基質小胞プロテアーゼについて

長崎大学医学部整形外科

山田 健治・松本 智子

岩崎 勝郎

長崎大学歯学部口腔生化学

桂 暢彦

The Protease Associated with Matrix Vesicles

by

Kenji Yamada, Tomoko Matsumoto, Katsuro Iwasaki

Department of Orthopaedic Surgery Nagasaki
University School of Medicine

Nobuhiko Katsura

Department of Oral Biochemistry Nagasaki
University School of Dentistry

The activity of matrix vesicle specific protease is completely inhibited by o-phenanthroline and restored by Co or Zn ions. Purified matrix vesicle protease shows no reaction with anti-collagenase (CLSII) serum.

はじめに

基質小胞 (matrix vesicles) は, 1967 年, Anderson, Bonnucci らによって, 石灰化前線に見出されて以来, 石灰化の initiator site と考えられており, 坂田⁷⁾ は基質小胞プロテアーゼが石灰化基質の有機質胞部に関与していることを示した. 藤原⁸⁾ は基質小胞プロテアーゼを精製し, この性質を調べて, 金属プロテアーゼであることを示した. これらの研究では, 金属イオンの種類, 調製時に使用したコラゲナーゼに混在するプロテアーゼの混入の恐れはないことの確認が未解決である. 本研究はこれらの点を明らかにすることを目的とした.

方 法

1. 基質小胞の分離, 精製

仔牛又は8週令のニワトリの骨端軟骨から, Vaananen, Korhonen⁸⁾ ら及び藤原⁸⁾の方法により基質小胞を分離した. すなわち, Fig. 1 に示すごとく, 骨端軟骨をコラゲナーゼ (Worthington collagenase

Fig. 1 Isolation schema⁸⁾

Fig. 2 Gel filtration of matrix vesicles of Sepharose CL2B

CLS II) 0.2%を含む, 50 mM TES (N-tris (hydroxymethyl)-2-aminoethane sulfonic acid) buffer, 0.25 M sucrose, 0.1 mM CaCl_2 PH 7.4 で, 3 時間消化した後, 遠心分離によって基質小胞分画 F 4 を得た。

次に F 4 を Percoll 密度勾配遠心を行う代りに Sepharose CL2B (10×450 mm), elution buffer 0.2 M Tris-HCl PH 7.0 にてゲルろ過を行い V_0 に溶出した分画 (Fig. 2—A) を精製基質小胞分画とした。

2. 基質小胞プロテアーゼの分離

Sepharose CL2B 精製基質小胞分画を, 0.008%, sodium deoxycholate で 12 h 処理後, 凍結乾燥し, これを Sephadex G 150 (9×450 mm), elution buffer 0.2 M Tris-HCl pH 7.0 でゲルろ過を行い基質小胞プロテアーゼを分離した。

3. 蛋白, 酵素活性の測定

蛋白は, Lowry 法によって測定した。アルカリ性ホスファターゼ及び酸性ホスファターゼはそれぞれ, 0.05 M carbonate buffer pH 10.5, 及び 0.1 M citrate buffer pH 5.0 で p-nitrophenyl phosphate を基質として測定し, プロテアーゼ溶液単位体積当りの relative specific activity で示した。プロテアーゼ活性は, 2% azo casein を基質として, Tris-HCl pH 7.0 で 12 h incubation し, 終濃度 5

%に TCA を加えた後, 3,000 rpm 10 分遠心し, 上清を 0.5 M NaOH 中にて 450 nm の吸光度で示した。

4. 抗コラゲナーゼ血清の作製

成熟家兔にコラゲナーゼ (Worthington collagenase CLS II) と Freund's complete adjuvant を皮内に投与し, 1 週後に Freund's incomplete adjuvant とコラゲナーゼを投与, 更に 1 週後同様に投与し, その 1 週後にコラゲナーゼのみを与えて, 1 週後に採血, 遠心して抗血清を得た。

5. 抗原抗体反応

抗原抗体反応は, 二重免疫拡散法によって抗 CLS II 血清, 基質小胞, 基質小胞プロテアーゼとの間に行った。すなわち, 1%, agarose ゲル中にて, 48 h 反応後, 10%のアミドブラック 10 B にて染色し, 沈降線を観察した。

6. 金属イオンによるプロテアーゼ活性の回復

プロテアーゼが必要とする金属イオンの種類を調べた。0.5 mM o-phenanthroline にて, プロテアーゼ活性が完全に失活することを確認した後, 0.5 mM o-phenanthroline で 10 分間, preincubation して失活させたプロテアーゼに各種の金属イオンを 1 mM 加えて, プロテアーゼ活性の回復をみた。金属はすべて塩化物を使用した。

Fig. 3 Gel filtration of deoxycholate extracted and freeze dried protease on Sephadex G 150

結 果

F 4 を Sepharose CL2B でゲルろ過すると, Fig. 2 に示すごとく, プロテアーゼ活性は, A, B の 2 相性を示す. Al^{3+} が示すように基質小胞にはアルカリ性ホスファターゼが多く含まれており, V_0 に溶出されたアルカリ性ホスファターゼの多い A 分画が, 基質小胞分画である. B の分画のプロテアーゼ活性はコラゲナーゼ由来のものである. これは, 抗コラゲナーゼ血清の反応で確認した.

次に A の分画を 0.008 % deoxycholate で処理し, 凍結乾燥したものを Sephadex G 150 でゲルろ過すると Fig. 3 に示すごとく, プロテアーゼ活性の 88 % が $K_{av}=0.6$ 付近に溶出された. 0.008 % deoxycholate のみの処理では, 26 % しか溶出されなかった. 又, 0.3 % の deoxycholate でも 60 % が溶出される.

抗コラゲナーゼ血清との反応は, Fig. 4 に示すごとく, コラゲナーゼとのみ沈降線を認め, 精製基質小胞, Sephadex G 150 処理の基質小胞プロテアーゼとの間には沈降線を認めていない. 上記の方法によって精製した基質小胞プロテアーゼには, 使用したコラゲ

A: anti CLSII serum B: collagenase(CLSII)
C: matrix vesicle D: matrix vesicle protease

Fig. 4 Immunodiffusion reactivity

ナーゼに含まれるプロテアーゼは混入していないことを確認した.

キレート剤によって失活させた基質小胞プロテアーゼの金属イオンによる活性回復は, Table 1 に示すように, コントロールのプロテアーゼ活性を 100 % として示した. プロテアーゼ活性は, 0.5 mM の EDTA,

Table 1 Effect of metal ions

Substance added	Final concentration (mM)	Relative activity (%)
None	—	100
o-phenanthroline	0.5	0
EDTA	0.5	0
o-phenanthroline and	0.5	
CoCl ₂	1.0	64
ZnCl ₂	1.0	52
CaCl ₂	1.0	0
MgCl ₂	1.0	0
LaCl ₃	1.0	0
FeCl ₂	1.0	31
FeCl ₃	1.0	0
MnCl ₂	1.0	43
CuCl ₂	1.0	25

o-phenanthroline にて 100 % 失活する。これらに各種金属イオンを加えると, Co, Zn イオンで約 60 % 回復する。又, 2 価 Fe, Mn, Cu イオンでも多少の回復がみられる。リンタンパクと最も親和性の高いとされる La³⁺ や, Ca, Mg では回復はみられなかった。

考 察

基質小胞には, 特有のプロテアーゼが存在し, これはコラゲナーゼ由来でないことを, 抗原抗体反応にて確めた。小胞内での局在については, 藤原⁴⁾ は deoxycholate 0.008 % で活性最大となると述べており, 膜に存在するのではないかと述べている。Hirschman⁵⁾ らは sucrose の不連続性密度勾配遠心で基質小胞を精製し, プロテアーゼ活性を調べ, deoxycholate 0.02 % でプロテアーゼの 1.2 %, 0.5 % で約 90 % のプロテアーゼが溶出されると述べている, 本研究では, 0.008 % deoxycholate で 26 % 0.3 % では 60 % であったが, 0.008 % deoxycholate 処理後, 凍結乾燥したものは, 約 90 % のプロテアーゼが溶出された。これはプロテアーゼ活性が膜に結合しているというよりは, 小胞液に存在しているのではないかと考えられる。

又, 金属の種類については, 藤原⁴⁾ は金属プロテアーゼであることを示したが, 金属については言及していない, Ehrlich²⁾ らは, 骨端軟骨から, neutral protease を抽出し, proteoglycan を分解することを示し, MgCl₂, CaCl₂ 10mM でこの活性が増すことを報告しているが, このプロテアーゼが基質小胞由来かど

うかは不明である。一方, Morales⁶⁾ らは軟骨細胞を培養して, この medium から, neutral protease を抽出し, これは, latent form で aminophenyl mercuric acetate で活性化され, o-phenanthroline で失活し, CaCl₂ 存在下で, Co 又は Zn イオンで再活性化すると述べている。これも基質小胞に由来するか否かは不明であやが, 金属の種類は同様である。本実験では Ca イオンの存在は無関係であった。

坂田⁷⁾ は proteoglycan はハイドロキシパタイトの結晶の生長を阻害し, 基質小胞によってその阻害作用が消失することを示している。基質小胞が小胞内にプロテアーゼを持ち, 小胞内のアパタイト結晶核が生長すると, 小胞膜が破れ, プロテアーゼを放出すると考えるならば, アパタイト結晶の生長, 増殖を迎えていたプロテオグリカンなどの非コラーゲン性タンパクが分解され, 石灰化前線において有機質の脱却が起こることを合理的に説明できる。

ま と め

1. 基質小胞には特有のプロテアーゼが存在する。
2. 基質小胞プロテアーゼは, 金属プロテアーゼであって活性の発現には, Co 又は Zn イオンが必要である。
3. 精製した基質小胞プロテアーゼには, 調製時に使用したコラゲナーゼに由来するプロテアーゼの混入はない。

文 献

- 1) Ali, S. Y., Sajdera, S. W. and Anderson, H. C.: Isolation and characterization of calcifying matrix vesicles from epiphyseal cartilage. Proc. Nat. Acad. Sci. 67: 1513-1520, 1970.
- 2) Ehrlich, M. G., Armstrong, A. L. et al.: Patterns of proteoglycan degradation by a neutral protease from human growth plate epiphyseal cartilage. J. Bone & Joint Surg. 64-A: 1350-1354, 1982.
- 3) 藤沢隆一, 佐々木 哲: 歯の高リン酸化 Ca-結合蛋白—ホスホリン—, 蛋白質核酸酵素別冊 26: 333-344, 1983.
- 4) 藤原敏勝: 石灰化機構の研究。基質小胞のプロテアーゼについて, 歯基礎誌, 24: 393-405, 1982.
- 5) Hirschman, A., Dentsch, D. et al.: Neutral peptidase activities in matrix vesicles

- from bovine fetal alveolar bone and dog sarcoma. *Calcif. Tissue Int.* 35: 791-797, 1983.
- 6) Morales, T. I. and Kuettner, K. E.: The properties of the neutral proteinase released by primary chondrocyte cultures and its action on proteoglycan aggregate. *Biochi. Biophys. Acta.* 705: 92-101, 1982.
- 7) 坂田道昭: 石灰化機構の研究. 基質小胞によるプロテオグリカンの分解. 歯基礎誌, 22: 649-660, 1980.
- 8) Väänänen, H. K. and Korhonen, L. K.: Matrix vesicles in chicken epiphyseal cartilage. Separation from lysosomes and the distribution of inorganic pyrophosphatase activity. *Calcif. Tissue Int.* 28: 65-72, 1979.

質問・発言

熊本大学 石川浩一郎

Matrix Vesicles 内に Co と Zn を含有するマトロプロテアーゼがあると理解してよいでしょうか? 採取された Matrix Vesicles 全てにこのようなマトロプロテアーゼがあるのでしょうか? 石灰化に關与するもののみにあるのでしょうか?

解答

長崎大学 山田 健治

1. プロテアーゼの基質小胞内の局在については、膜に存在するという文献もみられるが、高濃度の界面活性剤 (例えば deoxycholate 0.5 % や、凍結乾燥で膜がこわれると、プロテアーゼの大部分が溶出され、小胞内に存在するのではないかと推察される。