

白ネズミ表皮および真皮に存在する アミノペプチダーゼの比較

児玉 治・菅原 潔・大内 毅

Comparative Studies of Aminopeptidases from the Epidermis and the Dermis of Rat

OSAMU KODAMA, KIYOSHI SUGAWARA
and TAKESHI OUCHI

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、ケラチン化に伴い、核・ミトコンドリア等の細胞構成成分の消失することが認められている。この際、核酸分解酵素および蛋白分解酵素の関与が考えられ、すでに表皮に存在するリボヌクレアーゼの報告がなされている。^{1)~3)}一方、皮膚に存在するプロテイナーゼ、ペプチダーゼに関する研究はなされているけれども、皮膚を機能的構造的に異なる表皮と真皮に分離して、それぞれの組織に存在するペプチダーゼに関する報告は、ほとんどない。そこで、著者らの研究テーマである表皮細胞分化機構^{11)~12)}の一環として、ケラチン化に関与している蛋白分解酵素の存在を明らかにする目的で、まず表皮および真皮に存在するアミノペプチダーゼの比較検討を行ったので、その結果について報告する。

実 験 方 法

表皮および真皮の分離

生後3~4日目のウイスター系ラットの皮膚を、0.24 M-塩化アンモニウム溶液 (pH9.5) 中0℃で攪拌しながら、15分間処理後、表皮を真皮よりピンセットを用いて剝離し、それぞれ0.25 M 蔗糖0.01 M トリス-塩酸緩衝液 (pH7.6) にて数回洗い以後の実験に供した。

なお以後の実験は全て0°~4℃で行った。

酵素の調製法

前述の方法で分離した表皮および真皮を、それぞれ0.25 M 蔗糖0.01 M トリス-塩酸緩衝液 (pH7.6) 中で、すり合せの比較的ゆるやかなTen Broeck型ホモジナイザーを用いて磨砕した。磨砕物を三枚重ねのガーゼで濾過し、濾液を800×g、10分間遠心し、その上澄液を105,000×g、120分間遠心した。105,000

×gの遠心の上澄液をさらに、バイオエンジニアリング社製のダイアフィルター(膜:G-10T)を使用し、約 $\frac{1}{5}$ に濃縮し、ゲル濾過およびディスク電気泳動の試料とした。

ゲル濾過法による分子量の測定

Andrewsの方法¹⁴⁾に従って行なった。すなわち各標準蛋白質2mgを2mlの0.15 M 塩化ナトリウム0.1 M リン酸緩衝液 (pH7.6) に溶解し、同緩衝液で緩衝化したセファデックスG-200のカラム(2.1×89cm)にかけ、1時間18mlの流速で、4mlづつ採取した。標準物質としては以下のものを使用した。カタラーゼ(分子量=240,000, 牛肝臓, Sigma Chemical Company), γ -グロブリン(分子量=160,000, 牛フラクションII, Miles Laboratory Inc.)および血清アルブミン(分子量=67,000, 牛, Sigma Chemical Company)

ディスク電気泳動

7.5%のアクリルアミドゲルを使用し、電極緩衝液は0.1 M トリス-硼酸緩衝液 (pH8.3) を用いた。方法として濃縮用ゲルおよび試料用ゲルを省き、蔗糖を加えて30%蔗糖溶液(W/V)とした試料50 μ lを分離用ゲルの上に直接静かに乗せ、チューブ(6×100mm)1本当たり3mAの定電流で1時間泳動を行い、泳動後ゲルを2.5mmの長さにかミソリを用いて切り、個々のゲル切片をそれぞれ別々の小試験管に入れ、0.1 M トリス-塩酸緩衝液(pH7.0)2mlを用いて6時間酵素の抽出を行い、抽出液の酵素活性を測定した。

酵素活性の測定

基質としてアミノ酸ナフチルアミドを使用し、アミノペプチダーゼの作用により遊離放出される β -ナフチルアミン(β -NA)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の定量法¹⁵⁾

を一部改良した著者等の方法¹³⁾を用いた。すなわち消化試験管に6mMの各種アミノ酸ナフチルアミド溶液40 μ lをとり、0.1Mトリス-塩酸緩衝液160 μ lを加えて37 $^{\circ}$ C5分後、酵素液40 μ lを加えて反応させた。S-H還元試薬存在下での測定には、緩衝液を140 μ lにして、12mMのジチオスレイトール(DTT)20 μ lを加えて反応させた。一定時間後、反応混液より50 μ lをとり、0.2N-塩酸溶液50 μ l中に加えて反応を停止させた後、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 μ lを加え、15分後535nmにおける

吸光度を島津分光光度計QR-50型により測定した。1分間に1 μ moleの β -ナフチルアミンを遊離する酵素量を1単位とした。

実験結果

セファデックスG-200によるゲル濾過

Fig. 1は表皮および真皮の105,000 \times g上澄液を、ダイアフィルターにより約 $\frac{1}{3}$ に濃縮したのちセファデックスG-200のゲル濾過を行った溶出パターンを示している。

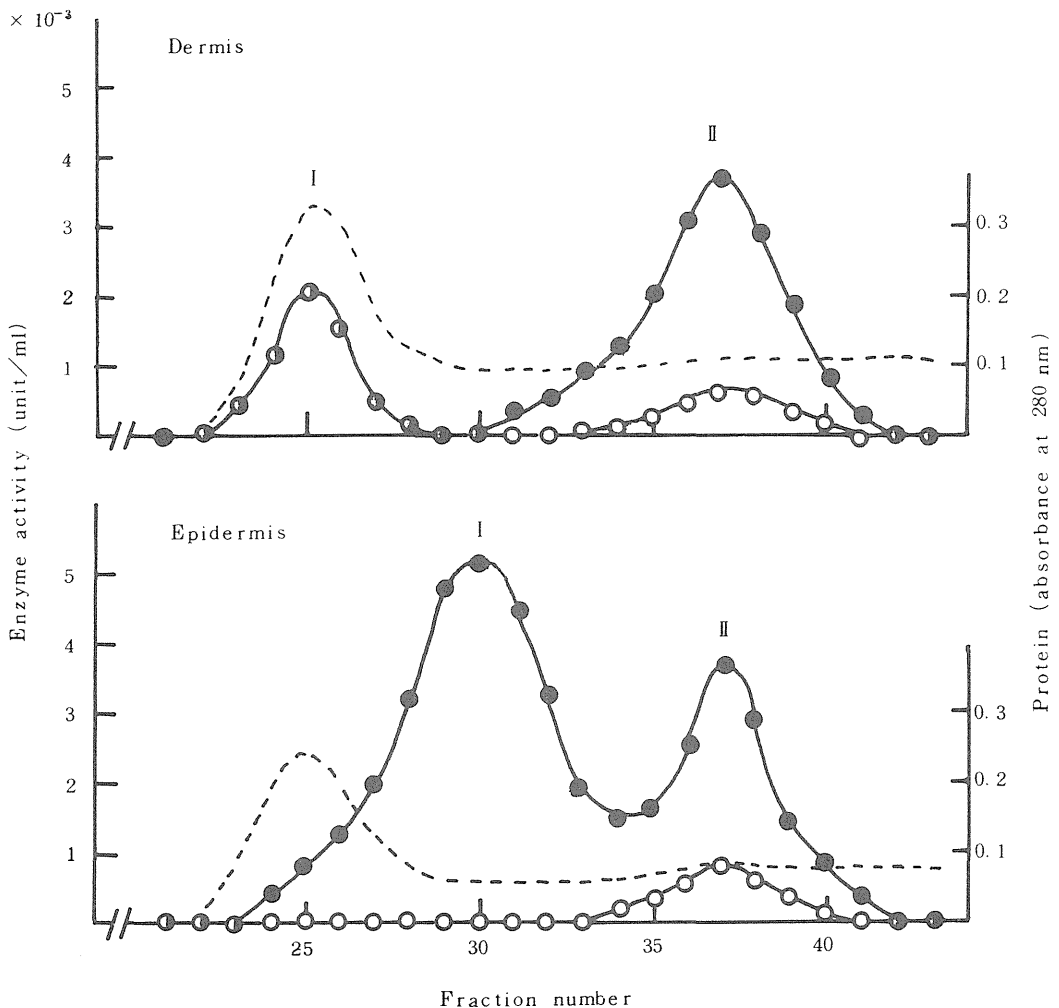


Fig. 1 Sephadex G-200 gel filtration of aminopeptidases from 105,000 \times g supernatant fraction of the epidermis and the dermis. The column (2.1 \times 91 cm) was equilibrated with 0.1M phosphate buffer, pH7.6. Fractions of 4 ml were collected. : absorbance at 280 nm, —●— : activity on Leu- β -NA in the presence of DTT (1mM), —○— : activity on Leu- β -NA in the absence of DTT.

この図より表皮 $105,000 \times 9$ 上澄液には, 2種のアミノペプチダーゼが認められ, いずれもSH還元試薬により顕著に活性化された。以後セファデックスG-200で最初に溶出してくるアミノペプチダーゼを表皮アミノペプチダーゼI, 2番目に溶出してくるアミノペプチダーゼを表皮アミノペプチダーゼIIとする。

真皮 $105,000 \times 9$ 上澄液には, カラムの排除容量 (void volume) に溶出し, SH還元試薬により活性化を受けないアミノペプチダーゼと, 表皮アミノペプチダーゼIIと同じ溶出位置に溶出され, SH還元試薬により活性化されるアミノペプチダーゼの2種のアミノペプチダーゼが認められた。以後最初に溶出してくるアミノペプチダーゼを真皮アミノペプチダーゼI, 2番目に溶出してくるアミノペプチダーゼを真皮アミノペプチダーゼIIとする。

次に Andrews の方法¹⁴⁾により, ゲル濾過によりこれらのアミノペプチダーゼの分子量を求めた。(Fig. 2) その結果, 表皮アミノペプチダーゼIの分子量は約20万, 表皮アミノペプチダーゼIIおよび真皮アミノペプチダーゼIIの分子量は約8万と測定された。

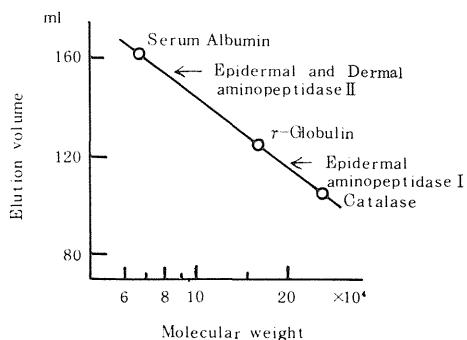


Fig. 2 Estimation of molecular weight of aminopeptidases from the epidermis and the dermis by Sephadex G-200 gel filtration.

The molecular weight was assayed by the method of Andrews. Each protein (2mg) was applied to a Sephadex G-200 column (2.1×89 cm) equilibrated in and eluted with 0.1M phosphate buffer pH7.6 containing 0.15M NaCl. Fractions of 4ml were collected.

Table. 1 The substrate specificity of aminopeptidases from the dermis and the epidermis.

Substrate	Dermal aminopeptidase		Epidermal aminopeptidase	
	I	II	I	II
Leu- β -NA	100	29	100	50
Arg- β -NA	34	100	37	100
Lys- β -NA	18	91	45	100
Val- β -NA	2	3	15	8
Gly- β -NA	21	30	83	36

The relative hydrolysis rate were given as percentages of the best substrate (100%).

The enzyme activities were assayed in the presence of DTT (1mM) except for dermal aminopeptidase I.

アミノ酸ナフチルアミド水解活性の比較

一方, 上記各種アミノペプチダーゼの基質特異性を Table.1 に示すような各種アミノ酸ナフチルアミドを用いて検討した。その結果表皮アミノペプチダーゼIIおよび真皮アミノペプチダーゼIIは, ほぼ同じ基質特異性を示し, 塩基性アミノ酸のナフチルアミドをよく水解した。表皮アミノペプチダーゼIと真皮アミノペプチダーゼIは, とともにロイシル- β -ナフチルアミドをよく水解したが, 基質特異性においては明確な差が認められた。すなわち, 表皮アミノペプチダーゼIは真皮アミノペプチダーゼIに比較して, グリシル- β -ナフチル

アミドをよく水解し, またリジルー- β -ナフチルアミドおよびバリルー- β -ナフチルアミドについても比較的よく水解した。この点表皮アミノペプチダーゼIの方が基質特異性の幅がやや広い。

至適pH

Fig.3に, ロイシル- β -ナフチルアミドに対するpH作用曲線を示した。表皮アミノペプチダーゼIIと真皮アミノペプチダーゼIIの至適pHは, とともにpH 7.2を示し, 表皮アミノペプチダーゼIはpH 6.9および真皮アミノペプチダーゼIはpH 6.5にそれぞれ至適pHが見られた。

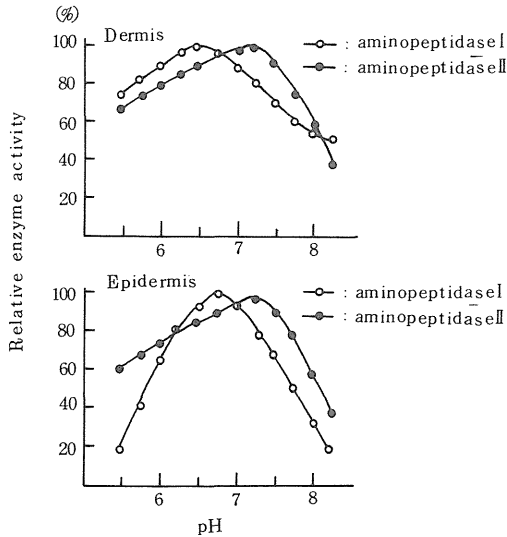


Fig. 3 Effect of pH on the Leu- β -NA splitting activity of aminopeptidases from the epidermis and the dermis. The buffer was KH_2PO_4 - $\text{Na}_2\text{B}_4\text{OH}$, 0.1M, at the indicated pH. The enzyme activities were assayed in the presence of DTT (1mM) except for dermal aminopeptidase I.

これらの結果より表皮アミノペプチダーゼ II と真皮アミノペプチダーゼ II は、同一酵素と思われる。

一方表皮アミノペプチダーゼ I は、表皮に特異的なアミノペプチダーゼと考えられる。

ディスク電気泳動

上記の点をさらに確認する為、ディスク電気泳動を行って検討した。

Fig. 4 に表皮および真皮の $105,000 \times g$ 上澄液のディスク電気泳動による活性のパターンを示した。表皮および真皮ともに泳動距離の長い活性ピークは、同じ移動度を示し、基質特異性はいずれも表皮および真皮アミノペプチダーゼ II とほぼ同一であった。

表皮および真皮の移動度の短い活性ピークの基質特異性は、それぞれ表皮アミノペプチダーゼ I および真皮アミノペプチダーゼ I の基質特異性とほぼ同じであった。

考 察

ラット表皮および真皮の $105,000 \times g$ 上澄液には、それぞれ 2 種のアミノペプチダーゼが認められた。そのうち表皮アミノペプチダーゼ II と真皮アミノペプチダー

ゼ II は、いずれもゲル透過における溶出位置から分子量 80,000、至適 pH 7.2 を示し、また基質特異性も Table. 1 に示されるように極めて類似する事、およびディスク電気泳動の移動度が同じことなどから、この両酵素は同一種類が真皮、表皮の何れの組織にも存在している結果と考えられる。

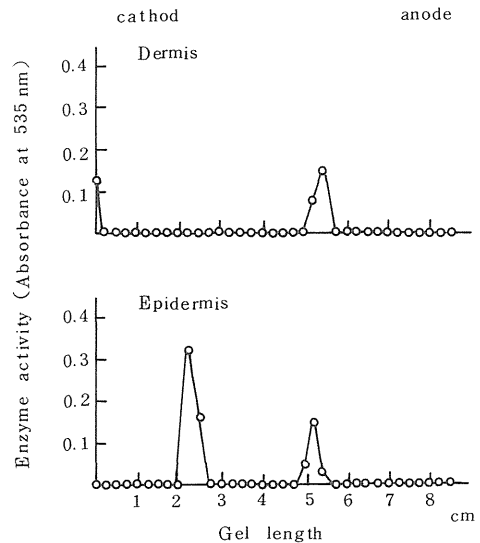


Fig. 4 Electrophoregrams of aminopeptidases from the dermis and the epidermis of rat on polyacrylamide gel columns at pH 8.3 for 60min. The enzyme activities were assayed in the presence of DTT (1mM).

また真皮アミノペプチダーゼ I は、Fig. 1 に見られるようにゲル透過において排除容量の位置に溶出し、ディスク電気泳動においてもゲル中を移動しないことから、かなり高分子と考えられる。

表皮アミノペプチダーゼ I は、分子量約 20 万であり、SH 還元試薬により著しく活性化し、ゲル透過およびディスク電気泳動においても真皮には本酵素が認められず、表皮アミノペプチダーゼ I は、表皮に特異的に存在することより、本酵素が表皮細胞分化特に表皮のケラチン化反応に何らかの機作により関与しているものと推定される。また、表皮にのみ存在し、真皮に存在しないプロテイナーゼが著者等により見出されており、今後表皮に局在する蛋白分解酵素に対して、表皮の構成蛋白質を基質にして検討する必要がある。

一方、Pirkko-Lissa Mäkinen 等の全皮膚ホモジネートでの結果によると、セファデックス G-200 の溶出

パターンでは, 3種のアミノペプチダーゼが認められ, これは真皮アミノペプチダーゼ I, 真皮および表皮アミノペプチダーゼ II と表皮アミノペプチダーゼ I に相当すると考えられる。表皮に特異的に存在する表皮アミノペプチダーゼ I およびプロティナーゼは, いずれも SH還元試薬の存在しない場合には, ほとんど活性が認められず, また活性発現には SH還元試薬の存在が不可欠である。

以上の結果からこれらの酵素作用の発現には組織内の SH化合物の濃度が著しく影響すると考えられ, 表皮の SH化合物の濃度変化とケラチン化反応および上記これら蛋白分解酵素の生理的機能発現にどのような相関関係が存在するか非常に興味を持たれる。

文 献

- 1) Tabachnik, J. and R. Freed: Federation Proc., 19, 51 (1960)
- 2) Tabachnik, J. and R. Freed: Federation Proc., 20, 219 (1961)
- 3) Wheatley, V. R. and E. M. Farber: J. Invest. Dermatol., 36, 199 (1961)
- 4) Hopsu Havu V. K. and C. T. Jansén: Acta derm Venereol., 49, 458 (1969)
- 5) Jansén C. T. and V. K. Hopsu-Havu: *ibid.*, 49, 468 (1969)
- 6) Jansén C. T. and V. K. Hopsu-Havu: *ibid.*, 49, 525 (1969)
- 7) Jansén C. T. and V. K. Hopsu-Havu: Acta Dermatovener (Stockholm), 50, 412 (1970)
- 8) Seppä H. E. T., C. T. Jansén and V. K. Hopsu-Havu: *ibid.*, 51, 35 (1971)
- 9) Fräki J. E. and V. K. Hopsu-Havu: Acta Derm. Forsch., 242, 329 (1972)
- 10) Mäkinen P-L. and J. Raekallio: Enzymologia., 36, 93 (1968)
- 11) Sugawara K. and I. A. Bernstein: Biochim. Biophys. Acta., 238, 129 (1971)
- 12) Sugawara K., Y. Katagata, and T. Ouchi: Scientific Reports of the Faculty of Agriculture Ibaraki University., 20, 41 (1972)
- 13) Kodama O., K. Sugawara, and T. Ouchi: *ibid.*, 20, 31 (1972)
- 14) Andrews P: Biochem. J., 91, 222 (1963)
- 15) 松谷衛・竹久元彬・福波黎子・島末明・菊川縫子: 臨床検査, 11, 92 (1967)

Summary

The aminopeptidases from 105,000 ×g supernatant of the epidermis were separated into two fractions, designated epidermal aminopeptidase I (MW 200,000) and epidermal aminopeptidase II (MW 80,000) by gel filtration on a column of Sephadex G-200.

Epidermal aminopeptidase I preferentially hydrolyzed Leu-β-naphthylamide followed by Gly-β-naphthylamide at pH 6.9 and was found to be localized in the epidermis but not in the dermis of the rat skin.

Epidermal aminopeptidase II hydrolyzed Lys-β-naphthylamide and Arg-β-naphthylamide actively at pH 7.2. Both of the enzymes were highly dependent on sulfhydryl groups for activity.

In a same manner, the aminopeptidases of the dermis were separated into two fractions, designated dermal aminopeptidase I and dermal aminopeptidase II. Dermal aminopeptidase I hydrolyzed Leu-β-naphthylamide rapidly at pH 6.5 and was not activated by Dithiothreitol. The eluates of the dermal aminopeptidase I was taken as the void volume of the column of Sephadex G-200. Dermal aminopeptidase II showed the typical characteristics of epidermal aminopeptidase II. It was assumed that dermal aminopeptidase II and epidermal aminopeptidase II were identical.