

12) 筋構成蛋白質に対する新 serine protease の作用

勝 沼 信 彦*

研究協力者 真 田 幸 弘* 八十川 信 正**

はじめに

すでに我々は遺伝性筋ジストロフィーマウスや人の Duchenne 型および Becker 型筋ジストロフィー症の骨格筋において我々が見出した新 serine protease の活性が異常増加している事実を示し、さらには筋ジストロフィー症における筋構成蛋白質の特異的な崩壊パターンにこの新 serine protease が関与している可能性を示唆した(1-4)。現在まで個々の筋構成蛋白質の細胞内蛋白分解酵素に対する分解され易さについて検討した例は Ca^{2+} 依存性中性プロテアーゼの他に報告はない(5-7)。

今回我々は家兎骨格筋より精製した個々の筋構成蛋白質に対する新 serine protease の分解能を検討したので報告する。

実験材料および方法

筋構成蛋白質の精製には3~4kgの雄の家兎の骨格筋を用いた。serine protease の精製には250~300gの雄のウイスター系ラットを用いた。

o-phthalaldehyde (Fluorescin) とその稀釈緩衝液 (Trisrisol) は Merck Japan Co. のものを、蛋白定量標準液は Miles Lab. Inc の血清アルブミン溶液を、Sodium dodecyl sulphate (SDS)-ゲル電気泳動の分子量決定マーカーは BDH Chem. Ltd. のものを

使用した。

新 serine protease は従来(3)に従い活性を測定し、Katunuma ら(8)の変法を用いて精製し、結晶化したもの(9)を使用した。その比活性は7600 units/min/mg である。蛋白濃度は Biuret 法(10)または Lowry らの方法(11)を用いて測定した。Myosin, Actin, Troponin, Tropomyosin, α -Actinin, M-protein はそれぞれ Perry (12), Ebashi and Ebashi (13), Ebashi ら (14), Mueller (15), Masaki and Takaiti (16), Masaki and Takaiti (17) の方法を用いて調整して基質として用いた。

新 serine protease の各筋構成蛋白質に対する分解能は以下の方法を用いて蛍光法により測定した。0.25M Na-りん酸緩衝液, pH 8.0, 10^{-5} M の各筋構成蛋白質, 2×10^{-8} ~ 10^{-7} M の新 serine protease の存在下で反応液を1.0ml とした。37°C で0~60分間反応し適当な時間に0.2ml を汲み出し、1.3ml の純水を加え、3分間煮沸して反応を止めた。次に1.5ml の0.01% Fluorescin を加え3000 r. p. m. 10分間遠心し、上清を Benson et al. (18) の方法を用いて L-leucine 当量として測定した。

各筋構成蛋白質の分解様式については以下の方法を用いて検討した。反応液は上述の方法と同じものを用いた。ただし serine protease と基質とのモル比は異り、それぞれ各図の欄外に示した。各時間に0.2ml 汲み出し、同量の2% (w/v) SDS (50% glycerol

* 徳島大学医学部附属酵素研究施設酵素化学部門

** 徳島大学医学部第2内科

を含む), および2-mercaptoethanol 20 μ lを加え, 3分間煮沸した. 次に1% (w/v) bromophenol blue 10 μ lを加え, 約20 μ gの蛋白量のサンプルを SDS-ポリアクリルアミド電気泳動に用いた. 泳動には8.0%アクリ

ルアミドスラブゲルを用いWeber and Osborn (19)の方法に従って行った.

結 果

我々は最近, 骨格筋中のこの新 serine pro-

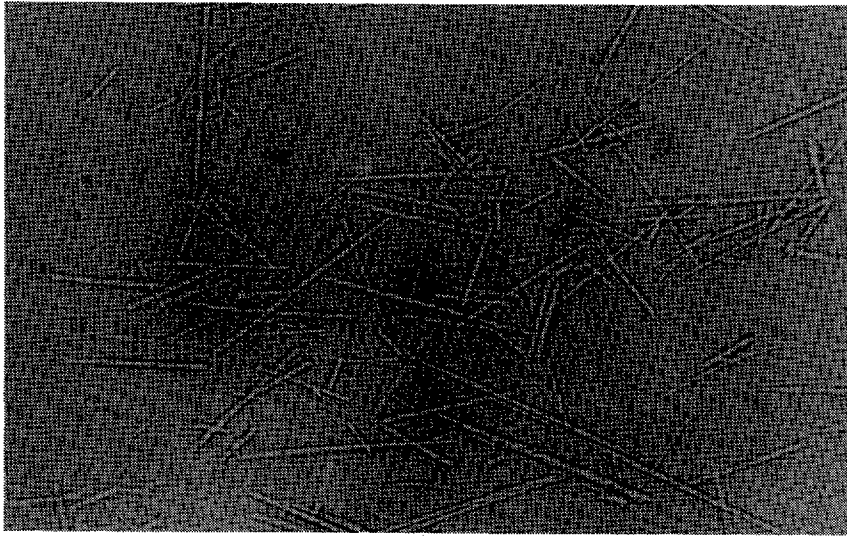


図1 Photomicrograph of the crystals of serine protease from rat skeletal muscle.

表1 Activities of the serine protease on various myofibrillar proteins.

| Substrate | Molar ratio ^a | Time of incubation (min) | | | | | |
|---------------------------------|--------------------------|--------------------------|------|------|------|------|------|
| | | 0 | 5 | 10 | 15 | 30 | 60 |
| n moles equivalent to L-leucine | | | | | | | |
| Myosin | 1 : 500 | 0 | 16.0 | 27.0 | 41.4 | | |
| | 1 : 500 | 0 | | | 34.0 | 51.5 | 73.5 |
| | 1 : 100 | 0 | 38.5 | 52.6 | 57.8 | | |
| Troponin | 1 : 100 | 0 | 7.0 | 15.5 | 24.0 | | |
| | 1 : 100 | 0 | | | 24.5 | 28.0 | 35.0 |
| Tropomyosin | 1 : 100 | 0 | | | 16.0 | 30.0 | 38.0 |
| Actin | 1 : 100 | 0 | | | 5.5 | 9.5 | 13.0 |
| α -Actinin | 1 : 100 | 0 | | | 0 | 0 | 0 |
| M-Protein | 1 : 100 | 0 | | | 0 | 0 | 0 |

^aMolar ratio of serine protease to substrate in the reaction mixture.

tease を結晶化しており、その型は図1に示した様に30~50 μ m の棒状である。表1はこの新 serine protease の各筋構成蛋白質に対する分解を反応中に遊離してくるアミノ酸、ペプチドの量として測定したものである。

ミオシンの分解は酵素対ミオシンのモル比が1:500の場合、15分までは直線的に増加し、その後は1:100の比においても見られる様に徐々に一定となる。トロポニン、トロポミオシンの分解パターンはミオシンと同様で

あるが分解速度はミオシンに比べて少ない。アクチンはさらにゆっくりと分解されるが、 α -アクチニン、M-プロテインからはアミノ酸ペプチドの遊出は全く認められない事からこの2者は分解されないと考えられた。これらの結果から、ミオシン、トロポニン、トロポミオシンを本酵素が限定分解するものと考えられた。次にこれらの筋構成蛋白質の本酵素による分解様式をSDS-ポリアクリルアミド電気泳動法により検討した。図2はミオシ

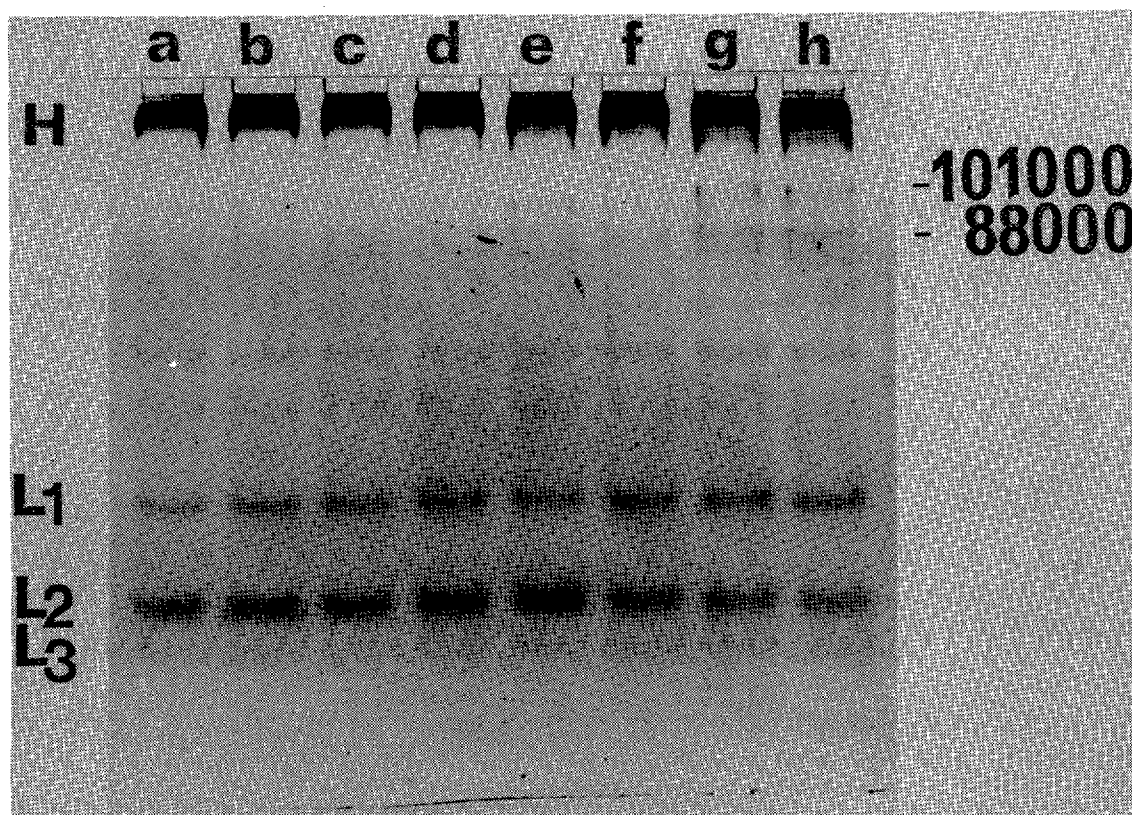


図2 Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoretic patterns of myosin after incubation with and without serine protease. Myosin was incubated in 0.25 M sodium phosphate buffer, pH 8.0, for 0 (a), 15 (b), 30 (c) and 60 (d) min without the serine protease, and for 0 (e), 15 (f), 30 (g) and 60 (h) min with the protease. The molar ratio of serine protease to myosin was 1:300. Experimental conditions are described in the Materials and Methods. H, heavy chain of myosin; L-1, L-2, L-3, light chains of myosin.

ンの分解様式を示したもので、ミオシンの heavy chain のバンドは時間と共にしだいに巾広くなり分子量100,000と80,000の2つの新しいプロダクトが出現した。light chain 2は徐々に分解されるが light chain 1は全く分解されなかった。トロポニンに対する結果

は図3に示したがトロポニン-Tは反応15分間で完全に分解される。次にトロポニン-Iは徐々に分解されるがトロポニン-Cは分解されなかった。トロポニン-Cの下に認められる分子量13,000のバンドはトロポニン精製中に生じたトロポニンの分解産物であろうと

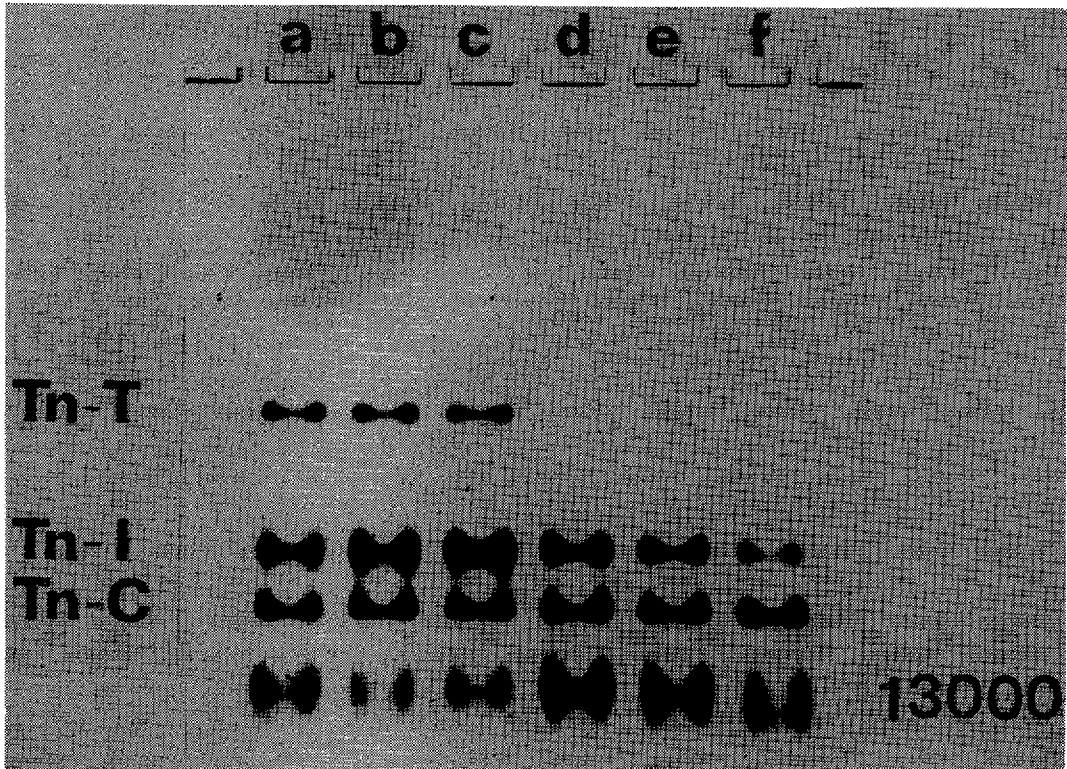


図3 Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoretic patterns of troponin after incubation with and without serine protease. Experimental conditions were similar to those for Fig. 2. Troponin was incubated for 0 (a) and 60 (b) min without the protease, and for 0 (c), 15 (d), 30 (e) and 60 (f) min with the protease. The molar ratio of the serine protease to troponin was 1:300. Tn-T, troponin-T; Tn-I, troponin-I; Tn-C, troponin-C.

考えられた。図3はトロポミオシンの結果を示したものであるが、反応15分でトロポミオシンのバンドはほとんど消失し、分子量32,000の新しいバンドが出現しているが、これも30分後には消失し、分子量21,500と19,000の2つの新しいバンドのみとなっている。図4はアクチンに対する結果である。ア

クチンは徐々に分解されバンドが細くなっているが新しい分解産物は認められなかった。図5は α -アクチニンであるが全く分解されていないことがわかる。以上の結果はこの新serine proteaseがミオシン、トロポニン、トロポミオシン、アクチンに作用し、しかも限定分解を行う事を示している。

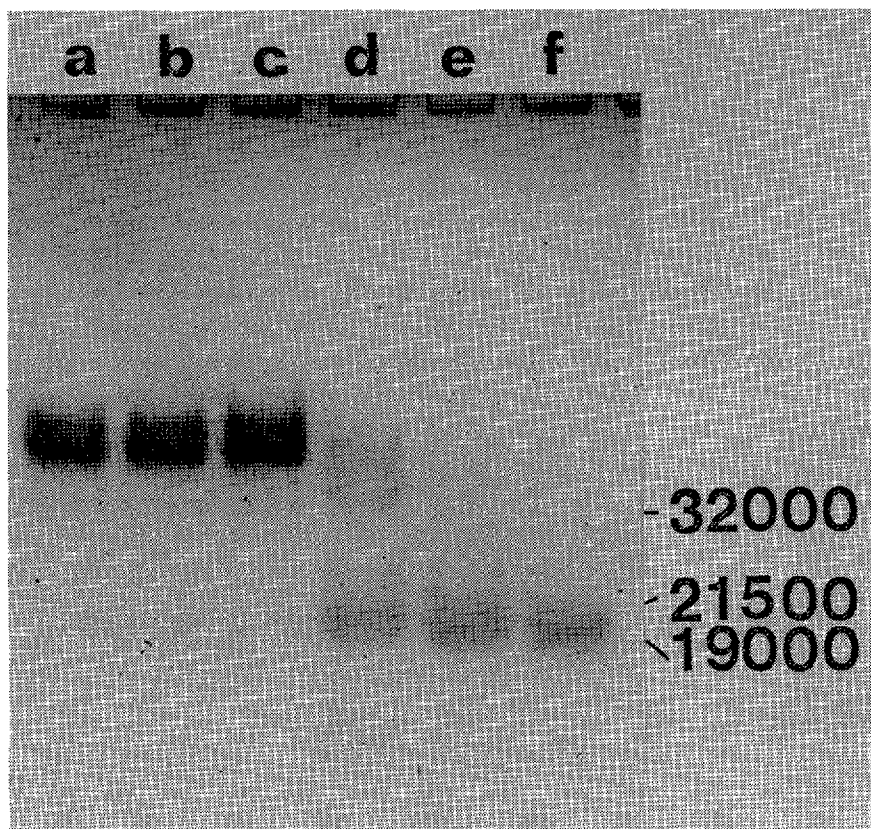
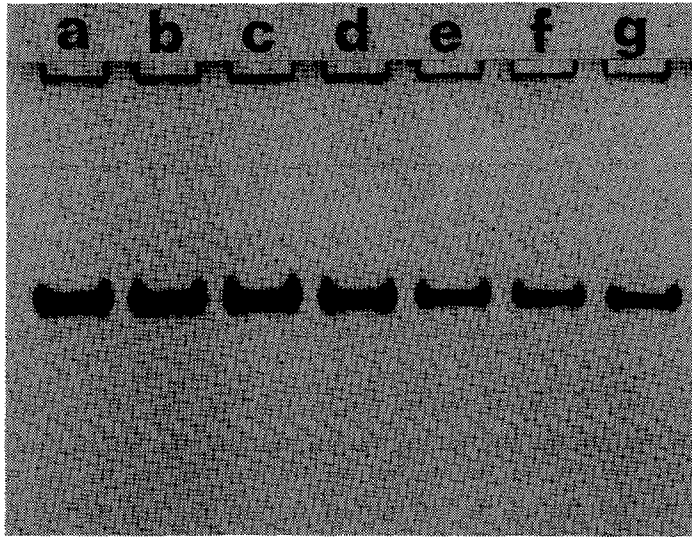
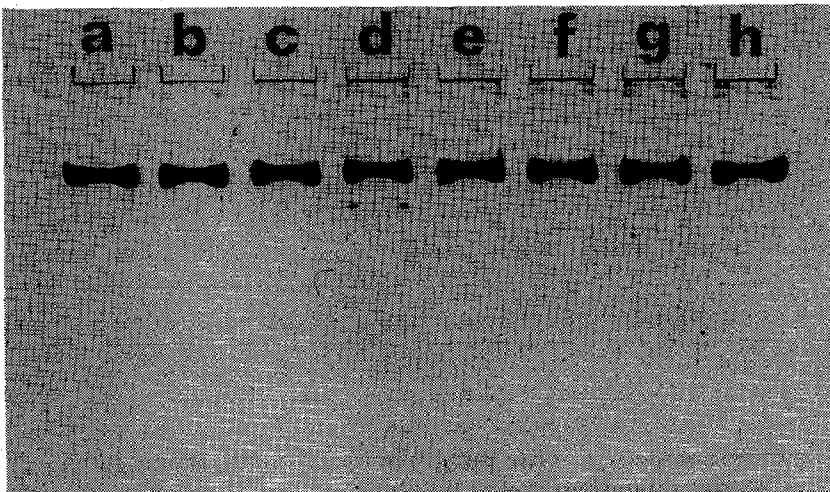


図4 Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoretic patterns of tropomyosin after incubation with and without the serine protease. Experimental conditions were as for Fig. 2. Tropomyosin was incubated for 0 (a) and 60 (b) min without the protease, and for 0 (c), 15 (d), 30(e) and 60 (f) min with the protease. The molar ratio of the serine protease to tropomyosin was 1 : 200.



5 Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoretic patterns of actin after incubation with and without serine protease. Experimental conditions were as for Fig. 2. Actin was incubated for 0 (a), 30 (b) and 60 (c) min without the protease, and for 0 (d), 15 (e), 30 (f) and 60 (g) min with the protease. The molar ratio of the serine protease to actin was 1 : 200.



6 Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoretic patterns of α -actinin after incubation with and without serine protease. Experimental conditions were as for Fig. 2. α -Actinin was incubated for 0 (a), 15 (b), 30 (c) and 60 (d) min without the protease, and for 0 (e), 15 (f), 30 (g) and 60 (h) min with the protease. The molar ratio of the serine protease to α -actinin was 1 : 200.

考 察

Dayton ら (5) は Ca^{2+} 依存性中性プロテアーゼがトロポニン-T, トロポニン-I, トロポミオシン, C-プロテインをよく分解するがミオシン, アクチン, α -アクチニンは分解しないと報告している。トロポニン, トロポミオシン, α -アクチニンに対する我々の新 *serine protease* の作用も両者の限定分解産物がわずかに異なることを除けば大変よく似ている。すなわち *serine protease* はトロポミオシンを2つの分子量21,500と19,000のフラグメントに分解するが Ca^{2+} 依存性中性プロテアーゼは分子量13,000~18,000フラグメントに分解する。またトロポニンに対しても *serine protease* はトロポニン-T, トロポニン-I から約13,000の分子量のプロダクトが生じるが Ca^{2+} 依存性中性プロテアーゼは分子量10,000と14,000の2つのフラグメントに分解する。両者の作用で最も異なるのはミオシンとアクチンに対してである。*serine protease* は非常にすみやかにミオシンを分解し、また徐々にではあるがアクチンも分解するが Ca^{2+} 依存性中性プロテアーゼはこの両者には全く作用しない。この様にこれら2つの *protease* は互いに筋構成蛋白質への作用に対して特異性を有しており、生理的条件下あるいは病的条件下での筋構成蛋白質の分解に異った役割を有しているものと考えられる。

すでに我々は筋ジストロフィー症の罹患筋において本酵素活性が異常に上昇しており(1-4), しかも蛋白分解酵素による限定分解産物と考えられる数種の蛋白質が出現している(2-3)ことを報告している。それ故以上の結果は我々のこの新 *serine protease* が筋ジストロフィー症における筋蛋白質崩壊に関与している可能性が高い事を示唆している。細胞内の蛋白質の分解に関与している *protease* はこれら2つの酵素ばかりでなくライソゾーム系の酵素も含めた多くの *protease* の協調作用によってその分解が調節されているものと考えられる。事実、最近 Uchida

ら(20)はネズミ心筋からミオシンをよく分解する新しい *protease* の存在を報告している。細胞内でのこれらの *protease* の活性調節はおそらく、それぞれ個々の *protease* に特異的なインヒビターの量によって調節されているものと考えられ、今後我々は本酵素の特異的インヒビターを追求しようと考えている。

文 献

- 1) 勝沼信彦, 真田幸弘 (1977) 医学のあゆみ. 100, 927-933.
- 2) 勝沼信彦, 真田幸弘 (1977) 日本臨床. 35, 20-27
- 3) Sanada, Y., Yasogawa, N. & Katunuma, N. (1978) J. Biochem. 83, 27-33.
- 4) Katunuma, N., Yasogawa, N., Kito, K., Sanada, Y., Kawai, H. & Miyoshi, K. (1978) J. Biochem. 83, 625-628.
- 5) Dayton, W. R., Goll, D. E., Stromer, M. H., Reville, W. J., Zeece, M. G. & Robson, R. M. (1975) Cold Spring Harbor Conferences on Cell Proliferation, Vol. II. Proteases and Biological Control, pp. 551-577, Cold Spring Harbor, New York.
- 6) Dayton, W. R., Goll, D. E., Zeece, M. G., Robson, R. M. & Reville, W. J. (1976) Biochem. 15, 2150-2158.
- 7) Dayton, W. R., Reville, W. J., Goll, D. E. & Stromer, M. H. (1976) Biochem. 15, 2159-2167.
- 8) Katunuma, N., Kominami, E., Kobayashi, K., Banno, Y., Suzuki, K., Chichibu, K., Hamaguchi, Y. & Katsunuma, T. (1975) Eur. J. Biochem. 52, 37-50.
- 9) Sanada, Y., Yasogawa, N. & Katunuma, N. (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. in press.
- 10) Gornall, A. G., Bardawill, C. S. & David, M. M. (1949) J. Biol. Chem. 177, 751-766.

- 11) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- 12) Perry, S. W. (1955) in *Methods in Enzymology* (Colowick, S. P. & Kaplan, N. O. eds.) Vol. 2, pp. 583-586, Academic Press, New York.
- 13) Ebashi, S. & Ebashi, F. (1955) *J. Biochem.* 55, 604-613.
- 14) Ebashi, S., Kodama, A. & Ebashi, F. (1968) *J. Biochem.* 64, 465-477.
- 15) Mueller, H. (1966) *Biochem. Z.*, 345, 300-321.
- 16) Masaki, T. & Takaiti, O. (1969) *J. Biochem.* 66, 637-643.
- 17) Masaki, T. & Takaiti, O. (1974) *J. Biochem.* 75, 367-380.
- 18) Benson, J. R. & Hare, P. E. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. US.* 72, 619-622.
- 19) Weber, K. & Osborn, M. (1969) *J. Biol. Chem.* 244, 4406-4412.
- 20) Uchida, K., Murakami, U. & Hiratuka, T. (1977) *J. Biochem.* 82, 469-476.

↓
検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用
論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります
↓

はじめに

すでに我々は遺伝性筋ジストロフィーマウスや人の Duchenne 型および Becker 型筋ジストロフィー症の骨格筋において我々が見出した新 serine protease の活性が異常増加している事実を示し、さらには筋ジストロフィー症における筋構成蛋白質の特異的な崩壊パターンにこの新 serine protease が関与している可能性を示唆した(1-4). 現在まで個々の筋構成蛋白質の細胞内蛋白分解酵素に対する分解され易さについて検討した例は Ca²⁺依存性中性プロテアーゼの他に報告はない(5-7).

今回我々は家兎骨格筋より精製した個々の筋構成蛋白質に対する新 serine protease の分解能を検討したので報告する.