

Title	ヒト腩液アミラーゼの分離精製とその性質
Author(s)	松浦, 貴志男
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/33763
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名・(本籍)	まつ 松	うら 浦	き 貴	し 志	お 男
学位の種類	医学博士				
学位記番号	第 6143 号				
学位授与の日付	昭和 58 年 6 月 29 日				
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当				
学位論文題目	ヒト膵液アミラーゼの分離精製とその性質				
論文審査委員	(主査)				
	教授 川島 康生				
論文審査委員	(副査)				
	教授 和田 博 教授 宮井 潔				

論文内容の要旨

(目的)

膵アミラーゼには電気泳動の移動度の異なるいくつかの活性画分があることが知られている。また急性膵炎患者の血清中には、その発症初期から、膵アミラーゼの minor component (微少成分) が多数出現することが観察されている。そしてこの minor component の出現程度から急性膵炎の重症度を判定する指数も考案され、臨床応用されている。一方、癌患者の膵液中のアミラーゼには、同様に多くの minor component があると報告されている。しかし、現在までこの minor component がどのような機序で出現するかの詳細は不明である。本研究ではヒト膵液からアミラーゼをその component (成分) ごとに分けて精製し、蛋白化学的、酵素化学的ならびに免疫学的性質を比較検討した。そして体液中に膵アミラーゼの minor component が出現する機序と、それを分析することの診断的意義を明らかにしようとした。

(方法と成績)

1) 膵液アミラーゼの精製

膵頭十二指腸切除術後の外膵液嚢より膵液を無菌的に採取し凍結保存して原材料とした。この凍結膵液を解冻後、25%飽和になるように硫酸を加え、沈澱を遠心分離で除去し、その上澄に加温処理したトウモロコシ澱粉を加え、アミラーゼを吸着させた。それを25%飽和冷硫酸水で洗浄し、M/100 Ca Acetate を含む M/50 NaCl 溶液 (pH 6.5) に懸濁しアミラーゼを溶離した。溶離酵素を硫酸75%飽和で塩析し Sephadex G-100 でゲル濾過を行ない、次いでアンホラインで等電点電気泳動を行った。膵液アミラーゼの大半は等電点7.1を示す画分 (P₁) であり、他に等電点6.5の画分

(P₂)が認められた。P₁ は当初の活性に対し約50%の収量で結晶として分離され、その比活性は約33倍に増大した。精製酵素はディスク電気泳動的にも、また超遠心的にも単一であった。

2) 腩液アミラーゼP₁およびP₂の蛋白化学的性質

5%ポリアクリルアミドゲル電気泳動ではP₁とP₂に移動度の相異があり、P₂はより陽極側へ泳動された。一方10%ポリアクリルアミドゲルを用いたSDSディスク電気泳動でP₁、P₂ともに単一のバンドを示し、移動度も同じで、分子量は約54,000と推定された。なお平衡沈降法による分析ではP₁は分子量約55,000と推定された。アミノ酸組成はP₁、P₂ともに非常によく類似し、アミノ酸組成は同一とみなされた。ペプチドマップ法ではP₁、P₂ともに37個のペプチドを数えることができた。P₂のペプチドマップ法においては陽極側への移動度の高いペプチドが存在し、これはP₁においてはみられず、P₁とP₂の間に荷電の相異なるペプチドの存在することがわかった。

3) 腩液アミラーゼP₁およびP₂の酵素化学的性質

P₁、P₂の作用最適pHは全く同じ7.0で、両者の作用最適温度は40℃であった。またM/50 NaClおよびM/100 Ca Acetate 存在下で30℃、24時間の試験の場合、pH4~10の間で安定であった。耐熱性は、M/50 NaClおよびM/100 Ca Acetate 存在下に、pH6.5、15分間の加熱の場合、P₁、P₂はいずれも50℃まで安定であった。活性発現に及ぼす塩の効果についてはP₁、P₂に差はなく、両者ともに活性発現にはNaClが必要であった。一方作用特異性を検討するためβ-limit dextrin、グリコーゲンを基質としてP₁、P₂を作用させたところ、反応生成糖はグルコース、マルトース、マルトトリオースおよび数種の分解オリゴ糖で、両者の間に著しい差はみられなかった。また澱粉の分解限度は42%で、分解率20%でヨード反応は完全に消失した。

4) 腩液アミラーゼP₁およびP₂の免疫学的性質

P₁でウサギを免疫して作製した抗血清を用いた免疫拡散法では、P₁、P₂の沈降線は単一融合していた。また腩アミラーゼP₁のradioimmunoassay系ではP₁、P₂の間に86.3%の免疫交叉性が認められた。

5) 腩組織アミラーゼの精製

剖検時に迅速に採取した腩組織より同様の方法でアミラーゼを精製した。アンホラインを用いた等電点電気泳動の結果は、腩液アミラーゼとは異り、腩組織アミラーゼは主なる3種の画分と、わずかながらその他のいくつかの画分からなっていた。その主なる3種の画分の等電点はそれぞれ7.1、6.5、6.2で、はじめての2つの等電点は腩液のそれと一致した。

(総括)

1. ヒト腩液アミラーゼの主成分であるP₁とminor componentであるP₂を分離精製し、その性質を比較検討した。
2. P₁、P₂は分子量、アミノ酸組成に相異がなく、酵素化学的、免疫学的にも差を認めなかった。ただペプチドマップにおいて両者の間にいくつかのペプチドの位置の相異を認めた。
3. P₁、P₂の等電点ないし電気泳動における移動度の相異はペプチドの荷電の相異によるものであり、minor componentが凍結融解のくり返しや、Bacillus circulansのpeptido-glutaminaseによっ

て生成される事実より、 P_2 は P_1 の deamidation によって生じたものであると考えられた。

4. 膵液と膵組織アミラーゼの構成比の相異は、膵組織からアミラーゼが精製されるに至るまでの過程における modification によると解された。
5. 臨床診断に応用されている体液中のアミラーゼの分画定量は、膵組織中又は体液中における post-translational modification の程度を明らかにしているものと考えられた。

論文の審査結果の要旨

本論文はヒト膵液からアミラーゼを component ごとに分離精製し、その蛋白化学的、酵素化学的および免疫学的性質を比較検討し、急性膵炎患者血清中や膵癌患者の膵液中に出現するアミラーゼの minor component が major component の deamidation によって生じたものであることを明らかにしたものである。現在臨床応用されている体液中のアミラーゼの分画定量は、膵組織中または体液中における posttranslational modification の程度を反映していることを示した価値ある研究であると考えられる。