

ラット表皮のアミノペプチダーゼ I 活性 に対するカチオンと S H化合物の影響

富原靖博・菅原 潔・児玉 治・大内 毅

Effects of Cations and thiol Compounds
on the activity of Epidermal Aminopeptidase I

YASUHIRO TOMIHARA, KIYOSHI SUGAWARA,
OSAMU KODAMA and TAKESHI OUCHI

From Laboratory of Biochemistry,
Department of Agricultural Chemistry,
Ibaraki university, Ami, Ibaraki-ken
300-03, Japan

緒 言

哺乳動物の表皮では定常的に細胞分化が行なわれており、細胞の形態の変化とともにミトコンドリアおよび核が消失する。この現象は当然、RNA、DNAおよび蛋白質の分解消失、あるいは化学的な変化を伴うものと推定される。一方これらの分解消失とともに、物理的および化学的に強靱なケラチンの生成が起こっている。これらの分解および生成反応に蛋白質分解酵素が当然重要な働きをしているものと考えられた。しかし従来、哺乳動物表皮の蛋白質分解酵素に関する研究はほとんど見られず、われわれは表皮の細胞分化機構解明の立場から⁽¹⁻²⁾、ラット表皮の蛋白質分解酵素の研究を進めてきた。⁽³⁻⁵⁾ 前報⁽⁵⁾では表皮には Epidermal aminopeptidase I (MW 200,000) および Epidermal aminopeptidase II (MW 80,000) の2種が存在し、Epidermal aminopeptidase II は真皮にも存在するが、Epidermal aminopeptidase I は表皮にのみ存在すること、また、いずれも S H依存性である事を報告した。本報では、表皮にのみ存在する Epidermal aminopeptidase I の重要性を考え、この酵素の L-Arg-β-NA 水解 (アミノペプチダーゼ B 活性) 活性に対する低分子化合物の影響として特に各種 S H化合物の濃度の影響、および各種無機イオンの影響について調べた。その結果、酵素活性と S H濃度変化についてシスティンおよびグルタチオン

のような生体成分として存在する S H化合物とメルカプトエタノール、DTT、およびチオグリコール酸のような非生体性 S H化合物の間に明らかに異なったパターンが認められた。またこの酵素活性に対する無機イオンの影響については従来、肝臓、皮膚 (大部分は真皮) あるいは E. Coli などからの Aminopeptidase B のものとは異なった影響が示された。

実験材料および方法

1) 表皮の分離

生後4日目(体重約7.2g)のウィスター系ラットの皮を0.24M塩化アンモニウム溶液中(pH9.5)0℃でときどき攪拌しながら15分間処理後、表皮を真皮よりピンセットを用いて剥離し、Earleの溶液中で数回洗った後以後の実験に用いた。

2) 酵素の調整法

すべての操作は0℃~+4℃で行なった。前述の方法により分離した表皮を幾つかの切片とし、0.01M トリス-塩酸緩衝液(pH7.6)で比較的すり合わせのゆるやかなTen Broeck型ホモジナイザーを用いて静かに往復を5回程くり返し磨砕した。それを10,000×g、10分間遠心し、その上澄液を105,000×g、60分間遠心した。

3) 酵素活性の測定法

基質としてL-アルギニン-β-ナフチルアミドを使用した。この酵素の作用により遊離するβ-ナフチル

アミンを *p*-ジメチルアミノ桂皮アルデヒドとカップリングさせ、比色定量する松谷等⁽⁶⁾の定量法を一部改良した児玉等⁽⁷⁾の方法を用いた。すなわち 6 mM の L-アルギニン-β-ナフチルアミド溶液 40 μl をとり、0.1 M トリシュー塩酸緩衝液 (pH 7.0) 160 μl を加えて 37 °C、30 分後、酵素液 40 μl を加えて反応させた。SH 還元試薬存在下での測定には緩衝液を 140 μl にして、特に記す以外は 12 mM ジチオスレイトール終濃度 1 mM DTT 20 μl を加えて反応させた。37 °C 一定時間反応後、反応混液より 50 μl をとり 0.2 N 塩酸溶液 50 μl に加えて反応を停止させ 0.1 % *p*-ジメチルアミノ桂皮アルデヒドエタノール溶液 800 μl を加えた。15 分後 535 nm における吸光度を測定した。1 分間に 1 μmole の β-ナフチルアミンを遊離する酵素量を 1 単位とした。

4) ゲルろ過法による分子量の測定

Andrew の方法に従って行なった。すなわち各標準、蛋白質質量 2 mg を 2 ml の 0.01 M トリシュー塩酸緩衝液 (pH 7.6) に溶解し同緩衝液で緩衝化した Bio-Gel A-0.5 m のカラム (3.8 × 37 cm) にかけ、溶出速度 2.4 ml/cm²/hr で 5 ml づつ分取した。標準物質としては以下のものを使用した。

カタラーゼ (MW 240,000, 牛肝臓 Sigma chemical Company)

γ-グロブリン (MW 160,000, 牛フラクション II, Miles Laboratory Inc)

および牛血清アルブミン (MW 67,000, Sigma chemical Company)

5) 蛋白質の定量

Lowry らの方法⁽⁹⁾に従った。標準蛋白質としては、牛血清アルブミンを用いた。

実験結果

Bio-Gel A-0.5m によるゲルろ過

Fig. 1 に表皮の 105,000 × g 上澄液の Bio-Gel A-0.5m カラムによるゲルろ過の溶出パターンを示した。最初に溶出してくるアミノペプチダーゼが表皮アミノペプチダーゼ I である。この酵素は SH 酵素であり L-Leu-β-ナフチルアミドより L-Arg-β-ナフチルアミドを 3~4 倍よく水解した。

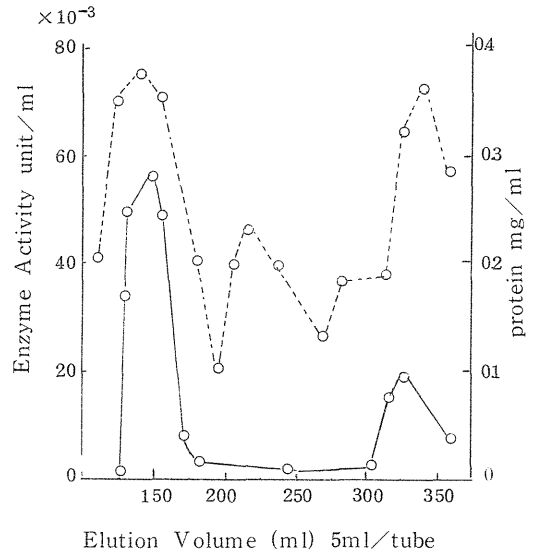


Fig. 1 Gel chromatography of epidermal aminopeptidases on a column of Bio-Gel A-0.5m column (3.8 × 37cm). Sample was 8ml homogenate supernatant fluid, protein concentration 11mg/ml. Elution; 0.01M Tris-HCl pH7.6, flow rate; 2.4ml/cm²/hr, fraction volume; 5.0ml. ○-○; Enzyme activity, ○··○; Protein concentration

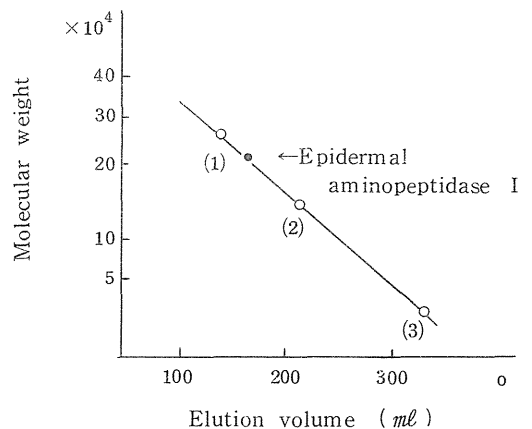


Fig. 2 Determination of the molecular weight of the aminopeptidase by the gel filtration on Bio-Gel A-0.5m, (1) Catalase, (2) γ-Globulin, (3) Serum Albumin

次にAndrewの方法によるゲルろ過により表皮アミノペプチダーゼIの分子量を求めた (Fig. 2.) その結果、表皮アミノペプチダーゼIの分子量は200,000と測定された。

カチオンの影響

Table I に本酵素のL-アルギニン-β-ナフチルアミド水解活性に対するカチオンの影響を示した。この表より、Cu⁺⁺, Zn⁺⁺, Cd⁺⁺, Hg⁺⁺, のような金属は極めて顕著な阻害作用を示し、Na⁺, Mg⁺⁺, Sr⁺⁺ ではほとんど影響が認められず、Ni⁺⁺は10⁻²Mでは著しく阻害するが10⁻⁴Mでは57%の活性が示された。

Table 1

Effect of various cations on the hydrolysis of L-Arg-β-NA by the enzyme in the 0.1M Tris-HCl buffer (pH7.0) with 30 minutes preincubation. The relative activity rate was given as percentages of the control (without cations)

Cations	cation concentration (M)		
	10 ⁻² M	10 ⁻³ M	10 ⁻⁴ M
none	100	100	100
Na ⁺	94	94	118
K ⁺	115	131	126
Cu ⁺⁺	1	6	3
Mg ⁺⁺	91	92	99
Ca ⁺⁺	97	131	145
Zn ⁺⁺	5	3	5
Cd ⁺⁺	3	3	9
Ba ⁺⁺	82	120	115
Hg ⁺⁺	3	4	18
Mn ⁺⁺	35	35	25
Sr ⁺⁺	90	119	110
Co ⁺⁺	57	123	138
Ni ⁺⁺	9	26	57

またMn⁺⁺は10⁻²~10⁻⁴Mの濃度範囲ではほぼ一定(65~75%阻害)の阻害作用を示した。一方K, Ca⁺⁺, Ba⁺⁺およびCo⁺⁺は10⁻³~10⁻⁴Mにおいてやや促進する作用を示した。

SH化合物の影響

Fig. 3. SH化合物の濃度変化の影響を示した。

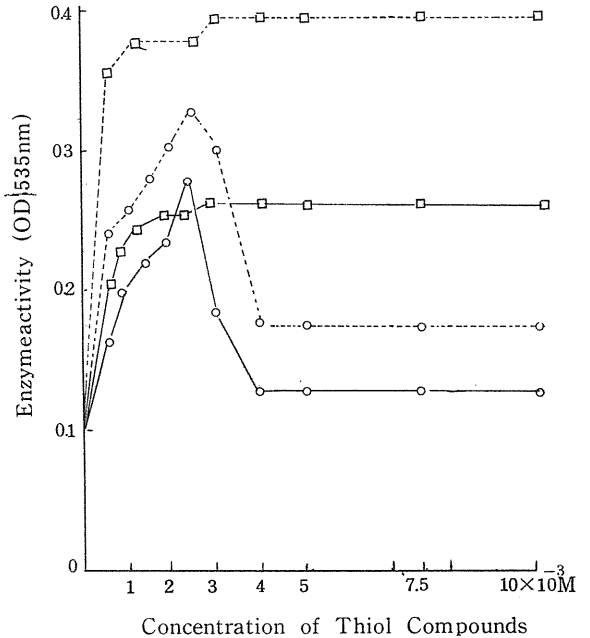


Fig. 3

Effect of the various concentrations of SH compounds on the hydrolysis of L-Arg-β-NA by the enzyme in the 0.1M Tris-HCl buffer (pH7.0) with 30 minutes preincubation.
 —○— Glutathione ...○... Cysteine
 —□— Thioglycolic acid
 ...□... Dithiothreitol

グルタチオンおよびシステインは2.5 × 10⁻³Mの濃度に活性のピークがみられ、それ以上の濃度では活性の低下が示された。これに対してチオグリコール酸やチオスレイトールでは2.5 × 10⁻³M以上の濃度範囲でも活性の低下がみられず活性に対する著しく異なるパターンが示された。

考 察

ラット表皮Aminopeptidase I は基質としてL-Arg-β-NAを L-Leu-β-NAよりも3~4倍も早く水解することからAminopeptidase B に属する可能性が示唆された。しかし、この酵素の分子量は200,000と算

出され、従来ラットの肝臓より抽出されたアミノペプチダーゼ B (MW 95,000) のそれより大きい分子量を示し、ラットの肝臓に存在するアミノペプチダーゼ B とは明らかに異なる酵素である事が推定された。また L-Arg-β-NA を基質とした場合のラット表皮アミノペプチダーゼ活性は Cu^{2+} , Hg^{2+} , Zn^{2+} , および Cd^{2+} のような金属イオンによって顕著に阻害された。この点はラットの肝臓アミノペプチダーゼ B と同様で SH 基に対する作用の結果と推定された。これに反して、 Ca^{2+} , K^+ , Ba^{2+} , および Co^{2+} は低濃度 ($10^{-4}\text{M} \sim 10^{-3}\text{M}$) で若干の活性促進効果を示した。この点はラットの肝臓アミノペプチダーゼ B と異なる。次に本酵素のラット表皮からの抽出には KCl 添加の効果が認められなかった。この点、ラットの皮よりのプロティナーゼの抽出に 8% KCl の存在が著しい抽出促進作用⁽¹⁰⁾を示した結果とは異なる。一方、本酵素活性に対する種々の SH 化合物の濃度変化について検討した結果、2つの異なったパターンが示された。その1つのタイプはチオグリコール酸および DTT に見られるタイプで $1.5 \times 10^{-3}\text{M}$ 付近で最大の活性を示し、この濃度以上に SH 化合物の濃度を増加しても活性の低下が示されなかった。これに対して、他のもう一つのタイプはシステインおよびグルタチオンの場合に見られるタイプで $2.5 \times 10^{-3}\text{M}$ 付近で極大を示し、 $2.5 \times 10^{-3}\text{M}$ 以上の SH 濃度になると著しく活性を阻害する事が示された。これは現在まで実験に供した SH 化合物の範囲内で整理すると I のタイプは合成化学薬品としての SH 化

合物であり、II のタイプは生体成分として存在する SH 化合物である。このことはこれら生体 SH 化合物がその体内における濃度変化により本酵素の活性発現に重要な働きを有しているものと推定され、その機構およびその生理的意義に関して現在研究を進めている。

文 献

- (1) Sugawara K. and I.A. Bernstein : Biochim. Biophys. Acta, 238, 129 (1971)
- (2) 菅原潔, 片方陽太郎, 大内毅 : 茨大農学部学術報告 20, 41 (1972)
- (3) 菅原潔, 三宅茂, 大内毅 : 茨大農学部学術報告 22, 25 (1974)
- (4) 菅原潔, 木崎康造, 徳誠吉, 大内毅 : 茨大農学部学術報告 23, 65 (1975)
- (5) 児玉治, 菅原潔, 大内毅 : 茨大農学部学術報告 23, 53 (1975)
- (6) 松谷衛, 竹久元彬, 福沢黎子, 島未明, 菊川縫子, : 臨床検査, 11, 92 (1967)
- (7) 児玉治, 菅原潔, 大内毅, : 茨大農学部学術報告 20, 31 (1972)
- (8) Andrews, P. : Biochem. J. 91, 222 (1963)
- (9) Lowry O.H.N., J. Roebrough, A.L. Farr, and R. J. Randall : J. Biol. Chem. 193, 265 (1951)
- (10) Jansen, C.T. and V.K. Hopsu-Havu : Acta drem-venereal 49, 525 (1969)

Summary

1. Epidermal aminopeptidase I which hydrolyzed L-arg-β-Naphthylamide faster than L-Leu-β-Naphthylamide was purified partially from the extract of the epidermis of new-born rats. And the enzyme presumably belong to the group of aminopeptidase B.
2. The epidermal aminopeptidase I was activated moderately with Ca, K, Ba, and Co ions in relatively lower concentrations (in $10^{-4} \sim 10^{-3}\text{M}$)
3. The epidermal aminopeptidase B activity depended on the presence of thiols. The maximum rate was observed at $2.5 \times 10^{-3}\text{M}$ of cysteine and glutathion, and in higher concentration of the thiols, the activity was inhibited remarkably. Other hand, in the presence of non-biological SH, no decrease of the activity was demonstrated in higher concentration.