

3) 筋肉中のプロテアーゼの精製とその活性中心の検索 ならびに特異的阻害剤の開発に関する研究

今 堀 和 友*

筋ジストロフィー症の成因は不明であるがおそらく1つの遺伝子の欠陥にもとづく遺伝子病であろう。しかし、その表現型はその遺伝子の直接の欠陥だけでなく、その欠陥に由来して起こると思われる多くの“なだれ現象”さらには、その feed back にもとづく現象等が重なって極めて複雑になり、表現型から直接の原因をつかむことが非常に難しくなっていると思われる。

この様に“こんがらがった糸をほぐす様な問題”への取り組み方にはいろいろあるが、その1つは、筋ジストロフィー症について知られている種々の現象を説明できるような仮説を考え、その是非を実験的にたしかめることであろう。

今回この様な仮説の1つとして KAF (Kinase Activating Factor) と呼ばれる筋肉中のプロテアーゼを考え、MDはこのKAFに特異的な阻害剤の欠除によるものと考えてみた。その理由はいろいろあるが、例えば、筋ジストロフィー症患者およびその carrier の血液中の CK (Creatine Kinase) 活性が著しく上昇しているという江橋らの報告がある勿論、これは筋細胞中のCKが血液中にもれ出したためともいえようが、血液におけるCKの増加量は筋肉におけるCKの減少量をはるかに上廻っている。従って、筋ジストロフィー症においてはCKが de novo に合成されるようになったか、あるいは、CKが活性化されたかのいずれかを考えなくてはならない。筋ジストロフィー症においては阻害剤欠

乏のため、KAFによりCKが活性化を受けたとする考え方は一応妥当性があるであろう。また、CKの活性上昇が筋ジストロフィー症の初期に著しく、後期に消失することや、筋ジストロフィー症の進行と共に筋肉中の種々のタンパク質が消失していく事実も、プロテアーゼの作用を示唆しているように思われる。

一方、筋ジストロフィー症に関する顕著な現象の1つとして、Mb (myoglobin) の電気泳動のパターンの変化が三好らによって報告されている。筋ジストロフィー症が遺伝的に劣性であることを考えると、これは複数個の遺伝子の表現の仕方の変化というより、Mb そのものの修飾によるものと考えた方が楽である。その修飾剤の1つの候補としてKAFが考えられるかも知れない。

以上のことをふまえると、問題は筋肉よりKAFを精製し、これがCKの活性化や、Mbのパターンの変化をもたらすか否かを検討することになる。しかしながら、KAFの精製は極めて大変な仕事であるので、今回は市販のタンパク質分解酵素でKAFを代用し、上記問題を検討してみた。

研究方法

CKはウサギ筋肉から精製した凍結乾燥品で Boehringer より購入した。CKの酵素活性は、基質クレアチンとATPから生じるADPをピルビン酸キナーゼ、乳酸脱水素酵素を介してNADHの減少に変換して定量した。Mbはウサギ、およびサル¹⁾の筋肉から Singer 法および三好らの CM-Sephadex カラムクロマトグラフィーを用いる方法により精製した。

* 東京大学医学部第二生化学

Mbの分析には Tris-EDTA-Borate 緩衝液および Veronal 緩衝液を用いるセルロースアセテート膜電気泳動と、Tris-EDTA-Borate緩衝液を用いるアクリルアミドゲル電気泳動とを用い、タンパク質の染色にはアミドブラック、ヘムタンパク質の検出にはベンチジン染色を使用した。

結 果

CKに市販のプロナーゼ、ズブチリシン、トリプシン、キモトリプシンを作用させ(30℃, 基質とプロテアーゼ比(S/E)=80~1000(W/W)), プロテアーゼ処理によるCK活性の変動を調べた。プロナーゼとズブチリシン処理により、CK活性は時間と共に徐々に減少し、特にプロテアーゼ量の多いところ(S/E=80)ではCK活性は数時間のうちに著しく減少した。一方、トリプシン、キモトリプシンの場合は、基質特異性が厳密なためか、高濃度のプロテアーゼで処理してもCK活性の変動はほとんど見られなかった。このようにプロテアーゼ処理に伴うCK活性の変化を調べたところ、活性の減少が見られただけで、CK活性が増加する現象は見出せなかった。

プロテアーゼ処理を行ったCK標品を電気泳動で調べると、いずれの場合にも対照のCKと同じ位置に1本のバンドが検出された。プロナーゼやズブチリシンの場合、CKのバンドの濃さは残存酵素活性に割合近かったが、トリプシン、キモトリプシンの場合には、バンドの濃さも対照と変わらず、CKがほとんどプロテアーゼの作用を受けなかったことが示された。

Singer 法および三好らの方法で精製したウサギとサル Mb の電気泳動パターンは、いずれの場合も Mb に相当するバンドは1本で Mb の亜分画は見出せなかった。Mb の電気泳動パターンにおよぼすプロテアーゼの効果を見るために、材料の筋肉をまず自己消化

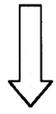
させ、これから抽出精製した Mb 分画を調べる方法、および、精製 Mb に市販のプロテアーゼを作用させる方法の2つを検討した。

前者では自己消化の条件を検討したが、Mb の電気泳動パターンは全く変化しなかった。後者の場合、Mb にトリプシン、キモトリプシンを高濃度で作用させても Mb のパターンには何の変化も見られなかったが、同量のズブチリシン(S/E=20)を作用させると、Mb は著しく分解され、電気泳動のパターンは大きく変動した。しかし、この場合にも Mb の亜分画に相当するバンドは見出せなかった。

考 察

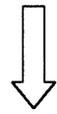
以上のように市販のタンパク分解酵素を用いた実験においては、CKの活性化も Mb のパターン変化もみられなかった。この原因として少くとも次のことが考えられる。(1) Mb としてはウサギ、サルのもを用いたし、CK としてはウサギのもを用い、いずれもヒトのものではないので期待する結果がえられなかった。(2)今回用いた市販のプロテアーゼ類の基質特異性が K A F の基質特異性と異なるので期待する結果がえられなかった。(3) CK や Mb の調製中に何かの artifact が生じ、このため期待する結果が生じるのを妨げた。(4) CK や Mb にみられる変化は K A F とは全く無関係のものである。

これらの可能性のいずれであるかについては今後一層の研究を続ける必要がある。しかし、例えば Krebs らの結果によれば、K A F によるホスホリラーゼキナーゼの活性化に関しては、K A F は完全にトリプシンやキモトリプシンで代用されるという。これからすれば、上記(2)の可能性は薄いようである。今後は(1)、(3)、(4)の可能性を確かめた上で K A F の調製にとりかかるか否かを検討してゆきたい。



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



筋ジストロフィー症の成因は不明であるがおそらく1つの遺伝子の欠陥にもとづく遺伝子病であろう。しかしその表現型はその遺伝子の直接の欠陥だけでなく、その欠陥に由来して起こるとされる多くの“なだれ現象”,さらには、その feed back にもとづく現象等が重なって極めて複雑になり、表現型から直接の原因をつかむことが非常に難しくなっていると思われる。