人表皮より抽出した Extracellular な Keratinase に対する 低分子 Inhibitor について

脇元 敦彦 佐川 弥生 樋口 道生 滝内 石夫

昭和大学藤が丘病院皮膚科

〔受付：12月22日，1982年〕

Microsporum canis よりの extracellular な keratinase をマーカーとして，人表皮の homogenate を限外濾液し，濾液を CM cellulofine を通過させ，DEAE cellulofine に吸着させ，NaCl にて溶出後，凍結乾燥し Sephadex G-25 による gel 濾過をおこなうことにより低分子の inhibitor を抽出した。この inhibitor の分子量は，gel 濾過法より約4,000と推定された。又，凍結乾燥，100℃，4分間の熱処理にも安定であつた。抽出された inhibitor 2.9 μ g により0.4 keratinase unit の活性が50%阻害された。この keratinase に対する阻害活性の外，2 μ g の inhibitor により thiol protease の代表的酵素である，papain (12.5 μ g) 活性は31%，serine protease である trypsin (6.25 μ g) 活性は12%阻害された。

皮膚糸状菌は強靱な組織である皮膚の角質にのみ寄生する。この際，菌自体は機械的に角質を破壊し，角層に含まれる non-keratin 物質を栄養源としているとの説¹⁾もみられるが，酵素等を産生し，それにより角質を化学的に処理し，Keratin を栄養源としているのであろうとの報告²⁻⁶⁾，が多くみられる。これらの報告の中には，菌糸が角質細胞を貫通している所見を電顕的に示した報告^{3,4)}，毛髪に侵入した菌糸の周囲のみが溶解していることを蛍光法を用いて観察した報告⁵⁾，さらに *Trichophyton mentagrophytes* の培養液とモルモット皮膚を反応させると，dermoepidermo separation が生じるという結果から，蛋白分解酵素の関与を論じた⁶⁾もの等がみられる。

著者等は，皮膚糸状菌が角質に寄生し栄養源を得るためには，糸状菌の産する酵素 extracellular keratinase (keratinase と略) が重要な要因の1つとして働いているものと考え，この keratinase を抽出し⁷⁾，その生化学的性状や⁸⁾，白癬病巣皮膚における keratinase の局圧を報告した⁹⁾。さらに，人皮膚と keratinase を *in vitro* で作用させると，有棘細胞さらに真皮成分も消化され，短時間作用させたのみでも有棘細胞層には acantholysis 様の変化を生じ，長時間反応さ

せると角質細胞のトノフィラメントも消化されること等¹⁰⁾について報告してきた。しかしながら，通常皮膚糸状菌は有棘細胞より下層のいわゆる living layer に侵入していない。この理由は，皮膚糸状菌が角質を好むために侵入しないのではなく，生体内に存在する阻害物質のために侵入できないのであると考えられている¹¹⁾。

今回，著者等は人表皮中より極めて低分子の keratinase 活性阻害物質を見出し，この阻害物質を部分的に精製し，若干の性状について明らかにしたので，ここに報告する。

実験材料と方法

低分子 inhibitor の分離 手術時に得た瘢痕組織の真皮成分をできる限りはさみにて除去したのち，60℃の温水中に30秒間浸し表皮のみを剥離した。かようにして採取した湿重量3.75 g の表皮を10 ml の28 mM phosphate buffer, pH 7.2に浮遊させ，polytron homogenizer にて15秒間隔にて1分30秒 homogenate したのち，10,000 g にて10分間遠沈し，上清を Millipore filter (0.4 μ m) にて濾過し固形成分を除去した。そののち，濾液を限外濾過器 (Amicon, YM 5 filter) にて再び濾過し，濾液を0.1 N HCl にて pH 6.1に補正後，28 mM phosphate buffer, pH 6.1で平衡化した CM cellulofine CL (生化学工業) を通し，流出液の pH を0.1 N NaOH にて pH 7.8に補正し，

別刷請求先：滝内石夫

〒227 横浜市緑区藤が丘1-30
昭和大学藤が丘病院皮膚科

同緩衝液 pH 7.8にて平衡化した DEAE cellulofine AL (生化学工業) に吸着させた。0.1 M NaCl-28 mM phosphate buffer, pH 7.2にて低分子 inhibitor を溶出させ、流出分画を凍結乾燥させ、2 ml の28 mM phosphate buffer, pH 7,2に溶解後 Sephadex G-25 (column 1.9×90 cm, 流速13.5 ml/hr)に乗せ、同じ buffer にて gel 濾過をおこない、3 ml ずつ分画した。この内の Keratinase に対する阻害活性の認められた fraction No. 49~58の30 ml をまとめ、凍結乾燥をほどこしその後の試料とした。

Keratinase の分離 *Microsporum canis* より extracellular な keratinase を Takiuchi *et al.* の方法¹²⁾により分離し、Keratinase unit についても Takiuchi *et al.*¹²⁾に従った。

酵素の反応速度と基質濃度との相関 5~100 mg の human albumin (Sigma 社) を 1 ml の28 mM phosphate buffer, pH 7.2に溶解し、この溶液200 μ l に 25 μ l の trypsin (0.25 mg/ml, Sigma 社), papain (0.5 mg/ml, Sigma 社), Keratinase (124 KU/ml) の各酵素溶液を加え、37℃にて30分間 incubate する。Incubation 後10%トリクロール酢酸 (TCA と略) 225 μ l を加えて酵素反応を止め、15分間氷冷したのち、3,000 rpm にて10分間遠沈し、上清を Lowry 法¹³⁾を施行し分光光度計にて500 nm での吸光度を測定した。Control 値は TCA 処理直前に25 μ l の酵素溶液を加えたものを用いた。

Inhibition assay 前述の酵素濃度の keratinase, trypsin, papain 溶液25 μ l に inhibitor 溶液200 μ l (28 mM phosphate buffer, pH 7.2) をそれぞれ加え、室温にて30分静置した。そののち基質として25 mg/ml of 28 mM phosphate buffer, pH 7.2の human albumin 溶液200 μ l を加え前述の酵素 assay をおこない、500 nm にて測定した。

0 %酵素活性値は、TCA 処理直前に基質溶液を加え、100%酵素活性値は、TCA 処理直前に inhibitor 溶

液を加えた系を用い同じ操作を施した。阻害率は 0 % 値、100%値をもとに算出した。

50%酵素活性阻害値の測定 50%活性阻害値 (ID₅₀ と略) は Aoyagi & Mizuno の記載¹⁴⁾に従い測定した。ID₅₀をきたす inhibitor 量 (μ g) を 1 inhibition unit とし、specific activity は unit 値を蛋白濃度 (mg) で割った値で現わした。

Slab 電気泳動 電気泳動は永井の方法¹⁵⁾に準じ 10%polyacrylamide gel にて pH 9.4, 10 mA, 1 時間の条件にて施行した。泳動は Micro slab gel 電気泳動装置 (マリソル産業) を用いた。泳動後、0.25% coomassie brilliant blue R-250にて染色をおこなった。

Heat stability Inhibitor 溶液を密栓し、100℃にて 1 分から 5 分間 incubate したのち、papain に対する inhibition assay を施行した。

蛋白濃度の測定 Lowry 法¹³⁾により500 nm 又は 750 nm により測定した。

分子量の測定 Gel 濾過 (Sephadex G-25) により測定した。Marker protein としては cytochrome c, myoglobin, DNP-L-alanine (いずれも Serva 社) を用いた。

実験結果

低分子 inhibitor の分離 表皮よりの inhibitor の精製過程を Table 1 に示し、Sephadex G-25による gel 濾過の流出パターンを Fig. 1 に示した、Fraction No. 49~58 に keratinase に対する阻害活性が認められた。この分画の電気泳動像を Fig. 2 に示した。

酵素と基質濃度の相関 Fig. 3 に示した如く、おのおの酵素濃度における最大速度の1/2に値いする albumin 量は、約 5 mg と測定され、この albumin 量をもって inhibition assay 時の基質濃度とした。

Papain, Trypsin に対する阻害 抽出された2 μ g の inhibitor により、papain 活性は31.0%, trypsin 活性も12.0%阻害された。

Table 1. Inhibitory activity of the inhibitor in each purification step

	Total vol. (ml)	Total prot. (mg)	ID ₅₀ (μ g)	Total units	Specific act. (units/mg)	Yield (%)	Purity
Ultra-filtration	35	16.24	42.0	386.7	23.8	100	1.0
CM cellulofine	50	12.00	40.0	300.0	25.0	77.6	1.1
DEAE cellulofine	130	1.69	6.0	281.7	166.0	72.8	7.0
Gel-filtration (Sephadex G-25)	40	0.27	2.9	93.1	344.8	23.6	14.5

Fig. 1. Gel filtration of the low-molecular-weight protease inhibitor on Sephadex G-25.

The column (1.9×90 cm, 3.0 ml/fraction, 13.5 ml/hr) was equilibrated with 28 mM phosphate buffer, pH 7.2. The sample that had been partially purified with CM cellulofine and DEAE cellulofine was applied to this column. Symbols: ●—●, OD at 280 nm; ○—○, inhibitory activity against keratinase.

Fig. 2. Hydrolysis of human albumin by trypsin.

●—●, keratinase ■—■, and papain ▲—▲.

Fig. 3. Slab electrophoresis of the purified low-molecular-weight protease inhibitor on 10% polyacrylamide gel run at pH 9.4.

Table 2. Heat stability of the inhibitor at 100°C

100°C	1 min	96.9%
	2 min	96.7%
	3 min	92.3%
	4 min	86.1%
	5 min	0%
(control)	0 min	(100)%

The inhibitory activity against papain retained about 86% after 4 min incubation at 100°C, but that activity was completely lost after 5 min incubation at 100°C.

Fig. 4. Estimation of molecular weight of the inhibitor with gel filtration on Sephadex G-25.

Symbols: ○; myoglobin, ●; cytochrome c, △; low-molecular-weight protease inhibitor, ▲; DNP-L-alanine.

Heat stability Table 2 に示した如く, 100°C, 4 分間の熱処理によつても control に比較し, 86.1%の活性が残存するが, 5 分間の熱処理によつて阻害活性は消失した.

分子量の測定 Sephadex G-25による gel 濾過より

求めた分子量は、約4,000と測定された (Fig. 4).

考 察

生物の生存に不適と思われる角質にのみ皮膚糸状菌は寄生するといえるが、糸状菌による感染が生じた皮膚を血清と共に器官培養すると、糸状菌は有棘細胞層以下の living layer に侵入しないが、血清のかわりにサブロー培地を用いると、たちどころに living layer に侵入するという¹¹⁾。従つて、侵入を阻害する物質が血清中に存在するため、糸状菌は living layer 以下に侵入できないものと思われている¹¹⁾。皮膚糸状菌の感染にさいし、parasite 側の重要な因子の1つであると考えられている keratinase に対する生体内の活性阻害物質については、重金属イオンと α_2 -macroglobulin (α_2 -M と略)以外に報告されていない¹⁶⁾。 α_2 -M は殆んど全てのエンドペプチターゼを阻害するといわれる。今回も、Amicon YM 5 filter により限外濾過されず濾過器内に残在する試料に keratinase に対する阻害作用が認められ、single radial immunodiffusion による測定にて1.64 mg の α_2 -M が証明された。 α_2 -M は表皮中に極めて少量存在するとの報告¹⁷⁾があるが、分子量が約80万といわれる α_2 -M が正常な状態での皮膚基底膜を通過し、表皮内に侵入できるかについては疑問に思われる。しかしながら、ひとたび糸状菌による感染が生じると、皮膚の組織反応としては表皮内の spongiosis、さらには小水疱の形成が見られることより、当然 α_2 -M は表皮内に侵入し二次的に酵素に対する阻害作用を発揮し、感染の進行を防止する1つの要因となつているものと思われる。今回抽出した低分子の inhibitor が血清中より表皮内へ移行したものか、皮膚単独に存在するものであるかは判らない。いずれにせよ極めて低分子であり、かつ感染等の認められない癬痕部の表皮より抽出された結果から、正常な表皮中にも常時存在するものと考えられる。このことより、皮膚糸状菌が酵素を用いて living layer に侵入することを一次的に防止しているのでないかと推測された。

人間の皮膚より抽出された protease inhibitor の報告は少なく、著者等の調べた範囲では、Turner *et al.*¹⁸⁾、Geces *et al.*¹⁹⁾、Junnila *et al.*²⁰⁾、Fräki *et al.*¹⁷⁾、Järvinen²¹⁾、Welgus *et al.*²²⁾、Toki and Yamura²³⁾の報告がみられるのみである。これらの中で、著者等も Järvinen の報告する epidermal SH-protease inhibitor を抽出し、keratinase に対する反応を調べたが、その阻害作用は全く認められなかつた (未発表)。蛋白分解酵素はその触媒残基により trypsin, ker-

atinase が含まれる serine protease, papain に代表される thiol protease, その他酸性 protease, 金属 protease の4種に分類されている。これら4種の protease 群のうちの2種以上に対し明らかに阻害活性を有する人体中の阻害物質は、 α_2 -M のみであり、他の阻害物質はいずれも1種のみを強く阻害するものである。表皮より抽出された protease inhibitor の分子量は、Järvinen による SH-protease inhibitor の12,500が最も少なく、その他はいずれも数万から数十万である。今回抽出された inhibitor の分子量は、低分子なため測定方法に問題があるとはいへ、約4,000と測定され、この結果は熱に対する安定性や、分子量5,000以下の物質を原則的に濾過するとされる Amicon YM 5 filter を通過する点からも裏付けられると思われる。

今回抽出された低分子 inhibitor は、gel 濾過の流出パターンや電気泳動の結果より、単一であろうと推定されるが、SDS 電気泳動による検索をおこなつておらず、複数の inhibitor が存在する可能性は否定できない。いずれにせよ、このような低分子の fractionの中に serine protease である keratinase, trypsin, さらに thiol protease である papain の活性を阻害する物質が存在するという点、現在まで報告された人表皮中のみならず、人血清中の protease inhibitor と異なる未知の inhibitor ではないかと推測された。

本論文の要旨は、第26回日本医真菌学会総会(甲府市)にて口演した。

文 献

- 1) Raubitschek, F.: Mechanical versus chemical keratolysis by dermatophytes. *Sabouraudia*, 1: 87-90, 1961.
- 2) Yu, R.J., Harmon, S.R. and Blank, F.: Hair digestion by a keratinase of *Trichophyton mentagrophytes*. *J. Invest. Dermatol.*, 53: 166-171, 1969.
- 3) Miyazaki, H., Seiji, M. and Takagi, Y.: Electron microscopic study on fungi in horny layer. *Jap. J. Derm.*, 76: 265-271, 1966.
- 4) Mercer, E.H. and Verma, B.S.: Hair digested by *Trichophyton mentagrophytes*. *Arch. Dermatol.*, 87: 357-360, 1963.
- 5) Verma, B.S.: The use of fluorescence microscopy in the study of in vitro hair penetration by ringworm fungi. *Brit. J. Derm.*, 78: 222-224, 1966.
- 6) Cruickshank, T.: Separation of epidermis from dermis by filtrates of *Trichophyton mentagrophytes*. *Nature*, 177: 1085-1086, 1956.

- 7) 滝内石夫, 樋口道生: *Microsporium gypseum* の産生するケラチナーゼの分離, 精製ならびにその生化学的性状について. 日皮会誌, 87: 305—309, 1977.
- 8) 清 佳浩, 樋口道生, 滝内石夫: *Microsporium canis* の産生する Keratinase の生化学的性状について, 昭和医誌, 39: 49—54, 1979.
- 9) Sei, Y., Takiuchi, I. and Masutani, M.: Electron and immunoelectron microscopical studies on the extracellular protease (keratinase) of dermatophytes. 40th Ann. Proc. Electron Microscopy Soc. Amer., 158—159, 1982.
- 10) 滝内石夫, 清 佳浩, 樋口道生: Extracellular な Keratinase に対する抗血清の作製. 日皮会誌, 91: 771—773, 1981.
- 11) Blank, H., Sagami, S., Boyd, C. and Roth, F.J.: The pathogenesis of superficial fungus infection in cultured human skin. Arch. Derm., 79: 524—535, 1959.
- 12) Takiuchi, I., Higuchi, D., Sei, Y. and Koga, M.: Isolation of an extracellular proteinase (keratinase) from *Microsporium canis*. Sabouraudia, 20: 281—288, 1982.
- 13) Lowry, O., Rosenbrough, N.T., Farr, A.L. and Randall, R.T.: Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193: 265—275, 1951.
- 14) Aoyagi, T. and Mizuno, D.: A rapid antibacterial test for Mycobacteria using a reverse T type of tube in rocked culture. J. Gen. Microbiol., 20: 180—183, 1959.
- 15) 永井 裕: ディスク電気泳動法, 蛋白質・核酸・酵素, 11: 818—823, 1966.
- 16) Yu, R.J., Grappel, S.F. and Blank, F.: Inhibition of keratinase by α_2 -macroglobulin. Experimentia, 28: 886, 1972.
- 17) Fräki, E. and Väino, K.: Human skin protease. Partial purification and characterization of a protease inhibitor. Arch. Derm. Forsch., 243: 153—163, 1972.
- 18) Turner, R.H., Kurbun, A.K. and Ryan, T.J.: Inhibition of fibrinolysis by human epidermis. Nature, 223: 841—842, 1969.
- 19) Gecse, A., Lonovics, J., Zsilinszky E. and Szekeres, L.: Characteristics of the human skin bradykinin-destroying enzyme. J. Med., 2: 129—135, 1971.
- 20) Junnila, S.K., Jansen, C.T. and Hopsu-Havu, V. K.: Elastase and trypsin inhibitors of human skin and serum. Partial purification and characterization. Acta. Derm. Venereol., 51: 251—256, 1971.
- 21) Järvinen, M.: Purification and some characteristics of the human epidermal SH-protease inhibitor. J. Invest. Dermatol., 72: 114—118, 1978.
- 22) Welgus, H.G., Stricklin, G.P., Eisen, A.Z., Bauer, E.A., Cooney, R.V. and Jeffrey, J.J.: A specific inhibitor of vertebrate collagenase produced by human skin Fibroblast. J. Biochem., 254: 1938—1943, 1979.
- 23) Toki, N. and Yamura, I.: Further studied on a new kallikrein inhibitor in human skin.—Its purification and characterization. Arch. Dermatol. Res., 267: 301—311, 1980.

Purification and Some Characteristics of human Epidermal Low-Molecular-Weight Protease Inhibitor of Extracellular Keratinase

Atsuhiko Wakimoto, Yayoi Sagawa, Dousei Higuchi and Iwao Takiuchi

Department of Dermatology, Showa University Fujigaoka Hospital, Yokohama, Kanagawa 227, Japan

The low-molecular-weight protease inhibitor of the extracellular keratinase from *Microsporium canis* was separated from the human epidermis extracts by means of homogenation, ultrafiltration, ion-exchange-chromatography and gel-filtration. By these procedures, 0.27 mg of the inhibitor was obtained from 4 g of original human epidermis. The molecular weight of the inhibitor was approximately 4,000 estimated by the gel-filtration on Sephadex G-25. The inhibitor was heat-stable and its activity could be endured after the incubation at 100°C for 4 min. This inhibitor possessed toward not only serine protease (keratinase and trypsin), but also thiol protease (papain).