

## 21) 顆粒球の新セリンプロテアーゼと 進行性筋ジストロフィー症

青木 洋祐\*

研究協力者 池田 和子\*

進行性筋ジストロフィー症の病因論として神経障害説、血管障害説、筋膜異常説等が唱えられている。最近本症の赤血球膜に種々の異常が見出されてきたことから本症の本態を膜異常症としてとらえる見方が有力になりつつある<sup>1)</sup>。しかし膜異常が本症に存在するとしてもこれが本症の発症にどのように結びつくかに関しては未だ判然としない。

一般に細胞膜は外界との隔壁という役割以外に細胞機能にきわめて重要な意義を有している。ある種のプロテアーゼを細胞表面に作用させると細胞機能に著明な変化が生じることがわかっている。抗原で感作されたモルモットの腹腔浸出細胞にトリプシンを作用させると抗原による遊走阻止作用が消失するし<sup>2)</sup> トロンピン、プロナーゼあるいはファイシンをマウス線維芽細胞やニワトリ胚芽細胞に作用させると細胞分裂が促進され、**contact inhibition** が消失することがわかっている。<sup>3)</sup> またトリプシン、キモトリプシン、あるいはパパインをリンパ球表面に作用させると DNA 合成が著増することが報告されている。このような事実から生体内においてある種のプロテアーゼが細胞膜に作用して細胞機能を変化させている可能性が考えられるわけである。従って筋細胞膜にもある種のプロテアーゼが作用してその機能を制御している可能性は考

えられる。従って筋膜異常症として本症をとらえようとする場合、プロテアーゼに対する筋膜(あるいはもっと広く生体膜)の感受性を調べることも意義あることと思われる。

筆者等は最近骨髄細胞のミトコンドリア内膜に新しいセリンプロテアーゼが存在することを見出した<sup>4), 5)</sup>。後述のようにこのプロテアーゼは生体内で筋膜にも作用し得るものと考えられるので本症患者についてこのプロテアーゼ活性を測定し、赤血球膜の本プロテアーゼに対する感受性を調べ、本症発症における本プロテアーゼの意義を追究した。また筋ジストロフィーマウスより筋膜を作製し、本プロテアーゼに対する感受性も検討した。

### 方 法

1. 赤血球膜および成熟顆粒球の調製：本症患者18例(先天型3名, Duchenne型14名, ウールリッチ型1名)より末梢血を10mlへパリン採血し、生理食塩水7mlを加えてよくかき混ぜた後、15mlのLymphoprepに重層し、400×g, 30分間遠心し、沈渣を約4mlの血漿にsuspendし、7mlのLymphoprepに重層し、室温に約30分間放置した。血漿の層を集めて、生理食塩水で2回洗浄し、成熟顆粒球を集めた。また室温30分放置後の沈渣を生理食塩水で3回洗浄した後、Dodgeの方法で赤血球膜を得た<sup>6)</sup>。

2. 筋膜の作製：筋ジストロフィーマウスお

\* 自治医科大学第二生化学

よびコントロールマウスの上下肢、腹筋、背筋より筋肉片を採取し、50mM CaCl<sub>2</sub> (pH 7.0) 中で細かく切りきざんだ後、polytron homogenizer でホモジナイズし、遠沈(400×g, 5分間)した。沈渣を25mM NaCl, 2.5 mM histidine-HCl (pH 7.4) 溶液(A液と略す)に suspend し、400×g, 3分間の遠心により洗浄をくりかえす(15回)。その後10容量のA液中で熱処理(37°C 30分間)し、400×g, 3分間の遠心をくりかえし(10回)した後 Tris-HCl で pH 8.0 にした水10容量を加えて氷上で10分間攪拌し、400×g, 3分間遠心する。沈渣の上層の透明な層を除きながら遠心をくりかえすと(10回)ほぼ純粋な筋膜が得られる。なるべく intact な筋膜を得るために McCollister 法や Hotta 法より遠心操作を多くし、ATP 処理は行わないのが特徴である。

3. 新しいセリンプロテアーゼの調製：ヒト骨髓細胞から既報の方法<sup>5)</sup>により結晶化し実験に使用した。

4. プロテアーゼ活性の測定：成熟顆粒球中の本プロテアーゼ活性の測定は既報の方法<sup>5)</sup>によった。

5. 赤血球膜および筋膜の本プロテアーゼに対する感受性の測定：赤血球膜あるいは筋膜(いずれも蛋白濃度0.2%) 0.5ml, 1 M リン酸緩衝液 (pH 8.5) 0.06ml, および本プロテアーゼ(1mg/ml) 0.01ml を37°C 15分間反応させ、10%トリクロル醋酸0.5ml 添加により反応を止め30分間室温放置後遠心し、上清中のニンヒドリン反応陽性物質の量を測定することにより本プロテアーゼに対する感受性を測定した。

### 結 果

まず筆者達が見出した新しいセリンプロテアーゼ<sup>4), 5)</sup>について簡単に述べる。このプロテアーゼは骨髓細胞のうち赤芽球と顆粒球のミトコンドリア内膜に存在する。分子量31,800 至適 pH 8.5, 活性に必須なアミノ酸残基とし

て1個のセリン, 1個のヒスチジンの他に1個のカルボキシル基がわかっている。人工基質およびプロテアーゼインヒビターに対する態度はエラスターゼに類似しているが、エラスチン分解能は有しない。酵素を基質にした場合 Apo-pyridoxal enzyme に比較的特異的に不活性化能を有する。赤芽球では本プロテアーゼは同じくミトコンドリア内膜に存在するδ-アミノレブリン酸合成酵素量を崩壊面から調節している。顆粒球の本プロテアーゼは慢性関節リウマチ、急性増悪期のベーチェット病、網膜中心静脈血栓症等で活性の増大が見られ、結晶化した本プロテアーゼを IgG に作用させると単球浸潤を主とした炎症を惹起する起炎物質を生じることがわかっている。本症患者末梢血より採取した成熟顆粒球について本プロテアーゼ活性を測定した結果が図1に示してある。全例において正常範囲であった。

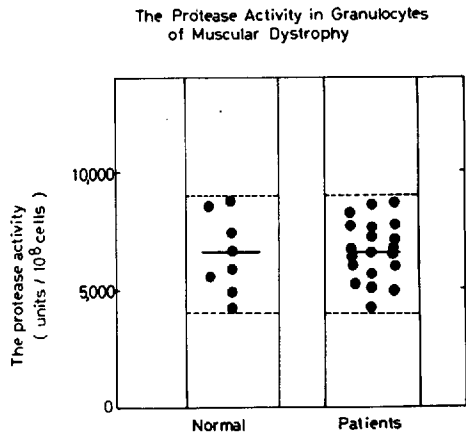


図1 筋ジストロフィー症患者の成熟顆粒球内新プロテアーゼ活性

次に本症患者末梢血より赤血球膜を作製し本プロテアーゼに対する感受性(崩壊しやすさ)を正常人のそれと比較した結果が図2に示してある。統計的に有意の差をもって本症患者赤血球膜は本プロテアーゼに対する感受

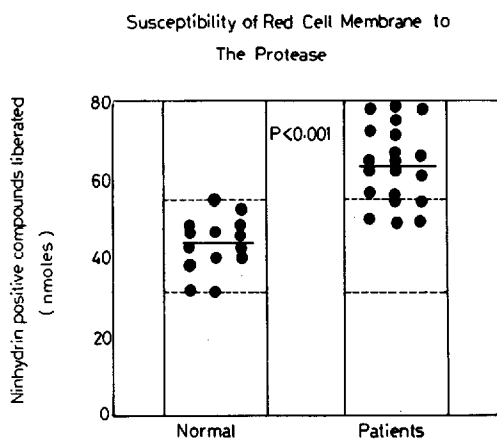


図2 筋ジストロフィー患者赤血球膜の新プロテアーゼに対する感受性

性が亢進していることがわかる。トリプシンと比較した場合、本プロテアーゼは赤血球膜に対してはほぼ同程度の proteolytic 作用を有するが、カゼイン分解能はトリプシンの  $\frac{1}{20}$  にすぎない。そこでトリプシンに対する本症患者赤血球膜の感受性を調べた結果が図3である。例数は多くないがトリプシンに対して

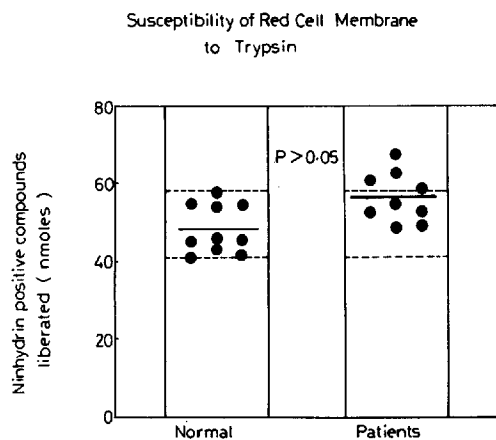


図3 筋ジストロフィー症患者赤血球膜のトリプシンに対する感受性 (トリプシン量は新プロテアーゼ量と同量を用いた)

は本症患者赤血球膜は正常人のそれとほぼ同程度の感受性を示した。

次にマウスより筋膜を作製し、本プロテアーゼに対する感受性を調べた。図4に示すよ

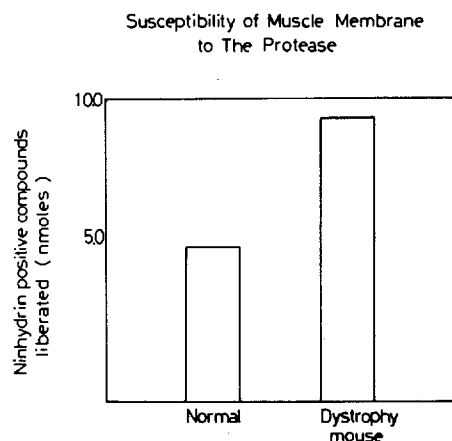


図4 筋ジストロフィーマウス筋膜の本プロテアーゼに対する感受性

うに筋ジストロフィーマウスの筋膜はコントロールのそれに比較して本プロテアーゼに対する感受性が亢進していた。

## 考 察

前述のように種々のプロテアーゼが細胞膜に作用して細胞機能を変化させることは広く知られている。しかし生体内で実際にこのような現象が起っているかどうかは未だ判然とはしない。事実トリプシンやキモトリプシンは血中や組織液中では大量に存在するインヒビターによって不活性な状態でしか存在しないと考えられるし、トロンビンも血中では直ちにアンチトロンビンによって不活性化されてしまう。またパパイン、プロナーゼあるいはファイシンは高等動物体内には存在しない。従って実際に生体内で細胞膜に作用してその機能を変化させ得るプロテアーゼに関しては未だ判然としないのである。

最近筆者等が見出した本プロテアーゼは末梢血中では顆粒球ミトコンドリア内膜の内側に存在する。顆粒球は成熟して末梢血中に遊出すると約7時間の半減期で組織中へ出てゆく。従って顆粒球の主たる役割は血中でなくむしろ組織中の作用と考えられる。顆粒球ミトコンドリア内膜の内側に存在するという特殊性によって本プロテアーゼは当然筋膜にも作用し得ると考えられる。本プロテアーゼが細胞膜に作用して細胞機能を変化させる証拠は既に存在する。すなわち結晶化した本プロテアーゼをリンパ球に作用させるとリンパ球のPHAに対する感受性が著増する。本プロテアーゼでリンパ球を処理するとそのみでは何の変化をも惹起しない微量のPHAを添加してもリンパ球のDNA合成は著増することがわかっている(投稿中)。以上の結果からわかることは本症患者の赤血球膜は本プロテアーゼによって正常人のそれよりもこわされやすいということ、すなわち構造的な異常を意味する。更に筋ジストロフィーマウスの筋膜がコントロールマウスのそれよりも本プロテアーゼによって崩壊されやすいという事実(本実験は3匹ずつの比較であるのでより多数例についての結果を見ないと確定的な結論は出しにくい)は本症における筋膜の構造的異常を推定させ、生体内では本プロテアーゼに対する感受性が亢進しているために種々の筋細胞機能の異常が惹起される可能性を示唆するものと考えられる。

## 文 献

- 1) Rowland, L. P. (1976). Pathogenesis of muscular dystrophies. *Arch. Neurol.*, 33 : 315-321.
- 2) David, J. R., Lawrence, H. S., and Thomas, L. (1964). The in vitro desensitization of sensitive cells by trypsin. *J. Exp. Med.*, 120 : 1189-1200.
- 3) Teng, N. N. H., and Chen, L. B. (1975). The role of surface proteins in cell proliferation as studied with thrombin and other proteases. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 72 : 413-417.
- 4) Aoki, Y., Urata, G., Takaku, F., and Katunuma, N. (1975). A new protease inactivating  $\delta$ -aminolevulinic acid synthetase in mitochondria of bone marrow cells. *Biochem Biophys. Res. Commun.*, 65 : 567-574.
- 5) Aoki, Y. (1978). Crystallization and characterization of a new protease in mitochondria of bone marrow cells. *J. Biol. Chem.*, 253 : 2026-2032.
- 6) Dodge, J. T., Mitchel, C., and Hanan, D. J. (1963). The preparation and chemical characteristics of hemoglobinfree ghosts of human erythrocytes. *Arch. Biochem. Biophys.*, 100 : 119-130.

↓ **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

進行性筋ジストロフィー症の病因論として神経障害説,血管障害説,筋膜異常説等が唱えられている.最近本症の赤血球膜に種々の異常が見出されてきたことから本症の本態を膜異常症としてとらえる見方が有力になりつつある 1).しかし膜異常が本症に存在するとしてもこれが本症の発症にどのように結びつくかに関しては未だ判然としない.