TITLE:

A Neutral Proteinase of Monkey Liver
Microsomes : Solubilization, Partial
Purification and Properties(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Sogawa, Kazuhiro

CITATION:

Sogawa, Kazuhiro. A Neutral Proteinase of Monkey Liver Microsomes : Solubilization,
Partial Purification and Properties. 京都大学, 1979, 理学博士

ISSUE DATE:

1979-03-23

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/222160>

RIGHT:

氏 名	十 川 和 博 そ がわ かず ひろ
学位の種類	理 学 博 士
学位記番号	理 博 第 565 号
学位授与の日付	昭 和 54 年 3 月 23 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	理 学 研 究 科 動 物 学 専 攻
学位論文題目	A Neutral Proteinase of Monkey Liver Microsomes— Solubilization, Partial Purification and Properties (サル肝臓ミクロソームの中性プロテイナーゼ —— その可溶化, 部分精製および性質)

論文調査委員 (主 査) 教 授 高 橋 健 治 教 授 大 沢 済 教 授 日 高 敏 隆

論 文 内 容 の 要 旨

細胞内には各種プロテイナーゼが存在し、細胞内蛋白質の代謝分解や前駆体蛋白質の限定分解など多くの生理的に重要な役割を果たしていると考えられている。これらのプロテイナーゼの生理的役割を解明するためには、それらの細胞内存在様式を明らかにするとともに、その分別、精製を行ない、その諸性状を解明する必要がある。現在までのところ、この分野の研究はリソゾーム中のカテプシン系プロテイナーゼについてある程度進んでいる以外極めて遅れている。本論文は、本申請者が先に初めてその存在を見出した、ミクロソーム膜結合中性プロテイナーゼについて、ニホンザル肝臓を用い、その可溶化条件を検討して、膜系における存在様式を探ぐるとともに、部分精製を行ない、その性状を検索したものである。

まずサル肝臓ミクロソーム膜系に強く結合し、凍解融解と 1M KCl 処理では可溶化されない中性エンドプロテイナーゼの存在を証明し、多種の試薬を用いて、その可溶化を試みた。この結果、この酵素はデオキシコール酸、コール酸、Triton X-114, Triton X-100, Emulgen 810 等の界面活性剤ではかなりよく可溶化されるが、種々のカオトロピックアニオン、尿素、塩酸グアニジン等では可溶化されないことが判明した。これらの事実から、本酵素は表在性酵素ではなく、膜と強い疎水性相互作用により結合している内在性酵素であると推定された。また、デオキシコール酸、コール酸および Triton X-100 を用いて可溶化に対する可溶化剤との処理時間、可溶化剤濃度およびミクロソーム膜蛋白濃度の影響等を検討し、可溶化と精製に有効な条件を明らかにした。

さらに、これらの知見に基づき、1M KCl および 0.05% ドデシル硫酸ナトリウム処理したミクロソーム膜より 1% Triton X-100 で本酵素を可溶化した後、ハイドロキシルアパタイトクロマトグラフィーおよびセファロース CL-6B によるゲル濾過法を用いて本酵素を部分精製した。この標品について、分子量が約 88,000 であり、カゼインに対する最適 pH は 8.0 であること、ジイソプロピルフルオロリン酸、フェニルメタンスルホンフルオリドで強く阻害されることから、活性部位に反応性セリン残基を有するセリンプロテイナーゼの一種であること、キモスタチンや金属キレート剤 (EDTA および EGTA) でも

かなり阻害されることから、キモトリプシンに若干類似性があり、活性発現に金属イオンが何等かの関与をすることなどが示された。また、尿素変性蛋白質に対する作用を検索し、ヒストンを最もよく水解し、以下カゼイン、ヘモグロビン、血清アルブミンの順に水解するが、 γ -グロブリン、卵白アルブミン、フィブリノーゲンにはほとんど作用しないことが示された。

以上の結果から、本酵素がミクロソーム膜の内在性蛋白質として、特異な生理的役割（膜蛋白質の代謝回転あるいは分泌蛋白質の限定分解など）を果たしている可能性が推定された。

参考論文4篇は、サル肝臓における本酵素の発見と、ネズミ肝臓における同種酵素のミクロソーム局在性の証明、ならびにサルの各種組織における酸性プロテイナーゼの分布特性の検索と新しい蛍光標識基質を用いるプロテイナーゼ活性測定法に関するものである。

論文審査の結果の要旨

細胞内プロテイナーゼの生理的役割の重要性が最近注目されて来ているが、これらのプロテイナーゼに関する研究は従来大変遅れており、その精製や性状の解明が強く望まれている。特に、細胞内オルガネラの膜系と強く結合しているタイプのプロテイナーゼはオルガネラの生理的機能とも関連して重要と考えられるが、この種のプロテイナーゼに関する知見はほとんど皆無である。申請者は、先にラット肝臓中にミクロソーム膜と強く結合するエンド型中性プロテイナーゼを初めて発見した。本研究ではサル肝臓を用いて同種酵素の膜系における存在様式を詳細に追究するとともに、その部分精製を行ない、部分精製標品について分子的、酵素的諸性状を明らかにしている。

申請者はまず、サル肝臓ミクロソーム分画について多数種の試剤を用いて本酵素の可溶化条件と可溶化度を詳細に比較検索し、デオキシコール酸、コール酸、Triton X-100 など限られた界面活性剤のみでよく可溶化される事実から、本酵素が膜の表在性蛋白として膜成分と疎水性結合で強く結合していることを結論した。したがって、本酵素は細胞内オルガネラの内在性エンド型中性プロテイナーゼとして初めて位置づけられたわけであり、その学問的意義は大きい。

申請者はさらに、本酵素の精製条件を精力的に検討し、その部分精製に成功した。本酵素は存在量が極めて微量である上に、特定の限られた種類の界面活性剤の存在下でのみ精製が可能であるため、その精製は極めて困難である。部分精製の段階ではあるが、精製にともなういくつかの難問題を解決し、他の同様な酵素の精製にも適用しうる種々の知見を得た点で高く評価される。また、部分精製酵素について、分子量、最適 pH、各種阻害剤の影響、基質特異性等を詳細に検索し、本酵素が新しいタイプのエンド型中性セリンプロテイナーゼであることを示した点も新知見として高く評価される。

以上、本論文はサル肝臓ミクロソーム膜に強く結合して存在するエンド型中性プロテイナーゼの存在を証明し、その存在様式を詳細に検索するとともに、その部分精製法を確立し、諸性状を解明した初めてのユニークな論文であり、オルガネラの膜結合性プロテイナーゼの生理的役割解明への新しい研究の発展の基礎となりうるものとして、その学問的貢献度は極めて高いものと考えられる。

よって、本論文は理学博士の学位論文として価値あるものと認められる。