ラット顎下腺中のトリプシン様プロテアーゼ についての研究

池 野 久 美 子

東北歯科大学口腔生化学講座 (指導 : 葛谷博敏教授)

[受付 : 昭和57年1月28日]

Studies on trypsin-like proteases in the submandibular gland of rats

Kumiko Ikeno

Department of Biochemistry, Tohoku Dental University

31-1 Misumido, Tomita-machi, Koriyama, 963

(Director : Prof. Hiroshi Kuzuya)

[Accepted for publication : January 28, 1982]

Key words : trypsin-like protease / rat submandibular gland

Abstract : The endogenous inhibitors of dopa decarboxylase in the rat submandibular gland are trypsin-like protease. We discussed whether or not these proteases were the same as the ones previously reported. The homogenate of the rat submandibular gland was frozen and thawed three times and the supernatant was subjected to isoelectric focusing ; seven active fractions of trypsin-like protease (isoelectric point, 4.0, 4.3, 4.5, 5.1, 5.5, 5.9 and 7.2) were obtained. The effects of trypsin inhibitors and metal ions on these proteases were investigated.

The protease with an isoelectric point of 4.0 was similar to kallikrein of the rat submandibular gland. However, it had different properties from kallikrein. The proteases with isoelectric points of 4.3 and 4.5, respectively, may be salivain. The three proteases with isoelectric points of 5.1, 5.5 and 5.9, respectively, were different from the enzymes previously reported. We thought these three proteases were isozymes. Proteases with isoelectric points of 4.0 and 7.2 did not inhibit dopa decarboxylase activity.

緒 言

ラット唾液腺中に、いくつかのタンパク分解酵素が存在することは以前からよく知られている¹⁻⁴⁾。

Riekkinen ら⁵⁾は、ラット顎下腺より DEAE-Cellulose クロマトグラフィーにより、トリプシンの合成基質である N- α -Benzoyl-L-arginine 2-naphthylamide (BANA) 及びその p-nitroanilide

(BAPA) を加水分解する5つの酵素を分離した。そのうち2つのアルカリ性トリプシン様プロテアーゼが精製され、Salivain⁶⁾及び Glandulain^{7,8)}と名付けられ、その性状も明らかになった。

橋本らは、ラット顎下腺からドーパ脱炭酸酵素 (Dopa decarboxylase, EC 4.1.1.26, 3, 4-Di-hydroxy-L-phenylalanine carboxylase ; DDC) を阻害する物質⁹⁾を分離精製し、この内因性ドーパ脱炭酸酵素阻害物質がトリプシン様プロテアーゼである¹⁰⁾ことを報告した。すなわち、ラット顎下腺

ホモジネートを等電点電気泳動法で分画すると、等電点 (I. P.) 4.5と5.5の画分に DDC 活性を阻害し、かつトリプシンの合成基質を加水分解するピークがみられた。種々検討の結果、I. P. 4.5のタンパク質は、Salivain と推察されたが、I. P. 5.5のタンパク質は、新しいトリプシン様プロテアーゼと考えられた。本報告はラット顎下腺に見出される新しいプロテアーゼを中心にして、従来から報告されているものと比較検討したものである。

実験材料及び方法

1. 実験材料

雄ウイスター系成熟ラット 4匹を断頭屠殺後直ちに顎下腺を摘出し、9倍量の精製水を加え、氷冷下に Polytron (Kinematica GmbH, Switzerland) ホモジナイザーで、30秒間 3回ホモジナイズした。さらにホモジネートの凍結融解を3回くり返し、これを100,000×g (Ave.) で60分間遠心分離した。これで得られた上清を試料として調整用の等電点電気泳動を行った。

2. 等電点電気泳動による分画¹¹⁾

上記試料 (12.4ml) に Ampholine (pH 3.5-10) (LKB) 5ml 及び精製水を加えて全量を100ml とし、これに Ultrodex (purified Sephadex G-75 superfine) (LKB) 5g を加えて、ガラス製トレイ (10.9×24.3×0.5cm) に流し込み、冷風をあてて約20%の水を蒸発させたのち、トレイを LKB 2117 Multiphor に設置し、4°C、6 watts の条件で16時間泳動した。泳動完了後、30画分に分画し各画分のゲルを精製水 5ml で溶出した。

各画分の pH は 4°C で測定した。

タンパク質の溶出パターンは280nm の吸光度を測定して求めた。

3. ドーパ脱炭酸酵素活性の測定

DDC 阻害活性の測定は、ラット肝臓の可溶性画分を DDC 標準酵素として用い、それに対する阻害率を測定した。すなわち、ラットの肝臓に9倍量の0.25M シクロロース溶液を加えて氷冷下に、Polytron ホモジナイザーで20秒間 2回ホモジナイズした。このホモジネートを100,000×g (Ave.) で60分間遠心分離し、その上清50μl を

DDC 標準溶液として用いた。

DDC 活性は、Lovenberg ら¹²⁾の方法に従い、生成されるドーパミンの蛍光強度を測定することにより求めた。また酵素反応により生成するドーパミンの安定化をはかるため、反応液にアスコルビン酸を加えた¹³⁾。

阻害活性は、DDC 標準溶液50μl、0.1M Tris-HCl 緩衝液 (pH 9.3) 100μl、各画分100μl の混合液を37°C で10分間ブレインキュベートした後、1M リン酸緩衝液 (pH 6.8) 100μl を加えてから、DDC 活性測定法に従った。

4. プロテアーゼ活性の測定

a) エステラーゼ活性

トリプシンの代表的な基質である p-Tosyl-L-arginine methyl ester (TAME) を用いて、各画分のエステラーゼ活性を測定した。測定は Hummel の方法¹⁴⁾をもとにして行った。すなわち TAME のエステル結合が水酸化を受けることにより生ずる247nm の吸光度の増加を島津 UV-300 自記分光光度計を用いて測定した。この際、25°C で5分間その反応を記録し、1分間あたりの optical density units (原法の用語による ΔE at 247 nm) を求めた。反応は、0.02M CaCl₂ を含む0.1M Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) 1.5ml、2mM TAME (基質) 1.5ml を混合した液を25°C に保ち、これに10μl の検体を加え開始した。

b) アミダーゼ活性

N-α-Benzoyl-DL-arginine p-nitroanilide (BAPA) を基質として、Riekkinen らの方法⁵⁾に従い、遊離した p-nitroaniline 量を410nm の吸光度の増加からアミダーゼ活性を算出した。反応液組成は、0.1M Tris-HCl 緩衝液 (pH 9.3) 1.5ml、2mM BAPA (基質) 1.0ml、検体50μl、精製水を加えて全量を3.0ml とした。酵素反応は37°C で5分間行った。反応停止には、1M 酢酸緩衝液 (pH 4.2) 1.0ml を加え、直ちに410nm の吸光度を測定した。

c) プロテイナーゼ活性

カゼイン (bovine) を基質として、各画分のプロテイナーゼ活性を検討した。Protease Detection Kit (BIO-RAD) を用い、基質を含む1%寒天ゲルを調整し、直径4mm の試料溝に各画分を10μl

Fig. 1 Isoelectric focusing patterns of inhibitory activity against dopa decarboxylase, pH, and absorbance at 280nm.

The supernatant of the homogenate of the submandibular glands of rats (12.4ml) was focused in a gel-bed of 5% ampholine (pH 3.5-10) for 16 hours. Each fraction was eluted with water (5ml) and the eluate was used to measure inhibitory activity, pH, and adsorbance at 280nm. The eluate was used in following experiments.

ずつ添加し、50°C、5時間インキュベートして、生成した透明リングの直径を測定した¹⁵⁾。

実験結果

1. 等電点電気泳動法によるタンパク質及びDDC阻害物質の分離

ラット顎下腺ホモジネート上清をpH 3.5-10の範囲で等電点電気泳動を行い、これを30画分して各画分のpH、タンパク質量及びDDC阻害活性を調べた。Fig. 1に示すようにタンパク質は10個ほどのピークに分離され、等電点を酸性側にもつタンパク質が非常に多く、等電点が8.0以上のタンパク質はごくわずかである。

DDC阻害活性を有する画分は、大きく画分4～6のピークIと画分8～12のピークIIに分離し、pH 9.3におけるピークIIのDDC阻害活性は一樣にほぼ100%を示した。ピークIは画分5に中心をもち、その等電点は4.5、ピークIIは2つのタンパク質成分を含み、その等電点は、画分8が5.1、画分10が5.5であった。

2. プロテアーゼ活性

トリプシンの基質であるp-Tosyl-L-arginine

methyl ester (TAME) を用いて、各画分のエステラーゼ活性を測定した。Fig. 2に示すように5つのピークと2つの肩がみられた。又トリプシンの特異的な基質とされるN- α -Benzoyl-DL-arginine p-nitroanilide (BAPA) を用いて、各画分のアミダーゼ活性を測定すると、4つのピークと2つの肩がみられた。両者から得られたそれぞれの加水分解酵素活性は、タンパク質ピークとも一致し、画分2、4、5、8、10、12、17の各加水分解酵素をI～VIIとした。これらの加水分解酵素の等電点は、I : 4.0, II : 4.3, III : 4.5, IV : 5.1, V : 5.5, VI : 5.9, VII : 7.2であった。Vは最も強くDDC活性を阻害し、最大のエステラーゼ活性を示し、同時にBAPAアミダーゼ活性も高い。又IIIは、DDCを阻害するピークIの中心で、最も高いBAPAアミダーゼ活性を有するが、エステラーゼ活性は比較的低い。ここで得られた加水分解酵素のうち、IとVIIを除くII～VIに、DDC阻害活性がみられる。VIIはエステラーゼ活性を有するが、アミダーゼ活性はほとんどみられない。

カゼインを基質とすると、II、IIIが最も活性が

Fig. 2 TAME esterase and BAPA amidase activities in the submandibular glands of rats.

The eluate of fraction number 2, 4, 5, 8, 10, 12, 17, was abbreviated as I, II, III, IV, V, VI, VII, respectively and the abbreviation was used in following figures.

A) TAME esterase activity; p-Tosyl-L-arginine methyl ester was used as substrate.

B) BAPA amidase activity; N- α -Benzoyl-DL-arginine p-nitroanilide was used as substrate.

高く、Vも比較的強く加水分解された。IV, VIは同程度で、Iはそれよりも活性が低く、VIIはほとんど作用を受けなかった。

そこで、これらの加水分解酵素について、さらに詳しい性状を検討した。

3. 加水分解酵素の性状

a) 至適 pH

BAPA を基質として、アミダーゼ活性の pH 依存性をみた。すなわち、I, II, III, Vは各分画溶出液を20 μl , IVは30 μl , VIは50 μl を用い、各タンパク質量はほぼ同量 (20 μg) となるようにした。Fig. 3 に示すようにIIIは pH 9.0~9.3に、II

Fig. 3 pH dependence of the hydrolysis of BAPA by the submandibular glands of rats.

Each sample, I ($\blacktriangle$ — $\blacktriangle$), II ($\blacksquare$ — $\blacksquare$), III ($\bullet$ — $\bullet$), IV ($\triangle$ ···· $\triangle$), V ($\circ$ ···· $\circ$), VI ($\square$ ···· $\square$), contained 20 μg of protein.

Fig. 4 Temperature dependence of the hydrolysis of BAPA by the submandibular glands of rats.

Each sample contained 20 μg of protein. Symbols correspond to those in Fig. 3.

は pH 9.3付近に、残りの I, IV, V, VIは pH 10.0付近に最大活性をもち、すべてアルカリ性側に、その至適 pH を有した。

b) 至適温度

同様に BAPA を基質として、加水分解酵素 I ~ VIの至適温度を検討した。いずれも50 $^{\circ}\text{C}$ 付近で最大活性を示した。I, II, III, およびIV, V, VIはそれぞれ同じような傾向をみせた(Fig. 4)。

c) 各種阻害剤の効果

トリプシンの天然阻害物質として知られる大豆及びリマ豆トリプシンインヒビターとオボムコイドの3種のトリプシンインヒビターのI~VIIのそれぞれに対する効果を、BAPAとTAMEの両基質を用いて検討した。BAPA アミダーゼ活性は、各種インヒビターとそれぞれの酵素を37°Cで15分間プレインキュベートしてから、基質を加え、37°Cで反応させて測定した。TAME エステラーゼ活性は、各種インヒビターとそれぞれの酵素を、37°Cで10分間プレインキュベートしてから基質を加え25°Cで5分間反応させて測定した。

Fig. 5はBAPAを基質として3種のインヒビターの添加量をかえてI~VIのアミダーゼ活性の変化をみたものである。Fig. 5-Aに示すように、大豆トリプシンインヒビターで、IV, V, VIは、非常に強く阻害を受け、互いに酷似した阻害変化を示し、10 μ g/mlでほぼ80%, 50 μ g/mlでは90%以上の阻害効果をあらわした。IIIもかなり強い阻害効果を示し、50 μ g/mlで、80%以上の阻害を受けたが、その阻害パターンは前三者とは異なり、むしろIIによく似た変化を示した。IIは50 μ g/mlで約50%の阻害を受けた。しかし、Iは50 μ g/mlでは、ほとんど阻害されず、100 μ g/mlで約10%, 500 μ g/mlでも30%弱の阻害しか受けなかった。

オボムコイドの添加では、500 μ g/mlの添加例でも、I~VIのどの加水分解酵素も、全く阻害されなかった(Fig. 5-B)。

リマ豆トリプシンインヒビター添加では、その効果に、各画分間で顕著な違いがあらわれた。すなわち、I, II, IIIは500 μ g/mlでも全く阻害されないが、IV, V, VIは50 μ g/mlでほぼ50%, 500 μ g/mlでは80~90%阻害され、その阻害パターンも一致している(Fig. 5-C)。

標品のトリプシン (Three times crystallized salt-free trypsin. Miles Biochemicals) に、これら3種のトリプシンインヒビターを添加すると、いずれも5 μ g/mlでほぼ完全に阻害された。

一方、TAMEを基質としてこれらI~VIIのつエステラーゼ活性が、前述の3種の天然トリプシンインヒビターでどのような阻害をうけるかを

Fig. 5 Effect of trypsin inhibitors on the hydrolysis of BAPA by the submandibular glands of rats.

20 μ g of protein of each fraction and trypsin ($\times \cdots \times$) were used as enzymes. Preincubation was carried out for 15 min at pH 9.3 and incubation was done for 5 min at the same pH. Trypsin was incubated at pH 8.0 for both incubation periods. Symbols correspond to those in Fig. 3.

Inhibitors; A) soy bean trypsin inhibitor, B) ovomucoid, C) lima bean trypsin inhibitor.

観察した(Fig. 6)。酵素量としてI~VIは各10 μ lを用い、VIIは20 μ l用いた。Fig. 6-Aに示すように、大豆トリプシンインヒビターを添加するとVIIが最も強く阻害され、50 μ g/mlでほぼ100%阻害された。又I, II, IIIもかなり強く阻害され、特にIIIは、50 μ g/mlで85%, 100 μ g/mlで、ほぼ100%の阻害を受けた。しかしVとVIは、ほとんど阻害を受けず、100 μ g/mlで20~40%の阻害で、この両者の阻害パターンは類似していた。

オボムコイド及びリマ豆トリプシンインヒビタ

Fig. 6 Effect of trypsin inhibitors on the hydrolysis of TAME by the submandibular glands of rats.

Preincubation was carried out for 10 min and incubation was done for 5 min at pH 8.0 respectively. Ten μg of protein of each fraction and trypsin ($\times \cdots \times$) was used as enzyme. Symbols correspond to those in Fig. 3 and VII ($\times$ — $\times$).

Inhibitors; A) soy bean trypsin inhibitor, B) ovomucoid, C) lima bean trypsin inhibitor.

ーでは、I～VIIのいずれも阻害されなかった。逆にリマ豆トリプシンインヒビターの添加で、BAPAを基質としたアミダーゼ活性が阻害されたIV, V, VIのうち、V, VIはTAMEを基質とすると、50%近く賦活された。このことから、IVはV, VIと性質を異にすると考えられる。

更に、これら3種の蛋白性プロテアーゼインヒ

Fig. 7 Effects of leupeptin and TLCK on hydrolysis of BAPA by the submandibular glands of rats.

Symbols correspond to those in Fig. 3 and Fig. 5.

ビター以外の阻害物質を添加して、ラット顎下腺から得られたI～VIのプロテアーゼに及ぼす効果を検討した。

セリン・チオールプロテアーゼに対する低分子阻害物質として知られるロイペプチンと、パパイン及びトリプシンの不活性化剤として知られる1-Tosyl-L-lysine chloro methyl ketone (TLCK) についての効果をFig. 7に示した。基質として、BAPAを用いた。

ロイペプチンの添加では、I～VIのいずれも非常に強く阻害された。5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ でIIIは100%, II, IV, V, VIはほぼ90%, Iも80%近く阻害された (Fig. 7-A)。

TLCK 添加による阻害は、あまり顕著でなく1 mM でI, IV, Vは阻害されず、残りのII, III, VIも20～30%の阻害を受けたのみであった (Fig. 7-B)。

トリプシン (標品) は、ロイペプチン5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, TLCK 0.1mM で、ほぼ完全に阻害された。

d) 金属イオンの効果

BAPAを基質として、CuイオンとCaイオンの効果を調べた。Fig. 8-Aに示すように、 CuCl_2 で加水分解酵素IV, V, VIは同様に阻害され、5

Fig. 8 Effects of Cu^{2+} and Ca^{2+} on the hydrolysis of BAPA by submandibular glands of rats. Symbols correspond to those in Fig. 3 and Fig. 5.

mM で80%以上の阻害を受けたが、II, IIIは同濃度で50%の阻害にとどまり、又IIIは1 mM 以下では全く阻害されなかった。

Ca イオンの効果をみると、トリプシン (標品) では、10mM で70%も活性が上昇したが、これらの加水分解酵素では幾分か阻害され、I~VIのいずれもトリプシンとは異なっていた (Fig. 8-B)。

そこで、TAME を基質として Ca イオンの効果をみると、Fig. 9 に示すように、トリプシン (標品) では、5 mM で2倍以上、10mM では2.5倍も賦活された。Iは50~100mM で1.5倍に、V, VIも20~30%賦活されたが、II, III, IV, VIIは、ほとんど影響されなかった。

以上の結果を Table 1 にまとめた。

考 察

ラット顎下腺中の加水分解酵素については古くから報告がなされている。1965年、Riekkinen

Fig. 9 Effect of Ca^{2+} on the hydrolysis of TAME by the submandibular glands of rats. Symbols correspond to those in Fig. 3 and Fig. 6.

ら⁵⁾は、ラット顎下腺の遠心上清画分から DEAE-Cellulose クロマトグラフィーで、5つの加水分解酵素を分離した。これらのうち、2つは酸性側 (pH 5.3および6.3) に、1つは中性 (pH 7.2)、残りの2つはアルカリ性側 (pH 8.1および9.2) にそれぞれ至適 pH をもっている。

至適 pH 9.2 の酵素は Salivain⁶⁾ と名付けられ、至適 pH 8.1 の酵素は Glandulain^{7,8)} と命名され、いくつかの物理化学的性状が明らかとなった。酸性プロテアーゼの一つは、カテプシン B¹⁶⁾ と同定され、さらにカリクレイン様 ペプチダーゼ¹⁷⁾ も分離された。

1967年、Minato ら⁴⁾は、ラット顎下腺の遠心上清画分の DEAE-Cellulose クロマトグラフィーで、カゼインを加水分解する5つの酵素を分離したが、この5つはすべてアルカリ性側にその至適 pH をもっている (pH 8.3, 8.3, 9.6, 9.6, 10.2)。また、Brandtzaeg ら¹⁸⁾により、ラット顎下腺から4つのカリクレインが見出されている。

著者らは、ラット顎下腺中に DDC 活性を阻害する内在因子が存在することを報告した。すなわち、I. P. 4.3~4.5 と I. P. 5.0~5.9 の両タンパク質は、DDC を阻害するほかに、トリプシンの

Table 1 Properties of seven fractions in rat submandibular gland and trypsin

	I	II	III	IV	V	VI	VII	Trypsin
Isoelectric point	4.0	4.3	4.5	5.1	5.5	5.9	7.2	10.8 ²⁰⁾
DDC inhibitory activity	—	+	++	+++	+++	+++	—	+++
*Optimum pH	10.0	9.3-10.0	9.0-9.3	10.0	10.0	10.0		8.0 ²⁰⁾
*Optimum temperature	50°C	50°C	50°C	50°C	50°C	50°C		
*Inhibitor								
Soy bean trypsin inhibitor	±	++	+++	+++	+++	+++		+++
Ovomucoid	—	—	—	—	—	—		+++
Lima bean trypsin inhibitor	—	—	—	++	++	++		+++
Leupeptin	+++	+++	+++	+++	+++	+++		+++
TLCK (low concentration)	—	+	+	—	—	+		+++
CuCl ₂ (low concentration)	+	±	—	+	+	+		+
*Activator								
CaCl ₂	—	—	—	—	—	—		++
Substrate								
BAPA	+	++	+++	+	++	+	±	+
TAME	++	++	+	+	+++	++	+	+++
Casein	+	+++	+++	+	++	+	±	++

* BAPA was used as substrate.

代表的な基質である TAME 及び BAPA を加水分解する。しかしキモトリプシンの基質である N-Benzoyl-L-tyrosine ethyl ester (BTEE) を加水分解しない。これらのことから DDC を阻害するラット顎下腺中の2つのタンパク質はトリプシン様プロテアーゼと考えられた。そして、I. P. 4.3~4.5のタンパク質は、Riekkinen らのいう Salivain に類似していると推察されたが、もう一方のプロテアーゼについては、新しいトリプシン様プロテアーゼと考えられた。

本報告では、DDC を阻害する2つのプロテアーゼを含め、成熟雄ラットの顎下腺には、7つ (I~VII) のプロテアーゼ活性画分があることを明らかにした。各々の I. P. は、I : 4.0, II : 4.3, III : 4.5, IV : 5.1, V : 5.5, VI : 5.9, VII : 7.2 で VII を除いてすべて酸性側である (Fig. 2)。また至適 pH は、I~VII が、pH 9.0~10.0 にあり、すべてアルカリ性側であって (Fig. 3)、Riekkinen らの報告した酸性及び中性に至適 pH をもつ加水分解酵素は見られなかった。

I~VII の加水分解酵素のうち、VII は TAME エ

ステラーゼ活性を有するが、BAPA アミダーゼ活性はほとんどなく、DDC 阻害活性ももたないことから、他の6種とは全く異なるトリプシン様エステラーゼと考えられる

BAPA を基質としたアミダーゼ活性を有する他の6種は、TAME エステラーゼ活性も有するが、そのうち I は、DDC 阻害活性をもたず BAPA を基質とした場合、試験した3種の天然トリプシンインヒビターの影響をほとんど受けないことなどから他の II~VI の酵素とはまた別のものと思われる。なお Bradtzaeg らの報告したラット顎下腺カリクレイン¹⁸⁾は、I. P. 3.87, 3.96, 4.07, 及び 4.16 の4つに分離され、N- α -Benzoyl-L-arginine ethyl ester (BAEE) エステラーゼ活性は高く、カゼイン分解能は非常に低い。この加水分解酵素 I も、I. P. 4.0 で、TAME エステラーゼ活性を有し、カゼイン分解能もそれほど高くないという点でこのカリクレインと一致している。しかし、腺カリクレインは、アシル-L-アルギニンのエステルは加水分解するが、アルギニンのアミドは、水解しにくいといわれている¹⁹⁾。I は、BAPA を

すみやかに比較的よく加水分解する点で、大いに異なる。

一方、Ekforsらは、ラット顎下腺より、カリクレイン様ペプチダーゼを分離しているが、これらは4つのアイソザイムからなり、TAMEもBAPAも基質となり、至適 pH は8.2~8.3で、Diisopropyl fluorophosphate (DFP) で阻害されず、リマ豆トリプシンインヒビターで阻害される¹⁷⁾と報告されている。I は TAME 及び BAPA 両基質に作用し、DFP と同じ作用をする Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) で、ほとんど阻害されない点で一致するが、至適 pH やリマ豆トリプシンインヒビターで阻害されない点で両者は異なる。

加水分解酵素 II ~ VI のうち、II, III は DDC 阻害ピーク I に、IV, V, VI は DDC 阻害ピーク II に含まれる (Fig. 1)。この両者阻害ピークに含まれるそれぞれの加水分解酵素は、Fig. 5-C に示されるように、リマ豆トリプシンインヒビターで異なる阻害パターンを示した。また Table 1 に BAPA を基質とした場合の性状をまとめたが、至適 pH, 大豆トリプシンインヒビターや CuCl_2 による阻害パターンの相違からも、DDC 阻害活性との関連性が明らかとなり、それぞれの阻害ピークに含まれる加水分解酵素の性状の相違が見出された。

TAME を基質とした場合の阻害剤の影響をみると、BAPA 基質の場合に同じ傾向を示した IV, V, VI (Fig. 5) のうち、IV は V, VI と異なっていた (Fig. 6 及び Fig. 9)。

以上のことから加水分解酵素 II, III は同一の酵素のアイソザイムと考えられ、Riekkinen らが精製分離したアルカリ性トリプシン様プロテアーゼ Salivain と、至適 pH, リマ豆トリプシンインヒ

ビターおよびオボムコイドで阻害されず、低濃度の Cu イオンでは阻害されない点⁶⁾で一致し、よく似たプロテアーゼと思われる。一方、IV, V, VI は従来のものとは全く別のプロテアーゼで、互いにアイソザイムと考えられる。

結 論

1. 成熟ラット顎下腺より等電点電気泳動法 (pH 3.5~10) により、7つのトリプシン様プロテアーゼを分離した。等電点はそれぞれ4.0(I), 4.3(II), 4.5(III), 5.1(IV), 5.5(V), 5.9(VI), および7.2(VII)であった。

2. これらのプロテアーゼの至適 pH は、すべてアルカリ性側にあった。

3. 等電点4.0(I)のプロテアーゼは、顎下腺カリクレインに似た性質を示したが、BAPA を水解するなど異なる点も多かった。

4. 等電点4.3および4.5(II, III)のプロテアーゼは、Salivain に類似し、互いにアイソザイムと考えられる。

5. 等電点5.1, 5.5および5.9 (IV, V, VI) のプロテアーゼは、従来報告されているものとは一致せず、新しいプロテアーゼと思われ互いに性質が類似することから、それぞれアイソザイムと考えられる。

6. 等電点7.2(VII)のプロテアーゼは、他の6つのプロテアーゼとは異なり、カゼインやアルギニンのアミドはほとんど水解しなかった。また、等電点4.0(I)のプロテアーゼと同様、ドーパ脱炭酸酵素阻害活性はなかった。

本研究は文部省科学研究費 (昭和56年度、課題番号 56770863) により行い、本論文の要旨は第54回日本生化学会 (仙台) において発表した。

抄録：ラット顎下腺中のドーパ脱炭酸酵素阻害物質は、トリプシン様プロテアーゼであることが報告された。このプロテアーゼが従来知られているいくつかのプロテアーゼと同じものか否かを検討した。顎下腺ホモジネートの凍結溶解を繰返し、その上清を等電点電気泳動により分離し、7つのプロテアーゼ活性画分 (等電点4.0, 4.3, 4.5, 5.1, 5.5, 5.9および7.2) を得た。各々について主にトリプシン阻害剤および金属イオンの影響を調べた。等電点4.0のものは、ラット顎下腺カリクレインに類似したが、BAPA を水解するなど異なる性質も有した。等電点4.3, 4.5のものは Salivain と考えられ、等電点5.1, 5.5, 5.9の3種は、従来報告されているものとは異なると考えられ互いに性質が類似することからアイソザイムと考えられる。等電点7.2のものは他のプロテアーゼとは異なる性質を有し、等電点4.0のものと同様、ドーパ脱炭酸酵素阻害性をもたなかった。

文 献

- 1) Sreebny, L. M., Meyer, J. and Bachem, E. : Characteristics of a proteolytic enzyme in the submaxillary and sublingual glands of the albino rat. *J. Dent. Res.*, **34** : 915-920, 1955.
- 2) Sreebny, L. M. : Studies of salivary gland proteases. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **85** : 182, 1960.
- 3) Riekkinen, P. J. and Hopsu-Havu, V. K. : Studies in the salivary glands II. Hydrolysis of chromogenic ester substrates. *Ann. Med. Exp. Fenn.*, **43** : 15-22, 1965.
- 4) Minato, A., Hirose, S. and Hayashi, S. : Studies on proteases in submaxillary gland I. Fractionation and general characteristics of rat submaxillary proteases. *Chem. Pharm. Bull.* **15** : 1356-1361, 1967.
- 5) Riekkinen, P. J. and Hopsu-Havu, V. K. : Studies in the salivary glands I. Trypsin-like enzymes. *Ann. Med. Exp. Fenn.*, **43** : 6-14, 1965.
- 6) Riekkinen, P. J., Ekfors, T. O. and Hopsu-Havu, V. K. : Purification and characteristics of an alkaline protease from rat submandibular gland. *Biochim. Biophys. Acta.*, **118** : 604-620, 1966.
- 7) Riekkinen, P. J., Ekfors, T. O., Hollmen, T. and Hopsu-Havu, V. K. : Purification and physical characteristics of a trypsin-like protease from the rat submandibular gland. *Enzymol.*, **32** : 97-109, 1967.
- 8) Riekkinen, P. J., Ekfors, T. O. and Hopsu-Havu, V. K. : Substrate specificity and modifier characteristics of an alkaline protease from the rat submandibular gland : Glandulain. *Enzymol.*, **32** : 110-127, 1967.
- 9) Hashimoto, S., Ikeno, T., Hasegawa, J., Nagatsu, T. and Kuzuya, H. : Endogenous inhibitors of dopa decarboxylase in the rat submandibular gland. *Archs. Oral Biol.*, **25** : 195-199, 1980.
- 10) 橋本誠一：ラット顎下腺中の内在性ドーパ脱炭酸酵素阻害物質の性状. *東北歯大誌*, **8** : 63-71, 1981.
- 11) Winter, A., Perlmutter, H. and Davies, H. : Preparative flat-bed electrofocusing in a granulated gel with the LKB 2117 Multiphor. Application Note 198 by LKB-Produkter AB, Stockholm, Sweden. 1975.
- 12) Lovenberg, W., Weissbach, H. and Udenfriend, S. : Aromatic L-amino acid decarboxylase. *J. Biol. Chem.*, **237** : 89-93, 1962.
- 13) Lamprecht, F. and Coyle, J. T. : Dopa decarboxylase in the developing rat brain. *Brain Res.*, **41** : 503-506, 1972.
- 14) Hummel, B. C. W. : A modified spectrophotometric determination of chymotrypsin, trypsin and thrombin. *Can. J. Biochem. Physiol.*, **37** : 1393-1399, 1959.
- 15) Bjerrum, O. J. : Quantitative Immunoelectrophoresis. *Scandinavian. J. Immunology. Supplement 2*, N. H. Axelsen, ed., Aas and W. ahl, Oslo, Norway, 82-83, 1975.
- 16) Hopsu-Havu, V. K., Riekkinen, P. J. and Ekfors, T. O. : Studies on the alkaline trypsin-like enzymes in rat submandibular gland and saliva. *Acta Odontol. Scand.*, **25** : 657-667, 1967.
- 17) Ekfors, T. O., Riekkinen, P. J., Malmiharju, T. and Hopsu-Havu, V. K. : Four isozymic forms of a peptidase resembling kallikrein purified from the rat submandibular gland. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **348** : 111-118, 1967.
- 18) Brandtzaeg, P., Gautvik, K. M., Nustad, K. and Pierce, J. V. : Rat submandibular gland kallikreins. Purification and cellular localization. *Br. J. Pharmacol.*, **56** : 155-167, 1976.
- 19) 鈴木友二：キニン系，血液凝固系のプロテアーゼ. *蛋白質・核酸・酵素*, **25** : 547-560, 1980.
- 20) Walsh, K. A. : Trypsinogen and trypsins of various species. *Methods of Enzymology.*, **19** : 41-63, 1970.