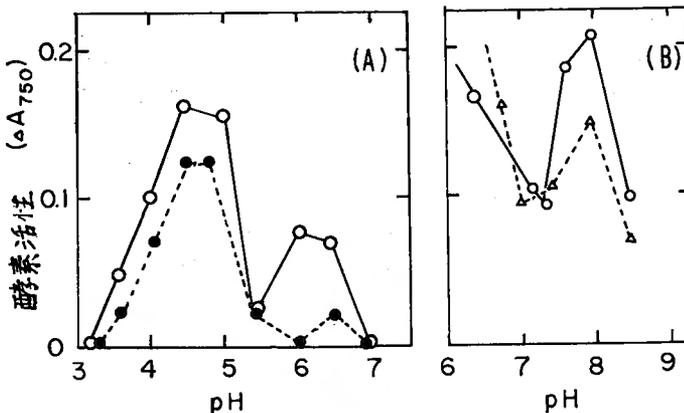
正常マウス脳でみられたのと同様に G203 glioma

の酸性領域至適 pH は 4.5 にあった (第 2 図 A)。この他に正常脳で認められないもう 1 つ別の酵素活性が pH 6.0 に認められた。カルシウムとシステイン存在下での中性領域の酵素活性は正常脳と同様に pH 8.0 に最大値をもって現われた (第 2 図 B)。glioma のこの Ca 依存性中性プロテアーゼの比活性は正常脳の 2

～3 倍高かった (データ提示せず)。類似の pH 曲線はヒトの glioma でも見られた (第 2 図 B)。pH 6.0 活性の出現と、高い pH 8.0 活性の存在が脳腫瘍に特徴的な性質と考えられたので、種々の程度の悪性度をもったヒト脳 glioma のこれらの酵素活性を比較することとした。



第 1 図 正常脳プロテアーゼの pH 依存性。基質として尿素変性ヘモグロビン (A) とカゼイン (B) を用いた。プロテアーゼ活性は 0.1 mg/ml ペプスタチン存在下 (●) と非存在下 (○) で測定した。中性領域 (B) では反応液中に 5 mM 塩化カルシウムと 10 mM システインを含む。酵素活性測定のため 105,000g 上清の 0.5 ml を用いた。酢酸ナトリウム緩衝液 pH 3.0～6.5, リン酸カリウム緩衝液 pH 5.8～7.0, トリス塩酸緩衝液 pH 7.0～8.8 を用いた。



第 2 図 G 203 glioma プロテアーゼの pH 依存性。基質として尿素変性ヘモグロビン (A) とカゼイン (B) を用いた。プロテアーゼ活性は酸性領域 (A) では 5 mM システイン存在下で、中性 pH 領域 (B) では 5 mM 塩化カルシウムと 10 mM システイン存在下で測定した。(○) マウス glioma, (●) マウス脳, (△) ヒト glioma。酵素活性測定のため 105,000g 上清の 0.5 ml を用いた。用いた緩衝液は第 1 図と同じである。

### 3. ヒト glioma のプロテアーゼ活性

ヒト脳腫瘍 20 例の pH 4.5, 6.0, 8.0 のプロテアーゼ活性を比較した (第 I 表)。pH 4.5 の比活性は症例によりかなりの変動がみられた。脳腫瘍におけるリソゾーム諸酵素活性、たとえば  $\beta$ -グルクロニダーゼや酸性ホスファターゼ活性は悪性度が進むにつれて上昇すると報告されている<sup>26)</sup>。しかし、リソゾーム酵素の 1 つとして知られている酸性プロテアーゼ活性と悪性度との間に明確な関連は見出し得なかった。pH 6.0 活性は大部分の症例で非常に低いか全く認められなかったが glioblastoma のいくつかの症例で活性の存在を認めた。このプロテアーゼの詳細な特徴は目下検討中である。脳腫瘍の pH 8.0 プロテアーゼの比活性は正常脳のほぼ 2～8 倍高かった。とくに glioblastoma の大部分の症例で pH 8 活性は明らかに高値であった。

第 1 表の結果に示された如く、3 つの異なる pH でのプロテアーゼ活性のうち、最もよく腫瘍の悪性度と関連していると考えられたのは pH 8.0 活性であった。それ故、この pH 8 の中性プロテアーゼを部分精製し、その特徴を調べた。

### 4. 中性プロテアーゼの部分精製

実験材料と方法で述べたように 20g のラット脳から 105,000g 上清分画 62 ml (564 mg 蛋白) を得た。この画分を 5 mM の 2-メルカプトエタノールと 5 mM の EGTA を含む 20 mM トリス塩酸緩衝液で平衡化させた DE-52 カラム (3.3 × 10 cm) にか

第1表 ヒト glioma のプロテアーゼ活性

症例番号	名 前	組 織 所 見	比 活 性 <sup>a</sup>		
			pH 4.5	pH 6.0	pH 8.0
1	K. Y.	Glioblastoma	27.7	10.4	51.8
2	S. T.	Glioblastoma	6.0	0	27.6
3	K. H.	Glioblastoma	5.1	0	27.5
4	M. Y.	Glioblastoma	0	4.0	31.8
5	F. S.	Glioblastoma	17.0	11.6	10.7
6	I. A.	Glioblastoma	5.6	3.7	10.7
7	S. F.	Glioblastoma	31.1	0	11.1
8	H. N.	Glioblastoma	12.4	5.7	19.0
9	H. O.	Glioblastoma	7.1	4.3	10.2
10	K. F.	Glioblastoma	12.0	2.7	12.7
11	K. S.	Glioblastoma	14.3	0	23.2
12	A. K.	Oligodendroglioma	0	0	51.6
13	N. M.	Oligodendroglioma	11.7	0	15.3
14	M. K.	Astrocytoma	7.5	0	6.1
15	S. I.	Astrocytoma	51.3	0	0
16	M. N.	Astrocytoma	3.2	0	38.9
17	H. A.	Astorocytoma	0	0	12.1
18	H. O.	Astrocytoma	0	1.7	14.4
19	N. K.	Astrocytoma	1.8	0	2.6
20	K. T.	Astrocytoma	26.5	0	7.2
対 照		Normal brain <sup>b</sup>	5.4	0	5.9

<sup>a</sup> 比活性は (A750nm/mg 蛋白/ml/30分)×10<sup>3</sup>でもって表わした。

<sup>b</sup> 3 症例の平均

け、未吸着部分を溶出後、このカラムを0.2M 塩化ナトリウムを含む500mlの上記緩衝液、0.25M 塩化ナトリウムを含む300mlの緩衝液および0.5M 塩化ナトリウムを含む500mlの緩衝液で段階的に溶出した。得られた溶出曲線を第3図に示す。0.25M塩化ナトリウムによって溶出されたプロテアーゼ活性画分を集めて2ml (28mg) に濃縮後、緩衝液であらかじめ平衡化した Sephadex G-200 カラム (1.6×90cm) にかけた。

15ml/h の流速で溶出させ、1.5ml 各分画を集めた。得られた結果を第4図に示す。分画番号40番から56番迄を集めて以下のプロテアーゼ活性測定に用いた。このようにして得られたプロテアーゼ(7mg蛋白)は315倍の精製度を示した(第2表)。105,000g 上清中の活性回収が100%以上に上昇したのはインヒビターの解離によるものかも知れない(下記参照)。

#### 5. Ca 依存性中性プロテアーゼの諸性質

第2表 Ca 依存性中性プロテアーゼの精製

画 分	容 量 (ml)	総蛋白量 (mg)	比活性 <sup>a</sup>	総活性 (×10 <sup>-3</sup> )	回収率 (%)	精製度
ホモジェネート	80	2907	3.8	11.0	100	1
上 清	62	564	23.0	13.0	117	6.1
沈 澱	60	2326	1.4	3.26	20.5	0.4
DEAE-cellulose	70	28	309	8.66	78.4	81.4
Sephadex G-200	26	7	1196	8.37	75.8	315

<sup>a</sup> 比活性は第1表と同じ方法で表わした。

部分精製された中性プロテアーゼに対するカルシウムとシステイン濃度の影響を調べた。カルシウムが存在しない場合酵素活性は全くなかったが、カルシウム添加によって活性が現われ、5mM の塩化カルシ

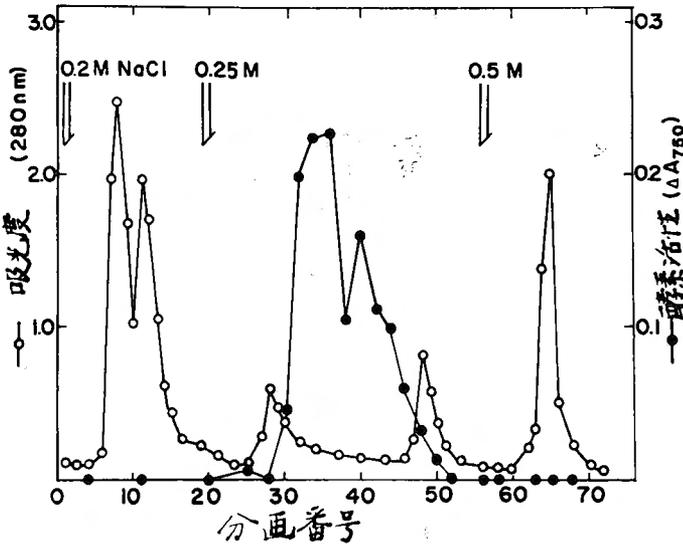
ウムを加えた時最も高い活性を示した(第5図A) 5mM 塩化カルシウム存在下の活性は、10mM システイン添加によって、さらに2~3倍上昇した。しかし一方、カルシウム非存在下でのシステイン濃度は活性

に全く影響を与えなかった(第5図B)。脳中性プロテアーゼのカルシウムとシステイン濃度依存性を最初に報告したのは Guroff<sup>6)</sup> であるが、本研究ではラット脳部分精製プロテアーゼを使って彼の実験結果を再確認すると共に、この酵素活性発現にカルシウムは不可欠でありシステインは補足的に働くことを示した。

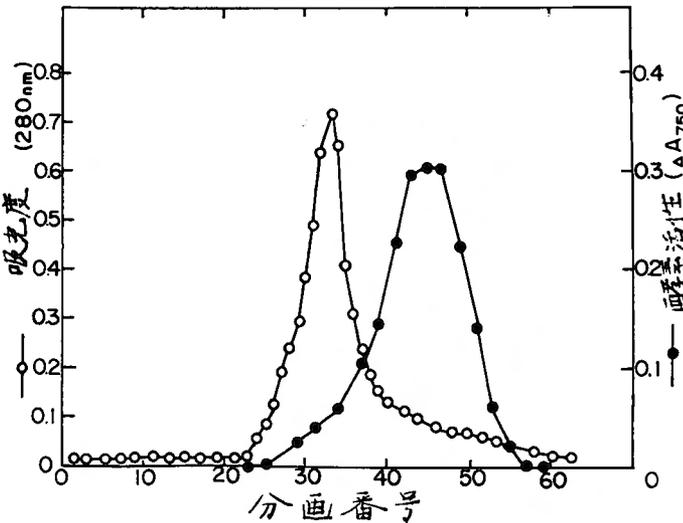
部分精製酵素はカゼインを非常によく水解し、酸化インシュリンB鎖およびミオグロビンを中等度に水解した。しかし尿素変性ヘモグロビン、ウシ血清アルブミンや  $\alpha$ -N-ベンゾイル-L-アルギニン-エチルエステル、N-ベンゾイル-L-チロシン-エチルエステル、N-アセチル-L-チロシン-エチルエステル、 $\alpha$ -N-ベンゾイル-DL-アルギニン-p-ニトロアニリドのような合成基質を水解しなかった(第3表)。これらの結果は Guroff が得た結果とよく一致している。

第4表に示したように、これまで調べた二価イオンのなかでカルシウムが最も有効であった。ストロンチウムとマンガンは次に有効であったが、他の金属イオンは全く無効であった。したがってこのプロテアーゼを Ca 依存性プロテアーゼと呼んでもよいと考えられた。

部分精製酵素の至適 pH は 7.5-8.0 にあり、Sephadex G200 ゲル濾過(第4図)よりおよその分子量が 84,000 と推定された。この値は普通の分泌性プロテアーゼ、たとえばトリプシン、キモトリプシンなどの分子量と比較して非常に大きい。しかしながら、他の組織、たとえば筋



第3図 DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーによる Ca 依存性中性プロテアーゼの精製。詳細な実験条件は本文中に記述した。各分画から 0.5ml を採取してそのプロテアーゼ活性を測定した。



第4図 Sephadex G-200ゲル濾過による Ca 依存性プロテアーゼの精製。詳細な実験条件は本文中に記述した。各分画から 0.5ml を採取してその Ca 依存性プロテアーゼ活性を測定した。

第3表 Ca依存性プロテアーゼによる種々の基質の水解

基 質	濃度	相対活性 <sup>a</sup> (%)
カゼイン	1%	100
ヘモグロビン	1%	1
ミオグロビン	1%	28
ウシ血清アルブミン	1%	0
酸化インシュリンB鎖	1%	51
$\alpha$ -N-ベンゾイル-L-アルギニン-エチルエステル <sup>b</sup>	7mM	0
N-ベンゾイル-L-チロシンエチルエステル <sup>b</sup>	0.7mM	0
N-アセチル-L-チロシンエチルエステル <sup>b</sup>	7mM	0
$\alpha$ -N-ベンゾイル-DL-アルギニン-p-ニトロアニリド <sup>c</sup>	1mM	0

a 活性測定に試験管当たり 50 $\mu$ g の部分精製酵素を用いた。

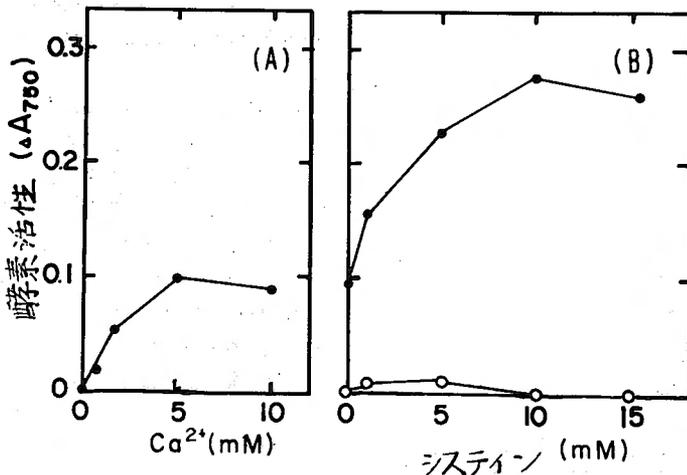
b 活性は Radiometer TTT 60型 pH スタットを用いて測定した。

c 基質から遊離されるp-ニトロアニリンを分光光度計を用いて 410nm で測定した。

肉<sup>4)</sup>、肝臓<sup>29)</sup>、子宮<sup>22)</sup>のCa依存性中性プロテアーゼの分子量が7-10 $\times$ 10<sup>4</sup>と報告されていることから分子量の大きいことはこの種のプロテアーゼに共通の特徴と考えられる。

最近、種々の組織のCa依存性中性プロテアーゼが重要な生理的意義を持っていると考えられるようになった。すなわち Drummondら<sup>4)</sup>はこの酵素がグリコーゲンリン酸化酵素の前駆体を活性化することを証明した。また、本プロテアーゼによって得られた活性化型蛋白質リン酸化M酵素はヒストンやプロタミンをリン

酸化するので<sup>8)</sup>、このプロテアーゼは遺伝情報発現機構の調節に重要な役割を持っていると考えられるようになった。そこで我々の得たCa依存性プロテアーゼ(G-200画分)が非活性化型の蛋白質リン酸化M酵素前駆体を活性化型蛋白質リン酸化酵素に転換することができるかどうか調べてみた。その結果を第5表に示す。蛋白質リン酸化M酵素前駆体の活性化酵素として、井上らにより若干異なった手順を経て分離された酵素と本研究で得た酵素とが同程度の比活性を示すことが明らかとなった。



第5図 プロテアーゼ活性に対するカルシウムとシステインの濃度の影響。プロテアーゼ活性は(A)システイン非存在下、または、(B)5mM塩化カルシウム存在下(●)と非存在下(O)で測定した。活性測定には部分精製酵素(試験管当たり50 $\mu$ g蛋白)を用いた。

#### 6. S-100蛋白によるCa依存性プロテアーゼの抑制

S-100蛋白は Moorら<sup>16)</sup>の変法にしたがって硫安分画、DEAE-Sephadex A-50 クロマトグラフィー、Sephadex G-100 ゲル透過により精製した。精製S-100蛋白の均一性は7.5%ポリアクリルアミドゲル電気泳動<sup>3)</sup>とウサギ抗S-100抗体に対する二重拡散法<sup>21)</sup>を用いて調べた結果、一応満足すべきものであることを知った。(第6, 7図)。

第8図Aに示すように最高のプロテアーゼ活性を示すために5mM以上のカルシウム濃度が必要であった。各試験管に15 $\mu$ gのS-100蛋白を添加するとこのカルシウム濃度依存曲線は右方へ平行移動した。このことはS-100蛋白が溶液中の有効カル

第4表 中性プロテアーゼ活性に対する二価陽イオンの影響

添加物	相対活性 <sup>a</sup>
CaCl <sub>2</sub>	100
SrCl <sub>2</sub>	64
MnCl <sub>2</sub>	20
CuCl <sub>2</sub>	0
BaCl <sub>2</sub>	0
MgCl <sub>2</sub>	0
ZnCl <sub>2</sub>	0
CoCl <sub>2</sub>	0
CdCl <sub>2</sub>	0

<sup>a</sup> 反応は5mM 二価陽イオンと10mM システイン存在下で行った。活性測定のため部分精製酵素(試験管当り 50μg)を用いた。カルシウム存在下の活性を100%とした。

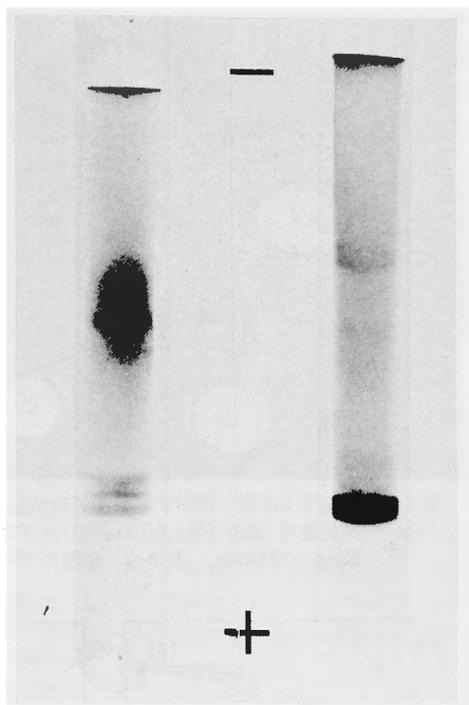
第5表 Ca 依存性プロテアーゼによる蛋白質リン酸化M酵素前駆体の活性化

プロテアーゼ	蛋白質リン酸化酵素活性 <sup>a</sup>	
	CaCl <sub>2</sub> (-)	CaCl <sub>2</sub> (+)
	cpm	cpm
0	1321	1352
20μg	1212	18554
10μg <sup>b</sup>	1300	8034

<sup>a</sup> ラット脳の蛋白質リン酸化M酵素の前駆体から活性化型蛋白質リン酸化M酵素への転換は受容体を[r-<sup>32</sup>P]ATP, 供与体をヒストンとしたリン酸化反応によって測定した。

<sup>b</sup> 神戸大学医学部第2生化学教室で調製された酵素標品。

シウム濃度を減少させたことを示している。第5図Bに示すように、3mM カルシウム存在下でのプロテアーゼ活性はS-100蛋白の濃度上昇と共に抑制された。脳特異的酸性蛋白の役割はまだ明らかにされていないが、Haglid ら<sup>7)</sup>はグリオプラストーマ中のS-100蛋白は非常に少ないと報告している。Ca 依存性中性プロテアーゼ活性は悪性gliomaで上昇しており(第1表)、又この活性はS-100蛋白により抑制される(第8図)。これら2つの結果がHaglid らの実験結果と直接関連があるかどうか更に研究を進めなければならない。しかし現在迄に得られた実験データから、正常であろうと悪性であろうと、脳組織中のCa 依存性プロテアーゼ、S-100蛋白と蛋白質リン酸化酵素系とは互いに密



第6図 7.5%ゲル(pH 8.5)のポリアクリルアミドゲル電気泳動。(A)はウシ脳ホモジネート、(B)は精製S-100蛋白のゲルを示す。蛋白はCoomassie Brilliant Blueで染色した。矢印はBromophenol-blueの泳動位置を示す。用いた蛋白量はゲル1本当りおよそ100μgである。

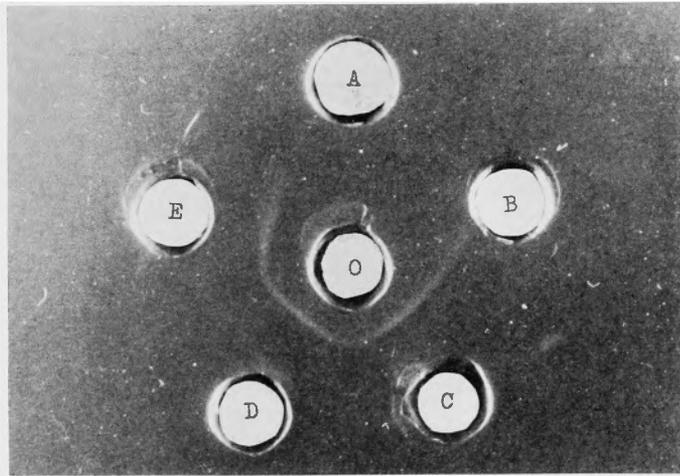
接な関連を持っている可能性を指摘したい。

7. 中性プロテアーゼ活性に対する種々のインヒビターの影響

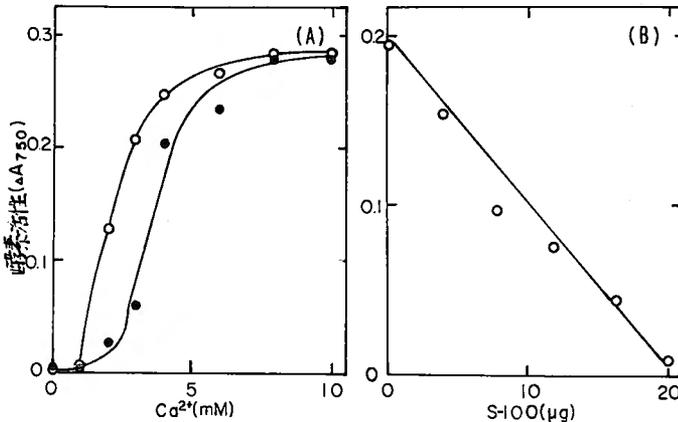
4種類の放線菌由来のプロテアーゼインヒビターの影響をみたところCa 依存性中性プロテアーゼ活性はロイペプチンによって最も強く抑制された(第6表)多くの細胞内中性プロテアーゼはキモスタチンに感受性があるということが知られているのに比べて<sup>9)27)</sup>、脳のCa 依存性プロテアーゼはロイペプチンに感受性が高いという点で他のプロテアーゼと異なる。チオールプロテアーゼ活性を抑制するPCMB(p-chloromercuribenzoate)やモノヨード酢酸もまたこの中性活性を抑制した。

8. ロイペプチンによるG203 glioma 細胞増殖の抑制

腫瘍中のプロテアーゼが組織間液に流出し腫瘍の浸潤および成長を促進するという報告<sup>28)</sup>があり、一方ブ



第7図 精製 S-100 蛋白に対する免疫拡散試験. 抗 S-100 蛋白ウサギ抗血清 10 $\mu$ g (O); S-100 蛋白(A)128 $\mu$ g, (B)64 $\mu$ g, (C)32 $\mu$ g, (D)16 $\mu$ g, (E)8 $\mu$ g, 室温にて24時間放置した.



第8図 Ca 依存性プロテアーゼに対するS-100蛋白の影響. プロテアーゼ活性は (A) S-100 蛋白15 $\mu$ g 存在下 (●) と非存在下 (○), または, (B) 塩化カルシウム 3 mM 存在下で測定した. 用いた酵素は第5図と同じである.

ロテアーゼインヒビターが腫瘍の増殖を抑制するという報告<sup>24)</sup>もある。そこで本研究では G203 glioma の培養細胞がロイペプチンによってどのような影響を受けるかを調べた。G203 glioma 培養細胞の正常増殖曲線は第9図に示すように5日目までに最大に達した。ロイペプチンを培養開始2日後に添加すると成長は強く抑制された。ロイペプチン投与量を増やすとそれだけ強く培養細胞の増殖は抑制され、50 $\mu$ g/ml ではま60%抑制された。

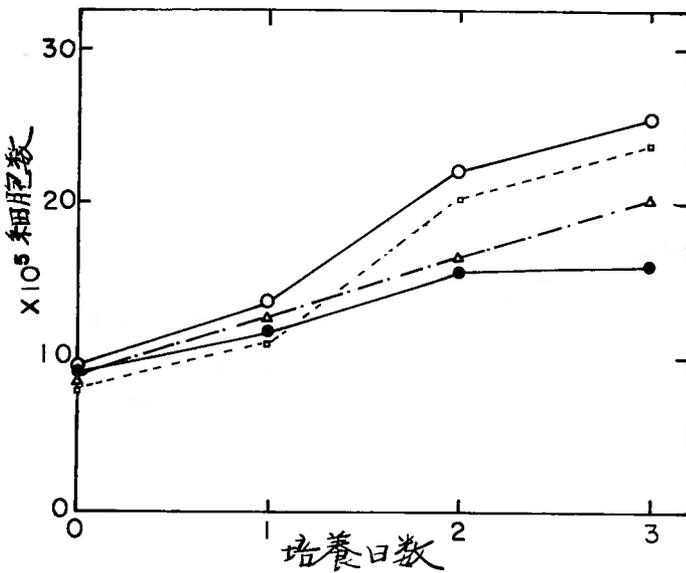
Schnebliら<sup>24)</sup>はトラジロールが変形細胞の増殖を抑制することを示唆した。これに比べてロイペプチンは抗原性の低い低分子量のペプチドなので、腫瘍細胞中で上昇したプロテアーゼ活性に対するロイペプチンの抑制効果から考えてみても、ある種の腫瘍の治療にロイペプチンを用いる可能性を検討することは有意義であると思われる。

### 9. Ca 依存性中性プロテアーゼインヒビターの存在と性質

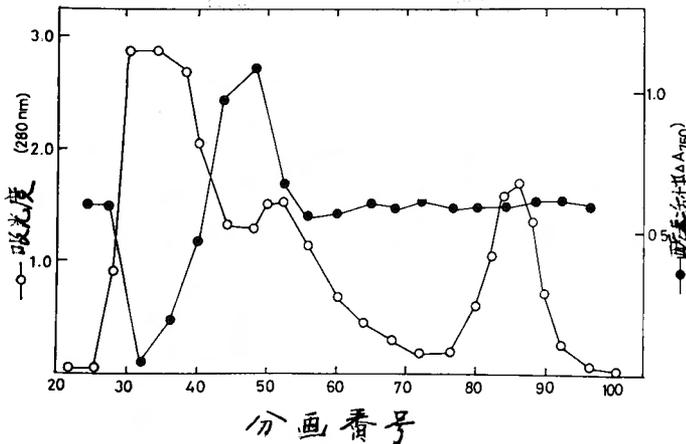
S-100蛋白による Ca 依存性中性プロテアーゼの抑制効果は S-100 蛋白とカルシウムとの結合に起因するものと考えられた (第8図)。一方多くの場合、プロテアーゼ活性はその特異的インヒビターと結合することによって調節されていると考えられている<sup>5)</sup> ところから、S-100 蛋白と異なった Ca 依存性中性プロテアーゼのインヒビターがラット脳内にあるかどうか調べた。

ラット脳105,000g 上清画分100ml (1020mg 蛋白) を Amicon PM-10 膜で濃縮後、5mM システインを含む 20mM トリス塩酸緩衝液で平衡化した Sephadex G200 カラム (3 $\times$ 100 cm) にかけた。同緩衝液の流速は 15ml/h で溶出させ 6ml 分画を集めた。それぞれの画分から 0.5ml をとり、別にえた部分精製 Ca 依存性中性プロテアーゼ溶液 50 $\mu$ l (1 mg 蛋白/ml) に加えた。5分間 37 $^{\circ}$ C 加温後、

カルシウムとシステインを含むカゼイン溶液 1.1ml を加えて酵素反応を開始した。以下の酵素活性測定法は材料と方法で述べた如く行った。第10図は得られた典型的溶出曲線を示している。添加プロテアーゼ活性値以上のプロテアーゼ活性の増加が分画番号 40~55 にみられ、第4図に示したのと同じ位置に溶出された。これに比べて、分画番号 25~40 の共存下でのプロテアーゼ活性は添加プロテアーゼ活性よりも低く、図ではゲルカラムの空間容量の位置に大きな陰性ピークを与え



第9図 G203 glioma の細胞増殖に対するロイペプチンの影響. 1シャーレ当たり  $6 \times 10^5$  の細胞を培養し, ロイペプチンは2日後に添加した. 1シャーレ当たりのロイペプチン濃度は, (○)  $0 \mu\text{g/ml}$ , (□)  $8 \mu\text{g/ml}$ , (△)  $20 \mu\text{g/ml}$ , (●)  $50 \mu\text{g/ml}$ .



第10図 Sephadex G-200 ゲル濾過による Ca 依存性中性プロテアーゼとそのインヒビターの分離. 詳細な実験条件は本文中に記述した. 部分精製酵素 (試験管当たり  $50 \mu\text{g}$  蛋白) を活性測定に用いた. 阻害活性は各分画から  $0.5 \text{ ml}$  を採取して測定した.

る結果となった. この結果は Ca 依存性プロテアーゼと分離可能で, かつ分子量の大きな内在性の脳内インヒビターの存在を示している.

インヒビター画分を集め限外濾過によって  $70 \text{ ml}$  (45

$\text{mg}$  蛋白/ml) に濃縮した. このインヒビターの特質をとくに3つの観点から調べる目的で以下の実験を行なった. (1)この阻害現象が  $\alpha_2$ -マクログロブリンのような高分子量の血清中プロテアーゼインヒビターの混在によるものかどうか, (2)このインヒビターが脳プロテアーゼに特異的か, それとも非特異的か, (3)インヒビターと S-100 蛋白との阻害機構が異っているかどうか.

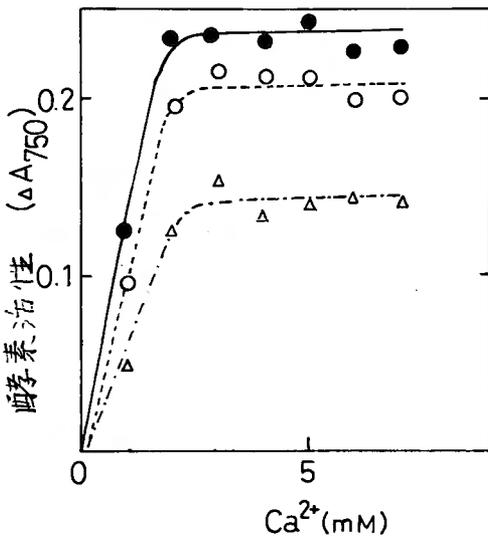
ヒト  $\alpha_2$ -マクログロブリンは  $100^\circ, 20'$  の熱処理により, そのトリプシンに対する阻害効果を失うことが知られている<sup>25)</sup>. 事実, ラット血清から分離した  $\alpha_2$ -マクログロブリンはこのような処理によって完全に不活化された. しかしながら, ラット脳から得られたインヒビターは同じ熱処理に対して全く安定であることがわかった (データ不提示). すなわち, 上述の(1)の可能性が除外された. 上述の(2)に関しては, このインヒビターはトリプシン, キモトリプシン, パパインに対して全く阻害を示さなかった (データ不提示) ので, Ca 依存性プロテアーゼに特異的なインヒビターであると考えて差支えない. また, このインヒビターは Drummond ら<sup>4)</sup>の得たトリプシンに対する阻害効果をもつウシ脳インヒビターとも異ったものと考えられる. 次に(3)の疑問に答えるために, 種々の濃度のカルシウム存在下で阻害実験を行なった. 第11図に示すようにインヒビターの阻害効果は過剰量のカルシウムを添加しても, これに影響されて減少することは見られなかった. すなわちインヒビターの阻害効果はカルシウム濃度に左

右されず, したがって, 本インヒビターの阻害機構は S-100 蛋白のそれとは異なったものと結論された. われわれは別に行なった予備実験によって, 同種のインヒビターがラット肝にも存在することを知った<sup>17)</sup>. こ

第6表 Ca依存性プロテアーゼに対する  
種々のインヒビターの影響

インヒビター	終濃度	相対活性 <sup>a</sup> (%)
—	—	100
PCMB	1mM	2
モノヨード酢酸	1mM	14
ロイペプチン	0.1mg/ml	4
アンチバイン	0.1mg/ml	12
キモスタチン	0.1mg/ml	24
ペプスタチン	0.1mg/ml	85
大豆トリプシンインヒビター	0.1mg/ml	100

<sup>a</sup> 5mM 塩化カルシウム及びシステイン存在下で反応させた。  
但しPCMBとモノヨード酢酸の場合はシステインを添加していない。



第11図 Ca依存性プロテアーゼに対するラット脳インヒビターの影響。プロテアーゼ活性はインヒビター非存在下(●), 80 $\mu$ g インヒビター(○), 250 $\mu$ g インヒビター(Δ)存在下で測定した。用いた酵素は第5図と同じである。

れらインヒビターの生理的役割の解明はなお今後多くの研究に待たなければならない。

#### IV. 総括

1. マウス正常脳ホモジネートは, pH 4.5 および 8.0 にそれぞれ最適 pH をもつプロテアーゼ活性を示す。後者は Ca 依存性プロテアーゼであった。G203

glioma では, pH 8.0 の比活性は正常脳のそれより 2~3 倍高く, また pH 6.0 に正常脳で認められない活性が存在した。

2. ヒト glioma 20例の Ca 依存性プロテアーゼの比活性は, 一般に正常脳のそれより 2~3 倍高く, かつ悪化性につれて上昇し, glioblastoma で高値を示す例が多かった。
3. Ca 依存性プロテアーゼを315倍に部分精製した。本プロテアーゼは分子量約  $8.4 \times 10^4$  で, 最適 pH は 7.5~8.0 にあり, カゼイン, 酸化インシュリンB鎖, ミオグロビンを水解したが合成基質は全く水解しなかった。又, 蛋白質リン酸化M酵素前駆体を著しく活性化した。
4. S-100 蛋白はCa依存性プロテアーゼを抑制した。この事は脳腫瘍でS-100蛋白が減少するという事実との関連を示している。
5. G203 glioma の培養細胞の増殖はこのプロテアーゼを最もよく阻害する外来性インヒビターであるロイペプチンによって強く抑制された。
6. この Ca 依存性プロテアーゼを特異的に阻害するインヒビターがラット脳内に存在することを証明した。このインヒビターの阻害機構はS-100蛋白のそれとは異なっている。

本論文の要旨は第48回日本生化学大会 (1976. 9. 4, 札幌)<sup>18)</sup>, 第36回日本脳神経外科学会総会 (1977. 10. 27, 大阪)<sup>19)</sup> で発表した。

稿を終るに臨み, 生化学的実験について御指導, 御教示, 御校閲を賜りました京都大学医学部病理学教室, 村地孝教授, ならびに御指導, 御校閲を賜りました恩師, 半田肇教授に衷心より感謝の意を表します。なお, 本研究を行なうに際して京都大学医学部病理学教室の設備, 機器を利用して頂いたことを感謝します。神戸大学西塚教授に蛋白質リン酸化酵素測定に際し御便宜を頂きました事を感謝します。又, L. Rönnebeck 博士よりの抗S-100蛋白ウサギ抗血清の恵与及び石田陽一博士よりのG203 glioma の恵与に謝意を表します。

#### References

- 1) Anson ML: The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. J Gen Physiol 22: 70-89, 1938.
- 2) Aoyagi T and Umezawa H: Proteases and biological control (ed Reich Rifkin D, et al) Cold spring Harbor Symposium 429-454, 1975.
- 3) Davis BJ: Disc electrophoresis II. Method and application to human serum proteins. Ann N Y

- Acad Sci **121**: 404-427, 1964.
- 4) Drummond GI and Duncan L: On the mechanism of activation of phosphorylase *b* kinase by calcium. *J Biol Chem* **243**: 5532-5538, 1968.
  - 5) Fritz H, Tschesche H, et al: Bayer-Symposium V "Proteinase Inhibitors" Springer-Verlag Berlin, 1974.
  - 6) Guroff G: A neutral, calcium activated proteinase from the soluble fraction of rat brain. *J Biol Chem* **239**: 149-155, 1964.
  - 7) Haglid KG and Stavrou D: Water-soluble and pentanol-extractable proteins in human brain normal tissue and human brain tumors, with special reference to S-100 protein. *J Neurochem* **20**: 1523-1532, 1973.
  - 8) Inoue M, Nishizuka Y, et al: Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. II. Proenzyme and its activation by calcium dependent protease from rat brain. *J Biol Chem* **252**: 7610-7616, 1977.
  - 9) Katunuma N, Katsunuma T, et al: Studies on new intracellular proteases in various organs of rat. I. Purification and comparison of their properties. *Eur J Biochem* **52**: 37-50, 1975.
  - 10) 瓦井美津江: 実験的膠腫の病理組織学的研究, 可移植性実験膠腫移植腫瘍の組織化学組織培養法による検索. *北関東医学* **19**: 1-25, 1969.
  - 11) Keilola H and Keil B: Isolation and specificity of cathepsin B. *FEBS Lett* **4**: 295-298, 1969.
  - 12) Koono M, Hayashi H, et al: studies on the mechanism of invasion in cancer. IV. A factor associated with release of neutral protease of tumor cells. *Int J Cancer* **13**: 105-115, 1974.
  - 13) Kunits M: Crystalline soybean trypsin inhibitor. II. General properties. *J Gen Physiol* **30**: 291-310, 1947.
  - 14) Lowry OH, Randall RJ, et al: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**: 265-275, 1951.
  - 15) Marks N and Lajtha A: Separation of acid neutral proteinases of brain. *Biochem J* **97**: 74-83, 1965.
  - 16) Moor BW and MacGregor D: Chromatographic and electrophoretic fractionation of soluble proteins of brain and liver. *J Biol Chem* **240**: 1647-1653, 1965.
  - 17) Nishiura I, Murachi T, et al: The occurrence of an inhibitor of  $Ca^{2+}$ -dependent neutral protease in rat liver. *J Biochem in press*
  - 18) 西浦 巖, 村地 孝, 他: 正常及び脳腫瘍細胞内プロテアーゼ, *生化学* **48**: 444, 1976.
  - 19) Nishiura I, Handa H, et al: The role of intracellular proteases in brain tumor. *Neurol Med Chir* **18** (Part I) 1978 in press
  - 20) Oja SS and Oja H: Cerebral proteinases in the growing rat. *J Neurochem* **17**: 901-912, 1970.
  - 21) Ouchterlony O: In vitro method for testing the toxin-producing capacity of diptheria bacteria. *Acta Pathol Microbiol Scand* **25**: 186-191, 1948.
  - 22) Puca GA, Brescian F, et al: Estrogen binding proteins of calf uterus. *J Biol Chem* **252**: 1358-1366, 1973.
  - 23) Ross E and Schatz G: Assay of protein in the presence of high concentration of sulfhydryl compounds. *Anal Biochem* **54**: 304-306, 1973.
  - 24) Schnebli HP and Burger MM: Selective inhibition of growth of transformed cells by protease inhibitors. *Proc Nat Acad Sci U S A* **69**: 3825-3827, 1972.
  - 25) Schulman NR and Tagnon HJ: A proteolytic inhibitor with anticoagulant activity separated from human urine and plasma. *J Biol. Chem* **213**: 655-671, 1955.
  - 26) Shibata I, Fukuda S, et al: Lysosomal enzymes and dibutyl 3', 5'-adenosine monophosphate basic and clinical studies on lysosomal enzyme activities in glioma tissues and glial cells. *Neurol Med Chir* **15** (Part I): 27-33, 1975.
  - 27) Suzuki Y and Murachi T: The occurrence of a neutral protease and its inhibitor in rat peritoneal macrophage. *J Biolchem* **82**: 215-220, 1977.
  - 28) Sylven B and Bis-Svenson I: On the chemical pathology of interstitial fluid. I. Proteolytic activities in transplanted mouse tumors. *Cancer Res* **25**: 458-468, 1965.
  - 29) Takai Y, Nishizuka Y, et al: A proenzyme of cyclic nucleotide independent protein kinase and its activation by calcium dependent neutral protease from rat liver. *Biochem Biophys Res Comm* **77**: 542-556, 1977.
  - 30) Walsh KA and Wilcox PE: The serine proteases. In Perlman GE and Lorand L(eds): *Methods in Enzymology*, Volume 19, "Proteolytic Enzymes" Academic Press, New York, 1970, pp 31-112.