

牛歯肉からの3種のコラゲナーゼ・インヒビターの分離とそれ等の性質について

安達 義雄 野原 広美

新潟大学歯学部生化学教室

(主任：野原広美教授)

(昭和62年11月6日受付)

Separation and characterization of three forms
of collagenase inhibitor from bovine gingiva

Yoshio ADACHI, Hiroyoshi NOHARA

Department of biochemistry, School of Dentistry,

Niigata University

要 旨

私達は、約100 gの牛歯肉から直接歯肉抽出液を得、CM-Sephadex, Con-A Sepharose, Sephadex, Heparin-Sepharoseの各カラム・クロマトグラフィーを使って3種のコラゲナーゼ・インヒビターを分画することが出来た。1つは、Con-A Sepharoseに吸着し2% MDGPで溶出される分子量約38,000の糖タンパク質である〔 α Con-A(+)]。このインヒビターは、リューマチ・コラゲナーゼ活性のみを抑える。他の2つは、Con-A Sepharoseに吸着せず分子量が各々約50,000と21,500である。前者は人のリューマチ・コラゲナーゼのみならず、セリン・プロテアーゼのトリプシン、金属プロテアーゼのサーモリシンの活性もまた抑制した〔 α Con-A(-)]。後者はリューマチ・コラゲナーゼの外に、弱いながらサーモリシンにもインヒビターとしての活性を示した〔 β]。しかし、これら3つのコラゲナーゼ・インヒビターは、バクテリア・コラゲナーゼに対してはインヒビター活性を示さなかった。又、熱(60°C, 30分と90°C, 30分)に対しても3種のインヒビターは安定であった。しかし、

還元(5mM DTT)後のアルキル化(20mM MIA)によって、いずれのインヒビターもコラゲナーゼに対するインヒビター活性を失った。

序 論

コラゲナーゼは、細胞外マトリックスに於けるコラーゲンの生理的交換あるいは病的分解に重要な働きをしていると考えられている。細胞外コラゲナーゼの活性調節には種々の方法がある¹⁾。この中、特に重要なものは特異的インヒビターの作用である²⁾。過去10年間に、多くの天然のコラゲナーゼ・インヒビターが精製されその特徴が調べられている。これらのインヒビターは3つに分類される。第1のクラスとしては、分子量2~3万の糖タンパク質があげられる^{3)~8)}。これらは主として、組織ないしは細胞の培養液から単離されている。第2のクラスとしては、組織から部分精製された分子量1万前後の塩基性タンパク質のインヒビターが有る^{9)~10)}。第3のクラスは、血清インヒビター： α_2 -マクログロブリン^{11)~12)}と β_1 -アンチコラゲナーゼ⁶⁾¹³⁾からなる。

歯肉の培養組織あるいは培養細胞がコラゲナー

ゼ・インヒビターを合成するという報告がある^{14~17)}。しかし、これらは精製度が低くその性質もよく検討されていない。私達は、大量の歯肉組織からコラゲナーゼ・インヒビター活性の分画精製を行ない3種のインヒビター分画を得、それ等の特徴を明らかにしたので報告する。

材料と方法

1. 試薬

Trypsin (Type I, bovine Pancreas), Trypsin inhibitor (Type I-S, Soybean), Thermolysin (Type X, B. thermoproteolyticus), Collagenase (Type III, C. histolyticum) 及び Serum Albumin (bovine) は Sigma, Casein は Merck, [¹⁴C] formaldehyde (10 Ci/mol) は New England Nucler, [¹⁴C] acetic anhydride は the Radiochemical Center Amersham, Monoiodoacetic acid は和光純薬K.K., CM-Sephadex (C-50), Con A-Sepharose, Sephadex G-75 と G-150 及び heparin-Sepharose CL-6B は Pharmacia から購入した。又、他のすべての化学薬品は、高純度のものを使用した。リウマチ患者の関節滑液は、Dr. Kanbara (Niigata cancer hospital) より頂戴した。

2. 牛歯肉抽出液の調整

生理食塩水で十分洗浄した牛歯肉(食肉衛生検査センターから得られた)は、先ず液体窒素下で凍結磨細し、更に2倍重量の海砂と共に0.2M NaClを含む Buffer A (0.05 M Tris-HCl buffer, pH 7.6/0.01 M CaCl₂ /0.05% Brij 35 /0.02% sodium azide) を適量添加し、乳鉢中で十分に磨細した。磨細後5倍量の Buffer A を加え、4℃の低温室で22時間振盪しながら抽出を行なった。抽出液の10,000×g, 20分間の遠心により得られた上清は、50%酢酸でpH 5.0に調整され、NaClを10%になるように添加後1時間放置された。放置後、コラーゲンなどの沈殿を10,000×g, 20分間の遠心で除いた。その上清を0.05% Brij 35を含む0.03M acetate buffer (pH 5.4) に透析した。十分透析後、遠心(10,000×g, 20min.)し、その上清を crude extract とした。

3. コラゲナーゼ・インヒビターの精製

crude extract (タンパク質1,562mg) は0.05% Brij 35 を含む0.03 M acetate buffer で平衡化した CM-Sephadex column (3.7×45cm) にかけて、分画した。上述の acetate buffer と 0.1 M NaCl を含む acetate buffer で洗浄後、0.1~0.5 M NaCl を含む acetate buffer でグラディエント溶出した。得られた2つの活性ピークのうち、先に溶出された活性ピークをα、後からの活性ピークをβと命名した。続いて別々にα及びβ分画を0.2 M NaClを含むBuffer Aに透析してから、同じBufferで平衡化した Con-A Sepharose column で分画した。α活性は、Con-A に吸着する分画〔α Con-A(+)] と非吸着分画〔α Con-A(-)] に現われた。β活性は、非吸着分画にのみ現われた。次にこれらの3分画を 0.2 M NaCl を含む Buffer A で平衡化した Sephadex column で更に精製した。2つのα分画には G-150, β分画には G-75を用いた。得られた各活性分画を、Buffer B (0.05 M Tris-HCl buffer, pH 7.2/0.05% Brij 35/0.02% sodium azide) で平衡化した Heparin-Sepharose column によって更に精製した。溶出は Buffer B を含む0~0.6 M NaCl のグラディエントで行なった。得られた各活性ピークを各々の最終標品として以下の実験に用いた。

4. コラゲナーゼ・インヒビターの活性測定

コラゲナーゼ・インヒビター活性は、一定量のコラゲナーゼに各インヒビターを適量添加して測定した。基質コラーゲンは、Yanagimura 等(1983)¹⁸⁾により述べられたようにラットの皮膚から精製し、[¹⁴C]無水酢酸でアセチル化した。[¹⁴C]コラーゲンの比活性は、 3.1×10^5 cpm/mg protein であった。関節滑液コラゲナーゼは、ヒアルロニダーゼ処理¹⁹⁾とアミコンのダイアフロー膜 XM 100A による超濾過、更に Sephadex G-150によるゲル濾過によって精製した。比活性は、2 unit/mg であった。コラゲナーゼの1 unit は、25℃、1分間にコラーゲン1μgを分解する。インヒビター存在下でのコラゲナーゼ活性測定は、基質として[¹⁴C]-アセチル化コラーゲンをを用い可溶性条件下で保温し、反応産物を50% dioxaneで分離

する Terato 等(1976)²⁰⁾の方法を若干改変して行なった。反応液は、0.2ml中に0.05 M Tris-HCl (pH 7.6), 0.2 M NaCl, 0.01 M CaCl₂, 0.05% Brij 35, 0.02% Na-azide, 0.5 M glucose, 46.6μgの [¹⁴C] - コラーゲン, 0.02 unit のコラーゲナーゼ及び適量のインヒビターを含む。反応条件は25°C, 18時間であった。インヒビターの1 unit は、この反応条件下でコラーゲナーゼ活性を50%阻害する量である。

5. トリプシン, サーマリシンに対するコラーゲナーゼ・インヒビターの阻害活性測定

基質としてのカゼインを, Rice & Means(1971)の方法²¹⁾によって, [¹⁴C] formaldehyde でラベルした。比活性は, 6.38×10^6 cpm/mg protein であった。反応液は, 0.1ml中, 0.2 M NaClを含む Buffer A, 3.9μgの [¹⁴C]カゼイン, 0.1μgのトリプシンあるいは0.01μgのサーモリシン及びインヒビター標品を含む。反応は, 基質無添加で35°C, 60分間保温後, 基質を添加し, 更に20分間保温して行なった。反応後, 20%トリクロロ酢酸の等量を加え0°Cに10分間放置後, 10,000×gで10分遠心した。その上清を, 液体シンチレーションカウンターで測定した。

6. コラーゲナーゼ・インヒビターのアルキル化によるインヒビター活性の測定

インヒビター標品は, 5 mM DTT と0.2 M NaCl を含む Buffer A 中で20°C, 2時間処理された。反応後, モノヨウド酢酸を20mM になるように添加し, 更に20°Cで2時間保温した⁸⁾。2時間後コラーゲナーゼ・インヒビター活性を測定した。

7. タンパク質の測定

カラム・クロマトグラフィー溶出液中のタンパク質は A_{280 nm} の測定によってモニターされた。精製過程の各段階でのタンパク質濃度は Lowly 等(1951)の方法²²⁾によって決定した。

結 果

1. コラーゲナーゼ・インヒビターの部分精製

コラーゲナーゼ・インヒビターは, 牛の歯肉から0.2 M NaCl (pH 7.6) での抽出, 2 M NaCl

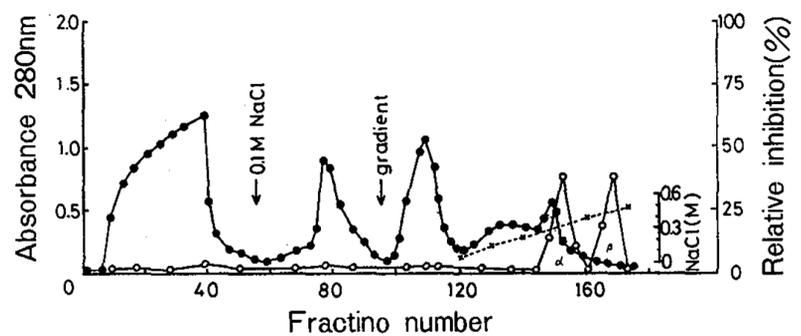


Fig.1 粗抽出液のCM-Sephadexクロマトグラフィー

Crude extract (1562mg) を, 0.05% Brij 35を含む30mM acetate buffer (pH 5.4) で平衡化した CM-Sephadex カラム (3.7×45cm) にかけた。カラムを同じ buffer で洗ってから, 吸着したタンパク質を0.1 M NaCl を含む同じ buffer で溶出し, 更に, 同上 buffer を含む0.1~0.5 M NaCl のグラディエントで溶出した。溶出液 (19ml/tube) の一部を, タンパク質量とインヒビター活性測定に用いた。●-●, A_{280nm}; ○-○, 阻害活性(%); x-----x, NaCl濃度

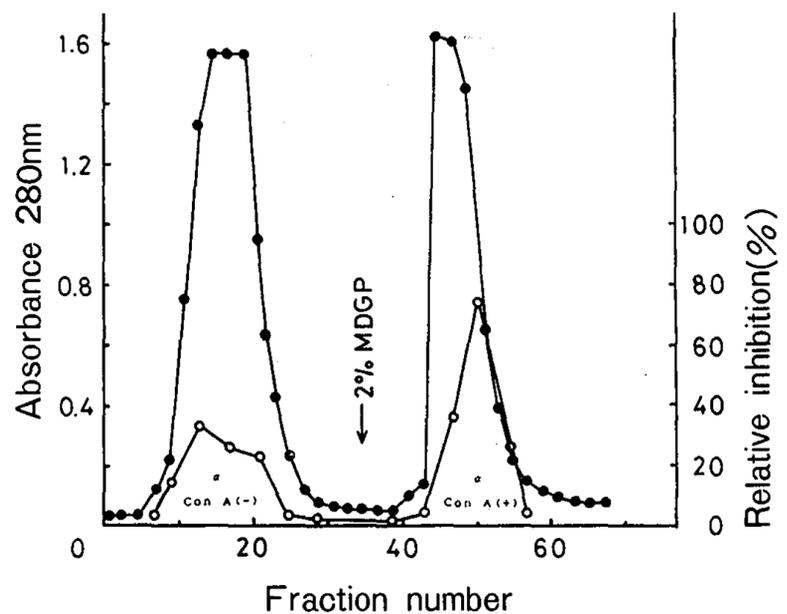


Fig.2 コラーゲナーゼ・インヒビターα分画のCon A-Sepharoseクロマトグラフィー

CM-Sephadex クロマトグラフィーからのインヒビター活性の第1ピークα (143mg) を, 0.2 M NaCl を含む buffer A で平衡化した Con A-Sepharose カラム (1.5×18cm) にかけた。同じ buffer で十分洗浄後, 吸着タンパク質は2% 1-methyl-α-D-glucopyranoside を含む buffer A で溶出した。溶出液 (2.7ml/tube) の一部を, タンパク質量とインヒビター活性測定に用いた。●-●, A_{280nm}; ○-○, 阻害活性(%)

(pH 5.0) と acetate buffer (pH 5.4) での沈殿法, そして更に各種クロマトグラフィー法を使って精製した。2 M NaCl (pH 5.0) を使っての沈殿法は, 次からのクロマトグラフィーを妨害するコラーゲンを除くのに効果的であった。crude

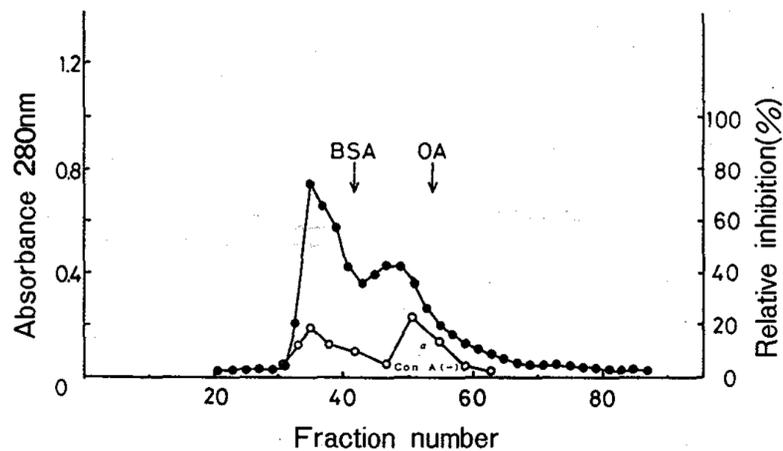


Fig.3 コラゲナーゼ・インヒビター α -Con A(-)分画のSephadex G-150クロマトグラフィー

Con A-Sepharose クロマトグラフィー (Fig.2) からのインヒビター分画 α -Con A(-) (77mg) を, 0.2 M NaCl を含む buffer A で平衡化した Sephadex G-150カラム (1.9 \times 103cm) にかけて。タンパク質は, カラムから同じ buffer で溶出した。溶出液 (3.4ml/tube) の一部を, タンパク質量とインヒビター活性測定に用いた。●—●, A_{280nm} ; ○—○, 阻害活性(%); BSA, bovine serum albumin; OA, ovalubumin

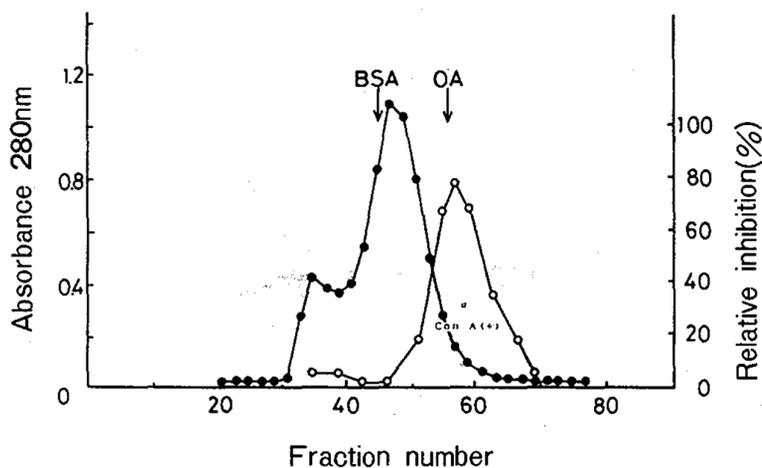


Fig.4 コラゲナーゼ・インヒビター α -Con A(+)分画のSephadex G-150クロマトグラフィー

Con A-Sepharose クロマトグラフィー (Fig.2) からのインヒビター分画 α -Con A (+) (32mg) を, 0.2 M NaCl を含む buffer A で平衡化した Sephadex G-150カラム (1.9 \times 104cm) にかけて。タンパク質は同じ buffer で溶出し, 溶出液 (3.5ml/tube) の一部を, タンパク質量とインヒビター活性測定に用いた。●—●, A_{280nm} ; ○—○, 阻害活性(%); BSA, bovine serum albumin; OA, ovalubumin

extract の最初の CM-Sephadex クロマトグラフィーにおいて, 2つの活性ピークが現われた。1つは約0.3 M NaCl で(α 分画), もう1つは約0.43 M NaCl で (β 分画) 溶出された (Fig.1)。 α 分画は, Con-A Sepharose カラム・クロマトグラフィーにより吸着しない活性分画 [α Con-A(-)] と,

吸着し 2% 1-Methy- α -D-Glucopyranoside で溶出され糖をもっていると思われる活性分画 [α Con-A(+)] に分かれた (Fig.2)。後者は, 細胞培養液から通常抽出されるインヒビターに相当するものと思われる。更に, α -Con-A (-) 分画と α -Con-A (+) 分画を別々に Sephadex G-150でゲル濾過を行なうと, 前者の活性は ovalbumin より前に溶出され分子量約50,000 (Fig.3), 後者のそれは ovalbumin より後ろに溶出され分子量約38,000 (Fig.4) と推定された。続いて, 各々の活性は, Heparin-Sepharose クロマトグラフィーで精製された。 α Con-A(-)分画のクロマトグラフィーでは3つの活性ピークが現われたが, 0.2 M NaCl付近で溶出されてくる分画が全活性及び比活性とも最も高いので, この部分を最終の α Con-A (-) インヒビター分画とした (Fig.5)。 α Con-A (+)分画のクロマトグラフィーでは, 0.33 M NaCl付近に溶出されたインヒビター活性を最終標品とした (Fig.6)。一方, CM-Sephadex で分離された β 分画も同様, 先ず Con-A Sepharose column で分画した。活性は Con-A Sepharose に吸着した部分には見出されず, 非吸着部分に現われた (Fig.7)。従って, この β も α Con-A (-) 同様に糖鎖をもっていない可能性が強い。続いて, Sephadex G-75カラム・クロマトグラフィーで分画すると, soybean trypsin inhibitor とほぼ同位置に溶出され (Fig.8), 分子量は約21,500前後と推定された。更に, Heparin-Sepharose カラム・クロマトグラフィー (Fig.9) を行なったところ, インヒビター活性は0.4 M NaCl 付近で溶出され, この部分をインヒビター β の最終標品とした。各インヒビターの精製段階のタンパク質量, 全インヒビター活性, 比活性は Table 1 に示してある。尚, 全抽出液中の α と β の活性比は35対65で, α Con-A(-)と α Con-A(+))のそれは42対58であった (Table 1)。

2. インヒビターの温度耐性

25 $^{\circ}$ C, 30分処理した各インヒビター標品のリユーマチ・コラゲナーゼに対する阻害活性を対照として, 60 $^{\circ}$ C, 30分と90 $^{\circ}$ C, 30分での阻害効果を調べた。その結果, 3つのインヒビターとも対照と同程度の阻害活性を現わし, 熱に対しては安定で

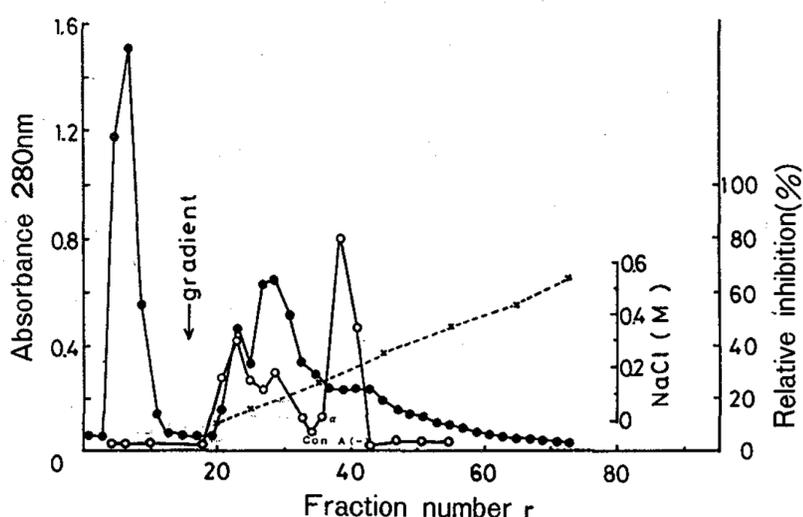


Fig.5 コラゲナーゼ・インヒビター α -Con A(-) Sephadex G-150分画の Heparin-Sepharose クロマトグラフィー

Sephadex G-150 クロマトグラフィー (Fig.3) からのインヒビター分画 α -Con A (-) (25mg) を, buffer B で平衡化した Heparin-Sepharose カラム (0.7×8 cm) にかけた。同じ buffer で洗浄後, 吸着したタンパク質は buffer B を含む 0~0.6 M NaCl のグラディエントで溶出した。溶出液 (0.8ml/tube) の一部を, タンパク質量とインヒビター活性測定に用いた。●—●, A_{280nm} ; ○—○, 阻害活性(%); ×-----×, NaCl濃度

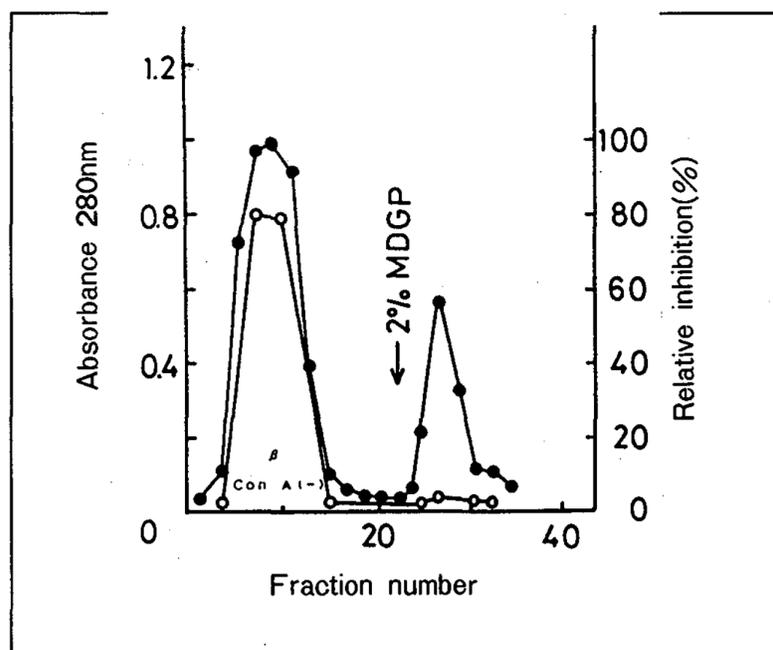


Fig.7 コラゲナーゼ・インヒビター β 分画の Con-A Sepharose クロマトグラフィー

CM-Sephadex クロマトグラフィー (Fig.1) からのインヒビター分画 β (31mg) を, 0.2 M NaCl を含む buffer A で平衡化した Con-A Sepharose カラム (1.0×8.5cm) にかけた。同じ buffer で洗浄後, 吸着したタンパク質を 2% 1-methyl- α -D-glucopyranoside を含む buffer A で溶出した。溶出液 (1.7ml/tube) の一部を, タンパク質量と阻害活性測定に用いた。●—●, A_{280nm} ; ○—○, 阻害活性(%)

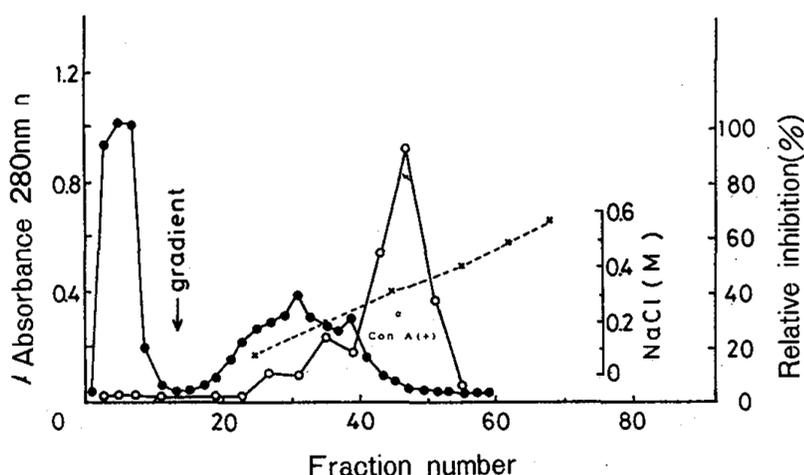


Fig.6 コラゲナーゼ・インヒビター α -Con A(+) Sephadex G-150分画の Heparin-Sepharose クロマトグラフィー

Sephadex G-150 クロマトグラフィー (Fig.4) からのインヒビター分画 α -Con A (+) (3.6mg) を, buffer B で平衡化した Heparin-Sepharose カラム (0.5×3.7cm) にかけた。同じ buffer で洗浄後, 吸着したタンパク質は buffer B を含む 0~0.6 M NaCl のグラディエントで溶出した。溶出液 (0.3ml/tube) の一部を, タンパク質量とインヒビター活性測定に用いた。●—●, A_{280nm} ; ○—○, 阻害活性(%); ×-----×, NaCl濃度

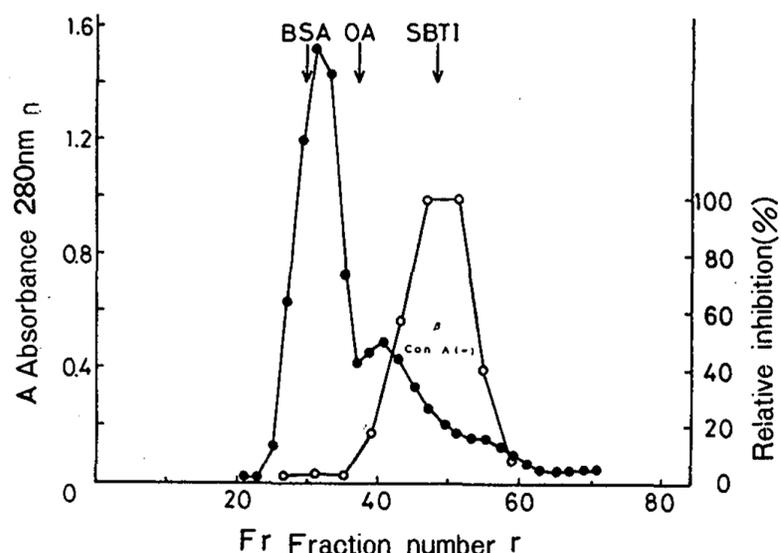


Fig.8 コラゲナーゼ・インヒビター β -Con A(-) 分画の Sephadex G-75クロマトグラフィー

Con A-Sepharose クロマトグラフィー (Fig.7) からのインヒビター分画 β -Con A (-) (20mg) を, 0.2 M NaCl を含む buffer A で平衡化した Sephadex G-75カラム (0.95×71) にかけた。タンパク質は, 同じ buffer で溶出した。溶出液 (0.74ml/tube) の一部を, タンパク質量とインヒビター活性測定に用いた。●—●, A_{280nm} ; ○—○, 阻害活性(%) ; BSA, bovine serum albumin ; OA, ovalbumin ; SBTI, soybean trypsin inhibitor

あることを示した(Fig.10)。

3. インヒビターのアルキル化の影響

各インヒビター標品を 5 mM ディチオスレイトールで還元後, 続いて 20 mM モノヨウド酢酸でア

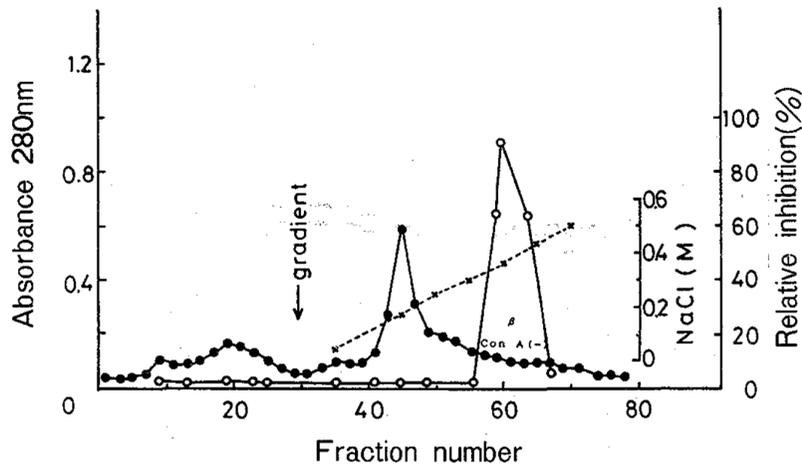


Fig.9 コラゲナーゼ・インヒビターβ-Con A (-) 分画の Heparin-Sepharose クロマトグラフィー

Sephadex G-75クロマトグラフィー (Fig.8) からのインヒビター分画β-Con A (-) (6.4mg) を buffer B で平衡化した Heparin-Sepharose カラム (0.5×3.5cm) にかけた。同じ buffer で洗浄後、吸着したタンパク質は buffer B を含む 0 ~ 0.6 M NaCl のグラディエントで溶出した。溶出液 (0.3ml) の一部を、タンパク質量とインヒビター活性測定に用いた。●—●, A_{280nm}; ○—○, 阻害活性(%); ×-----×, NaCl 濃度

Table 1 コラゲナーゼ・インヒビターの精製

	Protein (mg)	Total activity (units)	Specific Activity (Units/mg)
Crude extract	1562	—	—
CM-Sephadex			
α	143	1116	7.8
β	31	2067	66.7
ConA-Sepharose			
α-ConA (-)	77	289	3.8
α-ConA (+)	32	392	12.3
β-ConA (-)	20	1547	77.4
Sephadex G-150			
α-ConA (-)	25	92	3.7
α-ConA (+)	3.6	209	58.1
Sephadex G-75			
β-ConA (-)	6.4	1067	166.7
Heparin-Sepharose			
α-ConA (-)	6.82	27	32.9
α-ConA (+)	0.055	71	1290.9
β-ConA (-)	0.37	638	1724.3

コラゲナーゼ・インヒビターは、100g の牛歯肉から “材料と方法” に述べたように精製した。

ルキル化し、インヒビターのリューマチ・コラゲナーゼに対する抑制効果を調べた。Fig.11 に見られるように、各インヒビター共に抑制効果を失ったことが分かる。

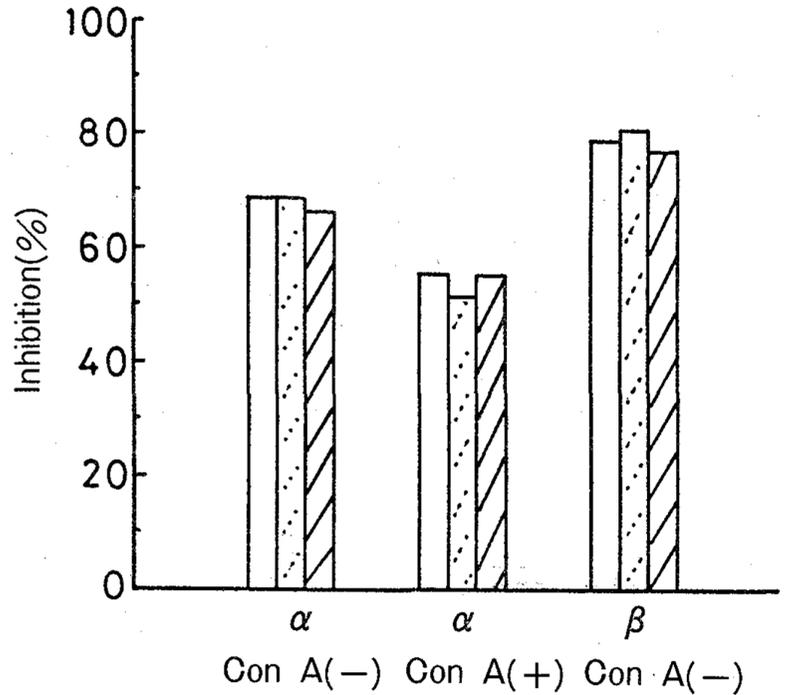


Fig.10 コラゲナーゼ・インヒビター標品の温度耐性

Heparin-Sepharose 分画からの3種のインヒビター標品：α-Con A (-)の1.36units, α-Con A (+)の1.1 units, βの1.56units を、0.2 M NaCl を含む buffer A にそれぞれに加え、30 分間指定の温度で処理した。このあと “材料と方法” に示したように、コラゲナーゼ・インヒビター活性を測定した。

□, 25°C; ▨, 60°C; ▩, 90°C

Table 2 バクテリア・コラゲナーゼに対するコラゲナーゼ・インヒビター標品の阻害効果

Collagenase inhibitor	cpm of collagen digested		Inhibition (%)
	without inhibitor	with inhibitor	
α Con A(-)	7113	6473	9
α Con A(+)	7113	6404	10
β Con A(-)	7314	6949	5

バクテリア・コラゲナーゼ (0.02μg) に、3種のコラゲナーゼ・インヒビターの Heparin-Sepharose 分画 (1.43units) を別々に添加し、“材料と方法” にあるように阻害活性を測定した。

4. インヒビターの各種プロテアーゼに対する阻害効果

各インヒビター標品のバクテリア・コラゲナーゼ、トリプシン、サーモリシンに対する阻害効果

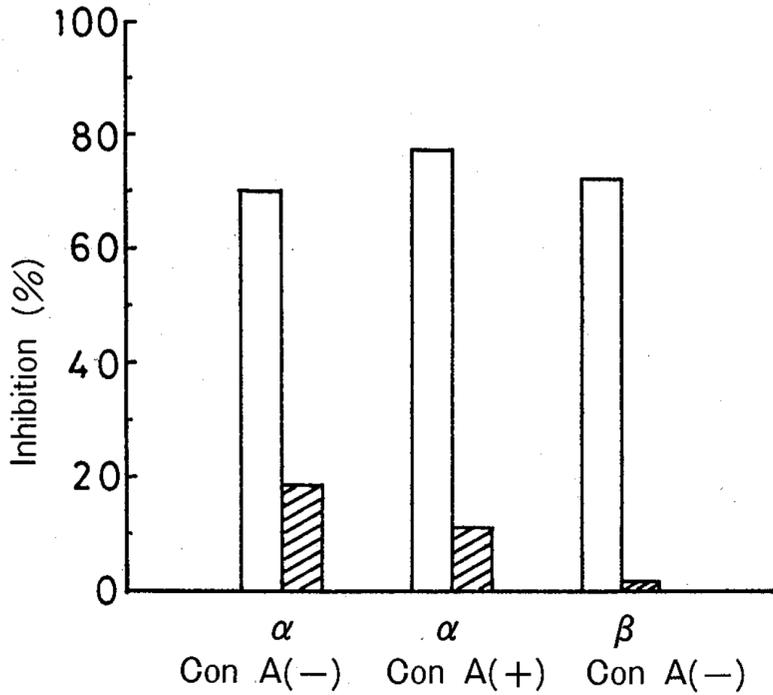


Fig. 11 コラゲナーゼ・インヒビター標品のアルキル化の影響

Heparin-Sepharose 分画からの3種類のインヒビター標品: α-Con A (-)の1.4units, α-Con A (+)の1.54units, βの1.4units のそれぞれを“材料と方法”に示したようにアルキル化した後, それらのコラゲナーゼ・インヒビター活性を測定した。

□, 非アルキル化; ▨, アルキル化

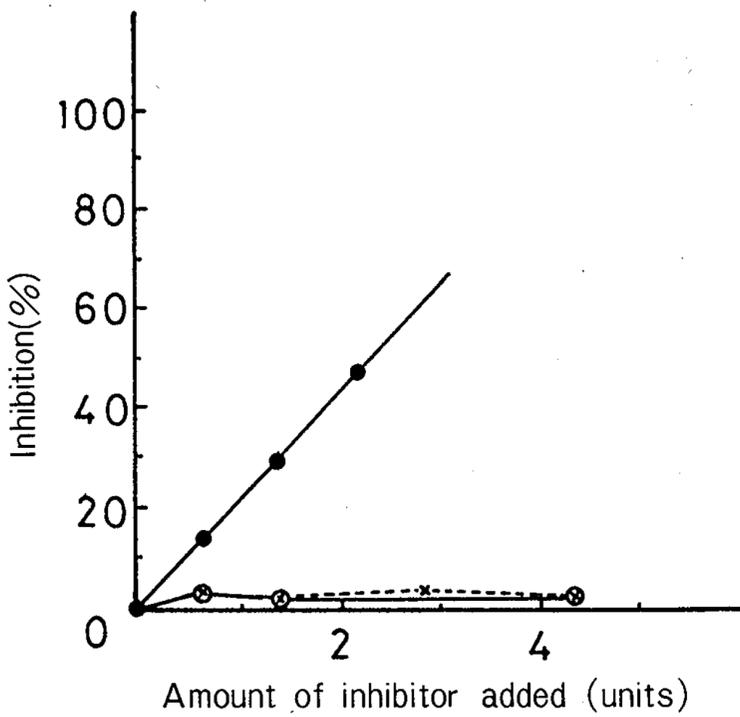


Fig. 12 トリプシンに対するコラゲナーゼ・インヒビター標品の阻害効果

3種コラゲナーゼ・インヒビターとして, Heparin-Sepharose 分画を表中の指定量使用した。トリプシン標品は0.1μg用いた。実験条件等は“材料と方法”参照。●—●, α-Con A(-); ○—○, β; ×-----×, α-Con A(+)

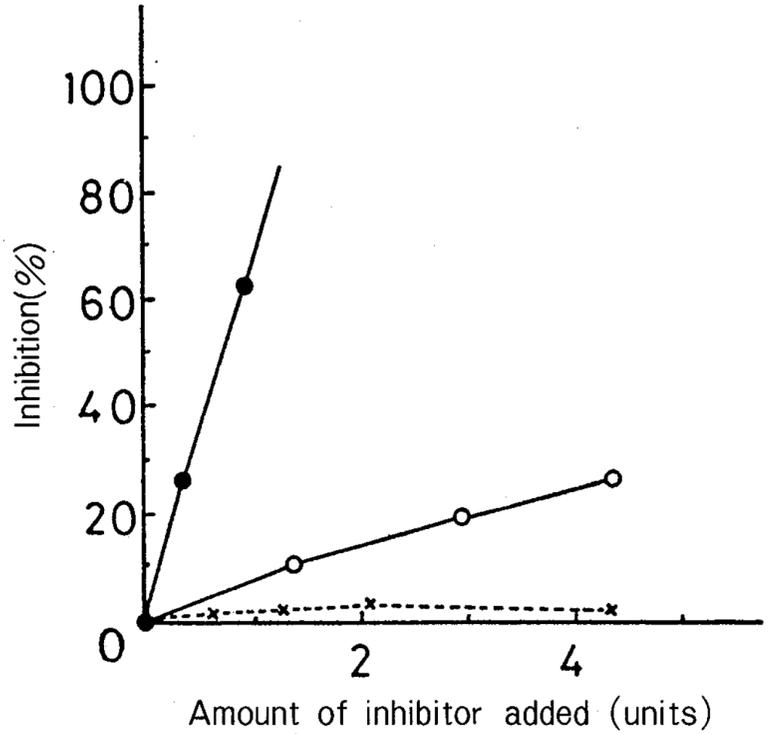


Fig. 13 サーマリシンに対するコラゲナーゼ・インヒビター標品の阻害効果

3種のコラゲナーゼ・インヒビターとして, Heparin-Sepharose 分画を表中の指定量使用した。サーモリシン標品は0.01 μg用いた。実験条件等は“材料と方法”参照。●—●, α-Con A(-); ○—○, β; ×-----×, α-Con A(+)

を調べた。その結果, いずれのインヒビターもバクテリア・コラゲナーゼに対しては, 阻害効果を示さなかった (Table.2)。インヒビター α-Con-A (+)は, セリン・プロテアーゼのトリプシン, 金属プロテアーゼのサーモリシンの両者に対しても阻害効果を示さなかった。ところが, インヒビター α-Con-A (-)は, リューマチ・コラゲナーゼは勿論のことトリプシン及びサーモリシンに対しても阻害効果を示した (Fig.12,13)。一方, βは, α-Con-A(-)より弱いけれど, サーマリシンに対しては阻害効果を示した (Fig.13)。

考 察

本研究では, 歯肉からのコラゲナーゼ・インヒビターを, 歯肉抽出液の 2 M NaCl (pH5.0) での処理と 30mM acetate buffer (pH 5.4) での透析, 更に, 得られた抽出液の CM-Sephadex, Con-A Spharose, Sephadex, Heparin-Sepharose 等の各種クロマトグラフィーによって精製した。クロマトグラフィーの中では, CM-SephadexとHeparin-Sepharoseが特に効果的であった。但し, イン

ヒビター： α Con-A(-)は、比活性の低いことからみて別の精製法を試みる必要があると思われる (Table.1)。他の2つのインヒビターでは、更に DE-Cellulose と2回目の Heparin-Sepharose クロマトグラフィーを行なうことにより、大略単一とすることが出来る。

ゲル濾過の結果 (Fig.3,4,8) から各インヒビターの分子量は、 α Con-A(-)が50,000, α Con-A(+)が38,000, β は21,500と計算された。 α Con-A(+)は糖を持ち、その分子量から見て牛の歯髄から得られた Kishi 等 (1984)²³⁾ のインヒビター標品 (M W: 36,000) に相当するものかもしれない。 α Con-A(-)は、分子量50,000と一般に見出されるコラゲナーゼ・インヒビターに比べてより大きい。普通、体液及び培養液に見出されるコラゲナーゼ・インヒビターは、 β のように分子量20,000~30,000のものが多く、又、それ等の多くは糖タンパク質である³⁾⁴⁾⁶⁻⁸⁾¹³⁾²⁴⁻²⁷⁾。私達が歯肉から直接抽出したインヒビターのなかでは、Con-A Sepharose に吸着しないものが最も多かった。Murphy 等(1985)²⁶⁾、Carmichael 等(1986)²⁸⁾によれば、インヒビターの core タンパク質は、分子量20,000~22,000の塩基性タンパク質であり、これに糖が添加され分子量も29,000と大きくなってから細胞外へ分泌されるという。この考えによれば、これまで培養液中などに β (Con-A非吸着)のようなコラゲナーゼ・インヒビターが見出されなかったのも当然である。私達の β が全く糖をもっていないかどうかは不明であるが、このインヒビターに更に糖が添加され、 α Con-A (+)になる可能性が考えられる。尚、Con-A Sepharose に吸着しないインヒビターは、人羊水⁵⁾、牛羊水、軟骨、新生子牛血清²⁵⁾、人リウマチ滑液⁸⁾に見出されている。

人リウマチ滑液⁸⁾、人羊水⁵⁾及び家兎骨⁴⁾から得たインヒビターは、熱処理で (90°C, 30~60分) 活性を失ったというが、通常コラゲナーゼ・インヒビターは熱に対して安定である³⁾²⁵⁾²⁹⁾。同様に、ここで述べているいずれのインヒビターも熱に対しては安定で、90°C, 30分処理でもほぼ100%のインヒビター活性を示し、熱による失活は

見られなかった (Fig.10)。一方、4-APMA のような SH 基結合試薬により失活するコラゲナーゼ・インヒビター⁵⁾⁸⁾¹⁴⁾¹⁵⁾¹⁷⁾³⁰⁾ の存在が報告されているが、私達の α Con-A(±)と β は、4-APMA や NEM などの SH 阻害試薬による処理ではこの活性を失わなかったが、還元後にアルキル化することにより3種類ともインヒビター活性を失った (Fig.11)。この食い違いの理由は不明であるが、いずれにしろ私達の場合は、遊離の SH 基の有無は別として、遊離の SH 基はインヒビター活性を現わすのに関係なく、S-S 結合がインヒビター活性を現わすのに重要な働きをしていることを示している⁴⁾⁷⁾⁸⁾²³⁾²⁵⁾。

動物細胞由来のコラゲナーゼ・インヒビターの特異性に関しては多くの報告があり、一般に、バクテリア・コラゲナーゼ、トリプシン及びサーモリシンなどのプロテアーゼに対しては活性を示さないことが報告されている³⁾⁴⁾⁸⁾²³⁾²⁴⁾²⁵⁾。私達が分画した3種類のコラゲナーゼ・インヒビターも、バクテリア・コラゲナーゼに対しては同じように活性を示さなかった (Table.2)。しかし、 α Con-A (+)以外は、他の2つのプロテアーゼに対してこれまでの報告とは異なった結果を示した。即ち、 α -Con-A(-)は、トリプシンとサーモリシンの両活性を押え、 β はサーモリシンに対して弱いながらも阻害効果を示した (Fig.12,13)。 α Con-A(-)標品は、Heparin-Sepharose クロマトグラフィー (Fig.5) により3個の活性ピークを生じたこと、又、この標品はまだ精精度が低いこと (Table.1) などからその多様性が考えられる。あるいは又、トリプシン・インヒビター、サーモリシン・インヒビター等々各々別々のインヒビターの混在が考えられる。従ってこの標品を更に精製し、単一のタンパク質が両プロテアーゼ活性阻害を現わすのかどうかを明らかにする必要がある。 β は、弱いながらもサーモリシン阻害活性を示し、 α Con-A (+)との相違を示した。Bunning 等(1984)²⁵⁾による羊水コラゲナーゼ・インヒビターは、 β 同様 Con-A に吸着しない分子量22,000のインヒビターであるがサーモリシンを阻害しない。このことは、 β が Bunning 等のそれと異なることを示すかもし

れない。他方, Murphy 等(1985)²⁶⁾, Carmichael 等(1986)²⁸⁾のインヒビターがサーモリシンの活性を阻害するかどうか不明である。

このように牛の歯肉にはいろいろのプロテアーゼ・インヒビターが存在し, これ等がコラーゲン代謝を複雑に調節しているものとおもわれる。

文 献

- 1) Jeffrey, J. J. : The biochemical regulation of collagenase activity. in Regulation of matrix accumulation (Mecham, R. P. ed.). pp. 53-98, Academic Press, Inc., Orland, 1986.
- 2) Murphy, G. and Sellers, A. : The extracellular regulation of collagenase activity. in Collagenase in normal and pathological connective tissues (Woolley, D. E and Evan-son, J. M., eds.). pp. 65-81, J. Wiley & Sons, Chichester, 1980.
- 3) Vater, C. A., Mainardi, C.L. and Harris, E. D. : Inhibitor of human collagenase from cultures of human tendon, J. Biol. Chem., **254**, 3045-3053, 1979.
- 4) Cawston, T. E., Galloway, W. A., Mercer, E., Murphy, G. and Reynolds, J. J. : Purification of rabbit bone inhibitor of collagenase. Biochem. J., **195**, 159-165, 1981.
- 5) Murphy, G., Cawston, T. E. and Reynolds, J. J. : An inhibitor of collagenase from human amniotic fluid. Biochem. J., **195**, 167-170, 1981.
- 6) Macartney, H. W. and Tschesche, H. : Collagenase inhibitor from human polymorphonuclear leukocytes. Eur. J. Biochem., **130**, 79-83, 1983.
- 7) Stricklin, G. P. and Welgus, H.G. : Human skin fibroblast collagenase inhibitor. J. Biol. Chem., **258**, 12252-12258, 1983.
- 8) Mercer, E., Cawston, T. E., Disilva, M. and Hazleman, B. L. : Purification of metalloproteinase from human rheumatoid synovial fluid. Biochem. J., **231**, 505-510, 1985.
- 9) Kuettner, K. E., Hiti, J., Eisenstein, R. and Harper, E. : Collagenase inhibition by cationic proteins derived from cartilage and aorta. Biochem. Biophys. Res. Commun. **72**, 40-46, 1976.
- 10) Geiger, S. B. and Harper, E. : The inhibition of human gingival collagenase by an inhibitor extracted from human teeth. J. Periodontal Res., **16**, 8-12, 1981.
- 11) Abe, S. and Nagai, Y. : Evidence for the presence of a latent form of collagenase in human rheumatoid synovial fluid. J. Biochem. **71**, 919-922, 1972.
- 12) Werb, Z., Burleigh, M. C., Barrett, A. J. and Starkey, P. M. : Interaction of α_2 -macroglobulin with proteinases : Binding and inhibition of mammalian collagenases and other material proteinases. Biochem. J., **139**, 359-368, 1974.
- 13) Woolley, D. E., Roberts, D. R. and Evan-son, J. M. : Small molecular weight β_1 serum protein which specifically inhibits human collagenases. Nature, **261**, 325-327, 1976.
- 14) Pettigrew, D. W., Sodek, J., Wang, H. M. and Brunette, D. M. : Inhibitors of collagenolytic enzymes synthesized by fibroblasts and epithelial cells from porcine and macaque periodontal tissues. Arch. Oral Biol., **25**, 269-274, 1980.
- 15) Pettigrew, D.W., Wang, H. M., Sodek, J. and Brunette, D. M. : Synthesis of collagenolytic enzymes and their inhibitors by gingival tissue in vitro. J. Periodontal Res., **16**, 637-645, 1981.
- 16) Simpson, J. W. and Mailman, M. L. : Synthesis of collagenase inhibitor by gingival fibroblasts in culture. Biochim. Bio-

- phys. Acta, **673**, 279-285, 1981.
- 17) Heath, J. K., Gowen, M., Meikle, M. C. and Reynolds, J. J. : Human gingival tissues in culture synthesize three metalloproteinase and a metalloproteinase inhibitor. *J. Periodontal Res.*, **17**, 183-190, 1982.
- 18) Yanagimura, M., Hara, K. and Nohara, H. : Collagenase activities in healthy and inflamed gingival of dogs. *J. Periodontal Res.*, **18**, 1-10, 1983.
- 19) Wize, J. : A latent collagenase from rheumatoid synovial fluid : Purification and partial characterization. *Biochim. Biophys. Acta*, **615**, 199-207, 1980.
- 20) Terato, K., Nagai, Y., Kawanishi, K. and Yamamoto, S. : A rapid assay method of collagenase activity using ¹⁴C-labelled soluble collagen as substrate. *Biochim. Biophys. Acta*, **445**, 753-762, 1976.
- 21) Rice, R. H. and Means, G. E. : Radioactive labelling of protein in vitro. *J. Biol. Chem.* **246**, 831-832, 1971.
- 22) Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with folin reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275, 1951.
- 23) Kishi, J. and Hayakawa, T. : Purification and characterization of bovine dental pulp collagenase inhibitor. *J. Biochem.* **96**, 395-404, 1984.
- 24) Nagayama, M., Sakamoto, S., and Sakamoto, M. : Mouse bone collagenase inhibitor : Purification and partial characterization of the inhibitor from mouse Calvaria culture. *Arch. Biochem. Biophys.*, **228**, 653-659, 1984.
- 25) Bunning, R. K., Murphy, G., Kumar, S., Phillips, P. and Reynolds, J. J. : Metalloproteinase inhibitors from bovine cartilage and body fluids. *Eur. J. Biochem.* **139**, 75-80, 1984.
- 26) Murphy, G. and Werb, Z. : Tissue inhibitor of metalloproteinase : Identification of precursor forms synthesized by human fibroblasts in culture. *Biochim. Biophys. Acta*, **839**, 214-218, 1985.
- 27) Murray, J. B., Allison, K., Sudhalter, J. and Langer, R. : Purification and partial amino acid sequence of a bovine cartilage derived collagenase inhibitor. *J. Biol. Chem.* **261**, 4154-4159, 1986.
- 28) Carmichael, D. F., Sommer, A., Thompson, R. C., Anderson, D. C., Smith, C. G., Wegus, H. G. and Stricklin, G. P. : Primary structure and cDNA cloning of human fibroblast collagenase inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **83**, 2407-2411, 1986.
- 29) Welgus, H. G., Stricklin, G. P., Eisen, A. Z., Bauer, E. A., Coony, R. V. and Jeffrey, J. J. : A specific inhibitor of vertebrate collagenase produced by human skin fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, **254**, 1938-1943, 1979.
- 30) Murphy, G., Cartwright, E. C., Sellers, A. and Reynolds, J. J. : The detection and characterisation of collagenase inhibitors from rabbit tissues in culture. *Biochim. Biophys. Acta*, **483**, 493-498, 1977.