

## 11) カルシウム依存性中性プロテアーゼの精製, 特異性と阻害に関する研究

今堀和友\*

研究協力者 鈴木絃一\* 石浦章一\*

我々は筋ジストロフィー症の研究の開始に当たり、萎縮時に見られる構造タンパク質の変質や量的減少の原因を探ることが、必ずしも遺伝的変異を直接究明することにはならないにせよ、治療に道を開くという面からは重要かつ妥当であると考え、異化の異常をきたす有力な候補として筋タンパク分解系に注目した。例えば、Duchenne 型で見られる進行性を説明する仮説として、筋肉構造タンパク質の生合成と分解のバランスが崩壊し、より加水分解方向に傾くことが原因ではないか、と考えた。まず我々は、病変に伴う構造タンパク質の減少は、生合成量の低下によるものではなく分解機構の活発化である、という事実をふまえ、中性付近に至適 pH を持ち細胞内可溶性画分に存在しており筋肉構造タンパク質の分解に関与していると考えられる  $\text{Ca}^{2+}$  依存性中性プロテアーゼ (Calcium-Activated Neutral Protease; 以下 CANP と略す) に着目して、病態変化とプロテアーゼ活性変化との関連を明らかにする目的で以下の研究にとりかかった。

CANP が筋肉の Z-band を消失させること、また筋肉の構造タンパク質、特にトロポニン、に対して高い基質特異性を示すこと、Duchenne 型筋ジストロフィーにおいて見られるトロポニンの減少パターンが CANP に

よる分解パターンに類似していること<sup>1)</sup>と、病変が筋肉に特異的に起こることを考えあわせると、本酵素が筋肉構造タンパク質の特異的分解に関与している可能性が高いと判断し研究を開始したものである。

材料は、筋ジストロフィーのモデル動物の 1 つであるジストロフィーチキンを使用できる見通しがついたため、ニワトリ骨格筋を出発物質とした。

現在までの報告では、最もよく精製された 1 例は Dayton らのブタ骨格筋からの酵素で、分子量 80,000 と 30,000 のダイマーと報告されていたが、均一性に問題があったため、まず単一に精製することが重要不可欠であると考え精製にとりかかり、均一な標品を得ると共に、同筋から CANP に特異的なタンパク性インヒビターも精製した。以下、我々の研究室で得られた結果を主としてこの単一に精製されたプロテアーゼの性質を述べ、生体内での CANP の活性調節機構を検討する。またニワトリの筋ジストロフィーに対して CANP がどこまで関与しているかその可能性をあげ、現在までのアプローチを述べてみたい。最後に、低分子性 CANP インヒビターの探索とそのジストロフィーチキンへの応用計画を述べる。

$\text{Ca}^{2+}$  によって活性化される中性プロテアーゼ (CANP) は、当研究室において等電沈殿、

\* 東京大学医学部生化学教室

DEAE-セルロースクロマトグラフィー、ウルトゲルによるゲルろ過、及び DEAE セルロース再クロマトグラフィーにより 2700 倍に精製された。精製標品は、ディスク並びに SDS 電気泳動的に単一で(図 1)、収量は 1

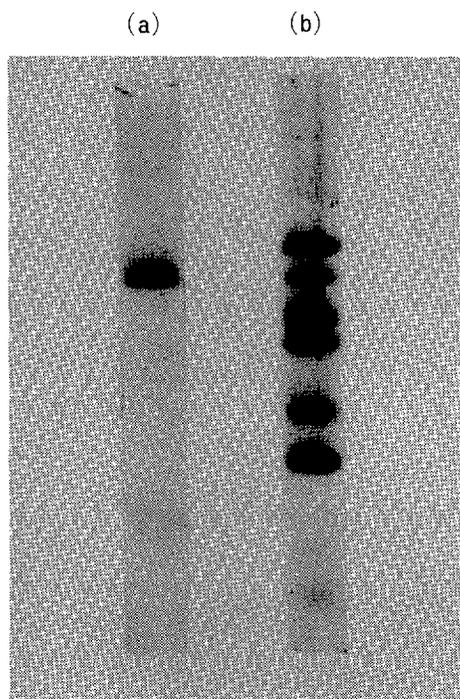


図 1 精製したプロテアーゼの SDS 電気泳動図

- (a) プロテアーゼ  
 (b) プロテアーゼ+マーカー (ホスホリラーゼ, BSA, PK, LDH, MK)

kgの筋肉より 4.6mgであり、Dayton らの報告の約10倍の高収量であった。分子量は、ゲルろ過及び SDS 電気泳動によって 80,000 と決定され、単一のポリペプチドから成るモノマー酵素であることが判明した。本酵素の至適 pH は 7.5~7.8 であり、アミノ酸分析の結果から Asp, Glu が多い酸性タンパク質であること、また  $\beta$ -メルカプトエタノールで活性化され、モノヨード酢酸で失活し、PMSF、

TPCK などで阻害を受けないなどの結果から CANP はセリン性プロテアーゼではなく、SH 基が活性に関与していることが確かめられた。また CANP は  $Ca^{2+}$  によって活性化されることが特徴の 1 つであるが、 $Ca^{2+}$  ( $K_a=0.8mM$ ) の他に  $Sr^{2+}$  ( $K_a=6.0mM$ ) によっても活性化を受けることがわかった。また  $Ca^{2+}$  の他に 2 価金属イオンを共存させると特に  $Zn^{2+}$  が  $Ca^{2+}$  の活性化能を完全に打ち消すことが判明した。CANP の基質としてはアルカリ変性カゼインが最も適当であったが、変性したヘモグロビン、ミオグロビン、チトクローム C も分解された。しかし人工基質については BAEE, BTEE, BAPA, Z-Glu-Tyr, Z-Phe-Ala, Bz-Gly-His-Leu, Suc-(Ala)<sub>3</sub>-PNA, Leu-PNA, などには一切作用しなかった。しかし、CANP を酸化インシュリン B 鎖及びグルカゴンに作用させると分解活性を示し、Tyr-Leu, Glu-Ala, Tyr-Thr, Phe-Val の結合を加水分解していることが、ダンシル法及びアミノ酸分析によって確認された。この結果と CANP の厳密な基質特異性を考えあわせると、必ずしも加水分解するペプチド結合の両端のアミノ酸を識別しているのではなく、高範囲のサブサイト構造や、高次構造の認識などの問題を考える必要があるように思われる。

筋肉構造タンパク質の分解については、まず精製したタンパク質を基質とした時に分解が起こるか否かを確かめた。CANP と基質のモル比を 1:100 として 30°C の条件で反応させたところ、トロポミオシンとトロポニンに顕著に分解したが、ミオシンと  $\alpha$ -アクチニンには部分的にしか作用せず、アクチニンには全く作用しなかった。この実験によりある特定の構造タンパク質しか基質としないことがわかった。次に個々の構造タンパク質について詳しく調べてみると、トロポミオシンにおいては分子量 36,500 のものが 18,000 と 16,500 の 2 本のペプチドに限定分解されていることが判明した(図 2)。また、トロポニンにおいて

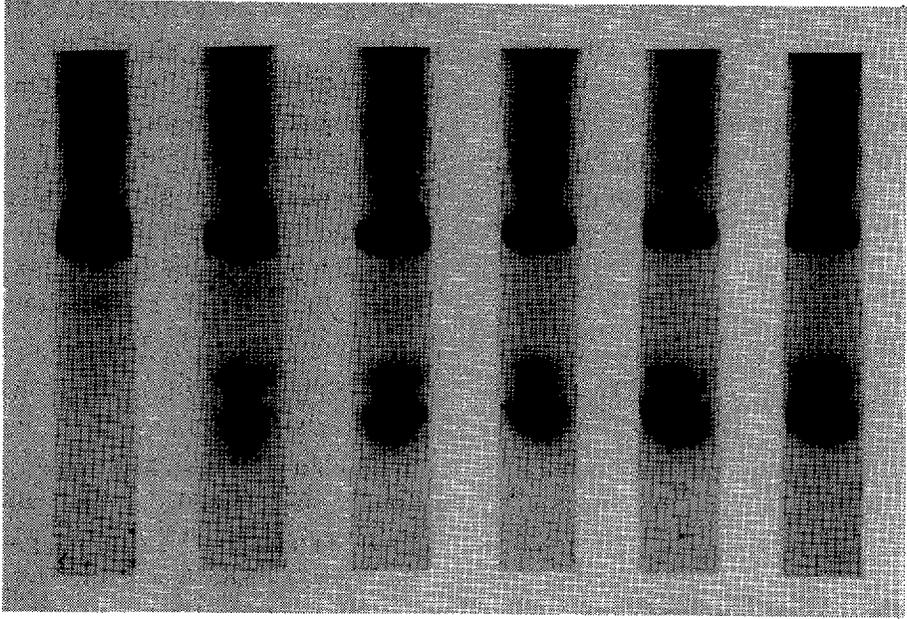


図2 CANP によるトロポミオシンの分解 ( SDS 電気泳動図)  
 プロテアーゼとトロポミオシンのモル比は 1 : 100.  
 左より分解時間 0', 10', 20', 30', 45', 60' .

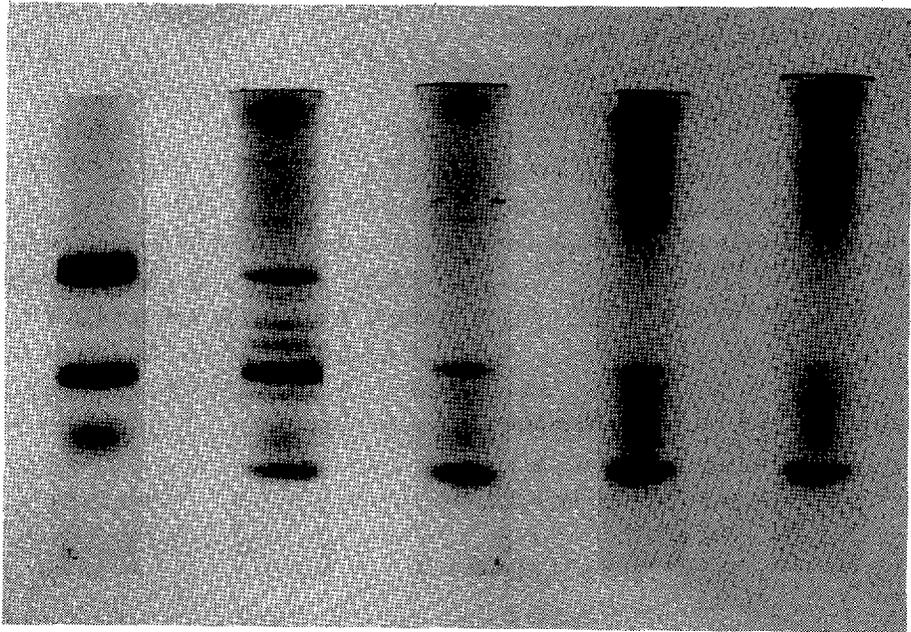


図3 CANP によるトロポニンの分解 ( SDS 電気泳動図)  
 プロテアーゼとトロポニンのモル比は 1 : 100.  
 左より分解時間 0', 10', 20', 30', 45' .

は、Tが一番はやく分解を受けて消失し、続いてI、Cの順になることがわかった(図3)。同時に我々は、筋原線維にCANPを作用させ、精製した構造タンパク質に作用させた結果と相違があるかどうかを確認しようとしたが全く差違は認められなかった。これらの実験より、精製構造タンパク質におけるCANPの作用は正確に生体内での作用を反映しているものと考えられた。以上の実験により、本酵素が筋肉の構造タンパク質、特にその調節タンパク質を特異的に限定分解する、という事実は、病変が筋細胞に集中していることを説明するものであり、本酵素がこの病変に大きな役割を果たすという我々の仮説を支持している。

しかし、どのようなプロテアーゼでも全く無差別に働いているのではないことは明らかである。そこでその生理活性の調節機構の解明が重要な問題となってくる。その1つが、特異的インヒビターによる調節である。我々はCANPに特異的なインヒビターをニワトリ骨格筋より分離精製することに成功した。分子量が67,000であるインヒビタータンパク質はCANPと1対1の複合体を作ると考えられ(図4)、阻害は $Ca^{2+}$ 濃度に影響されな

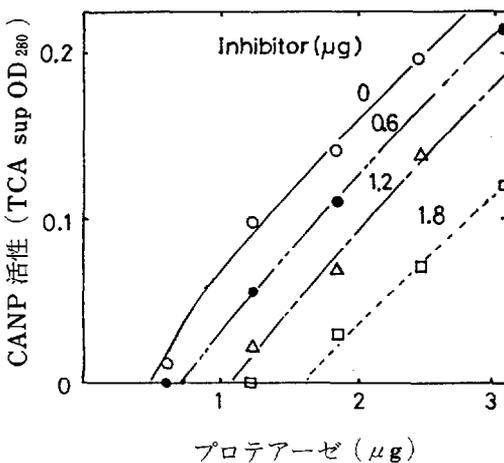


図4 インヒビターによるCANPの阻害

かった。しかし、骨格筋中にはCANPの1/3~1/5しか存在しないこと、生体内での解離会合の証拠がないことなどから、他の活性調節機構も示唆された。それが $Ca^{2+}$ による調節である。事実CANPは1~2 mMの $Ca^{2+}$ が存在しないと活性を持たず、この濃度は細胞内濃度 $10^{-5}M$ に比較するとかなり高いので、その生理作用には何らかの未知の因子が存在する可能性もまだ残されている。もっとも、局所的な $Ca^{2+}$ 濃度の急激な増加の可能性も否定できないので、この高濃度 $Ca^{2+}$ 要求性は今後、本酵素の存在意義を問う上でも重要な問題になろう。

さて、ニワトリの筋ジストロフィー症とCANPの間には密接な関係が見出せるであろうか。我々は研究を開始するに当たり次の予想のうちいくつかはニワトリの場合に該当するものならば、CANPとニワトリの筋ジストロフィー症の間に何らかのつながりがあるものと考えたこととした。まず1つは、CANPの絶対量の増加が見られるか、という問題である。我々は、粗抽出液の活性を測定することにより、せいぜい1~2倍に増加(ジストロフィーチキンの場合)しているだけであり、これは従来報告されている種々のプロテアーゼ活性の上昇に及ばないほどの増加であることを認めたので、この予想は見事にはずれた。次に、我々が精製したCANPインヒビター欠損も考えられたが、ジストロフィーチキン骨格筋より同インヒビターを精製することに成功し、量的にも質的にも正常のものと全く同一であることを確認した。第3は、杉田らの提唱による膜損傷説の立証であるが、ジストロフィーチキンの筋小胞体膜は、ヒトのDuchenne型ジストロフィー症患者のものよりは数段強固と考えられることや、ヒトのジストロフィー症に見られる赤血球膜のスペクトリンの分解がジストロフィーチキンの赤血球膜では見られないこと(CANPは確かにスペクトリンを分解する)などの情況証拠からこれがニワトリのジストロフィー症の原因

であるとは考えにくい。第4は基質である構造タンパク質が遺伝的もしくは後天的にCANPに作用されやすい形に変化しているのではないか、という予想であったが、構造タンパク質のSDS電気泳動による検索によりほとんど変化がないことが認められ、またCANPによる分解パターンも正常のものほとんど変わらないことが、わかった。しかし江橋らの研究によると<sup>2)</sup>、ジストロフィーチキンのトロポニンのCa<sup>2+</sup>感受性がやや鈍いことが指摘されており、案外小さな構造変化の差がCANPによる構造タンパク質のターンオーバー速度の変化となって現われるのかもしれない。

以上簡単にジストロフィーチキンでの研究発展の方向を述べてきたが、CANPの作用はニワトリよりもヒトの症状の方に類似点が見られる。トロポニンやスペクトリンの分解然り、活性上昇然り、である。そこで我々は、この遺伝性筋疾患におけるCANPの作用を減少させる意で低分子性インヒビターを探索することに着手した。現在までのところ、放線菌のプロテアーゼインヒビターであるロイペプチンがCANPの作用をin vitroで拮抗的に押えることを発見した(図5)<sup>3)</sup>。現在in vivoでの副作用や、CANP及びそれ以外のプロテアーゼに対する阻害効果を調べる目的で、ジストロフィーチキンへの投与を行ないつつある。この結果はまだ明らかになってはいないが、この実験によってCANP活性の

低下と萎縮の低減との間に関連が見られるならば、筋ジストロフィー症とCANPの関係が大きくクローズアップされるに違いない。

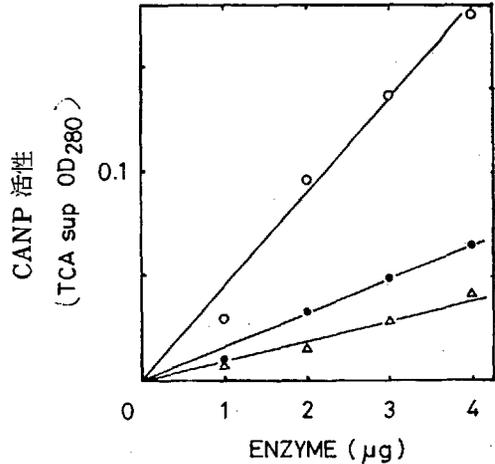
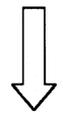


図5 ロイペプチンによるプロテアーゼの阻害  
 ○ ロイペプチン 0  
 ● " 0.1 μg  
 △ " 0.2 μg

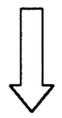
#### 文 献

- 1) Sugita, H. and Toyokura, Y.; Proc. Japan Acad. 52, 256 (1976)
- 2) 江橋節郎：昭和51年度厚生省心身障害研究補助金「筋ジストロフィー症の原因の究明に関する研究」班会議。
- 3) 石浦章一、今堀和友：日本臨床, 11, 28 (1977)



## 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



我々は筋ジストロフィー症の研究の開始に当たり、萎縮時に見られる構造タンパク質の変質や量的減少の原因を探ることが、必ずしも遺伝的変異を直接究明することにはならないにせよ、治療に道を開くという面からは重要かつ妥当であると考え、異化の異常をきたす有力な候補として筋タンパク分解系に注目した。例えば、Duchenne 型で見られる進行性を説明する仮説として、筋肉構造タンパク質の生合成と分解のバランスが崩壊し、より加水分解方向に傾くことが原因ではないか、と考えた。まず我々は、病変に伴う構造タンパク質の減少は、生合成量の低下によるものではなく分解機構の活発化である、という事実をふまえ、中性付近に至適 pH を持ち細胞内可溶性画分に存在しており筋肉構造タンパク質の分解に関与していると考えられる  $\text{Ca}^{2+}$  依存性中性プロテアーゼ (Calcium-Activated Neutral Protease; 以下 CANP と略す) に着目して、病態変化とプロテアーゼ活性変化との関連を明らかにする目的で以下の研究にとりかかった。