



Title	ヒト臍液アミラーゼの分離精製とその性質
Author(s)	松浦, 貴志男
Citation	大阪大学, 1983, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/33763">https://hdl.handle.net/11094/33763</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏名・(本籍)	まつ	うら	き	し	お
学位の種類	松	浦	貴	志	男
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	ヒト脾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
	(副査)	教	授	和田	博
		教	授	宮井	潔

## 論文内容の要旨

## (目的)

脾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。また急性脾炎患者の血清中には、その発症初期から、脾アミラーゼの 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脾炎の重症度を判定する指標も考案され、臨床応用されている。一方、癌患者の脾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、今までこの minor component がどの様な機序で出現するかの詳細は不明である。本研究ではヒト脾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。そして体液中に脾アミラーゼの 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試みた。

## (方法と成績)

## 1) 脾液アミラーゼの精製

脾頭十二指腸切除術後の外脾液瘻より脾液を無菌的に採取し凍結保存して原材料とした。この凍結脾液を解凍後、25%飽和になるように硫安を加え、沈殿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%飽和冷硫安水で洗浄し、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。溶離酵素を硫安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。脾液アミラーゼの大半は等電点 7.1 を示す画分 (P<sub>1</sub>) であり、他に等電点 6.5 の画分

(P<sub>2</sub>)が認められた。P<sub>1</sub>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) 脾液アミラーゼP<sub>1</sub>およびP<sub>2</sub>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P<sub>1</sub>とP<sub>2</sub>に移動度の相異があり、P<sub>2</sub>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P<sub>1</sub>、P<sub>2</sub>ともに単一なバンドを示し、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P<sub>1</sub>は分子量約55,000と推定された。アミノ酸組成はP<sub>1</sub>、P<sub>2</sub>ともに非常に類似し、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P<sub>1</sub>、P<sub>2</sub>ともに37個のペプチドを数えることができた。P<sub>2</sub>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P<sub>1</sub>においてはみられず、P<sub>1</sub>とP<sub>2</sub>の間に荷電の相異するペプチドの存在することがわかった。

## 3) 脾液アミラーゼP<sub>1</sub>およびP<sub>2</sub>の酵素化学的性質

P<sub>1</sub>、P<sub>2</sub>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/50NaClおよびM/100CaAcetate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/50NaClおよびM/100CaAcetate存在下に、pH6.5、15分間の加熱の場合、P<sub>1</sub>、P<sub>2</sub>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P<sub>1</sub>、P<sub>2</sub>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 $\beta$ -limit dextrin、グリコーゲンを基質としてP<sub>1</sub>、P<sub>2</sub>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) 脾液アミラーゼP<sub>1</sub>およびP<sub>2</sub>の免疫学的性質

P<sub>1</sub>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、P<sub>1</sub>、P<sub>2</sub>の沈降線は単一融合していた。また脾アミラーゼP<sub>1</sub>のradioimmunoassay系ではP<sub>1</sub>、P<sub>2</sub>の間に86.3%の免疫交叉性が認められた。

## 5) 脾組織アミラーゼの精製

剖検時に迅速に採取した脾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、脾液アミラーゼとは異り、脾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つの等電点は脾液のそれと一致した。

(総括)

- ヒト脾液アミラーゼの主成分であるP<sub>1</sub>とminor componentであるP<sub>2</sub>を分離精製し、その性質を比較検討した。
- P<sub>1</sub>、P<sub>2</sub>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。
- P<sub>1</sub>、P<sub>2</sub>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. 脾液と脾組織アミラーゼの構成比の相異は, 脾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, 脾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

本論文はヒト脾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, 急性脾炎患者血清中や脾癌患者の脾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, 脾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。