ヒト尿アミラーゼとその周辺の研究について

南浦能至*, 伊藤和央*, 米田幸生*

Studies on Human Urine α -Amylases and α -Glucosidases

Noshi MINAMIURA, Kazuo ITO and Yukio YONEDA

*Faculty of Science, Osaka City University
(3-3-138, Sugimoto, Sumiyoshi-ku, Osaka 558, Japan)*

Various kinds of enzymes are known to be secreted into human urine as normal components. However, the enzymatic and physicochemical properties, as well as the tissue sources of the urine enzymes, remains to be clarified. Human urine may be the sole limitless source of certain human enzymes. Among these enzymes, current results which are concerned with the purification methods, the enzymatic and physicochemical properties and the origins of human urine α -amylases and α -glucosidases are presented, and also the discrimination between pancreatic and salivary α -amylase isozymes using by the specific monoclonal antibodies is described and discussed in this review article.

1. はじめに

微量ではあるが、正常成分としてヒト尿中に存在する酵素は何ら法的制約を受けずに取り扱いのできる唯一のヒト起源酵素で、尿中に活性の認められるものの種類は数多い¹⁾。にもかかわらず分離精製法はもちろん、その諸性質、起源臓器組織の明らかにされているものは数少ない。一方、ヒト尿から得られる酵素はウロキナーゼにみられるように免疫学的障害なしに静注薬として、また病態診断のためのイムノアッセイ法の抗原として直接利用できる特質を有している。

著者らの研究室では、かかる観点からこれまでヒト尿中の種々酵素の分離精製法、酵素化学的・蛋白化学的性質、起源臓器組織などについて詳細に研究を進めてきた。ここではこれら酵素のうち α -アミラーゼと α -グルコシダーゼについて得られた知見とその周辺の研究およびモノクローナル抗体を用いる尿および唾液 α -アミラーゼの分別定量法について述べることにする。

2. ヒト α -アミラーゼについてヒト α -アミラーゼ [1,4- α -D-glucan glucanohydro-

lase, EC. 3. 2. 1. 1] はグリコーゲンの α -1,4 グルコシド結合を加水分解し、グルコース、マルトースおよびマルトオリゴデキストリンを生成する酵素で、主に唾液腺および膵臓で生産されている。その他、肝臓、腎臓、肺臓、小腸などほとんど生体を通じ広く分布しているらしい。しかし、これら臓器の α -アミラーゼ活性は唾液あるいは膵の活性に比べきわめて低く、通常ヒトアミラーゼは上記の唾液型および膵型 α -アミラーゼの2種のアイソザイムとして大別されている²⁾。

1) 唾液および膵 α -アミラーゼ

唾液腺で生合成される α -アミラーゼには分子量 5.6×10^4 の糖を有しない酵素 (Family B) とグルコサミン、フコース、マンノース、ガラクトースからなる糖鎖をもつ分子量 6.2×10^4 の酵素 (Family A) の2種が存在する³⁾。一方、膵由来の α -アミラーゼは分子量 5.4×10^4 で糖鎖をもたない⁴⁾。結晶として単離された唾液および膵 α -アミラーゼはいずれも等電点の異なるいくつかの component から構成され、両 α -アミラーゼは作用最適 pH, NaCl による活性化、基質特異性などの酵素化学的性質あるいはアミノ酸組成などの蛋白化学的性質が酷似し^{5,6)}、またそれぞれの酵素で調製された抗血清との反応性も免疫学的にたがいに同一である⁶⁾ ため、両 α -アミラーゼを識別しがたい。しかし、最近両 α -ミ

* 大阪市立大学理学部 (558 大阪市住吉区杉本 3-3-138)

Fig. 1. Isoelectric focusing of crystalline α -amylase from human urine.

Column, 110 ml; enzyme applied, 2 ml, 2,000 units/ml, $A_{280\text{nm}}^{\text{cm}}=5.0$; ampholine used, pH 3 to 10; 200 V, 3 mA for 3 hr and then 600 V, 0.5 mA for 45 hr at 4°C. ●, absorbance at 280 nm; ○, activity; ---, pH.

ラーゼのアミノ酸配列が DNA シーケンシングから決定され、わずか数%ではあるが相違することが報告⁷⁾されていることや、前に述べた等電点や糖含量の点において両 α -アミラーゼは同一蛋白ではない。

2) 尿 α -アミラーゼ

唾液腺および膵臓で生合成された α -アミラーゼは大部分消化酵素として消化管内に分泌されるが、一部は血中に移行し、腎を経て尿中に排泄される²⁾。尿中に排泄される α -アミラーゼはウロペプシノーゲンや RNA 分解酵素とともに他の酵素に比べ量的にはかなり多い (尿 1 l 当り約 0.5 mg)⁸⁾。

著者らの研究室では、はじめに述べたように、ヒト尿酵素の利用開発を目的として、種々酵素を分離精製し、その詳細な性質を調べているが^{5,8-16)}、その一環として尿 α -アミラーゼを分離精製したことがある^{5,10)}。すなわち、10 数名の正常青年男子の新鮮尿から澱粉吸着法およびセファデックス G-100 のゲルクロマトグラフィーなどで結晶として単離した。その結晶 α -アミラーゼと、同様の方法で唾液およびヒト膵から得た結晶 α -アミラーゼの性質を比較検討したところ、 β -リミットデキストリンの分解様式、作用最適 pH など酵素化学的性質において、これら 3 種の α -アミラーゼの間にはまったく差異は認められなかった。また SDS-電気泳動での移動度も同じであった。さらにフェノール硫酸法による試験でいずれの酵素も糖は有していなかった。しかし、アセテートセルロース膜上での電気泳動や等電点電気泳動などでは尿 α -アミラーゼは活性を有する少なくとも五つの component に分画された (Fig. 1)。そのうちの二つは唾

Fig. 2. Paper chromatograms of the digest of β -limit dextrin by the five isozymes of α -amylase in human urine.

Substrate, 8%; enzyme, 100 units/g β -limit dextrin; 40°C; 24 hr.

液 α -アミラーゼを構成する三つの component のうち二つと、他の二つは膵酵素を構成する三つの component のうち二つと電気泳動的には同じであった。この結果は尿に排泄される α -アミラーゼは唾液および膵由来のアイソザイムの混合物 (量的にはおおよそ 1:1 の割合) であることを強く示唆している。なお尿 α -アミラーゼを構成する五つの component の β -リミットデキストリンに対する分解様式は同じであった¹⁷⁾ (Fig. 2)。

3) 膵 α -アミラーゼのデアミナーゼによる修飾

ヒト膵組織ホモジネートから精製された標品は活性を有する三つの component からなることを上述した。著者ら⁴⁾は膵頭十二指腸切除後の膵管チューブから冷却しながら体外に導出される膵液を集め、これから膵組織ホモジネートの場合と同様の精製方法で α -アミラーゼを

Fig. 3. Isoelectric focusing of α -amylase of human pancreatic juice.

Column, 110 ml; ampholine, pH 3 to 10; enzyme applied, 10.2 ml, $A_{280\text{nm}}^{\text{cm}} = 0.38$, 1.38 units/ml; 580 V, 0.6 mA for 44 hr at 4°C. ○, absorbance at 280 nm; ●, activity; ---, pH.

分離した。膵液から精製した α -アミラーゼ標品は、膵組織の場合とは異なり、等電点 7.1 の major component (P₁) と等電点 6.5 の minor component (P₂) とに分かれた (Fig. 3)。これら二つの成分の基質特異性、酵素化学的性質やアミノ酸組成にはまったく差異はみられなかったが、トリプシンによる両 component の消化物のペプチドマップを作成したところ、アミノ酸組成が同じであるにもかかわらず、両 component の間にはわずかながら差異のあることを認めた (Fig. 4)。このことはある種の酵素により α -アミラーゼ分子が修飾された結果、二次的に生じたものと考え、膵液 α -アミラーゼの major component に枯草菌のペプチドグルタミナーゼ I および II¹⁸⁾ を作用させてみたところ、活性の変化はほとんどみられないにもかかわらず minor component と電気泳動的に相等する component の出現がみられ、さらに反応時間を長くすることによって、より等電点の低い component の生じることを見出した¹⁹⁾。この結果は膵

Fig. 4. Peptide maps of the tryptic digests of *S*-carboxymethyl derivatives of the components P₁ and P₂.

The *S*-carboxymethylcysteinyl derivative of the enzyme (1.0 mg) in ammonium bicarbonate, pH 7.5, was incubated with 0.01 mg of trypsin at 37°C under toluene. The trypsin had been incubated with tosylphenylalanine chloromethyl ketone to inactivate chymotrypsin, if present as a contaminant. Twelve hr later, an equal amount of trypsin was added to the mixture. After 24 hr incubation, the digests were obtained as a clean solution and lyophilized. The lyophilized digests (about 300 μ g) were applied to the mid point of one side of a glass plate coated with cellulose powder (20 $\times$ 20 cm, 250 μ m thick). Electrophoresis was performed at 600 V for 2 hr; pyridine-acetic acid-water (volume ratio 2 : 50 : 500) served as the buffer.

The second run was carried out by developing at 28°C for 5 hr with the solvent, *n*-butanol-pyridine-acetic acid-water (volume ratio 15 : 10 : 3 : 12). Peptides and amino acids were detected by spraying with 0.2% ninhydrin in butanol saturated with water and heating for 5 min at 110°C.

で生合成された直後の α -アミラーゼは等電点 7.1 の component のみであること、また膵組織から α -アミラーゼの精製中にある種デアミナーゼによって修飾を受け、結果として前述の三つの component が生じたことを意味している。もちろん膵組織中にもこの種のデアミナーゼが存在し、そのホモジネートから部分精製されている²⁰⁾。

4) α -アミラーゼ活性と病気診断

健康人の血中および尿中にほぼ一定量の α -アミラーゼが認められているが、膵炎などに際しては膵由来の α -アミラーゼ活性が顕著に増大すること、また耳下腺炎時には唾液腺由来の α -アミラーゼ活性が増大することなど、血中および尿中 α -アミラーゼ活性の変動と病態との間の相関関係が高いことが知られており、この事実は病気の診断に古くから利用されている²¹⁾。しかし診断に際し、血中あるいは尿中の α -アミラーゼ活性の変動が唾液あるいは膵由来のいずれの α -アミラーゼに帰因するのかを正確に分別定量できれば診断はよりの確になるはずである。現在、そのためにいくつかの方法、たとえばアセテートセルロース膜やポリアクリルアミドゲルを用いる電気泳動法²¹⁾や小麦から単離されたインヒビターによる両 α -アミラーゼに対する阻害度合の差異を利用する方法²²⁾、また両酵素の転移反応の差異を利用する方法²³⁾などの優れた方法が開発されている。また抗膵 α -アミラーゼ抗体 (ポリクローナル抗体) を利用するラジオイムノアッセイによる方法も試みられているが²⁴⁾、前述のように両 α -アミラーゼを的確に分別定量できるとは考えにくい。以上のように臨床医学の分野では両 α -アミラーゼの的確な分別定量が強く望まれている。

5) モノクローナル抗体利用による唾液および膵 α -アミラーゼの分別定量

モノクローナル抗体²⁵⁾は抗血清、すなわちポリクローナル抗体とは異なり抗原特異性がきわめて高い。換言すれば単一の抗原決定基のみを認識する。また、一度特異的抗体産生ハイブリドーマをクローニングすれば、マウスなど実験動物の腹腔内で培養することにより、一定の抗体価を有する抗体を随時必要量を得ることのできる特質を有している。したがって、近年生体成分の分離精製のためのイムノアフィニティークロマトグラフィーのリガンドに用いられるようになった²⁶⁾。また、モノクローナル抗体は上記生体成分の分離精製のみならず、これに蛍光分析法を組み合わせることによって、生体微量成分の定量分析のみならずたがいに分子構造の酷似する生体物質の分別定量に利用できる。

Fig. 5. Specificity of monoclonal antibody determined by sandwich enzyme immunoassay with the monoclonal antibody- β -D-galactosidase.

○, human salivary α -amylase; ●, human pancreatic α -amylase.

著者らはモノクローナル抗体を利用すれば血中あるいは尿中に混在する唾液および膵由来の α -アミラーゼアイソザイムを分別定量できるのではないかと考え、両アイソザイムをそれぞれ抗原として、マウス脾細胞とマウスミエローマ細胞との融合による特異的抗体産生ハイブリドーマの作成を試みた。

通常、モノクローナル抗体の調製には、動物の免疫感作に始まって、免疫感作脾細胞とミエローマとの細胞融合、特異的抗体産生ハイブリドーマの選択とクローニング、動物腹腔内でのハイブリドーマの培養、腹水から抗体の精製とかなり長時間を要する欠点はあるが、微生物が汚染しないよう十分配慮を施せば容易にモノクローナル抗体を得ることができる。しかし、ヒト α -アミラーゼアイソザイムの場合は、両酵素分子の蛋白化学的性質があまりにも似通いすぎて、得られたほとんどすべてのハイブリドーマの産生する抗体は、反応に遅速はあるが、両 α -アミラーゼと反応した。しかし細胞融合実験の回数を重ねた結果、唾液 α -アミラーゼを抗原とした場合、膵 α -アミラーゼとまったく反応せず唾液 α -アミラーゼのみと特異的に反応する抗体産生ハイブリドーマ株を得ることに成功した²⁷⁾。この株の産生する抗体のクラスは IgG に属し、澱粉など高分子グルカンを基質とした場合、 α -アミラーゼ活性を阻害しなかった。この抗体に β -D-ガラクトシダーゼを結合させ、サンドウィッチ法によるイムノアッセイ系を組み唾液 α -アミラーゼの定量標準曲線を作成したところ、定量できる感度は 100 ng/ml で、高感度とはいいがたく、今後反応性の高い抗体産生ハイブリドーマを検索する必要がある (Fig. 5)。

一方、膵 α -アミラーゼを抗原とした場合は唾液 α -アミラーゼの場合よりも特異的抗体産生ハイブリドーマの

出現率はきわめて低い。しかし、ごく最近、10数回以上の細胞融合の結果、膵 α -アミラーゼ特異的抗体を安定して分泌するハイブリドーマ株をクローニングすることができた。この株の産生する抗体は α -アミラーゼ活性を阻害しなかった。抗体のクラスはIgG₁に分類され、酵素イムノアッセイ系で固相化抗体としても、また標識抗体としても十分使用できるきわめて安定なものであった。そこでパーオキシダーゼ結合抗体を調製し、サンドウィッチ法で膵 α -アミラーゼの定量曲線を描いたところ、少なくとも10 fmol/150 μ l 濃度まで測定できることがわかった。この感度はヒト血清中の膵 α -アミラーゼのみを測定しうるに十分であった^{28,29}。現在のところヒト膵 α -アミラーゼ特異的モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ株を取得したという報告は他に見当たらない。現在、実用化のための試験が行われているがおいに期待される。

3. ヒト α -グルコシダーゼについて

α -グルコシダーゼ [α -D-glucoside glucohydrolase, EC. 3. 2. 1. 20] は非還元末端の α -1,4-グルコシド結合を加水分解し α -グルコースを生成する酵素で、アグリコンに対する挙動から、非還元末端グルコースに結合する糖またはアグリコンの種類の影響をあまり受けない酵素と非還元末端グルコースに α -1,4結合で接続する糖がグルコースでなければ作用しない酵素の二つに大別される³⁰。後者は、さらに低分子マルトオリゴ糖によく作用するものと澱粉やグリコーゲンのような高分子によく作用するグループに分類される³¹。ここで述べる α -グルコシダーゼは後者でマルトオリゴ糖のみならず澱粉やグリコーゲンに直接作用し、 α -グルコースのみを生成する典型的エクソタイプの酵素³²である。

α -グルコシダーゼは哺乳動物の種々組織・体液に広く存在するが、その生理的意義は不明な点が多い。しかし、とくに酸性 α -グルコシダーゼについては、1963年、Hers³³らによってヒト肝にこの酵素が存在し、組織においてグリコーゲンを異常に蓄積するいわゆるPompe病(糖原病II型)の患者にはこの酵素が遺伝的に欠損することを報告して以来、数多くの研究が行われるようになり、酸性 α -グルコシダーゼはリソソームに局在し、グリコーゲン分解系にかかわっているのではないかと考えられている³⁴。また、ホスホリラーゼ欠損病(Hers病)の場合もグリコーゲン代謝の異常がみられることから³⁵、ホスホリラーゼ系とは別に α -グルコシダーゼおよび α -アミラーゼの共同作用によるグリコーゲンの分

Fig. 6. Gel filtration on a Bio Gel P-200 column of glucose-forming amylase from urine.

0.02 M acetate buffer, pH 5.8; 107 $\times$ 3.2 cm; enzyme applied, 10 ml, $A_{280\text{nm}}^{\text{cm}}=60.0$, amylase and maltase activities, 4.2 and 25.5 units/ml at pH 5.4, respectively. $\circ$, glucose-forming amylase; $\bullet$, maltase; ---, absorbance at 280 nm.

解系を考慮する必要がある³⁶。

1) ヒト尿 α -グルコシダーゼ

1967年 Franzini ら³⁷はヒト尿中に α -アミラーゼとは別に性質の異なる2種の α -グルコシダーゼの存在を報告した。それ以後、急性肝炎³⁸、尿細管障害³⁹の患者の尿では α -グルコシダーゼの活性が有意に上昇することを明らかにした研究など二、三の報告があるにすぎない。

著者らはこれらとは独立して、前述の α -アミラーゼの精製過程において、 α -アミラーゼを除去した尿の非澱粉吸着画分にマルトースのみならずグリコーゲンや澱粉を加水分解しグルコースのみを生成する酵素の存在することに気づき、とりあえずこの酵素をグルコースホーミングアミラーゼ(GFA)として報告した⁴⁰。この酵素(α -グルコシダーゼ)は α -アノマー型グルコースを反応プロダクトとして生成することがHiromi ら³²によって明らかにされている。

ついで、 α -アミラーゼを除去した濃縮尿から硫酸塩析、DEAE-セルロースやバイオゲルP-200のクロマトグラフィーなどで精製を試みたところ、部分精製ではあるが、少なくともタイプの異なる3種の α -グルコシダーゼ(F₁, F₂, F₃と仮称)を得た⁴¹(Fig. 6)。しかし、精製過程におけるDEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーの段階で活性の回収率が30%以下でありよくないことから、もう1種別の α -グルコシダーゼが存在するのではないかと考え、現在Con A-セファロースを用いて精製法の検討中であるが、上記3種の α -グルコ

Fig. 7. Photomicrographs of human kidney tissue sections stained with FITC-rabbit antibody to urine α -glucosidase F_1 .

A, proximal convoluted tubules; B, Henle's loop (late proximal); C, distal tubules; D, collecting duct; E, glomerulus. Original magnification $\times 200$.

シダーゼに加えても1種酸性側に至適 pH を有する酵素 (F_4) の存在することは確実である⁴²⁾.

2) 尿 α -グルコシダーゼの起源

上記尿中の α -グルコシダーゼの起源を知るため、まずオートプシーで得られた正常ヒト肝の α -グルコシダーゼを DEAE-セルロース、セファデックスやバイオゲルのクロマトグラフィーでほぼ純粋の状態にまで精製し、諸性質を検討したところ、作用最適 pH、澱粉やグリコーゲンに対する分解限度、分子量あるいは等電点などの点において尿中の α -グルコシダーゼ F_3 と酷似することを知り、 F_3 の起源臓器は肝由来ではないかと推定した⁴³⁾。なお、尿 α -グルコシダーゼのみならず肝酵素も単独で β -リミットデキストリンあるいはグリコーゲンをおおよそ 60~70% 以上分解することから、 α -1,6 結合も水解することは事実で、先に述べたグリコーゲン代

Fig. 8. Chromatography of α -glucosidase (B fraction) on a column of heated glutinous rice.

The eluate (75 ml, $A_{280\text{nm}}^{\text{m}} = 0.94$, activity, 2.17 units/ml) from the Bio Gel A-1.5 m column was applied to a column (2.7 $\times$ 14 cm) of the heated glutinous rice. ●, absorbance at 280 nm; ○, activity. (1) 0.01 M acetate buffer containing 0.35 saturation of ammonium sulfate, pH 5.6. (2) 0.1 M potassium phosphate buffer, pH 8.0.

謝に關与する酵素であると考えられる。

一方、尿中の α -グルコシダーゼのうち量的に最も多い F_1 を蒸煮焙焼モチ米のカラムを用いるいわゆるアフィニティークロマトグラフィーなどにより単一成分になるまで精製し、それを抗原として家兎から得られる抗血清の DEAE-セルロースカラム素通り画分から、精製 α -グルコシダーゼ F_1 をリガンドとするアフィニティークロマトで抗 F_1 抗体 (IgG) を調製して、ラジオイムノアッセイ系を組み、ヒトの種々臓器の F_1 含量を調べた^{44,45)}。その結果、 F_1 は腎に最も多く (1,000 ng/g 湿重以上)、ついで脾 (250~350 ng/g 湿重)、そのほか脾、肺の順で、血清中 (30~40 ng/ml) にも少量ではあるが含有されていた。さらに最も量的に多く含まれる腎における α -グルコシダーゼ F_1 の局在性を上記精製抗 F_1 -IgG を FITC で標識し、間接蛍光抗体法により組織化学的に検討した。その結果、 F_1 は腎の近位尿細管およびヘンレ係蹄のみに特異的に局在することを明らかにした (Fig. 7)⁴⁵⁾。

また、腎 α -グルコシダーゼと尿 α -グルコシダーゼの酵素化学的・蛋白化学的性質を比較検討するため、ヒト腎の α -グルコシダーゼの分離精製を試みた。すなわち、オートプシーで得た組織化学的に正常な腎のホモジネートより塩溶液 (pH 7.6) で抽出される画分 (S) とその残渣から 0.5% のトリトン X-100 と 0.5% コール酸で抽出される画分 (B) から上記焙焼モチ米カラムを用い

Table 1. Some properties of human α -glucosidases.

	Kidney		Urine				Liver
	S	B	F ₁	F ₂	F ₃	F ₄	
Molecular weight ($\times 10^4$)	30	30	33	17	7	—	7
Isoelectric point	4.2	4.2	4.2	4.6	4.6	—	4.6
Optimal pH	5.6	5.6	5.6	6.3	4.9	4.5	4.5
pH-Stability	5-9	5-9	5-8	5-8	5-8	—	3-8
Thermal stability (°C)	50	50	53	45	53	—	55
Inhibition with anti-F ₁ antibody (substrate, potato starch)	+	+	+	+	+	—	—
Adsorption on glutinous rice	+	+	+	+	+	—	—
Limit of hydrolysis (%)							
Potato starch	72	70	64	70	83	—	80
Glycogen	45	43	50	64	74	—	70
β -Limit dextrin	32	32	30	31	68	—	51

てそれぞれ単一成分として精製した (Fig. 8). 両画分から精製した α -グルコシダーゼの酵素化学的・蛋白化学的性質は同一で、またこれらは尿 α -グルコシダーゼ F₁ と同一性を示すことから、尿 α -グルコシダーゼ F₁ は腎由来であると結論した⁴⁶⁾. なお腎のヘンレ係蹄および近位尿細管に存在する α -グルコシダーゼの生理的意義は現在のところ不明であるが、小腸刷子縁には糖輸送系と共役している α -グルコシダーゼの存在することが知られている³⁴⁾ ように、腎 α -グルコシダーゼもグルコースの再利用に関与するのではないかと考え、現在研究をすすめている. なお Table 1 に著者らが分離精製したヒト起源 α -グルコシダーゼの性質をまとめた.

3) 尿 α -グルコシダーゼ活性の変動

ヒト血清中の α -グルコシダーゼ活性はブタやウシなどの哺乳動物のそれに比べきわめて低く、その値は2万分の1から数千分の1であり、正確な測定値を得るにはあまりにも低すぎる³⁶⁾. また血中にはどのような α -グルコシダーゼが何種存在するのか現在のところ不明である. 一方、ヒト尿中の α -グルコシダーゼの活性は血中のそれに比べ数倍高い³⁶⁾ のに加え、その起源臓器組織も明らかにされつつある. またその量は濃度依存性であるが、尿量に関係なく1日当りの総活性は一定である⁴⁷⁾. したがって病態との関係において α -グルコシダーゼ活性を追跡する場合、他の酵素とは異なり尿を試料とするほうがよいと考えられる.

著者らは通常、 α -グルコシダーゼ活性測定にはマルトリオースの末端アルデヒドを還元したマルトリリトールを基質とし (pH 5.5, 37°C), 反応によって生成す

るグルコースを Park-Johnson 法あるいはグルコースオキシダーゼ法によって測定している⁴⁸⁾. また尿の活性は著者らが工夫した多検体透析器 (サンコープラスチック 株) で透析後、透析内液に混在する前述の4種の α -グルコシダーゼ活性の総和として測定している. まず正常青年男子の尿 α -グルコシダーゼ活性を調べたところ、その活性は 2~3 munit/ml および 5~6 munit/ml の二つのグループに大別され、1日の尿中への総排泄量は 2.0~4.0 unit であった^{36, 48)}. なお尿 α -グルコシダーゼ活性と α -アミラーゼ活性の間には相関関係は認められない⁴⁷⁾. ついで入院患者の尿中の α -グルコシダーゼ活性と病態との関連性を調べたところ、カドミウム中毒患者の尿中の α -グルコシダーゼが著しく低下、あるいは0になることを認めた⁴⁹⁾. カドミウムは近位尿細管を特異的に破壊し腎障害を起こさせるといわれており、この結果は前述の α -グルコシダーゼの近位尿細管局在性を強く裏づけるものである. また小川ら⁴⁷⁾ は急性あるいは術後肺炎患者の尿中活性が有意に上昇することなどから、 α -グルコシダーゼ活性の上昇は大手術や急性肺炎のような全身に障害をもたらす病態に関与し生体エネルギー代謝やストレスの影響を受けている可能性があるとして述べている.

4. おわりに

本稿は昭和61年10月3日催されたアミラーゼシンポジウムの福本先生追悼記念シンポジウムセッションでの講演内容を中心にまとめたものである.

恩師福本寿一郎先生はアミラーゼを中心に種々微生物

酵素の基礎研究と応用開発に情熱を注がれ、輝かしい業績を残されたことは周知のとおりである。先生は「研究の端緒は応用にあり、応用を考えると微生物ほど酵素の給源にふさわしいものはない」とのお考えで、門下生に指導されてこられた。著者も学生の頃より先生のご指導のもとに細菌アミノペプチダーゼの研究に携ってきた。本稿は最近になって、著者らの研究室で取り上げたヒト尿酵素の利用開発研究の一部であるが、上記の福本寿一郎先生のお考えに沿わぬところもあり、心苦しい。しかし、ヒト尿酵素も未利用資源の一つであり、ある意味で先生のお考えに通じるものであると信じ研究を進めている。起稿に際し先生のご冥福をお祈りするしだいです。

おわりに本誌に寄稿の機を与えられたアミラーゼ研究会の関係諸先生方に、また研究遂行に当たり終始ご指導、ご鞭撻を賜った山本武彦先生に深甚の謝意を表します。また貴重な研究成果をご提供くださいました小川道雄先生、松浦貴志男先生、西中弘先生、辻野一秋先生、また、研究に加わってくださった諸兄に深謝いたします。

文 献

- 1) W. P. RABB: *Clin. Chem.*, **18**, 5 (1972).
- 2) 小川道雄: 胆と脾, **1**, 1181 (1980).
- 3) D. J. STIEFEL and P. J. KELLER: *Biochim. Biophys. Acta*, **302**, 345 (1973).
- 4) K. MATSUURA, M. OGAWA, G. KOSAKI, N. MINAMIURA and T. YAMAMOTO: *Clin. Biochem.*, **16**, 224 (1983).
- 5) 南浦能至, 梅本公雄, 辻野一秋, 山本武彦: アミラーゼシンポジウム, **7**, 69 (1972).
- 6) T. TAKEUCHI, Y. NAKAGAWA, M. OGAWA, T. KAWACHI and T. SUGIMURA: *Clin. Chim. Acta*, **77**, 203 (1977).
- 7) Y. NAKAMURA, M. OGAWA, T. NISHIDE, M. EMI, G. KOSAKI, S. HIMENO and MATSUBARA: *Gene*, **28**, 263 (1984).
- 8) 南浦能至, 山本武彦: 日本応用酵素協会誌, **16**, 13 (1981).
- 9) N. MINAMIURA, H. CHIURA, K. TSUJINO and T. YAMAMOTO: *J. Biochem.*, **77**, 1015 (1975).
- 10) N. MINAMIURA, Y. KIMURA, K. TSUJINO and T. YAMAMOTO: *J. Biochem.*, **77**, 163 (1975).
- 11) N. MINAMIURA, K. MATOBA, H. NISHINAKA and T. YAMAMOTO: *J. Biochem.*, **91**, 809 (1982).
- 12) K. ITO, N. MINAMIURA and T. YAMAMOTO: *J. Biochem.*, **95**, 1399 (1984).
- 13) N. MINAMIURA, K. ITO, M. KOBAYASHI, O. KOBAYASHI and T. YAMAMOTO: *J. Biochem.*, **96**, 1061 (1984).
- 14) O. KOBAYASHI, K. MATSUI, N. MINAMIURA and T. YAMAMOTO: *J. Chromatogr.*, **210**, 180 (1981).
- 15) O. KOBAYASHI, K. MATSUI, N. MINAMIURA and T. YAMAMOTO: *J. Biochem.*, **97**, 37 (1985).
- 16) 南浦能至: 文部省特定研究成果報告書「生物化学反応の活用による有用物質生産の基盤解析」, p. 113 (1985).
- 17) N. MINAMIURA, K. UMEKI, K. TSUJINO and T. YAMAMOTO: *J. Biochem.*, **72**, 1295 (1972).
- 18) M. KIKUCHI and K. SAKAGUCHI: *Agric. Biol. Chem.*, **37**, 1813 (1976).
- 19) M. OGAWA, G. KOSAKI, K. MATSUURA, K. FUJIMOTO, N. MINAMIURA, T. YAMAMOTO and M. KIKUCHI: *Clin. Chim. Acta*, **87**, 17 (1978).
- 20) M. OGAWA, N. SAITO, K. FUJIMOTO, M. MASUIKE, A. MURATA, G. KOSAKI, N. MINAMIURA and T. YAMAMOTO: *Electrophoresis* **81**, C. R. ALLEN and P. ARNAUD, eds., Walter de Gruyter & Co., Berlin and New York, p. 471 (1981).
- 21) T. TAKEUCHI, T. MATSUSIMA, T. SUGIMURA, T. TAKEUCHI and T. TAKEMOTO: *Clin. Chim. Acta*, **54**, 137 (1974).
- 22) M. D. O'DONNELL, O'FITZ GERALD and K. F. McGEENY: *Clin. Chim. Acta*, **23**, 560 (1977).
- 23) K. OMICHI and T. IKENAKA: *J. Biochem.*, **94**, 1797 (1983).
- 24) Y. TAKETSUKI, T. KITAHARA, K. MATSUURA, M. OGAWA, M. AZUKIZAWA, K. MIYAI and G. KOSAKI: *Clin. Chim. Acta*, **97**, 261 (1979).
- 25) G. KÖHLER and C. MILSTEIN: *Nature*, **256**, 495 (1975).
- 26) 福井三郎, 杉野幸夫: バイオテクノロジーシリーズ「モノクローナル抗体」, 講談社サイエンティフィック, 東京 (1986).
- 27) K. ITO, M. KATAYAMA, N. MINAMIURA and T. YAMAMOTO: *J. Biochem.*, **97**, 1357 (1985).
- 28) 片岡勝幸, 米村 勝, 丸山 修, 新戸 修, 伊藤和央, 南浦能至: 日本農芸化学会大会講演要旨集, p. 87 (1987).
- 29) 新戸 修, 米村 勝, 丸山 修, 片岡勝幸, 伊藤和央, 南浦能至: 日本農芸化学会大会講演要旨集, p. 88 (1987).
- 30) 山本武彦: 「酵素ハンドブック」, 田宮信雄, 丸尾文治監修, 朝倉書店, 東京, p. 499 (1982).
- 31) 千葉誠哉: 澱粉科学, **27**, 84 (1980).
- 32) S. CHIBA, K. HIROMI, N. MINAMIURA, M. OHNISHI, T. SHIMOMURA, K. SUGA, T. SUGAMURA, A. TANAKA, S. TOMIOKA and T. YAMAMOTO: *J. Biochem.*, **85**, 1135 (1979).
- 33) H. G. HERS: *Biochem. J.*, **86**, 11 (1963).
- 34) 藤盛 健: 蛋白質・核酸・酵素, **18**, 1018 (1973).
- 35) 田宮信雄, 八木達彦, 吉田 浩訳: L. STRYER「生化学(上)」, 東京化学同人, 東京, p. 355 (1977).
- 36) 山本武彦: 澱粉科学, **25**, 79 (1978).

- 37) C. FRANZINI and P. A. BONINI: *Clin. Chim. Acta*, **17**, 505 (1967).
- 38) P. A. BONINI and C. FRANZINI: *Biochim. Biol. Sper.*, **7**, 47 (1968).
- 39) P. A. BONINI, C. CERIOTTI and B. FRANZINI: *Clin. Chim. Acta*, **27**, 415 (1970).
- 40) N. MINAMIURA, K. UMEKI, K. TSUJINO and T. YAMAMOTO: *J. Biochem.*, **72**, 1295 (1972).
- 41) N. MINAMIURA, H. CHIURA, K. TSUJINO and T. YAMAMOTO: *J. Biochem.*, **77**, 1015 (1975).
- 42) 米田幸生, 南浦能至: 未発表.
- 43) K. TSUJINO, M. YOSHIMURA, K. UMEKI, N. MINAMIURA and T. YAMAMOTO: *J. Biochem.*, **76**, 1235 (1974).
- 44) 宮内啓輔, 小川道雄, 南浦能至, 山本武彦: 未発表.
- 45) H. NISHINAKA, N. MINAMIURA, K. MATOBA, M. FURUSAWA and T. YAMAMOTO: *J. Histochem. Cytochem.*, **30**, 1186 (1982).
- 46) N. MINAMIURA, K. MATOBA, H. NISHINAKA and T. YAMAMOTO: *J. Biochem.*, **91**, 809 (1982).
- 47) 小川道雄, 齊藤尚子, 神前五郎, 梶田慈道, 木田準之助, 加納邦雄, 辻野一秋, 南浦能至, 山本武彦: *澱粉科学*, **26**, 90 (1979).
- 48) K. TSUJINO, J. KIDA, K. KANO, N. MINAMIURA and T. YAMAMOTO: *Jpn. J. Clin. Chem.*, **5**, 98 (1976).
- 49) 西中 弘, 南浦能至, 山本武彦: 未発表.

【質問】

北大農化 千葉

1. α -グルコシダーゼ F₁ の至適 pH は 5.6 とのことですが, このような至適 pH をもつ動物起源 α -グルコシダーゼは通常いわれております酸性 α -グルコシダーゼ (至適 pH 4.0 付近) や中性 α -グルコシダーゼ (至

適 pH 6.8 付近) のいずれかに分けることができますでしょうか.

2. 腎 α -グルコシダーゼの腎における機能につきまして何かお考えをおもちでしたら教えてください.

【答】

1. 一言で言うと, 一般に知られている酸性 α -グルコシダーゼと中性 α -グルコシダーゼの中間に至適 pH をもつ別種のものと考えます. ヒト尿中には 4 種のタイプの異なる α -グルコシダーゼが認められますがそれぞれ至適 pH は異なります. したがって厳密に酸性および中性 α -グルコシダーゼに分けることは困難かと考えております.

2. α -グルコシダーゼは腎の近位尿細管に局在することからグリコーゲン代謝に関係するのではなく, 現在のところ糖の再吸収に関係すると考え, 研究をすすめています.

【質問】

キリン麦酒 徳川

α -グルコシダーゼを精製して, 蒸煮焙焼モチ米を用いてみようと考えられた根拠はどのようなものか, おうかがいしたい.

【答】

別にこれといった根拠はありません. ヒト尿あるいは組織の酸性 α -グルコシダーゼはセファデックスに吸着するため (一種のアフィニティークロマト), 精製は難しくありません. しかし中性 α -グルコシダーゼはセファデックスには吸着せず, その分離精製はきわめて難しいので, 可能性のある精製法をすべて試みた結果です.