

共役酵素法による血液中のすい臓およびだ液 α -アミラーゼの活性測定



研究ノート

大道 薫* 池中 徳治**

1. はじめに

α -アミラーゼはデンプンやアミロースなどのグルコースの重合体に作用し、それらの内部の α -1, 4-配糖体結合を切断する加水分解酵素 (endo-型アミラーゼ) である。微生物、動物、植物など自然界に広く存在していて、人間もすい臓由来のすい臓 α -アミラーゼとだ液腺由来のだ液 α -アミラーゼを持っている。血液や尿など体液中の α -アミラーゼ活性はこれらに由来する。両酵素のアミノ酸配列はDNA塩基配列より推定されているが両者は非常によく似ていて94%のホモロジーがある¹⁾。ヒトの血液中の α -アミラーゼ量が病気にかかると変化する可能性がある²⁾。たとえば、すい炎などすい臓に障害が起こるとすい臓 α -アミラーゼ量が増加し、また耳下腺炎の場合はだ液 α -アミラーゼ量が増加することが知られている。このような病気と血中のアミラーゼ量に相関関係があるので、2種類の酵素量が簡単に測定できれば病気の診断がよりの確になる。現在、両アミラーゼの分別定量法として電気泳動、等電点分画、クロマトグラフィー、免疫学的方法あるいはアミラーゼインヒビターを利用する方法があるが、いずれの方法も簡便さと定量性の点で問題があると思われる。これから紹介する方法は両酵素の合成基質に対する作用の相違を利用する定量法であり、従来法の問題点を解決したものである。

2. 分別定量用基質 FG 5 P の調製^{3,4,5)}

先に述べたようにすい臓およびだ液 α -アミ

ラーゼは構造上互によく似ており、そのため未修飾のマルトオリゴ糖に対してほとんど同じように作用する。両酵素のわずかの相違、特に活性部位における相違を識別するために置換基をマルトペンタオースに導入し分別定量用の基質とした。

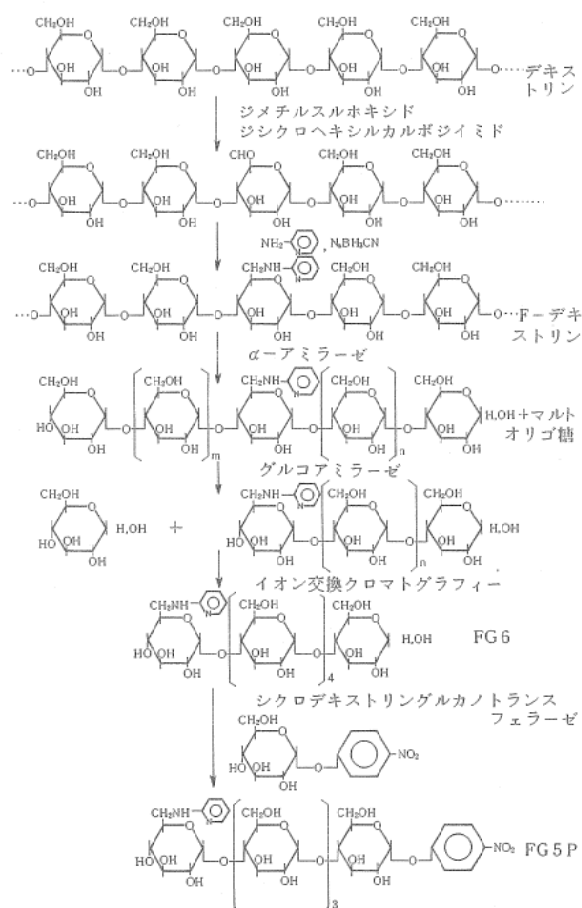


図1. 分別定量用基質 FG 5 P の合成経路

図1に示すようにデキストリンの一部 (約20個に1個の割合) のグルコース残基の6位の CH_2OH を酸化し CHO とし、還元的アミノ化により2-ピリジルアミノ基を導入したF-デキストリンを合成した。F-デキストリンに枯草菌の液化型 α -アミラーゼを限定的に作用させ、次にグルコアミラーゼを充分に作用させると非

*大道 薫 (Kaoru OMICHI), 大阪大学理学部, 化学教室, 助手, 理学博士, 有機生物化学

**池中 徳治 (Tokuji IKENAKA), 大阪大学理学部, 化学教室, 教授, 理学博士, 有機生物化学

還元末端が修飾された種々のマルトオリゴ糖とグルコースの混合物となる。FG 6 (非還元末端グルコース残基の6位が2-ピリジルアミノ化されたマルトヘキサオース) はこれらの混合物よりイオン交換クロマトグラフィーで単離される。FG 6にP-ニトロフェニル α -グルコシド (G-P) の存在下、シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼを作用させ、生成したFG 5Pを反応混合物中よりゲルクロマトグラフィーで単離した。合成基質FG 5Pは非還元末端グルコース残基が2-ピリジルアミノ基で修飾されているため、exo-型のグルコアミラーゼや α -グルコシターゼの作用をまったく受けないので、exo-型の酵素を共役酵素に用いる α -アミラーゼの活性測定用の基質として非常に有用である。

3. FG 5Pを基質としたヒト血清中の α -アミラーゼの分別定量⁶⁾

ヒトの α -アミラーゼはFG 5PをFG-G-GとG-G-PあるいはFG-G-G-GとG-Pに水解するが、すい臓 α -アミラーゼはだ液 α -アミラーゼと比べてFG-G-G-GとG-Pの生成量は多く、FG-G-GとG-G-Pの生成量は少ない (図2)。

従って血清中の両酵素の分別定量はFG 5Pを試料血清で消化し、反応混合物中のG-PとG-G-PあるいはFG-G-G-GとFG-G-Gの生成量と生成比を測定することで達成される。反応混合物中のG-PとG-G-Pの量を測定するには基質特異性の異なる α -グルコシターゼとイソマルターゼを共役酵素として利用

すると都合がよい。それは α -アミラーゼの作用によりFG 5Pから生成する分解生成物の量をP-ニトロフェノールの生成量として、400 nmにおける吸収の増加を比色計で連続的にモニターできるからである。 α -グルコシターゼは α -アミラーゼの作用で生成するG-PとG-G-Pに直ちに作用しP-ニトロフェノールを遊離するが、イソマルターゼはG-G-Pには作用せずG-Pのみを水解してP-ニトロフェノールを遊離する。 α -グルコシターゼ存在下で生成するP-ニトロフェノール量 (Pg) はG-PとG-G-Pの生成量の合計であり、これは試料中に存在する2種の α -アミラーゼ全体の酵素活性である。一方イソマルターゼ存在下で生成するP-ニトロフェノール量 (Pi) はG-Pの生成量と一致する (図3)。

従って両アミラーゼのFG 5Pに対する作用の相違はPi/Pg値に現われる (図4)。

両アミラーゼを適当な割合で混合し、その混合比とPi/Pgの関係を調べると図5に示すように直線関係になる。

試料血清中の両酵素の存在比はこの標準直線を利用してPi/Pg値より求められ、両アミラーゼのそれぞれの活性は全活性Pgを存在比でふりわけて算出される。

図6はFG 5Pを共役酵素存在下でヒトの血清で消化し、消化物のA₄₀₀の時間的経過を追ったものである。この図よりPgは1.33 μ M/分 (=35ユニット/l), Pi/Pgは0.23となり、標準直線 (図5) を使ってすい臓 α -アミラーゼとだ液 α -アミラーゼの存在比は66:34となり、すい臓 α -アミラーゼの活性は23ユニット

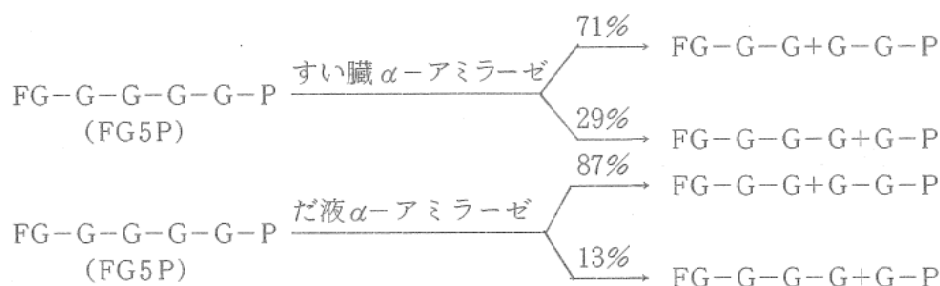


図2. ヒト α -アミラーゼによるFG 5P加水分解 FG: 6-デオキシ-6-[(2-ピリジル)]-アミノグルコース残基, G: グルコース残基, P: p-ニトロフェノール基, - : α -1, 4-配糖体結合。

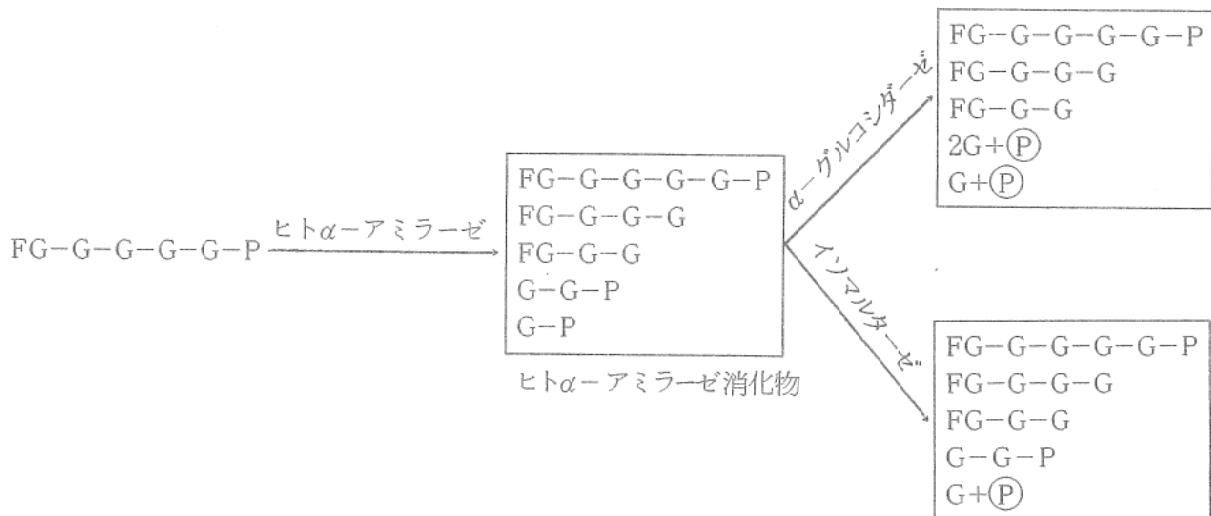


図3. FG 5Pのヒト α アミラーゼ消化物に対する α -グルコシターゼとイソマルターゼの作用

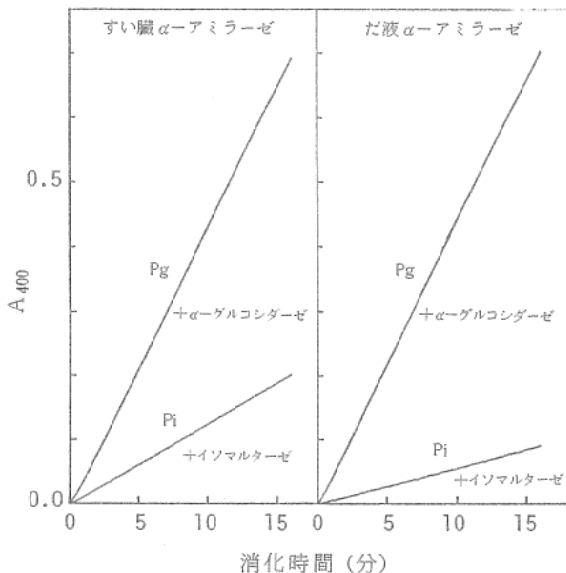


図4. 共役酵素存在下でのヒト α -アミラーゼのFG 5P消化

/ ℓ , だ液 α -アミラーゼの活性は12ユニット/ ℓ となる。酵素消化物をC18逆相カラムの高速液体クロマトグラフィーにかけFG-G-G-Gの生成量を調べるとFG-G-G-G (FG-G-G + FG-G-G-G)の比はPi/Pgと一致する。この事実は共役酵素を使う分別定量法が実際にヒト血清に適用できることを示している。

4. おわりに

現在、血清中の α -アミラーゼ活性の測定はデンプンやマルトオリゴ糖あるいはそれらの誘導体を基質として使用し、臨床検査の一項目としてよく行なわれている。ところがさらに進ん

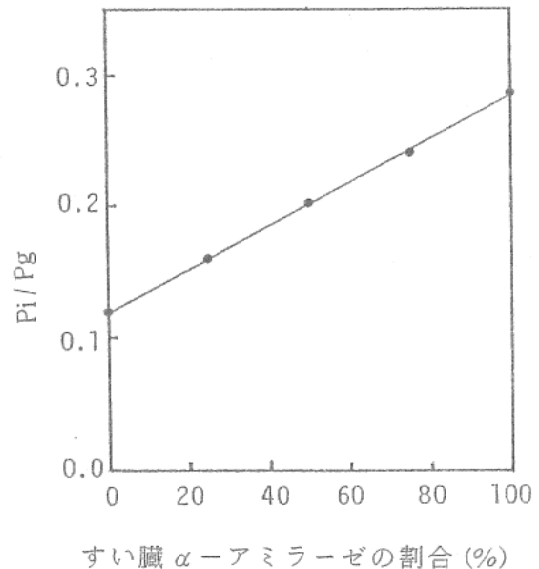


図5. すい臓 α -アミラーゼとだ液 α -アミラーゼの存在比とPi/Pgの関係

だすい臓 α -アミラーゼとだ液 α -アミラーゼの分別定量はまだあまり行なわれていない。それは一つには従来法に定量性と簡便さの点で問題があること、またあまり分別定量が行なわれていないために両アミラーゼ活性と病態の関係がはっきりわかっている例が少ないことなどが挙げられる。今回述べた方法は方法論としては現在臨床検査で行なわれている α -アミラーゼ活性の測定法と変わりなく簡単、正確である。本法によるデータの蓄積により現在まだはっきりとしていない種々の病態と両アミラーゼの相関が明らかになると思われる。

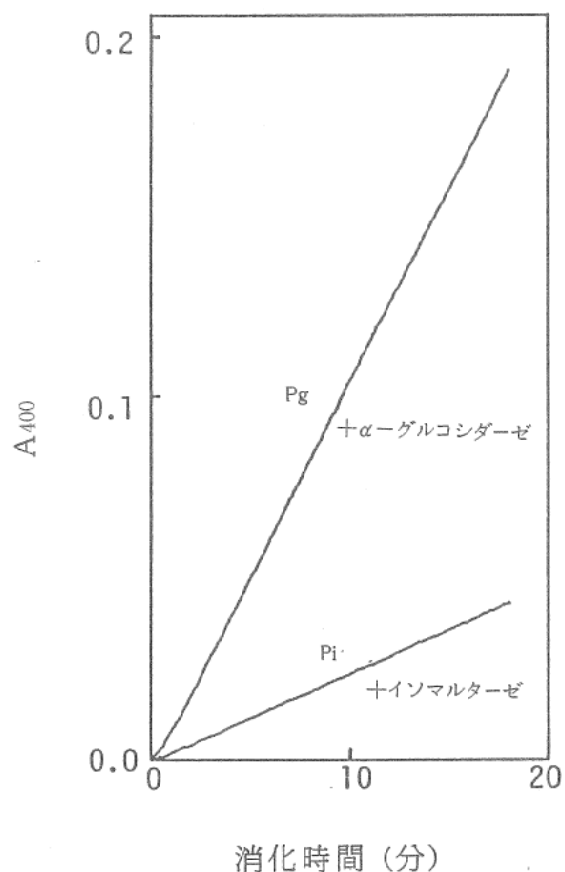


図6. 共役酵素存在下でのヒト血清のFG 5P消化

参考文献

- 1) Nakamura, Y., Ogawa, M., Nishide, T., Emi, M., Kosaki, G., Himeno, S. & Matsubara, K. *Gene*, **28**, 263 (1984)
- 2) 小川道雄, 消化器外科, **3**, 1115 (1980)
- 3) Omichi, K. & Ikenaka, T. *J. Biochem.*, **93**, 1055 (1983)
- 4) Omichi, K. & Ikenaka, T. *J. Chromatogr. (Biomedical Applications)*, **336**, 368 (1984)
- 5) Omichi, K. & Ikenaka, T. *J. Biochem.*, **97**, 977 (1985)
- 6) Omichi, K. & Ikenaka, T. *J. Biochem.*, **100**, 1353 (1986)