

プロリダーゼ欠損症患者，母親及び正常人赤血球中の プロリダーゼの精製とその性質

大橋俊孝*・大庭千佐*・大野貴司**・児玉裕敬*

(*化学教室・**皮膚科学教室)

Characteristics and Purification of Prolidase from Erythrocytes of Patients with Prolidase Deficiency, their Mother and Normal Human.

Toshitaka OHHASHI*・Chisa OHBA*・Takashi OHNO** and Hiroyuki KODAMA*

Departments of Chemistry and Dermatology**, Kochi Medical School,*

Nankokushi Kochi 781-51 Japan

Abstract. Two forms of prolidase could be separated from erythrocytes of normal subjects and mother of patients with prolidase deficiency using TSK DEAE-5PW Chromatography.

Only one form of prolidase was separated from erythrocytes of patients with prolidase deficiency.

Each peak (I and II) of prolidase differed in their response to Mn^{2+} , substrate specificity and heat stability. Prolidase activity in erythrocytes from patients with prolidase deficiency showed complete lack of peak I of normal prolidase, whereas peak II had normal activity against all the substrate tested. The various properties between patients' prolidase and peak II of normal prolidase were very similar.

Prolidase I (EC 3.4.13.9) have been purified to homogeneity from the erythrocytes of normal human and patient's mother.

Prolidase I from normal human and patient's mother have as molecular weight of about 112,000 and are composed of two subunits identical in molecular weight of 56,000.

The K_m values from gly-pro of normal and patient mother's prolidase I were 2.90 and 2.88 mM, but the V_{max} values for gly-pro of mother's enzyme was reduced about 30% compared to that of normal enzymes (mother : 6.02units/mg protein, normal:22.21units/mg protein).

Isoionic points of those enzymes by chromatofocusing were pH 4.6-4.7.

Prolidase II from erythrocytes of normal human, and patient's mother, and prolidase from patient's erythrocytes have also been purified highly. Prolidase II from normal human, patient's mother and patient's prolidase have a molecular weight of about 185,000, and are composed of two subunits identical in molecular weight of 95,000. The K_m and V_{max} values for various

substrates of these enzymes are almost same.

緒言

プロリダーゼは人間の体内に広く分布しているペプチダーゼでプロリンをカルボキシ末端に含むジペプチド (imidodipeptide) を加水分解し，プロリンを遊離させる酵素である。

人のイミドジペプチド尿症は1968年に Good man¹⁾らによって初めて報告され，その後Powell²⁾らにより，その原因がプロリダーゼの欠損によることが報告され，わが国では我々が³⁾最初に報告し，現在4家系が知られている。

プロリダーゼ欠損症では酵素が完全に欠損していると考えられていたが，その後種々の基質を用いて患者の赤血球，綿維芽細胞，血清の酵素を測定すると正常人とは基質特異性の異なった酵素があることに気づいた。そこで，プロリダーゼ欠損症患者，母親及び正常人の赤血球のプロリダーゼを精製し，それらの酵素の物理化学的性質について検討を試みてみた。

材料と方法

プロリダーゼ欠損症患者，母親及び正常人の血液をヘパリンを含む試験管に採血し，赤血球を常法により分離した。赤血球を凍結・融解により破壊し，その hemolysate に 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 7.0) で平衡化したセルロース陰イオン交換体を加え，60分間攪拌し，その suspension をカラムに注ぎ，プロリダーゼが NaCl (0-300 mM) の linear gradient (0.05M Tris-HCl buffer) 200ml で溶出された。溶出されたプロリダーゼがさらに硫酸 (40~70%) で分画され，透析を行った。その透析内液が TSK DEAE-5PW カラム (8×75mm)，MonoP HR5/20，TSK G3000SW (8×300mm) を用いて分離・精製された。

酵素活性の測定：

反応液には酵素溶液10 μ l，50mM Tris-HCl Buffer (pH 7.8) 70 μ l，10mM MnCl₂ 20 μ l，10mM substrate 100 μ l が含まれていた。まず酵素は37°C で10分間 preincubate し，30分間反応したのち，10% TCA を200 μ l 加えて反応を停止した。その反応液に Chinard⁸⁾ 試薬 3 ml を加えて90°C で10分間反応させ，酵素反応によって遊離した proline を定量した。

蛋白質の定量は Lowry⁹⁾ の方法により行なった。ポリアクリルアミドゲル電気泳動は Laemmli¹⁰⁾ の方法で行ない，プロリダーゼの活性染色は Lewis と Harris¹¹⁾ の方法で行なった。

プロリダーゼ I と II の分子量の測定には次のような標準品が用いられた。

Ferritin (MW=440,000), catalase (MW=232,000), aldolase (MW=158,000), bovine serum albumin (MW=67,000), ovalbumin (MW=43,000), chymotrypsinogen A (MW=25,000), ribonuclease A (MW=13,700)(Pharmacia. Ltd)

結果と考察

プロリダーゼはカルボキシ末端にプロリンを含む種々のイミドジペプチドを加水分解する酵素である。赤血球のプロリダーゼは種々の基質のうちで Gly-Pro が最も良い基質であることが知られていた。そのため、プロリダーゼの活性の測定には Gly-Pro を基質として用いてきた。

Gly-Pro を基質としてプロリダーゼ欠損症患者の赤血球のプロリダーゼを測定するとその活性は殆んど検出できなかつたため、このような患者ではプロリダーゼが完全に欠損していると考えてきた⁽²⁾。しかし、種々の基質を用いて酵素活性を測定してみると Gly-Pro に対しては殆んどその酵素活性を測定することは困難であったが、Met-Pro を基質として測定すると患者の酵素活性は正常人の酵素活性と比較してあまり減少していないことが判明した⁽⁴⁾。(表1)これらの結果はプロリダーゼ欠損症の患者の赤血球中のプロリダーゼは正常人とは基質特異性の異なつた酵素が残存していることを示している。

Table.1. Prolidase activity in erythrocytes from healthy subjects, patients with prolidase deficiency and their parents

	Control (n=5)	Father	Mother	Patient 1	Patient 2
Gly-Pro	165.67±15.37 (100)	93.48 (100)	81.10 (100)	4.72 (11.7)	4.13 (12.1)
Ala-Pro	144.01±7.87 (86.9)	66.63 (71.3)	78.58 (96.9)	14.95 (37.0)	14.98 (43.9)
Val-Pro	31.21±3.29 (18.8)	21.80 (23.3)	22.98 (28.8)	7.70 (19.1)	6.60 (19.3)
Leu-Pro	42.21±1.51 (25.5)	31.33 (33.5)	36.21 (44.7)	15.29 (37.8)	11.78 (34.5)
Met-Pro	76.57±1.03 (46.2)	65.07 (69.6)	56.37 (69.5)	40.41 (100)	34.12 (100)
Phe-Pro	64.01±2.64 (38.6)	43.72 (46.8)	46.64 (57.5)	13.00 (32.2)	10.67 (31.3)

Each value represents $X10^{-4}$ $\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein per min. Numbers in parentheses represent the relative activity of prolidase against different substrates.

正常人の赤血球中プロリダーゼについてはすでに精製され、分子量112,000で56,000の2つのサブユニットからなり、この酵素のみが存在していると考えられてきた⁽¹²⁾。

我々はプロリダーゼ欠損症患者の赤血球の残存プロリダーゼと正常人の赤血球中プロリダーゼを比較検討するために、赤血球中のプロリダーゼの精製を試みることにした。

正常人の赤血球中のプロリダーゼは TSK DEAE-5PW により peak I と II に完全に分離された。しかし、プロリダーゼ欠損症患者には正常人の peak I と同じ溶出位置に溶出される peak は検出することができなかつた。正常人のプロリダーゼも Gly-Pro を基質として測定すると peak II を検出できなかつたが Met-Pro を基質として測定すると peak I と II の両者を容

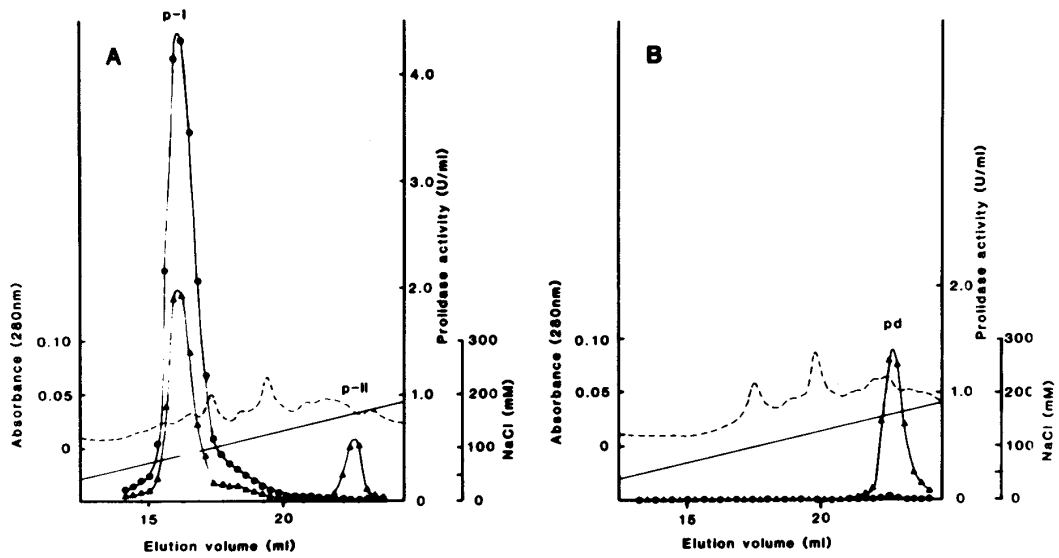


Fig.1. TSK DEAE-5PW (8×75mm) column chromatography of prolidase activities from erythrocytes of control (A) and patient with prolidase deficiency (B). Peak I (p-I) and peak II (p-II) are named in order of elution. Prolidase activities against gly-pro(●-●) and met-pro(▲-▲) were estimated as described in materials and methods.

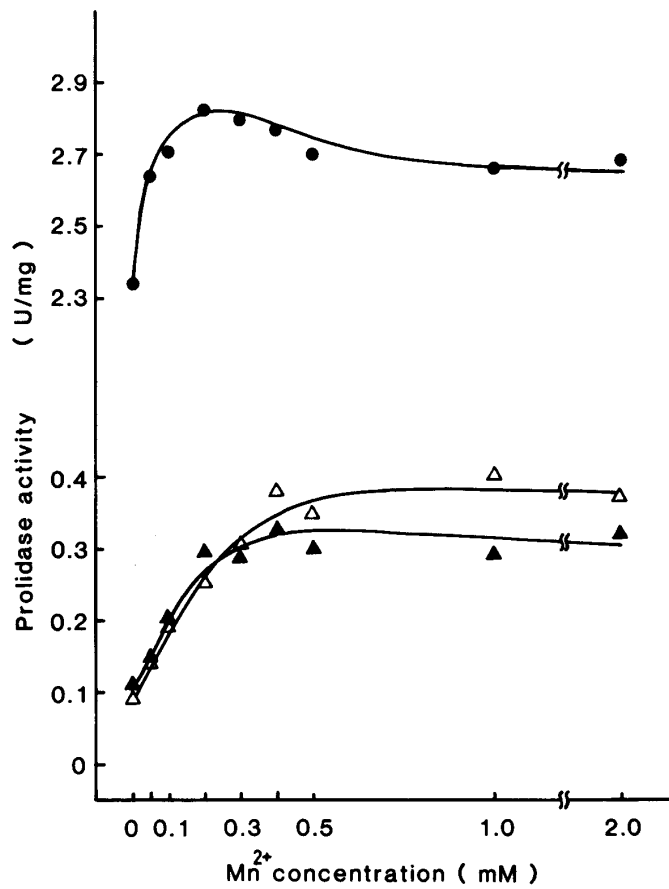


Fig.2. Effect of Mn^{2+} concentration on prolidase activities of peak I (●-●) and peak II (▲-▲) from control erythrocytes and peak (Δ-Δ) from patient erythrocytes. Each peak was preincubated with Mn^{2+} for 10min at 37°C (ala-pro).

易に検出することができた。(図1)

患者の母親のプロリダーゼも peak I と II の両者を検出することができた。

次に TSK DEAE-5PW で分離された peak I と II について種々の性質について比較検討を行なった。

1) Mn^{2+} イオンの影響を調べた結果が図2に示されている。peak I と II とも Mn^{2+} によってその酵素活性が増加するが peak I の方が II よりも低濃度で活性化されることを示している。患者のプロリダーゼは正常人の peak II と同じような性質を示した。

2) 図3には至適 pH を示している。正常人及び母親の peak I の至適 pH は7.6~7.7で、peak II と患者のプロリダーゼの至適 pH は8.0~8.1であった。

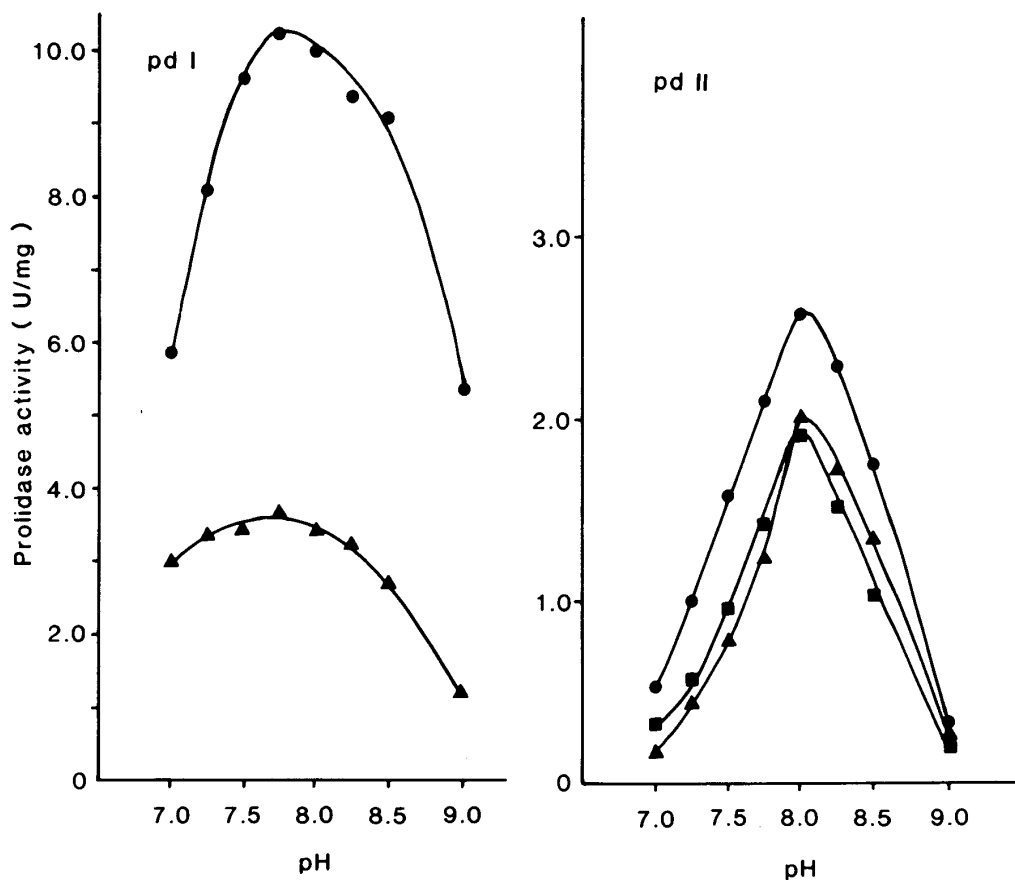


Fig.3. Effect of pH on the activities of prolidase I and II from normal human (●-●), patient with prolidase deficiency (■-■) and patient's mother (▲-▲). Tris buffers adjusted to appropriate pH with HCl were used.

3) 図4には熱安定性の実験を示した。正常人の peak I は Mn^{2+} がないと非常に不安定であるが、 Mn^{2+} イオンにより安定化されることがわかる。しかし peak II は Mn^{2+} の付加によっても安定化されなかった。(図4・A)

患者のプロリダーゼは Mn^{2+} の付加によっても殆んどその効果がなかった。(図4・B)

以上の結果から患者のプロリダーゼの性質は正常人及び母親のプロリダーゼの peak II と非

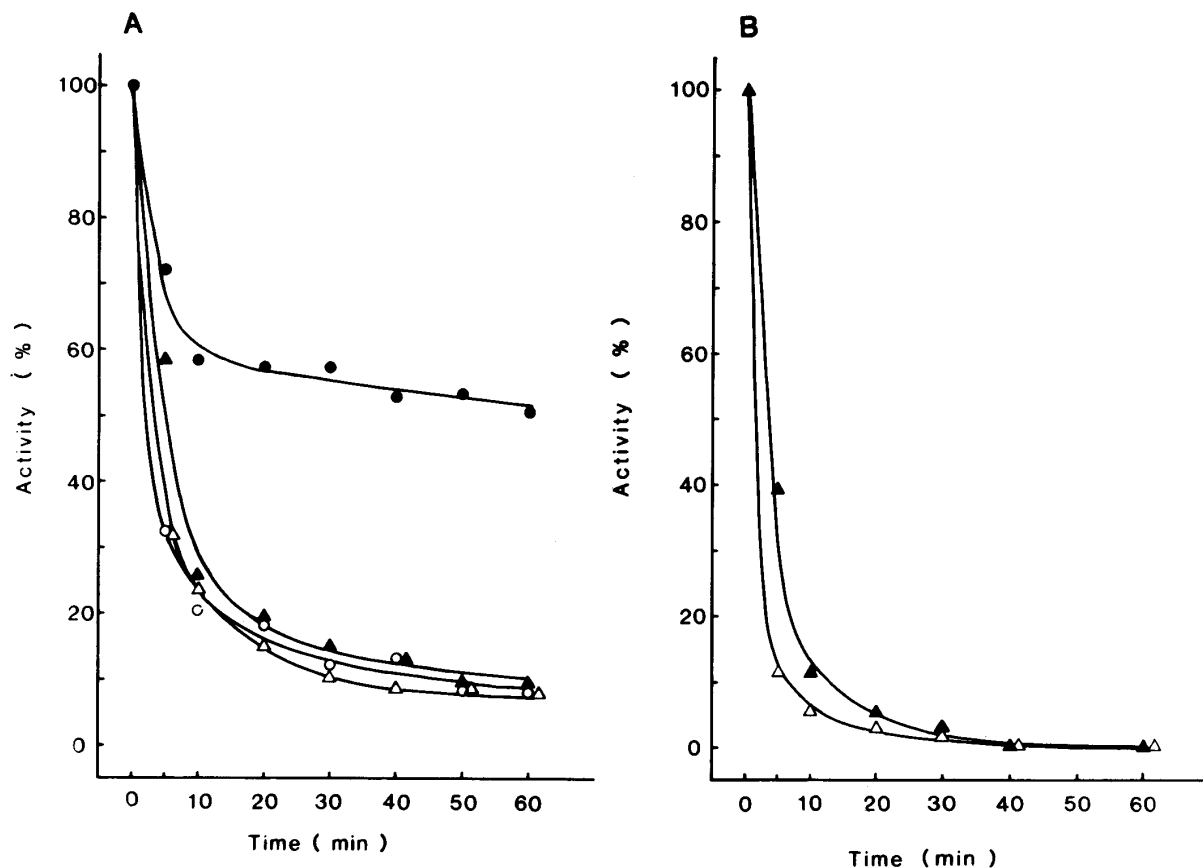


Fig.4. Effect of heat (50°C) on prolidase activities of peak I (●-●, ○-○) and peak II (▲-▲, △-△) from control erythrocytes (A), and peak from patient's erythrocytes (B) in the presence (●) or absence (○) of 1mM Mn^{2+} and assayed with phe-pro.

常によく一致した性質を持っていることが判った。

これらの酵素の性質をさらに詳細に調べるために正常人及び患者の酵素の精製を行なった。その精製の過程が表2に要約されている。母親の peak I (pd I) の酵素活性は正常人の peak I (pd I) の活性の約 1/2 であった。患者の peak I のプロリダーゼ活性は検出されなかった。この事実は本疾患が常染色体劣性遺伝であることを証明している。母親の酵素活性の減少が酵素量の減少ではなく、酵素の基質に対する特異性の低下によることが推測される。

一方、プロリダーゼ欠損症患者のプロリダーゼ、正常人の peak II (pd II) 及び母親の peak II (pd II) の specific activity は殆んど同じであった。

TSK G3000SW による正常人のプロリダーゼ I と II 及び患者のプロリダーゼの分子量の測定結果を図5に示した。正常人のプロリダーゼ I (peak I) の分子量は112,000でプロリダーゼ II (peak II) の分子量は185,000であった。母親のプロリダーゼの分子量は正常人のそれと同じであった。一方患者のプロリダーゼは正常人のプロリダーゼ II (peak II) と同じで185,000であった。

図6にはポリアクリルアミドゲル電気泳動を示した。正常人と母親の pd I (peak I) は単一

Table.2. Purification of prolidase from erythrocytes of normal human, patient with prolidase deficiency and her mother.

Normal						
	Volume (ml)	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Recovery (%)	Purification (fold)
Crude hemolysate	32.0	11040.3	105.41	0.0098	100	1
DEAE cellulose	134.5	229.19	73.71	0.32	69.93	34
Ammonium sulfate	12.2	48.47	52.87	1.01	50.16	106
pd-I (TSK DEAE-5PW)	5.9	4.16	29.50	7.10	27.99	743
pd-I (Mono P)	3.2	0.54	9.58	17.72	9.09	1855
pd-I (TSK G3000SW)	0.4	0.24	1.77	7.28	1.68	762
pd-II (TSK DEAE-5PW)	3.6	3.20	6.88	2.15		
pd-II (TSK G3000SW)	0.8	0.94	2.45	2.61		
Mother						
	Volume (ml)	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Recovery (%)	Purification (fold)
Crude hemolysate	21.0	8064.63	44.31	0.0055	100	1
DEAE cellulose	74.8	116.76	30.44	0.26	68.70	47
Ammonium sulfate	6.3	26.03	20.88	0.80	47.12	146
pd-I (TSK DEAE-5PW)	3.9	3.52	9.88	2.81	22.30	511
pd-I (Mono P)	2.0	0.38	2.02	5.32	4.55	967
pd-I (TSK G3000SW)	0.6	0.3	1.09	3.69	2.46	670
pd-II (TSK DATE-5PW)	2.4	3.07	3.28	1.07		
pd-II (TSK G3000SW)	0.6	0.53	1.26	2.37		
Patient						
	Volume (ml)	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Recovery (%)	Purification (fold)
Crude hemolysate	16.0	5617.12	9.60	0.0017	100	1
DEAE cellulose	110.0	118.14	4.40	0.037	45.83	22
Ammonium sulfate	6.08	17.10	3.28	0.192	34.2	113
TSK DEAE-5PW	2.4	1.84	3.17	1.72	33.02	1014
TSK G3000SW	0.6	0.41	1.13	2.75	11.81	1620

Prolidase I activities from normal human and patient's mother were assayed with gly-pro, but activities of their prolidase II and prolidase from patient were assayed with met-pro.

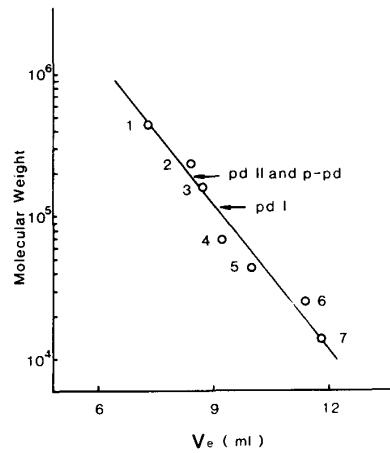


Fig.5. Estimation of the molecular weight of native prolidase on TSK G3000SW (8×300mm) using high pressure liquid chromatography. The numbers indicate the following standards : (1) ferritin (Mr=440,000) (2) catalase (Mr=232,000) (3) aldolase (Mr=158,000) (4) bovine serum albumin (Mr=67,000)

(5) ovalbumin (Mr=43,000) (6) chymotrypsinogen A (Mr=25,000) (7) ribonuclease A (Mr=13,700).

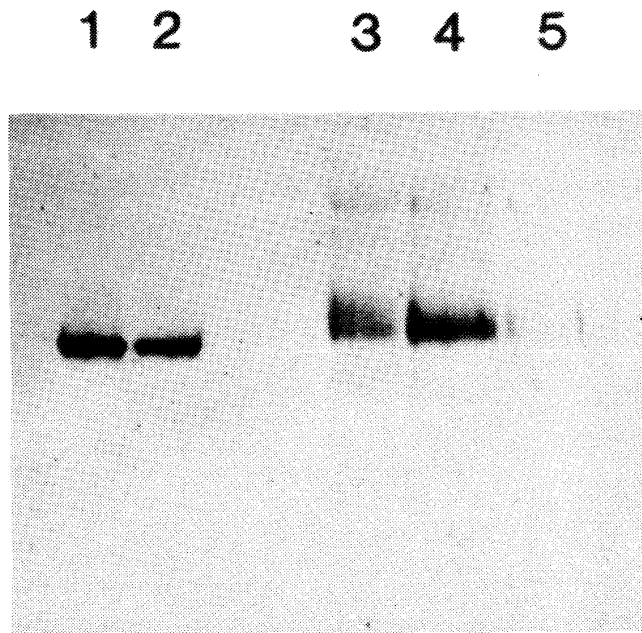


Fig.6. Polyacrylamide slab gel electrophoresis of the purified prolidase I and II from erythrocytes of normal human (1,3) and patient's mother (2,4) and prolidase from erythrocytes of patient with prolidase deficiency (5).

のバンドに精製された。両者の pd II (peak II) 及び患者のプロリダーゼもかなり高度に精製された。活性染色の結果もそれぞれバンドとよく一致した。図7には SDS-ポリアクリルアミドゲルによる電気泳動を示した。その結果正常人及び母親の pd I は56,000であり、pd I の酵素は56,000の2つのサブユニットから構成されている。これは遠藤等によって報告された正常人の赤血球の結果とよく一致していた。

表3に赤血球 Lysate 及び精製酵素の Km と Vmax の値を示した。赤血球 Lysates では

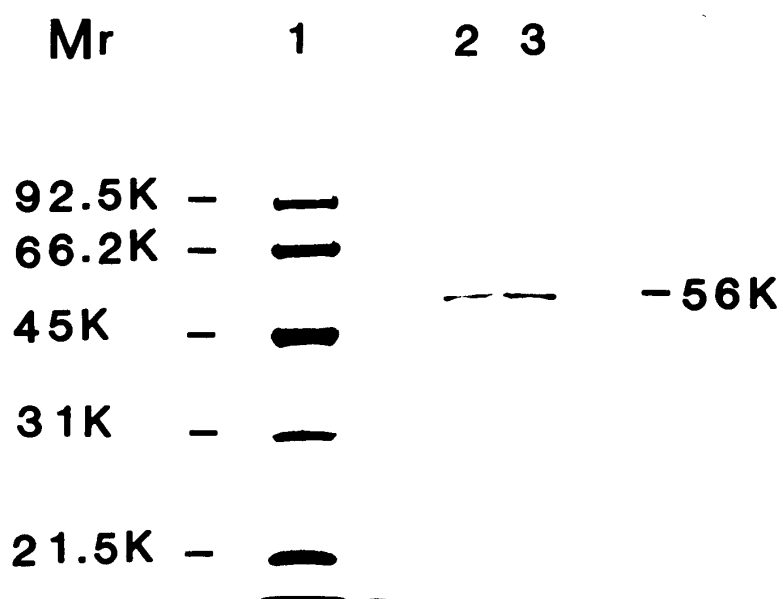


Fig.7. SDS-PAGE with slab gel containing 10% acrylamide gel of the purified prolidase I from normal human (2) and patient's mother (3). (1) indicates the following standards : phosphorylase B (Mr=92,500), bovine serum albumin (Mr=66,200), ovalbumin (Mr=45,000), carbonic anhydrase (Mr=31,000), soybean trypsin inhibitor (Mr=21,500).

Gly-Pro を基質として測定すると正常人及び患者の母親では概ね同値の K_m となった。しかし Met-Pro を基質として測定すると2つの K_m 値が得られた。一方患者では Gly-Pro では正常人の高い K_m 値と一値する値が得られた。 V_{max} については Gly-Pro を基質とすると母親のその値は正常人の値の約 $1/2$ となった。Met-Pro を基質にすると一方の V_{max} 値は約 $1/2$ の値となったが他方の V_{max} 値は両者に差が認められなかった。以上のことは赤血球に2つの酵素が存在していることを意味していると考えられる。

そこで精製した酵素標品 (pd I と pd II) を用いて K_m と V_{max} の値を求めた。正常人及び母親の種々の基質に対する pd I の K_m 値は pd II の K_m 値よりも低値を示したが、正常人と母親の酵素の K_m 値に差は認められなかった。患者のプロリダーゼも正常人の pd II の値とよく一致していた。母親の pd I の V_{max} の値は正常人の値よりもかなり低値を示した。一方 pd II の V_{max} は両者に差が認められなかった。また患者のプロリダーゼは正常人の pd II とほぼ同値を示した。

以上の結果から正常人及び患者の母親の赤血球には少なくとも性質の異なった2つのプロリダーゼがある。患者の母親の pd I は正常人の pd I との間で V_{max} の値に差が認められた。患者の赤血球には正常人の pd I は酵素活性では検出できなかった。この結果は遠藤¹³⁾等によるモノクローナル抗体の結果と同様であった。患者のプロリダーゼは正常人及び母親の pd II と種々の物理化学的性質が同じであった。これらの事実は患者の赤血球にはプロリダーゼ活性が全く欠損しているのではなく、正常人の pd I の活性が欠損していて pd II の酵素は残存してい

Table.3. Km and Vmax values of prolidase I and II from erythrocytes from normal human, patient with prolidase deficiency and her mother.

Km (mM)								
	Gly-Pro		Ala-Pro		Phe-Pro		Met-Pro	
	I	II	I	II	I	II	I	II
Normal	2.90	ND	0.98	17.63	1.10	17.60	0.92	10.25
Mother	2.88	ND	0.87	16.36	0.81	13.80	0.81	11.03
Patient	—	ND	—	14.58	—	18.97	—	11.43

Vmax (U/mg protein)								
	Gly-Pro		Ala-Pro		Phe-Pro		Met-Pro	
	I	II	I	II	I	II	I	II
Normal	22.21	ND	11.53	1.81	5.78	0.93	4.82	3.60
Mother	6.02	ND	3.37	1.87	1.46	0.90	1.48	3.70
Patient	—	ND	—	1.84	—	1.09	—	3.01

Km and Vmax values of prolidase from erythrocyte lysates						
Km (mM)				Vmax (nmol/min/mg protein)		
	Gly-Pro		Met-pro		Gly-Pro	
	a	b	a	b	a	b
Normal	2.87	0.80	9.43	22.17	5.44	13.37
Mother	2.25	0.97	11.41	12.57	3.82	12.53
Patient	ND	—	9.44	ND	—	14.12

ることを証明したものである。

REFERENCES

- 1) Goodman, S.I., Solomons, C.C., Muschenheim, F., McIntyre, C.A., Miles, B., and O'Brien, D. *Metabolism* 45, 152-159 (1968).
- 2) Powell, G.F., Rasco, M.A., and Maniscalco, R.M. *Metabolism* 23, 505-513 (1974).
- 3) Kodama, H., Umemura, S., Shimomura, M., Mizuhara, S., Arata, J., Yamamoto, Y., Yasutake, A., Izumiya, N. *Physiol. Chem. Phys.* 8, 463-473 (1976)
- 4) Kodama, H., Mikasa, H., Ohhashi, T., Ohno, T., and Arata, J. *Clin. Chim. Acta* 173, 317-324 (1988).
- 5) Butterworth, J. and Priestman, D.A. *J. Inher. Metab. Dis.* 7, 32-34 (1984).
- 6) Ohhashi, T., Ohno, T., Arata, J., and Kodama, H. *J. Inher. Metab. Dis.* 11, 166-173 (1988).
- 7) Umemura, S. *Physiol. Chem. Phys.* 10, 279-283 (1978).
- 8) Chinard, F.P. *J. Biol. Chem.* 199, 91-95 (1952).
- 9) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275 (1951).
- 10) Lammler, V.K. *Nature* 227, 680-685 (1970).
- 11) Lewis, P.W.H. and Harris, M. *Nature* 215, 351-355. (1967).

- 12) Endo, F., Matsuda, I., Ogata, A., and Tanaka, S. *Pediatr. Res.* 16, 227-231 (1982).
- 13) Endo, F., Motohara, Y., Indo, Y., and Matsuda, I. *J. Inher. Metab. Dis.* 10, Suppl. 2, 317-318 (1987).

(1988年9月9日受理)