ヒト尿中に存在する非カリクレイン性アルギニンエステラーゼについて¹⁾

松田兆史,*^a 秋浜澄行,^a 藤本幸男,^b 守屋 寛,^c 宮下 厚^d

明治薬科大学第一生化学教室,^a 北海道薬科大学臨床生化学教室,^b

東京理科大学薬学部生化学教室,^c 三楽病院泌尿器科^d

Studies on Human Urinary Arginine Esterases

YOSHIFUMI MATSUDA,*^a SUMIYUKI AKIHAMA,^a YUKIO FUJIMOTO^b

HIROSHI MORIYA^c and ATSUSHI MIYASHITA^d

Meiji College of Pharmacy,^a Nozawa, Setagaya-ku, Tokyo 154, Japan, Hokkaido Institute of Pharmaceutical Sciences,^b Otaru-shi, Hokkaido 047-02, Japan, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Science University of Tokyo,^c Shinjuku-ku, Tokyo 162, Japan and Department of Urology, Sanraku Hospital,^d Chiyoda-ku, Tokyo 101, Japan

(Received July 9, 1982)

A new arginine ester hydrolyzing enzyme in the human urine (human urinary arginine esterase, HUAE) was found. The content levels of this new enzyme, determined by *N*- α -tosyl-L-arginine methyl ester (Tos-Arg-Me) hydrolyzing activity, were measured to be 0.34 to 0.86 nmol/min/ml of human urine and the percentage of content level of this enzyme was calculated to be about 10 to 20 per cent of the total Tos-Arg-Me hydrolyzing activity. HUAE was partially purified and then separated into two forms (HUAE-1 and -2) by DEAE-cellulose chromatography. The approximate molecular weights of HUAE-1 and -2 were estimated to be 4.8×10^4 and 3.0×10^4 by Sephadex G-100 gel filtration, respectively.

Keywords—human urine; arginine ester hydrolyzing enzyme; esterolytic activity; ion exchange chromatography; estimation of molecular weight

緒 言

従来正常ヒト尿中に存在するアルギニンエステルまたは *p*-ニトロアニリド水解活性, すなわち *N*- α -Tosyl-L-arginine methyl ester (Tos-Arg-Me と略) や *D*-Valyl-L-leucyl-L-arginine-*p*-nitroanilide 水解活性のほとんどはカリクレイン (kallikrein, E.C. 3. 4. 21. 8) に由来するものと言われており²⁾ 尿中アルギニンエステラーゼ活性の変動はすなわち腎臓におけるカリクレイン生成あるいはカリクレインの関与する腎臓の生理的, 病理的変異を示すものと考えられ, この観点を基礎として腎臓尿におけるカリクレイン-キニン系の研究が進められてきた.³⁾ しかしながら近年ラットやイヌ尿中に非カリクレイン性アルギニンエステラーゼが存在することが報告され, その酵素化学的あるいは物理化学的性質の一部が明らかにされてきた.⁴⁻⁶⁾ ヒトにおいてもこの酵素の存在が推測され, 従来ヒト尿中アルギニンエステラーゼはカリクレインのみとされてきたことに対する再検討が必要と思われた.

今回我々はヒト尿中における非カリクレイン性アルギニンエステラーゼ活性につき検討したところ, この酵素の存在を認め, さらにその部分精製を行い若干の性質を明らかにすることができたのでここに報告する.

材 料 お よ び 方 法

ヒト尿 試料として用いたヒト尿は排尿直後あるいは一昼夜蓄尿したものを約6時間水道水に対して透析し, さらに遠心分離により沈殿物を取り除いたものを使用した.

タンパク量の測定 タンパク量の指標にはタンパク質の 280 nm の吸収を光路長 1 cm のセルを用いて測定した値 (A_{280}/ml) を用いた.

分子量の推定 分子量の推定は Andrews の方法⁷⁾ によりセファデックス G-100 カラムを用いて行った.

アルギニンエステラーゼ活性の測定 アルギニンエステラーゼ活性の測定は基質として Tos-Arg-Me を用いる Moriwiki らによって開発されたクロモトローブ酸法⁸⁾に準拠して、pH 8.0, 30°C の条件で行った。活性は1分間に加水分解された基質の量 (nmol/min) で表示した。

血流増加活性の測定 イヌを使用した血流増加活性の測定は Moriya らの方法⁹⁾により行った。

試薬 実験に使用した試薬はすべて半井化学 (京都) あるいは関東化学 (東京) の特級品を用いた。

結 果

実験はすべて室温で行った。

ヒト尿中に存在する非カリクレイン性アルギニンエステラーゼの検索

ヒト混合蓄尿約 5 l を流水透析し、さらに水を加えて 5 倍に希釈する。次に pH を 7.0 に調整し、DEAE-セルロース約 10 g を加え 2 時間吸着を行う。終了後 DEAE-セルロースをカラム (2×30 cm) につめ、0.05 M Tris-

Fig. 1. Separation of Arginine Esterase and Kalikrein in the Dialyzed Human Urine by DEAE-cellulose Adsorption

For details of the procedure, see the text. A, 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 7.0) containing 0.15 M NaCl. B, 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 7.0) containing 0.5 M NaCl., absorbance at 280 nm; —○—, Tos-Arg-Me esterolytic activity; —●—, vasodilator activity.

HCl 緩衝液 pH 7.0 で十分に洗浄する。酵素のカラムからの溶出はヒト尿性カリクレイン,¹⁰⁾ イヌ尿性カリクレイン¹¹⁾ およびイヌ尿性アルギニンエステラーゼ⁶⁾ おおのこの精製により得られた結果をもとに、まず 0.15 M NaCl を含む 0.05 M Tris-HCl 緩衝液 pH 7.0 (分画 I) で、次に 0.5 M NaCl を含む同緩衝液で行った (分画 II)。Fig. 1 に示したように分画 I および II は共に Tos-Arg-Me 水解活性を示した。また分画 II はイヌ血流増加活性をも示し、ヒト尿性カリクレインを含有する分画であることを認めた。分画 I はイヌ血流増加活性をほとんど示さず、アルギニンエステラーゼ活性のみを有することよりヒト尿性カリクレインとは異なる酵素であることを認めた。この分画 I が目的とする酵素、ヒト尿性アルギニンエステラーゼ (Human Urinary Arginine Esterase; HUAЕ と略) を含むものであり、この結果ヒト

TABLE I. Content Levels of Human Urinary Arginine Esterase

Sample number	Urine volume (ml)	Activity		Ratio HUAЕ/Whole (%)
		Whole urine	HUAЕ preparation	
1	780	— ^{a)}	0.49	
2	540	— ^{a)}	0.34	
3	540	— ^{a)}	0.42	
4	530	— ^{a)}	0.61	
5	300	— ^{a)}	0.64	
6	490	— ^{a)}	0.49	
7	560	— ^{a)}	0.54	
8	400	4.6	0.84	18.7
9	480	4.0	0.50	12.5
10	520	4.8	0.86	17.9
11	390	4.1	0.70	17.5
12	1680	5.2	0.52	10.0

a) not determined.

Esterolytic activity was assayed by colorimetric method with chromotropic acid⁸⁾ and activity was expressed in terms of nmol of Tos-Arg-Me hydrolyzed/min/ml of dialyzed urine at pH 8.0, 30°C. Details of procedures, see the text.

尿中にも非カリクレイン性アルギニンエステラーゼが存在することを確認することができた。

HUAE の含有量

HUAE の含有量の測定は、ヒト尿 (約 300—1600 ml) を精製水に対して十分透析した後 (コンダクティビティー: 2 mV 以下), 沈殿物が存在した場合には遠心分離により除去し, あらかじめ 0.05 M Tris-HCl 緩衝液 pH 7.0 で平衡化した DEAE-セルロースカラム (1×10 cm—1×20 cm) に添加し, 同緩衝液で十分に洗浄した後, 0.15 M NaCl を含む同緩衝液で溶出した液 (分画 I, HUAE 分画) について行った。測定値は原尿に換算し示した。

Table I に示したように尿中に存在する非カリクレイン性アルギニンエステラーゼの活性量は 0.34—0.86 nmol/min/ml urine の間にあり, その平均値は 0.58 nmol/min/ml urine であった。また全ヒト尿中 Tos-Arg-Me 水解活性に占める本酵素の割合は 12—20% 程度であった。

HUAE の部分精製

HUAE の精製はヒト混合尿 20 l を用いて行った。ヒト尿中に存在する非カリクレイン性アルギニンエステラーゼの項でのべた方法により得た分画 I (500 ml, 全活性 10200 nmol/min) を 0.05 M Tris-HCl 緩衝液 pH 7.0 に対して十分透析し, 次にあらかじめ同緩衝液で平衡化された DEAE-セルロースカラム (2×40 cm) に添加した。カラムは同緩衝液で十分洗浄後, 0—0.3 M NaCl を含む同緩衝液を用いた濃度勾配溶出法によって溶出を行った。溶出結果は Fig. 2A に示した。Tos-Arg-Me 水解活性は 2 つのピークを示したことから, HUAE には 2 種の酵素が存在することを確認することができた。これら 2 種の HUAE をそれぞれ高コンダクティビティーで溶出されるものを HUAE-1, 低コンダクティビティーで溶出するものを HUAE-2 と仮りに命名した。

次に溶出された HUAE-1 および 2 を前記緩衝液に対してそれぞれ透析した後, さらに濃縮し, 前記緩衝液で

Fig. 2. Partial Purification of Human Urinary Arginine Esterase-1 and -2 by DEAE-cellulose Chromatography (A) and Sephadex G-100 Gel Filtration (B, C)

For details of the procedure, see the text.

....., absorbance at 280 nm; —○—, Tos-Arg-Me esterolytic activity.

TABLE II. Summary of Partial Purification of HUAЕ-1 and -2

Step	Procedure	Protein recovery (%)	Esterolytic activity		
			Recovery (%)	Specific activity (nmol/min/ A_{280})	P. F. ^{a)}
1	Starting human urine (20 l)				
2	DEAE-cellulose adsorption and elution	100	100	0.71	1
3	DEAE-cellulose chromatography				
	HUAЕ-1	5.1	28.3	3.4	4.8
	HUAЕ-2	15.4	41.3	1.7	2.3
4	Sephadex G-100 gel filtration				
	HUAЕ-1	1.7	24.4	13.0	18.3
	HUAЕ-2	2.1	30.2	9.1	12.8

a) P.F.: purification factor.

Fig. 3. Estimation of Approximate Molecular Weights

Authentic proteins of aprotinin (A), myoglobin (B), soybean trypsin inhibitor (C), egg white albumin (D) and bovine serum albumin (E) were used as markers. Blue dextran was used for determination of the void volume and HUAЕ-1 (G) and -2 (F) were detected by its esterolytic activity.

性の測定によって行った。結果は Fig. 3 に示したごとくである。HUAЕ-1 および -2 の分子量はそれぞれ 4.8×10^4 および 3.0×10^4 と推定された。

考 察

従来ヒト尿中に存在する Tos-Arg-Me 水解活性の大部分はヒト尿性カリクレインに由来するものであると言われてきた。²⁾ しかしながら本研究により尿中に存在する Tos-Arg-Me 水解活性のうち 10—20% はカリクレイン以外の酵素に由来するものであることが明らかになった。本研究で見い出した新酵素 (HUAЕ-1 および -2) は DEAE-セルロースに吸着されるトリプシンようアルギニンエステラーゼであると思われる。この酵素はイヌ血流増加活性⁹⁾を示さない事より尿性カリクレイン¹⁰⁾とは明らかに異なるものである。また尿中に存在するウロキナーゼも本酵素と同様に 2 種の酵素の存在が認められているが、^{12,13)} ウロキナーゼは pI 値が高く CM-セルロースや SP-セファデックスに吸着されるなど本酵素の性質とは異なっている。

ラットやイヌの尿中にもヒトの場合と同様に非カリクレイン性アルギニンエステラーゼの存在が認められている。⁴⁻⁶⁾ しかしながらその含有量はイヌ尿の場合 100—300 nmol/min/ml urine, ラットの場合でも 100 nmol/min/ml urine 以上 (基質 Tos-Arg-Me) であり、ヒト尿中に存在する同酵素の含有量に比べて約 200—600

あらかじめ平衡化したセファデックス G-100 カラム (1.5×70 cm) に別々に添加した。溶出結果は Fig. 2B (HUAЕ-1) および Fig. 2C (HUAЕ-2) に示した。HUAЕ-1 の溶出位置は HUAЕ-2 のそれよりも早く、HUAЕ-1 の分子量は HUAЕ-2 よりも大きいことが推定できた。また HUAЕ-1 および -2 の Tos-Arg-Me 水解活性の比活性はそれぞれ 13.0 および 9.1 nmol/min/ A_{280} であった。

以上の結果をまとめて Table II に示した。HUAЕ-1 および -2 の Tos-Arg-Me 水解活性の回収率は DEAE-セルロース吸着溶出で得た活性総量を 100% とした場合、それぞれ 24% および 30% であった。

HUAЕ-1 および -2 の分子量の推定

分子量の推定はセファデックス G-100 カラム (1.5×90 cm) を用いたゲル濾過法によって行った。HUAЕ-1 および -2 の検出は Tos-Arg-Me 水解活

倍高濃度に存在している。さらに尿中全 Tos-Arg-Me 水解活性に占めるこれら酵素の割合もそれぞれ 55%, 50% と高率であり、本研究で得られたヒト尿中の同類新酵素とはその含有量および全 Tos-Arg-Me 水解活性に占める割合にも大きな差が認められた。一方イヌ尿中およびラット尿中に存在する非カリクレイン性アルギニンエステラーゼについても同様に 2 種の分子量の異なる酵素の存在が認められており、それぞれの分子量はイヌの場合 3.0×10^4 および 4.7×10^4 ⁶⁾ でありまたラットの場合には 2.85×10^4 および 4.2×10^4 ⁵⁾ と報告されている。これらイヌおよびラット中に存在する同種酵素の分子量はヒト尿中に存在する 2 種の酵素の分子量によく一致している。また本研究で得られた 2 種の酵素の分子量はヒト尿性カリクレインの分子量（等電点電気泳動を行わない標品 $3.8-4.8 \times 10^4$,^{14,15)} 等電点電気泳動後の標品 $2.7-2.9 \times 10^4$ ¹⁰⁾）とよく一致することは興味深い。

本酵素についての生理的あるいは病理的な作用は全く明らかになってはいない。今後は本酵素をさらに純粋な型で得、その酵素化学的あるいは物理化学的な性質を明らかにするとともに、腎臓生理や腎臓および尿のカリクレイン-キニン系との関連についても解明することが重要な課題であると思われる。

引用文献および注

- 1) Abbreviations: HUAE, humann urinary arginin esterase; Tos-Arg-Me, *N*- α -tosyl-L-arginine methyl ester.
- 2) 守屋 寛, 日本臨床, **22**, 659 (1964).
- 3) I.H. Mills, "Handbook of Experimental Pharmacology," Vol. XXV, ed. by E.G. Erdős, Springer-Verlag, Berlin, 1979, p. 549.
- 4) K. Nustad, J.V. Pierce, *Biochemistry*, **13**, 2312 (1974).
- 5) R.P. Mcpartland, D.L. Sustarsic, J.P. Rapp, *Endocrinology*, **108**, 1634 (1981).
- 6) H. Moriya, Y. Matsuda, K. Miyazaki, C. Moriwaki, Y. Hojima, "Kininogenases," Vol. 4, ed. by G.L. Haberland, J.W. Rohen, T. Suzuki, Schattauer Verlag, Stuttgart, 1977, p. 29.
- 7) P. Andrews, *Biochem. J.*, **91**, 222 (1964).
- 8) 森脇千秋, 井上典子, 法島義男, 守屋 寛, 薬誌, **91**, 413 (1970).
- 9) H. Moriya, Y. Yamazaki and H. Fukushima, *J. Biochem. (Tokyo)*, **58**, 201 (1965).
- 10) Y. Matsuda, K. Miyazaki, Y. Fujimoto, Y. Hojima, C. Moriwaki, H. Moriya, *J. Biochem. (Tokyo)*, **80**, 671 (1976).
- 11) Y. Matsuda, K. Miyazaki, Y. Fujimoto, Y. Hojima, H. Moriya, *Chem. Pharm. Bull.*, **30**, 2512. (1982).
- 12) N. Miwa, H. Takayanagi, A. Suzuki, *Chem. Pharm. Bull.*, **29**, 463 (1981).
- 13) L. Holmberg, B. Bladh, B. Astedt, *Biochim. Biophys. Acta*, **445**, 215 (1976).
- 14) O. Ole Moiyoi, J. Spragg, K.F. Austen, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **76**, 1893 (1979).
- 15) F. Fiedler, "Handbook of Experimental Pharmacology," Vol. XXV, ed. by E.G. Erdős, Springer-Verlag, Berlin, 1979, p. 103.