

表皮の蛋白質分解酵素

第2報 ラット表皮の酸性プロテイナーゼの細胞内分布とその二、三の性質

菅原 潔・木崎康造・徳 誠吉・大内 毅

Proteolytic Enzymes in the Epidermis

2. Subcellular Distribution and Some Properties of Acid Proteinase Activity in the Epidermis of Newborn Rat

KIYOSHI SUGAWARA, YASUZO KIZAKI,
SEIKICHI TOKU and TAKESHI OUCHI

緒 言

筆者らはラット表皮ケラチンの生成機作を無細胞系により行なっているが、蛋白質分解酵素について検討する必要を生じ、本研究に着手した。前報¹⁾では、無細胞系によるケラチン生成反応をpH7.5~8.6で行なうためもあり、pH7.5で示される酵素活性の細胞内分布について報告した。しかし、同報告で述べたごとく、ラット表皮の抽出液にはpH3.5およびpH5付近に活性の極大が示された。また一方、筆者らは¹⁴C-アミノ酸ラベルの前駆蛋白質をpH4.5可溶性区分より分画していることもあって、本報では、pH3.5およびpH5.5で示されるプロテイナーゼ活性の細胞内分布および若干の性質について述べる。

実験材料および方法

表皮の分離

生後4日目(体重約9.5g)のウィスター系ラットの皮を0.24M NH₄OH (conc NH₄OHでpH9.5に調節せるもの)水溶液中0°Cで時々攪拌しながら15分間処理後、表皮をピンセットを用いて真皮より機械的に剝離し、Earleの等張液で2回洗滌後用いた。

試 薬

基質用のヘモグロビン(牛血清, 和光特級)およびカゼイン(E. Merck社製)は和光純薬工業K. K.より購入した。その他の試薬は特級を用いた。

表皮の磨砕および遠心分画

すべての操作は氷水中あるいは0~+4°Cで行なった。前述の方法により分離した表皮を、9倍容の0.25M 蔗糖10⁻²M トリス-酢酸緩衝液(pH7.6, 10⁻³M NaCl₂

Table I Centrifugal Forces Used in Differential Centrifugation

Cell fraction	Centrifugal force(×g)	Time (min)
Nuclei+Cell debris	700	10
Mitochondria(Mi)	3,000	10
Lysosome(L)	20,000	15
Microsome(Mc)	105,000	90
Supernatant(S)		

The epidermis was separated from the dermis mechanically after treated with 0.24M NH₄Cl (pH9.5) for 15min. at 0°C, then homogenized with 9 volume of 0.25M sucrose in 10mM Tris HCl pH7.6 - 10⁻³M EDTA. The subcellular fractions were prepared according to the method described by Filipovic and Buddecke.

(From Laboratory of Biochemistry, Department of Agricultural chemistry, Faculty of Agriculture, Ibaraki University, Ami, Ibaraki-ken, 300-03 Japan)

を含む)中で比較的摺合せのゆるやかなTen Broeck型ホモジナイザーを用い、静かに5回程往復を繰返し磨砕した。磨砕物の遠心分画はFilipovic and Buddecke²⁾の方法を参考とし、上記磨砕物を二枚重ねのガーゼで濾

過し、滲液を Table I に従って遠心分画した。各区分の沈渣又はペレットは再び上記緩衝液にて洗滌し、遠心分離を繰返した。上記の粗核画分は cell debris を含むと考えられるので、同画分をホモジナイザーを用いて 2.2 M 蔗糖溶液に懸垂し 40,000×g、60 分遠心した³⁾⁵⁾。下層の沈渣を核画分 (N)、上層を cell debris 画分 (C) とした (Fig. 1)。また 105,000×g の上清画分

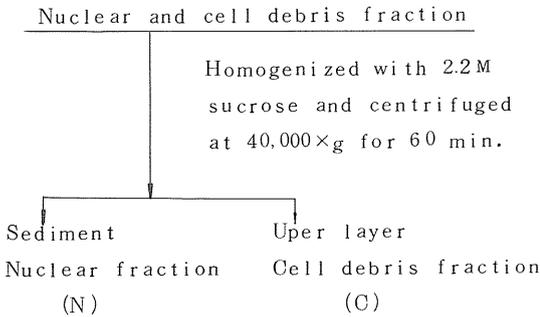


Fig.1 Separation of Nuclear Fraction and Cell Debris Fraction³⁾⁵⁾

は EDTA 存在下で再結晶した (NH₄)₂SO₄ を加えて 0.8 飽和とし、0°C 一夜放置後遠心分離、10⁻² M トリソー酢酸緩衝液に溶解し透析後活性測定に供した。

酵素活性の測定法

プロテイナーゼ活性の測定は Kunitz および Hagi hara ら⁷⁾⁸⁾ の方法にほぼ従って行なった。pH 3.5 におけるプロテイナーゼ活性は、2.5 % ヘモグロビン 4 容に終濃

度 1.35 M 相当の酢酸と 0.02 M 相当の硫酸の混合溶液 1 容を加え pH 3.5 とし基質溶液としこの基質溶液 1 容に酵素液 1 容加えて、40°C、2 時間反応させた。反応後、反応混液と同容の 0.4 M トリクロル酢酸 (TCA) を加え、37°C、30 分放置後、遠心分離又は Toyo No. 4 の乾燥滲紙により滲過した。滲液中の蛋白質分解生成物の量は Hagi hara⁷⁾ の Folin 比色法又は 275 nm の吸光度より測定した。酵素活性の単位は 40°C で 1 分間に L-チロシン 1 μg に相当する TCA 可溶性水解物を遊離する酵素量として表わした。比活性 (Specific activity) は酵素蛋白質 1 mg 当りの単位として表わした。Total Activity は酵素液中の比活性と蛋白質の mg 数との積より求めた。pH 5.5 又は pH 5.0 におけるプロテイナーゼ活性はヘモグロビン (又はカゼイン) を 6M 尿素を溶解した所定の緩衝液に溶解せしめた後、基質として用い、前述の pH 3.5 におけると同様にして測定した。

蛋白質の定量

蛋白質は Lowry⁹⁾ の方法により測定し、標準蛋白質としては牛血清アルブミンを用いた。

分子量の測定

セファデックス G-100 を用いる Andrews¹⁰⁾ のゲル滲過法により測定した。

実験結果

表皮の遠心分画法による細胞構成成分の分画

本報では、生理機能との関係をより明確に知るために前報¹⁾に比し細分化を試みた。すなわち核および cell debris の蛋白量が構成成分の全蛋白量の 61 %¹⁾をも占

Table II Subcellular Distribution of the Acid Proteinase Activity at pH 3.5

Cell fraction	Proteinase Activity units	% of Total Activity	Protein (mg)	% of Total Protein	Specific Activity units/mg	Relative Specific Activity
Nuclei (N)	13.4	21.4	18.24	41.0	0.734	0.519
Cell debris (C)	0.92	1.4	7.48	16.9	0.123	0.087
Mitochondria (Mc)	0.08	0.1	2.06	4.6	0.039	0.027
Lysosome (L)	—	—	0.96	2.2	—	—
Microsome (Mc)	2.27	3.6	2.65	6.0	0.856	0.606
Super (S)	46.02	73.4	13.00	29.3	3.540	2.507

Relative specific activity means the specific activity of each cell fraction relative to the specific activity of the whole homogenate taken as 1.00. The activity of enzyme was measured by the method of knitz⁶⁾ and Hagi hara et al⁷⁾ with a slight modification, using acid-denatured bovine hemoglobin. The protein was determined by the method of Lowry et al.⁹⁾

めることから, この画分を核画分と cell 画分に分離した。その結果, Table II に示すように核および cell debris の合計値が 57.9% を示し, 前回の値 61% にほぼ近く, 核画分が 41%, cell debris 画分が 16.9% をそれぞれ占めることが明らかとなった。次いで蛋白質量の多い画分は上清画分(S)であり 29.3% をしめ, ミクロソーム画分(Mc)が 6.0%, ミトコンドリア画分(Mt)が 4.6% と続き, リソゾーム画分(L)が最も少なく 2.2% であった。

pH 3.5 における酸性プロテイナーゼ活性の細胞内分布
表皮細胞構成成分の各画分における pH 3.5 で活性を示す酸性プロテイナーゼの分布を示したのが Table II である。まず, 各画分の活性の全活性に対する分布は, 上清画分(S)が 73.4% をしめて最も高く, ついで核画分の 21.4% であり, リソゾーム画分(L)は殆んど活性が認

められなかった。pH 7.5 で測定された中性プロテイナーゼ活性の場合の値 11.2%¹⁾とは著しい対比をなしている。一方, 比活性 (Units/mg) については, 上清画分が 3.54 と最も高く, ミクロソーム画分 (Mc) の 0.856, 核画分(N)の 0.734 と続き, Cell debris (C) およびミトコンドリア画分 (Mt) はそれぞれ 0.123 および 0.039 と著しく低い。

pH 5.5 における酸性プロテイナーゼの細胞内分布

Table III にその結果を示した。全活性の 77.6% が上清画分(S)に存在し, 核画分には 10.14% と, pH 3.5 における場合の 1/2 の値である。比活性については最も高い上清画分ですら 1.41 と, 一般的に pH 3.5 の場合に比較して値が低く, 核画分(N)では著しく低く 0.13 である。

Table III Subcellular Distribution of the Acid Proteinase Activity at pH 5.5

Cell fraction	Proteinase Activity units	% of Total Activity	Protein (mg)	% of Total Protein	Specific Activity units/mg	Relative Specific Activity
Nuclei (N)	2.4	10.14	18.24	41.0	0.13	0.244
Cell debris (C)	—	—	7.48	16.9	—	—
Mitochondria (Mc)	0.85	3.59	2.06	4.6	0.41	0.77
Lysosome (L)	0.58	2.45	0.96	2.2	0.60	1.125
Microsome (Mc)	1.47	6.21	2.65	6.0	0.55	1.032
Super (S)	18.36	77.60	13.00	29.3	1.41	2.645

Experimental conditions were the same as in Table II except the activity of the enzyme was measured at pH 5.5.

Sephadex G-100 カラムによるゲル透過

上清画分を 10mM トリス-酢酸緩衝液 pH 7.5-1mM EDTA で平衡化した Sephadex G-100 カラム (2.1×86.5cm) にのせ, 同じ緩衝液で溶出した。各画分について pH 3.5 での酵素活性を測定したパターンを Fig. 2 に示した。図に見られるように広範囲にわたって活性が示され, これは BANA を基質とする アミノ酸ナフテルアミダーゼ活性の幅狭いピークと対照的である。

各種試薬の影響

細胞構成成分中, 核画分(N)と上清画分につき, 各試薬の pH 3.5 における活性に対する影響を調べた結果が, Table IV である。-SH 試薬, DFP および EDTA など何れも核画分, 上清画分のどちらの画分に対しても影響が認められなかった。

考 察

表皮プロテイナーゼの細胞内分布について調べた。その結果, 中性プロテイナーゼに比較して pH 3.5 および pH 5.5 で示される酸性プロテイナーゼは, 上清画分と核画分に局在し, 両画分合せてそれぞれ 94.8% および 87.7% をしめた。リソゾームでは活性が認められず, 中性プロテイナーゼの場合の 11% とは著しい対比をなしている。また比活性を比較すると, 最も高いのは pH 3.5-酵素の上清画分 (3.54) であり, 次いで pH 5.5-酵素の上清画分 (1.41) であった。この点に関しても, 中性プロテイナーゼ¹⁾の場合にはリソゾーム画分が最も高い値を示した事実と著しく異なる。各画分の蛋白質量の比率と相対比活性 (Relative Specific Activity) の関係を示したのが Fig. 3 である。リソゾーム画分における活性は, 中性プロテイナーゼでは最も高く,

pH 7.5 → pH 5.5 → pH 3.5 と pH の低下と共にその相対活性の値も低下し、pH 3.5 ではついに活性の存在は見られない。

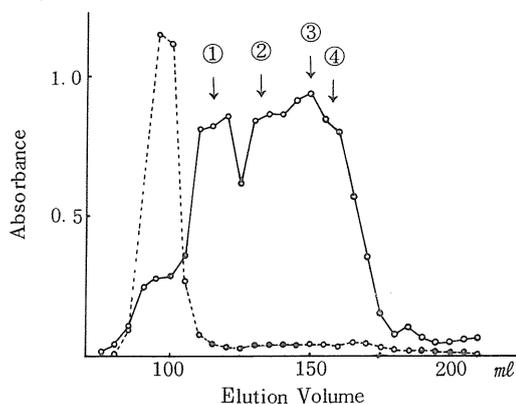


Fig. 2 Chromatography of the Acid Proteinase (at pH3.5) on a Column of Sephadex G-100. The supernatant fraction was applied on a column (2.1×856 cm) of Sephadex G-100 equilibrated with 10^{-2} M Tris-acetate pH7.5-0.15M NaCl and eluted with the same buffer. ○····○: Acid proteinase activity at pH3.5, measured by Lowry method at 750 nm. ○—○: Aminopeptidase Activity, α -N-Benzoyl-DL-arginine naphthylamide (BANA) hydrolytic activity, measured at 535 nm.

Table IV Effect of Various Reagents on the acid proteinase activity at pH3.5

Reagent	Final Concentration (M)	Residual activity (%)	
		Nuclei fraction	Supernatant fraction
none	—	100	100
EDTA	10^{-3}	106	129
DTT	10^{-3}	87	100
NEM	10^{-3}	85	105
PCMB	10^{-3}	94	127
"	10^{-4}	121	121
DFP	10^{-3}	102	116
"	10^{-4}	100	122

The enzyme in 0.04ml of 10^{-2} M Tris-acetate buffer pH7.6 containing various reagent was preincubated at 37°C for 30min, then added 0.4ml of 2% hemoglobin in 0.27 M acetate buffer pH3.5 as substrate. The residual activity was determined by Folin method. The abbreviation used are: EDTA; Disodium ethylene-diamine-tetraacetate, DTT: Dithiothreitol, NEM: N-Ethyl maleimide, PCMB; *P*-Chloromercuribenzoate, DFP; Diisopropylphospho fluoride.

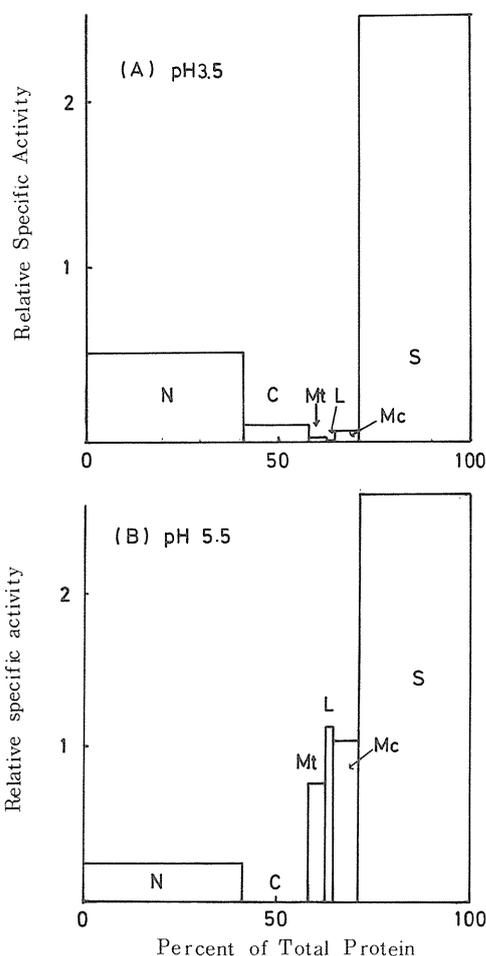


Fig. 3 Intracellular Distribution of Acid Proteinases at pH 3.5 (A) and pH5.5 (B) in Rat Epidermis. Fractions are represented by their relative nitrogen content, in the order in which they are isolated, i.e. from left to right: N. C. Mt, L, Mc and S.

上清画分をSephadex G-100 カラムにより分画した結果 (Fig. 2), 幅広い領域にわたってプロテイナーゼ活性が示された。この溶出各フラクションにつき、BANAを基質とするアミノナフチルアミダーゼ活性、また、 γ -glutamyl- ϵ -lysine結合を触媒するトランスグルタミナーゼ活性の分布を調べた結果、何れも幅のせまい鋭いピークが認められた。従って Fig. 2に示される酸性プロテイナーゼ (pH 3.5) 活性の幅広い分布は分画の技術的条件によるものとは認め難い。Fig. 4に示したように、分子量を求めると最初のピーク①は

100,000, ②の部分が72,000, ③のピークとみられる部分が50,000, そして④の部分が40,000を示す。これらの各ピークに存在する酵素はpH 3.5 付近に至適pHを有するそれぞれ別個の酵素であるのか, あるいは同一酵素の会合に由来する結果かは今後の検討を必要とする。

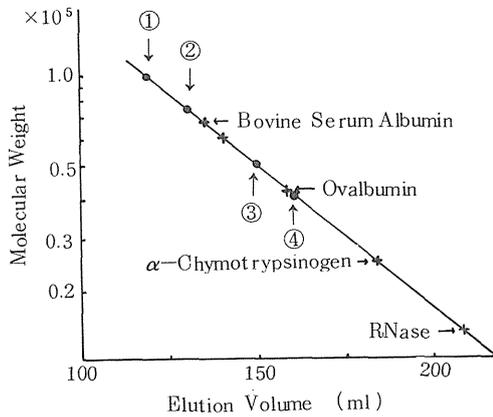


Fig. 4 Determination of Molecular Weight by Sephadex G-100

Table IV に示した試薬では核画分も上清画分も殆んど影響を受けず同種の酵素と考えられる。他の組織に存在するカテプシンDの性質とこの点に関しては大きな差異はなく, pH 3.5で活性を示す表皮プロテイナーゼは, カテプシンD又はカテプシンD様酵素と思われる。

Summary

1. The subcellular distribution of acid proteinase activities at pH 3.5 and pH 5.5 respectively was studied in the epidermis of newborn rat by differential centrifugation, in which the sedimental fraction at 700×g was divided into nuclear and cell debris fraction.
2. About 73% of the total acid proteinase activity at pH 3.5 was found in the final supernatant, and the major part of the remainder (21.4%) recovered in the nuclear fraction. No acid proteinase activity at pH 3.5 was detected in the lysosomal fraction.
3. The acid proteinase activity at pH 5.5 showed a distribution analogous to that of acid proteinase activity at pH 3.5.

文 献

- 1) 菅原 潔・三宅 茂・大内 毅: 茨大農学部学術報告, 22, 25 (1974)
- 2) Filipovic, I. and E. Buddecke: Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 349, 533 (1968)
- 3) 安藤鋭郎・寺山 宏・西沢一俊・山川民夫編: 生化学研究法, I, p 342 (1967) 朝倉書店
- 4) Sporn, M. B., T. Wanko and W. Dingman: J. Cell Biol. 15, 109 (1962)
- 5) Bush, H., W. C. Starluck, and J. R. Davis: Cancer Res., 19, 684 (1959)
- 6) Kunitz, M.: J. Gen. Physiol., 30, 291 (1947)
- 7) Hagihara, B., H. Matsubara, M. Nakai and K. Okunuki: J. Biochem. (Tokyo), 45, 185 (1958)
- 8) 赤堀四郎編: 酵素研究法, 2 p 237 (1956) 朝倉書店
- 9) Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall: J. Biol. Chem. 193, 265 (1951)
- 10) Andrews, P.: Biochem. J., 91, 222 (1964)