原 著

クマリン誘導体を基質とした血清ロイシンアミノ
ペプチダーゼの新しい微量蛍光測定法A Novel Fluorometric Ultramicro Determination of Serum Leucine
Aminopeptidase Using A Coumarine Derivative

西 福 幸 二*

KOJI SAIFUKU M.D.

金岡らは leucine aminopeptidase (LAP) の基質として新たに 7-L-leucyl-4-methylcoumarinylamide (LMC) を合成し、精製ブタ腎 LAP により分解されることを報告した。これは LMC の水解によって生じた 7-amino-4-methylcoumarin (AMC) の蛍光スペクトルが大きく赤方に移動し、基質に比べて蛍光強度も著しく高いことを利用したものである。われわれは、LMC を用いたヒト血清 LAP の新しい蛍光測定法を確立するために基礎的な検討を行なった。活性測定は、0.11 mM LMC と 5% (v/v) dimethylsulfoxide を含む 50mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) 2.0ml に 10 μ l の血清を加え、37℃で行なった。酵素活性は、AMC に由来する 440nm の蛍光の強度を経時的に 5 分間記録し、活性を計算した。水銀燈の 365nm の輝線を用いて励起するわれわれの条件下では、血清アルブミンによる基質の吸着や、ヘモグロビンの内部蛍光効果などは無視することができた。また高度なビリルビン血症による内部蛍光効果については、対照をおくことによって簡単に補正することができた。この蛍光測定法を用いて得られた活性値は、従来の Goldbarg 法とよい相関を示した。われわれの測定法は、極めて少量の血清で測定可能であり、また非常に簡単・迅速であるので、連続多試料分析には最も適していると考えられた。

Leucine aminopeptidase (LAP) は、leucine を N 末端にもつ peptide を加水分解して、leucine を遊離させるタンパク分解酵素である¹⁾。しかし、N 末端が leucine 以外の α -アミノ酸であっても、また peptide でなく leucine と他のアミノ基をもつ物質とのアミドであっても加水分解することが知られている¹⁾²⁾。LAP は腎に最も多く、小腸・脾・肝がこれに次ぎ、癌組織にも多いといわれる³⁾⁴⁾。血中活性レベルの上昇は主として肝胆道系疾患にみられ、胆汁移送障害を反映するため、alkaline phosphatase, α -glutamyl transpeptidase, 5'-nucleotidase などとともに、いわゆる胆管

酵素として広く臨床に応用されている。現在 LAP 定量法には、Green 法⁵⁾を改良した Goldbarg らの方法がもっとも広く用いられており、これは L-leucyl- β -naphthylamide を基質として遊離する β -naphthylamine を比色定量するものである⁶⁾。このほかには leucylglycine, leuciamide を基質とする測定法が知られている⁷⁾⁸⁾⁹⁾。微量測定法としては、L-leucylglycine を基質としたニンヒドリン呈色法 (Fleischer)⁷⁾⁸⁾と、生成する β -naphthylamine の直接蛍光測定法 (Rockerbie-Roth) が知られているが、前者は操作が煩雑であり、後者は感度が低く、測定に 30 分を必要とする⁹⁾¹⁰⁾¹¹⁾。金岡らは、LAP の基質として新たに 7-L-leucyl-4-methylcoumarinylamide (LMC) を合成し、これが精製ブタ腎 LAP により分解されることを報告

* 順天堂大学医学部内科学教室 (消化器)
Department of Internal Medicine, Juntendo
University, School of Medicine
(Jan., 27, 1978 受付)

した¹²⁾。Zimmerman らは、キモトリプシン活性を蛍光測定するために 7-glutarylphenylalanin-amido-4-methylcoumarin を用いたが¹³⁾、その場合と同様に LMC の水解によって生じた 7-amino-4-methylcoumarin (AMC) の蛍光スペクトルは大きく赤方移動し、蛍光強度も基質に比べて高いので、血清中の LAP 活性測定に応用しうるものと考えられた。われわれは、この方法を実用化するために基礎的検討を行ない、特に臨床検査室で多用されている中圧水銀燈を光源とする 蛍光光度計で測定できる条件を検討した。

材料および方法

1) 酵素試料

酵素試料としての血清は、肝機能検査 (GOT, GPT, AL-P, LAP, BILIRUBIN, γ -GTP, TTT, ZTT) で異常を認めない健康人 21 名と、当内科に入院中の肝胆道系疾患患者 20 名 (acute hepatitis: 3, chronic hepatitis: 3, liver cirrhosis: 5, hepatoma: 2, liver abscess: 1, cholelithiasis: 1, pancreatitis: 2, pancreatic cancer: 2, cholangioma: 1) より採取したものを用いた。血清は、採血後すみやかに血清分離し、これを低温保存 (0~4°C)、2 日以内に測定に供した。明らかな溶血をみとめたものは試料として用いなかった。

2) 試薬

LMC と AMC はそれぞれ金岡らの方法¹³⁾、および Von Pechmann と Schwarz らの方法¹⁴⁾によって合成したものを、金岡博士により供与された。脱脂ウシ血清アルブミンは Sigma 社、非脱脂ウシ血清アルブミンは国産化学のものを、また結晶ヒトヘモグロビンは N. B. C 社のものを用いた。

3) 蛍光測定

LMC と AMC の蛍光強度は、50mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0, 37°C) 中で、日立分光光度計 203 型により 365nm の輝線で励起し、440nm で測定した。励起蛍光スペクトル、および偏光度の測定は日立分光光度計 MPF 3 型で、吸収スペクトルは Cary 17 型で測定した。

4) 酵素活性の測定

37°C で反応液 (0.11mM LMC, 5% (v/v) DM SO, 50mM Tris-HCl 緩衝液 pH 8.0) 2.0mℓ に血清 10μℓ を加え、直ちに十分攪拌し、5 分間蛍光強度の増加を記録する。この直線より 1 分間当りの蛍光増加分を求めて F とする。ついで、光度計の測定条件をそのままにして血清コントロールを測定する。すなわち、AMC 標準液 (反応液の LMC の代わりに 1.0μM AMC を用いる) に 10μℓ の同血清を加えて十分攪拌後、その蛍光強度を読む (F₀)。これより活性値は次式によって求められる (表 1)。

$$\text{I.U./}\ell = \frac{F}{F_0} \times 200 \times 2$$

METHOD FOR LAP MEASUREMENT

1. Reagents.

a. Substrate solution.

0.11mM LMC in 50mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) containing 5% (v/v) DMSO.

b. Control solution.

0.001mM AMC in 50mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) containing 5% (v/v) DMSO.

2. Procedure.

a. Substrate solution.

2.0mℓ.

Serum.

10.0μℓ.

incubation for 5 min at 37°C

Excitation at 365nm.

Emission at 440nm.

F = Δ fluorescence intensity for 1 min.

b. Control solution.

2.0mℓ.

Serum.

10.0μℓ.

F₀ = fluorescence intensity.

3. Calculation.

$$\text{I.U./}\ell = \frac{F}{F_0} \times 200 \times 2$$

表 1

結 果

1. LMC・AMC の蛍光特性

図 1, 2 に、それぞれ LMC, AMC の励起・蛍光スペクトルおよび濃度・蛍光強度曲線を示す。自己消光は LMC よりも AMC で強く起こった (図 2)。

生産物 AMC の蛍光に対する基質 LMC の影響を検討すると、一定量の LMC に対して AMC

図1 Fluorescence of spectra of LMC and AMC at pH 8.0.
Left: excitation spectrum, right: emission spectrum. -----; LMC, —; AMC.

を(図3a), また AMC に対して LMC を段階的に加えると(図3b), 前者では消光は認められなかったが, 後者では LMC の増量に伴って蛍光強度の減少が認められた. 以上の結果をまとめて表2に示す.

励起光, および蛍光が共存物質によって内部消光効果をうけるとき, これを補正した蛍光強度 I_0 は式(1)によって表わされる.

$$I_0 = I \times \frac{\epsilon_a \cdot C}{(1 - e^{-\epsilon_a \cdot C}) \cdot e^{-\frac{\epsilon_f \cdot C}{2}}} \quad (1)$$

I_0 は内部消光効果のないときの蛍光強度. C , ϵ_a , ϵ_f はそれぞれ消光物質の濃度, 励起波長および蛍光観測波長での分子吸光係数. ただしセルは1cm角.

(1)式によって観察された I から I_0 を求めると, 図3bに示すように消光は完全に補正された.

2. ヒト血清 LAP の反応速度および K_m 値

0.025~0.375mM の LMC を基質としたときの LAP 水解反応の時間経過は, 少なくとも20分間は完全に直線的であった(図4).

用いた血清量と一定時間後の AMC の生成量は血清を20 μ l 以下, すなわち, 100 倍以上に希釈した場合ではよく比例した(図5).

ヒト血清 LAP の K_m は Woolf プロットから,

図2 Concentration dependence of the fluorescence of LMC (a) and AMC (b).
Cotitions: excitation; 365nm, emission; 440nm. 5% (v/v) DMSO, 50mM Tris-HCl buffer pH 8.0 at 37°C.

The data obtained at higher concentrations were shown in the inserted figures.

0.11 mM (37°C, pH 8.0) と計算された(図6). 図4でもみられた高濃度基質での速度の相対的な低下は, (1)式によって LMC による AMC 蛍光に対する内部消光効果を補正すると反応速度低下は

(a)

(b)

図3 Quenching of LMC fluorescence by AMC (a) and visa versa (b). Conditions were the same as in Fig. 2.

a. 0.05mM LMC, b. 0.001mM AMC.

消失した(図6, ●印).

3. 血清中の消光物質

1) アルブミン

LMC および AMC のアルブミンへの吸着を検

図4 Time course of the hydrolysis of LMC by human serum. human serum of 10μℓ was added to 2.0mℓ of standard reaction mixture (see the legend for Fig. 2.) with 1 : 0.375mM, 2 : 0.25mM, 3 : 0.20mM, 4 : 0.10mM, 5 : 0.05mM, 6 : 0.025mM LMC.

討すると、図7aに見られるように、LMCの蛍光強度は添加脱脂ウシ血清アルブミン量を増加すると大きく増加した。しかし、非脱脂ウシ血清アルブミンを添加した場合は、蛍光強度の増加は軽度であった(図7a)。これに対してAMCの蛍光強度は、脱脂・非脱脂アルブミンによってほとんど影響されなかった(図7b)。このとき添加アルブミンの増加に伴いLMC、AMCの蛍光偏光度が増加する傾向がみられた。図には示していないが、実際に用いる血清10μℓ中に含まれるアルブミン量(終末濃度0.2mg/ml以下)では、反応速度に対する基質吸着の影響は全くみられなかった。このことは図5の結果からも明らかである。

2) ヘモグロビン

ヘモグロビンは 10^{-6} M(サブユニット換算)をこえるとAMCの蛍光を強く消光した(図8)。ヘモグロビンの吸収による内部消光効果を(1)式を用いて補正しても、なお消光がみられた。この補正蛍光強度とヘモグロビン濃度の関係は、Stern-

図 5 Dependence of LMC hydrolysis on the amount of serum. The volume of the reaction mixtures added with human serum was 2.0ml. LMC was 0.011mM.

図 6 Woolf plot of LAP. The volume of serum added was 10μl and the measurement was carried out at 25°C. For the other conditions see the legend for Fig. 2. ●; values of the AMC fluorescence corrected by the equation (1) described in the text on LMC quenching.

図 7 Effect of bovine serum albumin on the fluorescence and polarization of LMC (a) and AMC (b). 0.125mM LMC and 0.001mM AMC. ○: non-defatted albumin, ●: defatted albumin.

図8 Quenching of the AMC fluorescence by hemoglobin. ○; fluorescence of 0.001 mM AMC, ●; the values corrected by the equation (1) on the inner filter effect of hemoglobin. Inset: Stern-Volmer plots of the corrected fluorescence vs. hemoglobin concentration.

図9 Quenching of the AMC fluorescence by serum bilirubin. ○; fluorescence of 0.001 mM AMC in the presence of the serum of a patient with hyperbilirubinaemia (10.0 mg/dl) ▲; corrected by the equation (1). ●; corrected by the equation (2)

Volmer の関係を満足し (図8の挿入図), 消光定数 K_q は $1.47 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ と求められた。

3) ビリルビン

抱合型ビリルビンは不安定であること, 非抱合型ビリルビンは水に不溶であることから, 試料としては高ビリルビン血症を示した閉塞性黄疸患者血清 (総ビリルビン濃度 10.0 mg/dl) を用いた。

標準液 2.0 ml に対して血清が約 10 μl 存在する場合には, AMC の蛍光は約 10% 消光された (図9)。

(1) 式を用いてビリルビンの吸収による内部濾光効果を補正してもなお消光がみられた (図9, ▲印)。

この補正值とビリルビン濃度の関係は Stern-Volmer の関係を満足し, 消光定数 K_q は 0.55 dl/mg であった。Stern-Volmer の式と (1) 式より, 補正式として (2) 式を用いることができる。

$$I_0 = I \times \frac{a \cdot e^{-\frac{b}{2}} \cdot (1 + 0.55c/f)}{1 - e^{-a}} \quad (2)$$

a, b は血清 200 倍稀釈液のそれぞれ 365, 440 nm における吸光度 (O.D.), C は血清のビリルビン濃度 (mg/dl), f は反応液における血清の稀釈倍率 (この場合は 200)。

得られた消光曲線をこの式で補正すると, 消光はほぼ完全に補正された (図9, ●印)。補正值が高濃度域で対照値 (ビリルビン濃度 = 0 mg/ml) をわずかに上回っていた。

4) その他の消光物質

患者血清中のヘモグロビン, ビリルビン以外の消光因子の存在を検討した。溶血がなく高ビリルビン血症でない健康人, 患者血清では, 10^{-6} M の AMC に対する消光はほとんど認められなかった。

5) 血清中の蛍光物質

5% DMSO を含む 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) 2.0 ml に 10 μl の血清を加え, 37°C で活性測定と同じ励起・蛍光波長で血清自身の蛍光を測定したところ, 健康人・患者のいずれの血清においても $3 \sim 9 \times 10^{-9} \text{ M}$ AMC に相当する蛍光物質が認められた。セルロースアセテート電気泳動法によって, この蛍光物質はアルブミン分画に存在することが確認されている。

図 10 Correlation between the values obtained by the fluorometry and Goldbarg-Rutenburg method. Correlation coefficient was 0.9897.

4. ヒト血清LAP活性測定の標準法および本法と Goldbarg 法との相関

以上の検討結果から、方法 4) に示すような反応条件を決定した。Km に等しい基質濃度で得た速度を 2 倍して Vmax を求めた。単位は生成 AMC μ moles/min/serum l (国際単位/l) とした。

本法に基づく測定値は Goldbarg 法による活性値とよい相関を示した (相関係数 0.9897) (図 10)。なお健康人の LAP 値 (男 11 例, 女 10 例) の平均値および標準偏差は 55.2 ± 10.6 I. U. /l であった。

考 察

従来 LAP 活性測定に用いられてきた Goldbarg 法は、血清 50~100 μ l を要し、さらにその酵素反応には 15 分から 30 分を必要とするが、著者の測定法によれば 5 分 (1 分でも可能) という極めて短い反応時間で、しかも、10 μ l という少量の血清を用いて活性を測定することができる。著者が励起波長として選んだ 365nm での LMC の分子吸光度 ϵ は 700 であるから (表 2)、基質濃度 0.11mM では吸光度にして 0.077 にすぎず、基質による吸収は AMC の励起にはほとんど影響しない。

一般に酵素活性測定では Vmax を測定するのが常識であり、Km 値の 50~100 倍の基質濃度を用いる。したがって、LAP の Km が 0.11mM であることから、10mM 程度の基質濃度を用いることが望ましい。しかしながら、0.15mM 以上では LMC 自身の濃度消光があり (図 2a)、また 0.15mM 以上では生産物 AMC の蛍光に対する内部消光効果が無視できないので (図 3b)、基質濃度として Km 値に等しい 0.11mM を採用した。この時の速度を 2 倍すれば、Vmax が得られるので実用上全くさしつかえない。このような、飽和基質濃度より稀薄な基質濃度においても、図 4 に示したように少なくとも 20 分間は一定の反応速度を示すのは、生産物の蛍光強度が極めて大きいため、反応時間中の基質量の分解は 100 分の 1 以下に留まるので、基質量低下に基づく反応速度の低下が実質

OPTICAL PARAMETERS OF LMC AND AMC AT pH 8.0
The reagents were dissolved in 50mM Tris-HCl buffer pH 8.0

	LMC	AMC
Excitation maximum (nm)	327	345
Emission maximum (nm)	390	440
Relative fluorescence at 440nm excited at 365nm	1	138
ϵ at 365nm	700	16200
ϵ at 440nm	0	0
Upper limit of the concentration without self quenching (μ M)	150	5

表 2

的に起こらないためである。しかしながら、著者の採用した低基質濃度では、血清中に基質吸着物質が存在するときは、大きな誤差を与える。蛍光強度および偏光度の増加から（図 7a）、脱脂アルブミンは基質である LMC と吸着するものと考えられる。しかし、反応液中の脱脂アルブミン添加濃度を増しても反応速度の低下は認められなかった。このことより、LMC のアルブミンによる吸着は、反応速度に影響を与えないほどわずかであると考えられる。よって図 5 に示された使用血清量増加に伴う相対的な反応速度の低下は、血清アルブミン以外の血清蛋白成分と、LMC との相互作用によるものと思われた。

著者の成績は、今後ますます多用されると思われる微量蛍光測定法の開発に当って、特に蛍光性基質、ないしは生産物の血清蛋白成分への吸着を十分に検討する必要があることを示している。ヘモグロビンは、多くの蛍光物質の励起波長と重なる近紫外部に強いポルフィリン由来の吸収帯を持つため、強い内部消光効果をもつ。著者の実験によって、さらに AMC に対して相互作用による強い消光作用をも示すことが明らかとなった（図 8）。しかしながら、肉眼的に溶血していない血清を 10 μ l 用いる限り、ほとんど活性値に影響しないことが確かめられた。ビリルビンは肝疾患患者血清には避けられない蛍光妨害物質であり、たとえば、10.0mg/dl の高ビリルビン血症では約 10% の消光がみられた（図 9）。ビリルビンの場合も、内部消光効果以外に相互作用に基づく消光が認められ、この両者は式(2)によって補正されることがわかった。その補正値は添加ビリルビン血清を増量するにつれて対照値を上回ってくるが、これはビリルビンによって消光をうけていた血清自身のもつ蛍光によるものと思われた。症例中一人だけ 4×10^{-8} M の AMC に相当する蛍光物質を血清中に認めたものがあったが、このような場合、 F_0 は AMC 標準液の蛍光強度を上回ってしまう。そこでこのような症例についてはあらかじめ血清中の蛍光物質 (F_s) を測定し、次式によって活性値を求めなければならない。

$$I.U./l = \frac{F}{F_0 - F_s} \times 200 \times 2$$

以上より、著者の条件下では LAP 活性測定の障害となる血清中の因子は存在しない。実際、種々の肝胆道系疾患の血清において Goldbarg 法とよい相関 (0.9897) が得られた。ただし、LAP 活性の高い検体については、本法との間に多少の差異が認められた。この原因については追って検索するが、Goldbarg 法自身にも問題があるので、この表から除いた。

今回著者は、発蛍光基質を用いて、より短時間で、より少量の血清量でも可能な LAP 活性の rate assay を確立したわけであるが、これらの特徴は連続多試料分析には極めて都合がよい。ただし、各試料ごとに血清コントロールを測定しなければならない。そこでヘモグロビンや、ビリルビンの内部消光効果をうけない波長域に励起・蛍光最大波長を有する生産物を生ずるような新しい蛍光基質の開発が強く望まれる。

本研究に際して、ご懇篤なるご指導を賜った関根隆光教授、また本論文に懇切なるご校閲を頂いた浪久利彦教授に深甚なる感謝の意を表します。あわせて終始細部にわたってご協力をいただいた山本啓一氏ならびに生化学教室員の諸氏に感謝致します。

文 献

- 1) Smith, E. & Bergmann, J. : Peptidase of intestinal mucosa.: J. Biol. Chem. **153**, 627~651, 1944.
- 2) 柴田 進 : Leucine aminopeptidase. : 臨床化学の実技, 定量篇, p. 221, 金原, 東京, 1971.
- 3) 柴田 進 : Leucine aminopeptidase : 病態生化学その基礎, p. 173, 金芳堂, 東京, 1974.
- 4) Phillips, R. & Manildi, E. : Elevation of leucine aminopeptidase in disseminated malignant disease : Cancer. **26**, 1006~1012, 1970.
- 5) Green, M.N, Bressler, R, Tsou, K. & Seligman. A.M.: The colorimetric determination of leucine aminopeptidase activity with L-leucyl- β -naphthylamide hydrochloride.: Arch. Biochem. Biophys. **57**, 458~474, 1955.

- 6) Goldbarg, J. & Rutenburg, A.: The colorimetric determination of leucine aminopeptidase in urine and serum of normal subjects and patients with cancer and other disease: *Cancer*. **11**, 283~291, 1958.
- 7) Fleischer, G.: Peptidase in human blood. 1. The hydrolysis of glycylglycine and glycyl-L-leucine by normal serum: *J. Biol. Chem.* **205**, 925~934, 1953.
- 8) Fleischer, G. Butt, H. & Huizenga, K.: Enzymatic hydrolysis of L-leucylglycine in serum in hepatic disease: *Pro.Staff. Meet. Mayo. Clin.* **32**, 410~424, 1957.
- 9) 伊東 進 : Ammonia 直接比色定量法を応用した leucine aminopeptidase 測定法の臨床的意義について : *日消会誌*, **71**, 44~58, 1974.
- 10) Rockerbie, R. & Rasmussen, K.: An ultramicro method for the fluorometric determination of leucine aminopeptidase in serum: *Clin. Chim. Acta.* **18**, 183~185, 1967.
- 11) Roth, M.: Une ultramicro method fluorimétrique pour le dosage de la leucine aminopeptidase dans les liquides biologiques: *Clin. Chim. Acta.* **9**, 448~453, 1964.
- 12) Kanaoka, Y., Takhashi, T. & Nakayama, H. : A new fluorogenic substrate for aminopeptidase: *Chem. Pharm. Bull.* **25**(2), 362~363, 1977.
- 13) Zimmerman, M., Yurewicz, E. & Patel, G.: A new fluorogenic substrate for chymotrypsin: *Anal. Biochem.* **70**, 258~262, 1976.
- 14) Von Pechmann, H. & Schwarz, O. : Studien über Cumarine : *Chem. Ber.* **32**, 3696~3699, 1899.

Summary

A Novel Fluorometric Ultramicro Determination of Serum Leucine Aminopeptidase Using A Coumarine Derivative

A simple and rapid rate assay of serum leucine aminopeptidase is described, using a novel fluorogenic substrate, 7-leucyl-4-methylcoumarinylamide.

The reaction is initiated by adding 10 μ l of serum and the fluorescence development for 1 min. due to the 7-amino-4-methylcoumarin liberated at 37°C is followed directly on recorder.

The proposed method is proved to be free from errors due to the adsorption of the substrate dye to serum albumin and to be applicable to hyperbilirubinemic sera by simple correction.

The values obtained by this method showed a good correlation with those by the conventional method of Goldbarg and Rutenburg.

KOJI SAIFUKU, M.D.

*Department of Internal Medicine, Juntendo University
School of Medicine*