

サル骨格筋からのカテプシン D の精製とその性質

丹 治 雅 夫

序

カテプシン D は脊椎動物の様々な器官に分布している。酸性 pH 下で活性を示すことからライソゾーム中に局在していると考えられていたが、抗体を用いた研究から細胞内だけでなく、それを分泌する細胞の回りや赤血球の膜にも結合して存在していることが示された。¹⁾

酵素活性はヘモグロビン分解能を測定することにより検出できる。活性は pH 3.0 で Anson の方法²⁾を改良した方法で測定され、酵素活性ユニットで示される。この酵素の特徴はペプスタチンという放線菌由来のカルボキシルプロテアーゼ阻害剤と 1 : 1 のモル比で結合して特異的に活性を阻害されることである。

生体での作用は主に 3 つに分けられる。第 1 は細胞内でのタンパク質の消化で、ヘモグロビンやムコ多糖などの代謝経路で重要な役割を果たしている。第 2 は必要に応じ前駆体蛋白を特異的に切断することにより、キニン等の活性ペプチドをつくり出す作用である。第 3 は前者がでたらめに作用した場合で、病気をひき起こす。例えばこの酵素がキニンによく似たロイコキニンを生産すると腹水貯留の原因になる。¹⁾

本研究は従来研究があまりなされていないサルのカテプシン D に関するものである。森山らによるとニホンザルの各臓器 1 g 中に含まれるカテプシン D 活性は肺で高く (0.93 unit/g 組織)、脾臓と腎臓はその 80%、肝臓で 50%、脳で 30%、心臓で 20%、骨格筋では 6% であった。³⁾しかし肺の活性は大部分はペプシン C 型のカルボキシルプロテアーゼによるものであった。⁴⁾

材料と方法

本研究は骨格筋を材料として行った。精製は特にことわらない限り、0.01M リン酸ナトリウム緩衝液 pH 7.0 を用いて 4℃ で行った。材料のホモジネートを送心分離して上清を取り、これを粗抽出物とする。これに 40% 飽和になるように硫酸を加えしばらく放置後、送心分離して沈殿を得た。沈殿から酵素を抽出し、コンカナバリン A セファロースカラムでアフィニティクロマトグラフィーを

行った。このステップで糖蛋白のみが精製される。得られた標品をセファデックス G 100 カラムクロマトグラフィーにかけると分子量の大きな蛋白質が除かれ、大部分の夾雑物が除去された。溶出液に 0.8 M 酢酸ナトリウム緩衝液 pH 4.0 を 1/7 量加えて pH 4.0 とし、ペプスタチンセファロースカラムでアフィニティクロマトグラフィーを行った。溶出は pH 8.2 の 0.1 M 炭酸水素ナトリウム水溶液を用いた。

結果と考察

このようにして得られた精製標品は SDS (ドデシル硫酸ナトリウム) 変性下でのポリアクリルアミド電気泳動により完全に精製されたことが確認された。またその収率は 50% で精製度は 2 万倍程度であった。

本標品は分子量が 3 万と 1.5 万の 2 本鎖から成るサブユニット構造をとっていた。両ユニットは SDS 変性の際メルカプトエタノールで S-S 結合を還元しなくともポリアクリルアミド電気泳動で分離されるので S-S 結合によって結ばれたものではない。ヘモグロビン分解活性の至適 pH は 3.5 であった。また、ペプスタチンと 1 : 1 のモル比で結合して活性が完全に阻害された。

以上の性質は従来報告されてきたブタ脾臓等のカテプシン D ときわめてよく似ている。アミノ酸分析を行った結果もこれら一般的なカテプシン D とよく一致している。

骨格筋のカテプシン D はサブユニット構造をもっていたが、これに対し森山らがサルの肺から精製したカテプシン D 型の酵素は単一鎖であった。カテプシン D については従来この両者のタイプが報告されており、2 本鎖のものは 1 本鎖のものよりプロテアーゼの作用をうけて生ずるものと考えられる。

精製標品を等電点電気泳動にかけたところ、7 種のアイソザイムが pH 5.7 ~ 7.5 の範囲に検出された。このうち主なもの 3 種であった。各アイソザイムはそれぞれペプスタチンと 1 : 1 のモル比で結合して活性が阻害され、また分子量も同じことから互いにきわめて類似した分子種であるらしい。各アイソザイムは骨格筋の粗抽出物を硫酸分画した後ただちに等電点電気泳動しても同様に検出されたので精製の途中で生じたものではない。アイソザイムの組成は動物によって異なるのが一

般的であるがサルの組成もブタ脾臓の組成とは異なっていた。これが種によって特有のものか、また器官によって差があるのかは興味もたれる。アイソザイム相互の差異がどのようなものかもまだ不明である。

REFERENCES

- 1) Barrett, A.J. (ed) (1977) Proteinases in Mammalian Cells and Tissues pp.209-248. Elsevier/North-Holland Biochemical Press, Amsterdam.
- 2) Anson, M. L. (1939) J. Gen. Physiol. 32, 79-89.
- 3) Moriyama, A. and Takahashi, K. (1980) J. Biochem. 87, 737-743.
- 4) Moriyama, A. and Takahashi, K. (1980) J. Biochem. 88, 619-633.

アカゲザルにおける、概念形成を用いた種の認知

吉久保真一

マカク属のサルのように、社会的構造を持った集団生活を営んでいる生物集団においては、集団の秩序を保つために様々な場面において適切な行動をしなければならない事は明らかと思われる。適切な行動をするためには、各個体が相手と自分の関係を正しく認知する事が必要であろう。そのような認知の問題の一つとして、「種の認知」の問題をマカク属のサルについて考えてみる事は興味深い事のように思われる。これまでに得られたマカク属に関する集団遺伝学的資料によれば、マカク属の種間の遺伝的分化は、種として分離して考えるには未分化な状態と考える事ができる。また、マカク属の別種とされる種間に雑種ができ、さらにその雑種にも妊性があるという事が報告されている。しかし一方で、同所的に数種のマカク属が生息している地域で、それらが雑種を形成して混じり合ってしまったという事実はないようである。これらから考えれば、マカク属の種は、お互いに遺伝子プールを共有する可能性と能力を持ちながら、何らかの仕組でそれを拒んでいる。いわば現在ダイナミックに種分化が進行している生物集団ではないだろうか。ここに、マカク属にお

いて、「種の認知」を問題にする生物学的意義があると考えられる。これまでも、サルの種の認知に関する行動的研究はいくつかある。しかし認知行動の対象となる刺激を比較的少数しか用いていないので、結果が単にそれらの少数刺激を弁別したものなのか、あるいは共通属性としての種を弁別したのか明らかでない。そこで、多数の刺激を用いて、それらの共通点を抽象させるという概念形成の方法を用いて、種の弁別ができるかどうかを調べるために、筆者は次のような実験を行った。

方法は、R. J. Herrnstein 達のハトを用いた実験に準じている。すなわち2つのカテゴリーに属すると考えられる多数の写真刺激を無作為な順序で継時的に提示し、各刺激に対する反応率を測定とし、それらの多数刺激が2群に分類されるか否かを検査する方法である。ここでは、アカゲザルの写っている写真(S^+)と、アカゲザルの写っていない写真(S^-)を2つのカテゴリーとして用いた。被験体は3頭のアカゲザルで、いずれも行動実験の先行経験はない。実験は、獲得訓練、般化テスト、分類テストの3段階より成り、各段階で各カテゴリーに属する写真刺激の内容が操作された。獲得訓練は S^+ と S^- の分類基準を学習させるものであり、各40枚ずつ計80枚の刺激を用いた。学習基準に達する速度に個体差が見出されたが、3頭共 S^+ と S^- の間に反応率の有意な差を示し、何らかの分類基準を獲得したのと考えられた。次に、その分類基準がどのようなものかを知るために般化テストを4回行い、回を増す毎に新しい刺激を追加した。この際 S^- にはマカク属を除いた他の動物の写真も含まれている点で、獲得訓練と異なる。1回めのテストでは、1頭を除き、 S^+ と S^- の間の反応率の差は見出されなかった。しかし、4回目のテストまでには3頭共、新しい刺激を正しく分類する事ができた。1回目から分類できた個体は、獲得訓練で最も早く学習基準に達した個体だった。これらから考えると、その1頭を除く2頭は、分類基準を用いて分類していたというよりも、100枚近くになる刺激を記憶していた可能性がある。しかし、記憶しなければならない数が増すにつれて、刺激の共通性による分類に移行したと思われる。これら分類基準を持った個体が、アカゲザルとニホンザルを分類できるかを調べたのが分類テストである。4回のテストを行い、特に4回