泌尿器科領域におけるアルドラーゼの研究

第3報 人組織アルドラーゼ・アイソザイムの研究

徳島大学医学部泌尿器科学教室 寺 尾 尚 民
(主任: 黒川一男教授)

UROLOGICAL STUDIES ON ALDOLASE. III. WITH SPECIAL REGARDS TO ALDOLASE ISOZYMES IN HUMAN TISSUES.

Naotami Terao

Department of Urology, School of Medicine, Tokushima University.

(Director: Prof. Kazuo Kurokawa)

1) The method of horizontal starch grain zone electrophoresis was employed for the studies on ALD isozyme in the normal kidney, the bladder, the prostata as well as the respective organ tumors, the normal liver and the iliopsoas muscle.

2) The ALD isozymes, ALD I and II were confirmed for the first time in the normal prostata, the bladder, prostatic tumors (cancer and adenoma). Especially, in the normal prostata and prostatic cancer, ALD II which was failed to demonstrate with veronal buffer but borate buffer afforded the excellent electrophoresis. Protein patterns with a lower albumin peak and A/G ratio were observed in a group of kidney, liver and iliopsoas, while that with a higher albumin peak and A/G ratio, in a group of bladder and prostata.

3) Kinetics of ALD isozyme were determined as Optimum pH being 8.5-9.0, Km 0.64-0.81 $\times 10^{-3}$ M, and relatively thermostable, which were observed with little difference among isozymes.

The effectors employed included Na, K, Ca, Mg, Mn, Zn, Cu, Co, Fe²⁺, Fe³⁺, cysteine-HCl, glutathione of reduced type, ascorbic acid, 2-mercaptoethanol, EDTA, diethylstilbestrol, PCMB, hexestrol, testosterone propionate, among which only diethylstilbestrol was able to demonstrate the differences in the isozymes with ALD II more strongly inhibited.

I. 緒 言

近年、種々の疾患での臨床診断方法として体液の酵素活性測定が盛んに行なわれ、主にその補助的診断方法としての価値を発揮するに到つてきた。しかし、この際、常に我々が銘記しなければならないことは、必ずしも体液中の酵素活性が直接体内での病態生理機構を反映するとは限らないということである。

しかしながら、幾多の疾患において、特殊な酵素の増減が診断上、有力な根拠を与えるものもある。泌尿器科においては、前立腺癌と酸フォスファターゼの関係は古くから知られているが、それにもおのずからの限界がある。

この意味より、最近“chemical biopsy”として臓器内における酵素の質的測定、特異的 pattern の分析より疾患臓器の意味づけ、診断に応用せんとする試みが為

されてきている。

II. 測定材料及び測定方法

剖検あるいは手術で得た正常腎、膀胱、前立腺およびそれらの腫瘍、腸腰筋の被検臓器をホモジネートし、10,000r.p.m., 5分間遠心沈澱上清を試料酵素液とした。

実験方法は、澱粉粒ゾーン電気泳動法によつた。不溶性澱粉粒を生理的食塩水でよく洗い、pH 8.6, 0.05M Veronal-HCl buffer (Veronal buffer と略記する),あるいは0.05M Boric acid borax buffer (Borate buffer と略記する)にそれぞれ平衡させたものを支持体とした。電気泳動法は水平型スターチプレート法(2×1×50cm)により、Veronal buffer 使用では300~600Volt, 16~20時間、また Borate buffer 使用では、300~500Volt, 8.5~16時間で、それぞれ2~6mA, 5℃で行なつた。

活性測定は、Sibley および Lehninger 法に基づく高

橋, 和嶋氏に準じた。

蛋白定量は, 銅-Folin 法によつた。

III. 測定成績 (第1表)

A. 正常臓器の ALD isozyme

1. 腎

2例につき, Veronal buffer にて泳動した。活性は陰極に泳動された一つのピークを示すのみであつた。albumin fraction は陽極に泳動され, globulin fraction に比べて, そのピークは極めて低く, A/G は0.27である。また, albumin と globulin fraction の別は, 人血清で泳動さすことにより確認した (第1図)。

第1表 泳動例総括

症例 使用緩衝液	正常臓器 13例					腫瘍 22例				
	肝	腸筋 腰	腎	膀胱	前腺 立	腎癌 孟	膀胱 癌	前腺 立腫	前腺 立癌	
Veronal HCl	0/2	0/2	0/2	0/3	0/4	0/1	4/4	13/ 13	0/4	
Borate	—	0/2	—	—	2/5	—	—	3/4	3/3	

アイソザイム分離例数/泳動総例数

第1図 正常腎

2. 膀胱

3例につき, Veronal buffer にて泳動した。全例とも陰極に泳動された活性のピーク一つをみるのみであつた。albumin fraction は, 腎における pattern とは逆に非常に高く, A/G は0.69を示した (第2図)。

3. 前立腺

a. pH 8.6, Veronal buffer 使用のとき

第2図 正常膀胱

第3図 正常前立腺

4例につき泳動したが, いずれも陰極に泳動されたピーク一つをみるのみであつた。

protein pattern は, albumin fraction のピークが高く, A/G は0.59で, 腎型とは逆に膀胱型に類似している (第3図)。

b. pH 8.6, Borate buffer 使用のとき

5例につき泳動したが, 中3例では陰極にのみ泳動された活性ピーク一つをみるに止まつた。しかし, 他の2例では, 陰極および陽極に泳動された活性のピークそれぞれ一つずつをみた。これは再泳動により, isozymeであることを確認し, 陰極での活性ピークを ALD I, 陽極でのそれを ALD II と命名した。

ALD I は, albumin fraction に, ALD II は, glo-

第4図 正常前立腺

第5図 ALD isozyme 再泳動

bulin fraction に一致している (第4, 5図)。

c. pH 7.6あるいはpH 9.0 Borate buffer 使用のとき
pH 7.6の場合では、活性 ALD I および II の分離が pH 8.6の場合に比して不充分であつた。

pH 9.0の場合は、活性および protein pattern より、その酵素蛋白の易動度が非常に大きいが不安定であることが分つた。

従つて、Buffer の pH は、8.6程度が最も適當である。

4. 肝

Veronal buffer にて、2例につき泳動した。しかし、共に ALD I の活性をみるのみであつた。

protein pattern は、腎型に近く、A/G は0.24である。

5. 腸腰筋

a. Veronal buffer 使用のとき

2例につき泳動したが、ALD I のみしかみられなかつた。

protein pattern は腎型に近く、A/G は0.20であつた。

b. Borate buffer 使用のとき

2例につき泳動したが、Veronal buffer. の場合と同様、ALD I をみるのみであつた。

B. 腫瘍の ALD isozyme

1. 腎盂移行上皮癌

1例につき、Veronal buffer にて泳動したが、ALD I をみるのみであつた。

2. 膀胱癌

4例につき、Veronal buffer にて泳動したが、全例に ALD I および II のピークを認めた (第6図)。

第6図 膀胱癌腫

3. 前立腺癌

a. Veronal buffer 使用のとき

4例を泳動したが、全例共 ALD I のピークをみたのみであつた。

b. Borate buffer 使用のとき

3例全例に、ALD I および II のピークを認めた (第7図)。

4. 前立腺肥大症 (前立腺々腫と記す)

a. Veronal buffer 使用のとき

13例全例に ALD I および II のピークを認めた (第8図)。

著者が始めて ALD isozyme 分離に成功したのは、この前立腺々腫においてである。

b. Borate buffer 使用のとき

4例中3例に ALD I および II の活性ピークを認めた。

第7図 前立腺癌腫

第8図 前立腺腫

尚, protein pattern は, 正常および腫瘍共に同様の pattern を描いている。

C. ALD isozyme の Kinetics

1. Optimum pH

pH 5.5~ 8.0 phosphate buffer, pH 7.5~ 9.0 tris (hydroxymethyl) aminomethane buffer, pH 9.0~10.0 carbonate bicarbonate buffer を使って活性測定を行なった。ALD I および II 共に, pH 8.5~ 9.0にて, optimum pH をもつものと思われる(第9図)。

2. Michaelis's constant (Km)

Lineweaver-Burkの式より。

$$K_m (\text{ALD I}) \doteq 0.64 \times 10^{-3} \text{M}$$

$$K_m (\text{ALD II}) \doteq 0.81 \times 10^{-3} \text{M}$$

となり, ALD I および II の K_m は, ほぼ同じであると

第9図 Optimum pH

第10図 Michaelis's constant (K_m)

考えられる(第10図)。

3. Heat treatment

37°, 50°, 55°, 60°Cの4点にて, 1分間酵素液加温の後, 反応させた。

ALD I および II は, 共に55°C迄は比較的安定であり, 60°Cにて初めて明らかな活性低下をみている。これより, 熱処理に対しても ALD I および II の差異は認められず, しかも, 熱に対してかなり安定であることが分る(第11図)。

4. Effector (第12, 13図)

effector 液は, 0.1ml (Final concentration 10^{-4} ~ 10^{-3} M)を使用した。実線(ALD I)および点線(ALD II)は effector を加えないときの活性値を示したもので対照とした。

a. 金属イオン (Final concentration 10^{-3} M)

Na, K, Ca, Mg, Fe^{2+} , Fe^{3+} では殆んど影響を受けな

第11図 Heat treatment

第12図 Effectors.

第13図 Effectors.

かつた。しかし、Zn, Co, では中等度の、Mn, Cu では強度の反応阻害がみられた。これら金属イオンによつては、ALD I および II の差異はみられない。

b. その他

cysteine-HCl, 還元型 glutathione, ascorbic acid, 2-mercaptoethanol, EDTA, diethylstilbestrol (Honvan) (以上 $10^{-3}M$), また p-chloromercuri benzoate (PCMB),

hexestrol (Hexron), testosterone propionate (Enarmone) (以上 $10^{-4}M$) を添加反応させた。この中、PCMB, testosterone propionate では、ALD I と II に差はなく、中等度に阻害された。

hexestrol では ALD I, II も阻害を受けず、diethylstilbestrol では、ALD I が殆んど影響を受けなかつたのに比し、ALD II は強く阻害されている。

その他の添加物によつては、いずれも活性への影響はみられない。

IV. 考 案

ALD は、1934年 Meyerhof および Lohman によつて家兎骨格筋中に発見され、1943年 Warburg らが、シロネズミの骨格筋より結晶として取出している。

1957年には、Kaletta-Gmünderらにより、肝中に2つの ALD の存在が指摘された。一つは筋中 ALD に似た主に Fructose-1-6-phosphate (F-1-6-P) に働く酵素また他は Fructose-1-phosphate (F-1-P) のアルドール分解を可能にする新しい酵素である。1959年 Drechsler らは、carboxypeptidase により筋 ALD は F-1-6-P に対する触媒作用が減退するが、F-1-P に対する作用には変りはないと報告した。また、Rutter らは、筋 ALD と肝 ALD は異なることを carboxypeptidase による活性の変化より指摘しており (1961年)、さらに、ALDF-1-6-P/F-1-P 活性比の高い、主に筋中に存在する ALD を“ALD A”, また、活性比の低い、かつ免疫化学的に抗筋肉型 ALD とは反応しない肝中にみられる ALD を“ALD B” とよんだ (1963年)。

同年、Schapira らは、Hepatoma における F-1-6-P および F-1-P ALD の変動を指摘し、従来の“quantitative”な考え方より脱皮して qualitative chemical biopsy”としての意義を報告している。

この頃より、直接 ALD isozyme の分離が試みられるようになってきた。1963年、Bär および Schmidt らは、ヒト正常大腸粘膜と大腸癌にて、DEAE cellulose を用いて ALD isozyme 分離を試みているが、成功してはいない。しかし、同年 Ziegemein は、ラッテの筋と ALD の DEAE cellulose への吸着の相違を指摘している。

1965年 Spolter らも、家兎筋と肝 ALD を種々の生化学的性質より区別している。同年 Christen らは、澱粉ゲル電気泳動で家兎筋および肝 ALD を分離している。

このように ALD isozyme の起りは、筋と肝中におけ

る ALD についてであり、その異同が追求されてきたが、主に次の諸点について検討されてきたといえる。

1) 基質特異性

F-1-P および F-1.6-P に対する Kinetics

2) Isozyme の同定

i) Immunochemistry

ii) Column chromatography

iii) Electrophoresis

ALD が isozyme として初めてその kinetics が明らかにされたのは、1963年 Woodfin & Rutter によつてであろう。家兎肝より電気泳動的に2つのタイプのALDを分離し、各々を結晶として抽出している (RLA 1 および RLA 2)。

これらは、家兎筋 ALD (RMA)とは、その kinetics より異なるものであり、特に RMA と RLA 1 とは免疫化学的にも明らかに相違したものであると述べている。

著者は膀胱癌、正常前立腺、前立腺癌および腺腫から始めて ALD isozyme を分離した。

A. ALD 活性パターンについて

Veronal buffer 使用のとき：

全ての正常肝、腸腰筋、腎、前立腺および腎盂癌、前立腺癌では、ALD I のみしかみられなかつたが、膀胱癌、前立腺々腫では、全例に ALD I と II がみられ、正常臓器でみられなかつた ALD II の出現が特異的である。

Borate buffer 使用のとき：

Veronal buffer で ALD II のみられなかつた正常前立腺では、5 例中 2 例 (40%)、前立腺癌では 3 例全例 (100%) に、また、全例にみられた前立腺々腫 4 例中 3 例 (75%) に ALD I および II が検出され、やはり腫瘍で ALD II の出現率が高い。

さらに、ALD I はいずれの場合にもみられ、ALD II の出現は、まちまちで、ALD II の失活傾向の大きいことが推定される。

腫瘍において、ALD II が出現し易い傾向にあることは、すなわち、解糖系代謝異常をきたしてくるためのものと考えられる。

B. 蛋白パターンについて

正常臓器と腫瘍との間には、同様のパターンがみられる。腎、肝、腸腰筋では、albumin のピーク、A/G が低く、一方、膀胱、前立腺では、albumin ピーク、A/G は高い値を示している。すなわち、腎と膀胱、前立腺パターンとは逆転型をなしている。

C. ALD isozyme の Kinetics

optimum pH では、Herbert ら、Sibley および Lehninger によれば、pH 8.5～9.0を、Dounce と Beyer らは結晶 ALD で pH 7.3を、更に1949年には、Sibley & Lehninger 法によれば、pH 7.3と 8.3をそれぞれ報告している。また、Jiménez らは、tris (hydroxymethyl) aminomethane buffer 使用で pH 7.5～9.0, phosphate buffer では、pH 7.5附近で最高反応速度が得られると述べている。Woodfin & Rutter によれば、RMA で pH 6.8～9.0, RLA 1 および 2 で pH 7.5～8.0を Optimum pH としている。

以上、optimum pH については、一定していないが、酵素の純度、また使用 Buffer の種類、その他の測定条件によつて異つてきているものであろう。

著者の測定結果では、ALD I, II ともに差はなく、Optimum pH は 8.5～9.0の間にみられ、これは Herbert ら、Sibley および Lehninger の報告値に近いものである。

Km は、Sibley および Lehninger は、 $1 \times 10^{-3}M$ 、Dounce および Beyer も $1 \sim 2 \times 10^{-3}M$ 、Herbert らも同様の値を示している。

著者の crude homogenate よりの測定値は、ALD I および II の Km は、ほぼ等しく、3 者の報告とほぼ一致している。

Heat treatment について

Sibley および Lehninger は、pH 8.6で38°C、Dounce および Beyer は、pH 7.2で30～35°Cを至適温度としている。しかし、Sibley らは、結晶 ALD では、38°Cが至適温度だが、crude homogenate の場合は50°Cといつており、これは恐らく高温で ALD を安定さす要素が crude homogenate の中に含まれているからであろうと述べている。また、低温での crude homogenate の安定性も保証されている。Sibley ら、杉田らは数時間、加藤は2～3時間、更に ALD 結晶液で高橋、和嶋は、3日間安定であるとしている。

著者の実験でも酵素液 1 分間熱処理後の活性測定の結果は、37～55°Cまでは、殆んど変動せず60°Cにて始めて低下をみており、熱に対して安定であることを示し、ALD I および II ともに同様の傾向である。

effector については、1943年 Warburg および Christian は、筋 ALD は、焦性磷酸塩、 α - α' -dipyridyl, glutathione らによつては阻害を受けず、筋肉より得た結晶 ALD は、重金属イオンがなくても活性であると報

告している。

Dounce & Beyer, Hsu は Cu による阻害を報告、更に Hsu は、Fe* で僅かに活性の上昇をみ、Zn, Mg, Fe* では影響のみられないこと、Cu の阻害作用は、minosine 添加により失なわれるとして、minosine の metal action への保護作用を認めている。前立腺に含有量の比較的高い Zn に中等度に阻害されるが、その生理的作用は不明である。また、阻害作用を利用することによつて、臨床治療面への応用もみられる。石原らは、精製 ALD 酵素に対して Toyomycin は、competitive inhibition を、Mitomycin C に対しては、non-competitive inhibition を与えるという実験結果より子宮癌患者への制癌剤投与の参考としている。

また、ALD への直接の作用ではないかも知れないが、高 ALD 血症に対するホルモン作用も報告されている。すなわち、Schapira, Thompson らによつて、高 ALD 血症に ACTH, steroid 投与を行い、結果その低下をみている。

hextestrol では全く阻害を受けず、diethylstilbestrol- (Honvan) で、ALD I は殆んど影響を受けないのに対して、ALD II は強度の阻害を受けている。このことは、前立腺腫瘍組織で ALD II が分離されやすいこと、非前立腺癌患者また前立腺癌患者の血清 ALD 値が diethylstilbestrol 投与により下降すること¹³⁾などを考え併せると関連性が推定される非常に興味深い点である(第5編参照)。

testosterone による阻害の意味は現在のところ不明である。

V. 結 論

1. 澱粉粒ゾーン電気泳動法により、正常腎、膀胱、前立腺およびそれらの腫瘍、正常肝、腸腰筋の ALD isozyme を追求した。

2. 正常前立腺、また膀胱、前立腺腫瘍(癌、腺腫)にて ALD isozyme (ALD I および II) を始めて確認した。特に、正常前立腺、前立腺癌では、Veronal buffer 使用時にみられなかつた ALD II が、より易動度の優れた Borate buffer 使用にて初めてみられた。

蛋白パターンでは、albumin のピーク、A/G の低い腎、肝、腸腰筋型と、逆に高い膀胱、前立腺型とに分かれる。

3. ALD isozyme の Kinetics を調べた。optimum pH は 8.5~9.0, Km は $0.64 \sim 0.81 \times 10^{-3} M$, heat treatment では、比較的热に安定であることが分り、上

記3者では、いずれも isozyme での差異はみられなかつた。

しかし、effector として、Na, K, Ca, Mg, Mn, Zn, Cu, Co, Fe*, Fe*, cysteine-HCl, 還元型 glutathione, ascorbic acid, 2-mercaptoethanol, EDTA, diethylstilbestrol, PCMB, hextestrol, testosterone propionate を使用したが、この中、diethylstilbestrol によつてのみ isozyme の差異がみられ、ALD II の方が強く阻害された。

文 献

- 1) Bär, U., Schmidt, E. and Schmidt, F.W.: Klin. Wschr., 41, 977, 1963.
- 2) Christen, Ph., Göschke, H., Leuthardt, F. and Schmid, A.: Helv. Chim. Acta, 48, 1050, 1965.
- 3) Dounce, A.L. and Beyer, G. T.: J. Biol. Chem., 173, 159, 1948.
- 4) Dounce, A.L., Barnett, S.R. and Beyer, G.T.: J. Biol. Chem., 85, 769, 1950.
- 5) Drechsler, E.R., Boyer, P.D. and Kowalsky, A.G.: J. Biol. Chem., 234, 2627, 1959.
- 6) Greenstein, J.P.: Cancer Res., 16, 641, 1956.
- 7) Herbert, D., Gordon, H., Subrahmanyam, V. and Green, D.E.: Biochem. J., 34, 1108, 1940.
- 8) Hsu, L.H.: J.F.M.A., 62, 464, 1963.
- 9) Ishihara, M., Terao, T. and Kakehashi, H.: Obstetr. Gynec. Ther., 8, 67, 1964.
- 10) Jiménez, E.S., Lee, E., Torres, J. and Soberón, G.: J. Biol. Chem., 239, 4154, 1964.
- 11) Kato, Y.: Jap. J. Gastroent., 58, 1333, 1961.
- 12) Kaletta-Gmünder, U., Wolf, H.R. and Leuthardt, F.: Helv. Chem. Acta, 40, 1027, 1957.
- 13) 黒川一男: 日泌尿会誌, 57, 960, 1966.
- 14) Markert, C.L. and Ursprung, G.H.: Develop. Biol., 5, 363, 1962.
- 15) Meyerhof, O.U. and Lohman, K.: Biochem. Z., 271, 89, 1934.
- 16) Meyerhof, O., Lohman, K. und Schuster, Ph.: Biochem. Z., 286, 301, 1936.
- 17) Potter, V. R., Pittot, H. C., Ono, T. and Morris, H.P.: Cancer Res. 20, 1255, 1960.
- 18) Rutter, W.J., Richard, O.C. and Woodfin, B.M.: J. Biol. Chem., 236, 3193, 1961.
- 19) Rutter, W.J., Blostein, R.E., Woodfin, B.M. and Weber, C. S.: Advances in Enzyme Regulation., 1, 39, 1963.
- 20) Schapira, F.: Compt. Rend. Soc. Biol., 148, 1997, 1954.
- 21) Schapira, F., Deryfus, J.C. and Schapia, G.: Nature, 200, 995, 1963.

- 22) Sibley, J.A. and Lehninger, A.L.: J. Biol. Chem., 177, 85, 1949.
- 23) Spolter, P.D., Adelman, R.C. and Weinhouse, S.: J. Biol. Chem., 240, 1327, 1965.
- 24) 杉田秀夫, 服部信, 豊倉康夫: 最新医学, 13, 213, 1958.
- 25) 高橋浩, 和嶋毅: 臨床病理, 11, 343, 1963.
- 26) 寺尾尚民: 日泌尿会誌, 59, 91, 1968.
- 27) Thompson, R.A. and Vignos, P.J.: Arch. Int. Med., 103, 551, 1959.
- 28) Warburg, O. and Christian, W.: Biochem. Z., 314, 149, 1943.
- 29) Warburg, O. and Christian, W.: Biochem. Z., 314, 399, 1943.
- 30) Woodfin, B.M. and Rutter, W.J.: Fed. Proc., 22, 483, 1963.
- 31) Ziegemein, R.: Klin. Wschr., 41 : 1164, 1963.

(昭和43年 4 月 2 日受付)