原著

ヒト脾抽出液中の中性プロテイナーゼ
——フィブリノーゲン分解とその性質——

永松 陽子* 岡本 歌子* 雨宮 武彦**

Neutral proteinase activity extracted from human spleen :
Its fibrinogenolytic activity and enzymatic properties

Yoko NAGAMATSU*, Utako OKAMOTO* and Takehiko AMEMIYA**

Key words : spleen proteinase, fibrinogenolysis, synthetic substrate, serine enzyme

The agent capable of degrading fibrin was prepared from human spleen extract by chloroform treatment, ammonium sulfate precipitation and Sephadex gel filtration. The agent degraded fibrinogen as well as fibrin at neutral pH. In kinetic studies, the fibrinogenolytic activity followed simple Michaelis-Menten kinetics, showing that the agent was a neutral proteinase. The activity was completely inhibited by DFP, but hardly by TLCK. These results suggest that the spleen proteinase has active serine, but no trypsin-type active histidine at its active center. The enzyme was not inhibited by trans-aminomethylcyclohexane carboxylic acid, a specific synthetic plasmin inhibitor, showing the different mode of action of the enzyme from that of plasmin.

In the studies using synthetic substrates, the spleen proteinase scarcely hydrolyzed the following synthetic esters and synthetic polypeptides : Ac-Gly-Lys-OMe, Ac-Phe-OEt, Ac-Try-OEt, Ac-Tyr-OEt, Ac-Lys-OMe, Tos-Lys-OMe, Tos-Arg-OMe and Ac-Arg-OMe ; Suc-(Ala)₃-pNA, DNP-Pro-Leu-Gly-Ile-Ala-Gly-Arg-NH₂, H-D-Phe-Pip-Arg-pNA, H-D-Val-Leu-Lys-pNA, Bz-Phe-Val-Arg-pNA and <Glu-Gly-Arg-pNA. These results indicate different selectivity on synthetic substrates of the enzyme from those of trypsin, plasmin, chymotrypsin, collagenase and elastase. The enzyme did not lyse elastin at elastin-agar plates.

緒 言

著者らはすでに、普通ラットの脾の高濃度塩

類抽出液は、中性条件でフィブリン分解作用があることを認め報告した。この作用は無菌ラットの抽出液では認められないことが特徴的であ

* 神戸学院大学栄養学部生理研究室〔〒673 神戸市垂水区伊川谷町有瀬〕, Laboratory of Physiology, Faculty of Nutrition, Kobe-Gakuin University, Kobe, Japan. (受付1979年10月16日, 受理1979年12月10日)

** 済生会兵庫県病院, Saiseikai Hyogo Hospital, Kobe, Japan.

った¹⁾。その後、永松はヒトの脾の2M過塩素酸ナトリウム(NaClO₄)抽出液から、フィブリン分解因子を部分純化し、分子量および阻害物質に対する態度から、この作用因子はプラスミンおよびトリプシンとは異なるプロテイナーゼであろうと推論した²⁾³⁾。

本論文では、この因子を脾の蛋白分解因子(SFP)と仮称し、そのフィブリノーゲン分解およびその性質について研究し、さらに他のプロテイナーゼとの性質の差について追求した。

I. 材料および方法

1. 材料

脾の蛋白分解因子(SFP)標本：前論文²⁾に記載したように、死後12時間以内に剖検した死体より採取した脾(病理組織学的に特別の変化を認めないもの)の2M過塩素酸ナトリウム(NaClO₄)抽出液を、クロロホルム脱脂、硫酸アンモニウム塩析、再度のゲル濾過によって部分純化した。脾は済生会兵庫県病院、神戸大学医学部病理学第一講座で剖検したものを使用した。

フィブリノーゲン(Fg)：フィブリン平板(F平板)用には、Poviet Production N.V.(Amsterdam)の65%凝固可能ウシ・フィブリノーゲン(B·Fg)を、酵素反応の基質としては Miles Laboratories INC (Elkhart) のヒト(H)およびBのFgを使用した。反応速度論的実験には、AB KABI (Stockholm) のH·Fgを使用した。いずれも90%凝固可能標本である。

プラスミノーゲン(Plg)：AB KABI のH·Plg、またはヒト血漿第Ⅲ分画をリジン・セフェローズで精製したPlgを使用した。

酵素：プラスミン(Pl)は、H·Plgを十分量のウロキナーゼ(ウロナーゼ、持田製薬、東京)で活性化して使用した。 α -キモトリプシンは Miles Laboratories INC の製品を、トリプシン(Try)は結晶トリプシン(Trypure Novo, Industry A/S, Bagsvaerd)を、エラスターゼはブタ膵エラスターゼ(Sigma)を、コラゲナーゼは Clostridium histolyticum から精製した酵素(Sigma)を使用した。F平板作製に使用したトロンビンは局所用ウシ・トロンビン(持田)であった。

蛋白基質：カゼインは α -casein (Sigma)を、ヘモグロビンは結晶ヒト・ヘモグロビン (ICN Pharmaceutical INC, Cleaveland)を、エラスチンはエラスチン粉末(半井化学)を使用した。

合成基質：N- α -acetyl-glycyl-L-Lysine methyl ester·AcOH (Ac-Gly-Lys-OMe), Acetyl-L-phenylalanine ethyl ester (Ac-Phe-OEt), Acetyl-L-tyrosine ethyl ester (Ac-Tyr-OEt), Acetyl-L-tryptophan ethyl ester (Ac-Try-OEt), Succinyl-L-alanyl-L-alanyl-L-alanine p-nitroanilide (Suc-(Ala)₃-pNA), 2, 4-Dinitrophenyl-L-prolyl-L-leucyl-glycyl-L-isoleucyl-L-alanyl-glycyl-arginine amide (DNP-Pro-Leu-Gly-Ile-Ala-Gly-Arg-NH₂)は、ペプチド研究所(箕面), Acetyl-L-lysine methyl ester·HCl (Ac-Lys-OMe), Tosyl-L-lysine methyl ester·HCl (Tos-Lys-OMe), Tosyl-L-arginine methyl ester·HCl (Tos-Arg-OMe)はSigma, Acetyl-L-arginine methyl ester·HCl (Ac-Arg-OMe)は Travenol Laboratories INC (Los Angelous) の製品を使用した。また、H-D-valyl-L-leucyl-L-lysine p-nitroanilide·2HCl (H-D-Val-Leu-Lys-pNA), Benzoyl-L-phenylalanyl-L-valyl-L-arginine p-nitroanilide (Bz-Phe-Val-Arg-pNA), H-D-phenylalanyl-piperidyl-L-arginine p-nitroanilide·2HCl (H-D-Phe-Pip-Arg-pNA), L-pyrroglutamyl-glycyl-L-arginine p-nitroanilide·HCl (<Glu-Gly-Arg-pNA)はAB KABIの製品を使用した。

酵素阻害物質：iodoacetamide (IAA), N-ethylmaleimide (NEM), p-tosyl-L-lysine chloromethane·HCl (TLCK)はE. Merk AG (Leverkussen), trypsin inhibitor from soybean type I-S (STI), diisopropyl-fluorophosphate (DFP)はSigma, t-aminomethylcyclohexane carboxylic acid (t-AMCHA)は第一製薬株式会社の純末を使用した。

2. 方法

フィブリン(F)分解：F平板法により測定した。F中にPlgを含む平板(Plg cont. F plate)および無Plg F平板(Plg-free F plate)の作製法は前報²⁾に記述した。使用被検液は

0.03ml, インキュベーションは 37°C, 20 時間行った。活性は F の溶解面積 (mm²) で表現した。Plg cont. F plate は SFP 標本中の Plg アクチベーターのチェックに使用した。

フィブリノーゲン (Fg) 分解: 0.1M tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) で 1% とし, リジン・セファローズで Plg を除去し, 同緩衝液で透析後, 希釈して使用した。反応混合液はこの Fg 液 1 ml, 酵素液 0.2 ml に同緩衝液を加え総量を 2 ml とした。37°C で種々の時間反応させ, 10% 過塩素酸 (PCA) 1 ml を加えて反応を停止させた。3,000rpm, 15 分間遠心分離後, 上清中の PCA 可溶反応生成物を 280nm の吸収で測定し, Fg 分解値とした。SFP 以外の酵素について測定する場合には, 反応混合液中に 2 M NaClO₄ 0.2 ml を加え, 塩類組成を SFP 活性測定の場合と等しくした。反応混合液中の NaClO₄ の終濃度は 0.2M である。

蛋白分解: α -カゼイン, H・ヘモグロビンの分解は 0.1M tris-HCl 緩衝液に溶解した 1% 蛋白溶液を基質として, Fg 分解の場合と同じく 280nm で PCA 可溶生成物量を測定した。

合成アミノ酸エステル水解: Hesterin 法⁴⁾に準拠した。リン酸緩衝液 (pH 7.5) に溶解した 20mM 基質 0.5 ml, 酵素液 0.2 ml, 同緩衝液 0.3 ml を混合し, 37°C, 30 分間反応させた。反応後, アルカリ性ヒドロキシルアミン, 1.5 ml を加え, 37°C, 10 分間放置後, 4N HCl, 18% トリクロール酢酸, 10% FeCl₃·6H₂O (0.1N HCl 溶解液) をそれぞれ 1.0 ml づつ加え, 3,000 rpm, 15 分間遠心分離して, 上清の 530nm の吸収で残存エステル量を定量した。

合成発色性ポリペプチド基質分解: 前記の KABI の合成基質を使用する場合は, KABI diagnostica⁵⁾ の指定する方法により, 遊離した pNA を測定した。tris-imidazole-HCl 緩衝液 (pH 7.5) に溶解した 10⁻³M 基質 0.25 ml に, 酵素液 0.25 ml, 同緩衝液 2.0 ml を混合し, 37°C で反応させた。反応開始から 3 分後のレコーダー値を測定した。また Suc-(Ala)₃-pNA を基質に使用する場合には Erlanger et al.⁶⁾法に準拠した。tris-HCl (pH 8.0) 緩衝液に溶解した 10⁻³M 基質 1.0 ml に酵素液 0.2 ml, 同緩衝液

Fig. 1 Influence of plasminogen on the fibrinolytic activity of SFP. —●— SFP + plasminogen containing fibrinogen. ○—○ SFP + plasminogen free fibrinogen.

0.8 ml を混合し, 37°C で 15 分間反応させた。15% 酢酸 1.0 ml で反応を停止し, 活性は 410nm で測定した吸光度で表現した。

DNP ペプチド分解: Masui, et al⁷⁾の方法にしたがった。0.15M NaCl, 5mM CaCl₂ および 0.02% ウシ血清アルブミンを含む tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) に溶解した 5×10⁻⁴M 基質 0.2 ml と, 酵素液 0.1 ml, 同緩衝液 0.1 ml を混合し, 37°C, 30 分間反応させた。1M HCl, 1 ml を加え反応を停止し, 酢酸エチル 2.0 ml を加えて振とうし, 3,000rpm, 15 分間遠心分離して, 上清を 365nm の吸収で定量した。

エラスチン分解: Schumacher and Schill⁸⁾にしたがって作製したエラスチン寒天平板 (E-Agar plate) を使用した。平板上にあけた径 2 mm の小孔内に被検液 0.003 ml を注入し, 37°C 20 時間のインキュベーション後, エラスチン溶解窓の面積 (mm²) を測定した。

それぞれの測定法ごとに, 反応溶液の塩類組成は等しく調整した。

II. 実験成績

1. SFP の Fg 分解

予備実験において, SFP は F 以外にも Fg

Fig. 2 Kinetic studies of fibrinogenolysis by SFP.

A. Effect of SFP concentration on fibrinogenolysis. Incubation: 15 min at 37°C.

Fibrinogen concentration: $\bullet$ — $\bullet$ 0.5%, $\circ$ — $\circ$ 0.25%, $\times$ — $\times$ 0.125%.

B. Effect of incubation time on fibrinogenolysis. SFP concentration: 1/2 concentration in Fig. 2A.

Fibrinogen concentration: $\bullet$ — $\bullet$ 0.5%, $\circ$ — $\circ$ 0.25%, $\times$ — $\times$ 0.125%.

C. Plot of fibrinogenolysis by SFP against substrate concentration. Incubation: 15 min at 37°C, SFP concentration: 1/2 concentration in Fig. 2A.

をよく分解し、高濃度では α -カゼイン、ヘモグロビンをも分解することが示され、プロテイナーゼであることが示唆された。また、Pl, TryがB-Fgに比べH-Fgを3倍以上分解するのに対し、SFPはB-Fgもよく分解し、B-Fgに対してH-Fgの分解は1.5倍であった。以下使用したFgはH-Fgであった。

図1はPlgを含むFgと、含まないFgを基質とした場合のSFPによるFg分解を比較したものである。図に示すように、Plgの有無にかかわらずSFPは、ほぼ等しい反応一時間曲線を書いてFgを分解した。この成績はSFPのFg分解がPlg活性化とは無関の、直接的なFg分解であることを示している。

この反応は、温度依存性が強く、20°C~45°Cの温度範囲での実験で、Fg分解値は温度10°Cの上昇ごとに、2.5~2.6倍の増加を示した。図2はSFP量(2A)、反応時間(2B)をそれぞれ変化させ、H-Fgに対する作用をしらべた成

績である。一定時間(37°C, 15分)の反応生成物質(E_{280})の増加はSFPの増加に依存し、また基質濃度に依存した。またSFP量を一定にして、反応時間を変えて画いた反応一時間曲線(2B)では、 E_{280} は一定時間内では直線的に上昇した。2Cには2Aおよび2Bの結果から、 E_{280} とSFP量、 E_{280} と反応時間が直線で示される範囲内で、基質濃度(反応に加えたFg濃度)と E_{280} 値の関係を示した。SFP量と基質濃度を適当に選定すれば、このFg分解は定量的に扱える酵素反応であることが示された。以下の実験はこの条件を選んで行っている。

pH安定性についての検討で、SFPは酸性側で不安定であることが示された。pH 4.0以下では急速に失活する。しかし中性およびアルカリ性側では安定で、pH 11.0で1時間放置しても活性の減少は認められなかった。

至適pHについての検討では、SFPが中性付近でよくFgを分解することは認められた

Fig. 3 Lineweaver-Burk plots showing fibrinogenolysis by SFP (—○—), plasmin (—○—) and trypsin (—×—). Velocity (V) is expressed as E_{280} of fibrinogenolysis for 10 min. Substrate concentrations (S) is expressed in % of fibrinogen.

Table 1 Comparison of the effects of various enzyme inhibitors on SFP, plasmin and trypsin

Inhibitor	Remaining activity (%)		
	SFP	Plasmin	Trypsin
Control (buffer)	100	100	100
TLCK	91	50	0
IAA	76	62	94
NEM	76	62	94
t-AMCHA	94	5	100
Cystein	110	10	100
DFP	0	0	0
STI	0	0	0

Enzyme activity was measured using fibrinogen as substrate. The final concentration of inhibitors was 10^{-2} M except that of STI (500 μ g/ml)

が、アルカリ側では基質の Fg が変性しやすいため正確な至適 pH を求めることが困難であった。ヘモグロビンを基質とした測定では、pH 7～9 の範囲にひろく至適 pH 域が認められた。

図 3 は Lineweaver-Burk にしたがって、SFP の Fg 分解 (pH 8.0) で、Fg 濃度の逆数に対して、その反応初速度の逆数をプロットした図である。Fg 濃度は終濃度 (%) で示し

た。Try, Pl についても同様の実験を行なった。基質が高濃度になると、3 者いずれの場合にも基質阻害が認められた。Fg に対する分解は、3 種の酵素系で異なるとされるにもかかわらず、この条件では、SFP は、Try, Pl とかなり近似した K_m 値で Fg を分解している。

以上の実験成績から SFP は Try, Pl などと同様に、中性条件で Fg を分解しうる中性プロテイナーゼであることが示された。

Fig. 4 Inhibition of DFP and STI on the fibrinogenolytic activity of SFP. SFP was mixed with DFP or STI and preincubated at 37°C for various periods of time, then fibrinogen was added. Remained fibrinogenolytic activity was measured after incubation for 30 min.

Table 2 Comparative activity of SFP, plasmin, trypsin and chymotrypsin against synthetic esters

Substrate	Esterolytic activity (%)			
	SFP	Plasmin	Trypsin	Chymotrypsin
Ac-Gly-Lys-OMe	0	100	100	10
Ac-Lys-OMe	0	87	100	5
Ac-Arg-OMe	0	36	100	0
Tos-Lys-OMe	0	65	100	10
Tos-Arg-OMe	0	18	100	0
Ac-Tyr-OEt	5	10	0	100
Ac-Phe-OEt	0	5	0	100
Ac-Try-OEt	5	10	0	100

The amounts of the enzyme were adjusted to show approximately the same fibrinolysis on a plg-free F plate (approx. 500mm²). The final concentration of the synthetic substrates was 5×10⁻³M. Esterolysis was measured after incubation for 30 min at 37°C. Complete hydrolysis of each substrate was expressed as 100.

2. SFP の Fg 分解に対する阻害物質の影響

表 1 は SFP の Fg 分解に対する種々の酵素阻害物質の影響をしらべ、Try, PI に対する阻害作用とを比較したものである。それぞれの酵素と表に示すような阻害物質とを混合し、10 分間ブレインキュベートした。その後酵素の残存活性を Fg 分解でしらべた。Fg との反応時間は 15 分とした。

SFP は PI, Try と同じく、DFP, STI により明らかな阻害を受けた。また PI は t-AMCHA およびシステインにより、Try は TLCK により著明な阻害を受けたが、SFP はこれらにより阻害を受けなかった。この事実は SFP の酵素としての作用様式が他 2 者とは異なることを示唆する。

図 4 は、SFP 阻害が明確である DFP および STI について、その濃度とブレインキュベージ

Table 3 Comparative amyolysis of SFP and plasmin

Substrate	SFP	Plasmin
H-D-Val-Leu-Lys-pNA	0	1.5
Bz-Phe-Val-Arg-pNA	0	0.075
H-D-Phe-Pip-Arg-pNA	0	0.075
<Glu-Gly-Arg-pNA	0	0.04

The amounts of the enzymes were adjusted to show approximately the same fibrinolysis on a plg-free F plate (approx. 250mm²). The final concentration of the chromogenic substrates was 10⁻⁴M. Figures in the table indicate E₄₀₅ at 3 min after mixing of enzyme and substrate at 37°C.

Table 4 Activity of SFP against synthetic specific substrates for elastase and collagenase

Substrate	SFP	Elastase (1.7 u/ml)	Collagenase (160 u/ml)
Suc-(Ala) ₃ -pNA (E ₄₁₀)	0.020	0.750	—
DNP-Pro-Leu-Gly-Ile-Ala-Gly-Arg-NH ₂ (E ₃₆₅)	0.010	—	0.375

The amounts of the enzymes were adjusted to show approximately the same fibrinolysis on a plg-free F plate (approx. 150mm²). The final concentration of the substrates was 5×10⁻⁴M. Incubation was performed for 30 min at 37°C.

Table 5 Comparison of SFP with elastase in fibrinolytic and elastolytic activities

Substrate	SFP	Elastase
Fibrinogen degradation (E ₂₈₀)	0.2	0.2
Plg-free F plate (mm ²)	720	300
Elastin-agar plate (mm ²)	0	64

Elastase solution was diluted to show the same fibrinogenolytic activity as that of SFP used.

オン時間との関係を示したものである。

低濃度の DFP では十分な阻害を得るために長時間のプレインキュベーションが、必要であったが、ここで使用した濃度では、いずれの濃度の DFP も最終的には完全阻害を示した。また STI による阻害効果は、阻害物質の濃度に無関係に 1 分以内にあらわれたが、その効果は STI の濃度に比例して認められた。

3. SFP の合成基質分解

表 2 は種々のプロテイナーゼの基質としてすでに知られている合成基質に対する SFP の作用を検討したものである。比較のために使用した酵素の濃度は F 分解において SFP と同一活

性を示すように調整してある。

表 2 に示すように、Pl, Try, キモトリプシンは、特異性は低いがそれぞれ分解しやすいアミノ酸エステル基質をもつことが示されたが、SFP はそのいずれをもほとんど分解しなかった。また、表 3 に示すように、SFP は、トロンビン, Try, Xa, Pl の特異的合成基質として報告されている Bz-Phe-Val-Arg-pNA, H-D-Phe-Pip-Arg-pNA, Glu-Gly-Arg-pNA および Pl の特異的合成基質として報告されている H-D-Val-Leu-Lys-pNA を分解しなかった。以上の実験は反応時間を 3 分にして行なった成績であるが、30 分の反応でも同様の結果がえられた。

表4はエラスターゼおよびコラゲナーゼの特異的合成基質である Suc-(Ala)₃-pNA および DNP-Pro-Leu-Gly-Ile-Ala-Gly-Arg-NH₂ に対する SFP の分解をしらべたものである。エラスターゼ、コラゲナーゼの、それぞれの特異的合成基質に対する反応は著明であるが、この条件では SFP はこれらに対してもごく微量の分解を示すにすぎない。

以上のように、これらの合成基質の中からは SFP に親和性の高い適切な基質を求めることはできなかった。

4. SFP のエラスチン分解

表4の実験で SFP が微量ながら Suc-(Ala)₃-pNA を分解しているの、SFP のエラスターゼ活性をエラスチンを基質として測定した。しかし、表5に示すように、SFP のエラスチン・寒天平板の分解は認められなかった。

III. 考 察

SFP は、2M の KSCN または NaClO₄ によりよく抽出されるが、生理的濃度の溶液では抽出されないことが報告されていた²⁾³⁾。この作用は塩類濃度を下げることにより急速に失活することから、高濃度塩類は抽出条件であると同時に作用出現のための条件ではないかという疑問があった。しかし本論文の実験で、SFP の Fg および他の蛋白に対する分解は終濃度 0.2 M で十分におこることが示され、2 M という高濃度は SFP の蛋白分解反応惹起の条件ではないことが示された。

本論文の実験で使用された SFP 標本は 2M NaClO₄ 抽出液をクロロホルム処理、硫酸アンモニウム塩析、ゲル濾過によって部分純化したものであるが、なお不純なものであり、ポリアクリルアミドゲル・ディスク電気泳動でも F 分解に対する活性を有するバンドとは別に多くの蛋白を含んでいた。さらに高度の純化が当然望まれるが、イオン強度の低下による失活が著しいため、イオン交換クロマトグラフィーの使用が困難であり、精製のためには特別な手段の導入が必要であると考えられる。

粗標本ではあるが、SFP は Try, Pl と同様に中性条件で、0.2M NaClO₄ 存在下に Fg を

よく分解し、その反応は Michaelis-Menten の機構にしたがい、反応速度論的に十分扱いうる反応であった。この条件で SFP は Try, Pl と同じオーダーの Km で Fg を分解した。

SFP の阻害実験では、DFP, STI が SFP の Fg 分解反応をよく阻害した。DFP の阻害は、時間とともに進行し、阻害物質の濃度とは無関係に最終的には完全阻害を示す不可逆的阻害であった。STI による阻害は、阻害物質の濃度により、プレインキュベーション時間とは無関係に一定の値をとる可逆的阻害であった。

また SFP は DFP による阻害から、その活性中心にセリン残基をもつことが示され、TLCK により阻害されないことから、活性中心には Try 型の活性ヒスチジン残基をもたないことが示された。また Pl の特異的阻害物質である t-AMCHA によっても阻害されず、結合部位または活性中心の構造が Pl と異なることが示された。

合成基質を使用した実験でも、SFP は Try, Pl, キモトリプシンがそれぞれ分解する特異的合成基質を分解せず、またエラスターゼ、コラゲナーゼの合成基質に対しても本実験の範囲ではごく微量の分解しかおこらず、これらの酵素とは酵素作用様式が異なることが示された。

従来ヒトの脾から分離された中性プロテイナーゼとしては Starkey and Barrett^{9~11)} の脾酵素、LoSpalluto, et al.¹²⁾ の脾酵素がある。前者はエラスターゼおよびカテプシン G (キモトリプシン様酵素) である。SFP は種々の蛋白基質を分解するにもかかわらず、エラスチンを分解せず、Suc-(Ala)₃-pNA に対しても微量の分解を示したにすぎない。また、カテプシン G はキモトリプシン用特異的合成基質をよく分解するが、SFP による分解は認められなかった。カテプシン G とは、これがシステインにより阻害を受けるが SFP は阻害されないという点で明らかに異なる。一方 LoSpalluto, et al.¹²⁾ の脾酵素はシステインにより活性亢進があり、分子量的にも類似性があるが、この酵素の F および Fg 分解については記載がない。なおカテプシン G と免疫的に同定される蛋白が、白血球抽出液中に存在することが認められている。

白血球中のF分解酵素としては、コラゲナーゼ¹³⁾、エラスターゼ¹⁴⁾、以外に Lebez and Koptar¹⁵⁾ のカテプシンFがある。この酵素は中性条件でFを分解するが、pH 3.5 においてもなおヘモグロビンを分解し、耐酸性を有する点でSFPとは異なる。その他白血球顆粒中のF分解酵素についての報告もあるが^{16~18)}、性質について詳述されておらず、現段階では比較して論じられない。いずれにしても、SFPは脾の細胞構造と密接に結合した不溶性酵素であり、中性条件でFおよびFgを分解するセリン・プロテイナーゼであると考えられる。なお本論文の限られた実験の範囲では、SFPが高い親和性を示す合成基質を与えることはできなかったが、使用基質中、わずかではあるが、Suc-(Ala)₃-pNAが示す分解は、今後SFPの合成基質を求める上で参考となる成績であろう。

生体内F除去機構としてのPI系の研究は多く、その酵素反応様式の研究も分子レベルで行われている。しかし、*in vivo*の実験でPI活性化によらないと考えられるF除去も多く報告されており、Fの代謝には白血球および網内系細胞の関与が示唆されている^{19~21)}。しかしこれに対する酵素レベルでのアプローチはまだ非常に少ない。SFPが生体内F除去機構に関与する可能性は大きく、病的条件でのその増減、細胞よりの遊離機構など今後の研究課題として興味ぶかい。

総 括

1) ヒト脾の2M NaClO₄抽出液を、クロロホルム処理、硫酸アンモニウム塩析、セファデックス・ゲル汙過により精製したSFPは、Fと同様にFgをよく分解した。そのFg分解反応はMichaelis-Menten機構にしたがう反応であり、SFPはTry、PIと近似のKm値でFgを分解した。

2) 合成基質を使用した実験で、SFPはTry、PI、キモトリプシン、コラゲナーゼ等の特異的基質を分解しなかった。しかし、エラスターゼの特異的基質であるSuc-(Ala)₃-pNAに対して微量の分解を示した。

3) 酵素阻害物質を使用した実験で、SFPは

セリンプロテイナーゼであるが、活性中心にはTry型の活性ヒスチジン残基をもたないことが示された。またSFPはt-AMCHAにより阻害されず、その作用様式はPIとも異なることが示された。

謝辞： 稿を終るにあたり、使用した脾の一部を御提供いただいた神戸大学医学部病理学第一講座の杉山武敏教授に深甚なる感謝の意を表す。また研究実施にあたって、御討論、御協力くださった神戸学院大学栄養学部生理学研究室の山本順一郎助教授、堀江登助手に感謝する。

この論文は永松陽子の神戸大学医学部に対する医学博士学位請求論文の一部である。

文 献

- 1) Okamoto, U., Yamamoto, J., Nagamatsu, Y. and Horie, N.: Fibrinolytic activity of lung and spleen extracts observed in conventional but not in germ-free rats. *Thrombosis. Haemostas.*, **42**; 726~732, 1979.
- 2) 永松陽子： ヒト脾から抽出されるフィブリン分解作用をもつ因子の部分純化ならびに若干の性質について。 *日本生理誌*, **40**; 463~471, 1978.
- 3) Okamoto, U., Nagamatsu, Y., Yamamoto, J. and Horie, N.: An insoluble spleen protease having dominant capability to split fibrin and fibrinogen at neutral pH. XVII Cong. Inter. Soc. Haematol. Abstracts (1), Paris, 454, 1978.
- 4) Hesterin, S.: The reaction of acetylcholine and other carboxylic acid derivatives with hydroxylamine, and its analytical application. *J. Biol. Chem.*, **180**; 249~261, 1949.
- 5) KABI Diagnostica: Synthetic chromogenic substrates. Data sheet, 1978.
- 6) Erlanger, B.F., Kokowsky, N. and Cohen, W.: The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch. Biochem. Biophys.*, **95**; 271~278, 1961.
- 7) Masui, Y., Takemoto, T., Sakakibara, S., Hori, H. and Nagai, Y.: Synthetic substrates for vertebrate collagenase. *Biochem. Med.*, **17**; 215~221, 1977.

- 8) Schumacher, G. F. B. and Schill, W. B.: Radial diffusion in gel for micro determination of enzymes. II. Plasminogen activator, elastase and nonspecific proteases. *Anal. Biochem.*, **48**; 9~26, 1972.
 - 9) Starkey, P. M. and Barrett, A. J.: Neutral proteinases of human spleen. Purification and criteria for homogeneity of elastase and cathepsin G. *Biochem. J.*, **155**; 255~263, 1976.
 - 10) Starkey, P. M. and Barrett, A. J.: Human lysosomal elastase. Catalytic and immunological properties. *Biochem. J.*, **155**; 265~271, 1976.
 - 11) Starkey, P. M. and Barrett, A. J.: Human cathepsin G. Catalytic and immunological properties. *Biochem. J.*, **155**; 273~278, 1976.
 - 12) LoSpalluto, J. J., Fehr, K. and Ziff, M.: Degradation of immunoglobulins by intracellular proteases in the range of neutral pH. *J. Immunol.*, **105**; 886~897, 1970.
 - 13) Ohlsson, K. and Olsson, I.: The neutral proteases of human granulocytes. Isolation and partial characterization of two granulocyte collagenases. *Eur. J. Biochem.*, **36**; 473~481, 1973.
 - 14) Ohlsson, K. and Olsson, I.: The neutral proteases of human granulocytes. Isolation and partial characterization of granulocyte elastase. *Eur. J. Biochem.*, **42**; 519~527, 1974.
 - 15) Lebez, D. and Kopitar, M.: Leucocyte proteinases. I. Low molecular weight cathepsins of F and G type. *Enzymologia*, **39**; 271~282, 1970.
 - 16) Hermann, G. and Miescher, P. A.: Differentiation of leucocytic fibrinolytic enzymes from plasmin by the use of plasmatic proteolytic inhibitors. *Intern. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, **27**; 346~354, 1965.
 - 17) Plow, E. F. and Edgington, T. S.: An alternative pathway for fibrinolysis. I. The cleavage of fibrinogen by leucocyte protease at physiologic pH. *J. Clin. Invest.*, **56**; 30~38, 1975.
 - 18) Biliezikian, S.B. and Nossel, H.L.: Unique pattern of fibrinogen cleavage by human leucocyte proteases. *Blood*, **50**; 21~28, 1977.
 - 19) Egberg, N. and Nordström, S.: Effects of reptilase-induced intravascular coagulation in dogs. *Acta Physiol. Scand.*, **79**; 493~505, 1970.
 - 20) Kowalski, E., Budzynski, A.Z., Kopec, M., Latallo, Z.S., Lipinski, B. and Wegrzynowicz, Z.: Circulating fibrinogen degradation products (FDP) in dog blood after intravenous thrombin infusion. *Thrombos. Diathes. Haemorrh.*, **13**; 12~24, 1965.
 - 21) Nordström, S. and Zetterqvist, E.: Effects of thrombin infusions upon ¹³¹I-labelled fibrinogen in dogs. *Acta Physiol. Scand.*, **72**; 85~99, 1968.
-