



Title	中、酸性域における加水分解酵素の活性測定法研究
Author(s)	手嶋, 真一
Citation	大阪大学, 1989, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/36543
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名・(本籍)	て 手	しま 嶋	しん 真	いち 一
学位の種類	薬	学	博	士
学位記番号	第	8 5 2 4	号	
学位授与の日付	平	成	元	年 3 月 15 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	中、酸性域における加水分解酵素の活性測定法研究			
論文審査委員	(主査)			
	教	授	柗井雅一郎	
	(副査)			
	教	授	岩田 宙造	教 授 北川 勲 教 授 富田 研一

論文内容の要旨

1. α -アミラーゼ活性測定法

α -アミラーゼは至適 pH が 7.0 付近の酵素で、澱粉やデキストリン等の糖重合体を加水分解する。臨床分野において、 α -アミラーゼ活性は、澱粉や修飾澱粉を基質とし、生成するグルコースの還元力を測定する化学法、オリゴ糖やオリゴ糖誘導体を基質とし、追随酵素を組み合わせた酵素法などで測定されている。

現在、 α -アミラーゼ活性測定には、操作の簡便性や内因性グルコース、マルトースの影響回避等の理由から、発色基 p-ニトロフェノール (PNP) をオリゴ糖の還元性末端に結合したオリゴ糖誘導体が広く利用されている。

しかし、発色基 PNP は α -アミラーゼの至適 pH 7.0 付近で充分な発色解離度を示さず、測定感度の不足、さらに若干の pH、温度の変動や、イオン強度等の測定諸条件の影響を受けるといった問題点を抱えていた。

そこで著者は、中性域に至適条件を有する α -アミラーゼ活性測定に適した発色基を探索し、pKa が低く pH 7.0 付近で充分に発色解離する 2-クロロ-4-ニトロフェノール (CNP) を見い出した。

pH 7.0 付近で充分な解離度と感度を有する発色基 CNP をマルトペンタオースの非還元性末端に結合した合成基質 2-Chloro-4-nitrophenyl β -maltopentaoside (β -G5CNP) を用いた α -アミラーゼ活性測定法は、内因性グルコース、マルトースの影響を受けない、高感度なレートアッセイである。本法 (β -G5CNP を基質とした測定法) は、基質の構造が明確であり、 β -G2CNP を主成生物とし、反応生成物も明確である。人膵 α -アミラーゼ、人唾液 α -アミラーゼに対する作

用性も、基質水解機序、基質親和性 (K_m 値)、至適 pH においてはほぼ同様な性質を示した。

2. 酸性フォスファターゼ活性測定法

酸性フォスファターゼ (ACP) (EC 3. 1. 3. 2) は至適 pH が 5.0 付近の酵素で、各種 phosphomonoesterase の総称である。酸性フォスファターゼ (ACP) 活性は、グリセリン酸、フェニルリン酸、ニトロフェニルリン酸、チモールフタレイニンリン酸等を基質とした方法で測定されている。

しかし、これらの方法は操作法が煩雑で、測定時間が長時間 (30~60 分反応) を要し、検体ブランク測定を必要とし、酵素活性測定にふさわしいとされるレートアッセイができない等の問題点を有していた。

中でも、フェニルリン酸、p-ニトロフェニルリン酸を基質とした方法が比較的簡便な操作法のため広く用いられている。しかし、ACP により遊離するフェノールや p-ニトロフェノールが発色反応を必要としレートアッセイできなかった。

著者は、これらの問題点を解決した合成基質 2, 6-ジクロロ-4-ニトロフェニルリン酸 (DCNP-P) を用いた酸性フォスファターゼの活性測定法について検討した。

著者らは、酸性域で十分な感度を有する発色基を探索し、2, 6-dichloro-4-nitrophenol (DCNP) を見いだした。

酸性域で充分な解離度と感度を有する発色基 DCNP をりん酸に結合した合成基質 2, 6-Dichloro-4-nitrophenyl phosphate (DCNP-P) を用いた酸性フォスファターゼ活性測定法は、発色反応不要な高感度レートアッセイであり、検体ブランク測定も不要である。

本法 (DCNP-P を基質とした方法) は、正常値域での測定精度も良好であり、阻害剤 (L-酒石酸) 添加により前立腺酸性フォスファターゼ (PAP) 活性測定も可能である。

論文の審査結果の要旨

加水分解酵素の活性測定法として従来用いられてきた、p-ニトロフェノールを発色基とする方法を、中性域に至適 pH のある α -アミラーゼ、および酸性域に至適 pH のある酸性フォスファターゼ等に適用することは問題が多く、事実上不適当であった。本研究は、種々の試薬の検索を行った中から、2-クロロ-4-ニトロフェノールが中性域の、2, 6-ジクロロ-4-ニトロフェノールが酸性域の発色基として適切であることを、基礎的、実験的検証によって明らかにすることにより、従来法に比して簡便、迅速且つ高い信頼性を有する上記酵素群の分析法を確立したものである。これらの成果は、学位論文として充分価値あるものと認める。