

# Leucine Dehydrogenase を共役させたヒト Aminopeptidase の定量的活性染色法\*

神田進司・真鍋満久・須藤加代子・菅野剛史\*\*

柴 田 秀 司\*\*\*

## Summary

An electrophoretic separation and a quantitative staining method for leucine aminopeptidase, arylamidase and cystyl aminopeptidase were described. L-Leucinamide was used as a substrate for the aminopeptidases electrophoretically separated, and the liberated L-leucine was oxidized by leucine dehydrogenase and NAD<sup>+</sup>. The activity bands were visualized by tetrazolium salt (MTT) as a final hydrogen acceptor.

Arylamidase and cystyl aminopeptidase were stained in the area of pre  $\alpha_1$ - and between  $\alpha_1$  and  $\alpha_2$ -globulin position, respectively. The leucine aminopeptidase was samely stained in the area of pre  $\beta$ -globulin. Employing this method, it was possible to determine the activity of each aminopeptidase with satisfactory accuracy and reproducibility.

Furthermore, this method would be useful to the analysis of enzymological properties of aminopeptidases because of its availability to other peptides, such as L-leucylglycine and L-leucyl-L-leucine, as substrate.

Key words: leucine aminopeptidase, arylamidase, cystyl aminopeptidase, L-leucinamide, leucine dehydrogenase.

## 序 論

降矢ら,<sup>1)</sup> 奥田ら,<sup>2)</sup> および 杉山ら<sup>3)</sup> は L-leucinamide (以下 LA と略) を基質とした aminopeptidase 測定法を開発し, L-leucine- $\beta$ -naphthylamide<sup>4,5)</sup> や L-leucine-*p*-nitroanilide<sup>6)</sup> を基質とした従来の測定法では困難であった leucine aminopeptidase (aminopeptidase [cytosol], EC 3.4.11.1 以下 LAP と略)<sup>7)</sup> の測定を可能にした。しかし, これらの方法は LAP だけではなく, arylamidase (aminopeptidase [microsomal], EC 3.4.11.2 以下 AA と略) および oxytocinase (cystyl aminopeptidase, EC 3.4.11.3 以下 CAP と略) をも同時に測定するものであり, その臨床的評価を考える際に総

活性に占める各酵素活性の割合を把握することが必要となった。<sup>8-10)</sup>

一方, 血清 aminopeptidase の多様性の解析は電気泳動的にも行われていたが, L-leucine- $\beta$ -naphthylamide<sup>11,12)</sup> や L-alanine- $\beta$ -naphthylamide<sup>13)</sup> を基質として用いているため活性染色が AA と CAP に限られており, LAP についての解析は泳動後のブロック抽出による方法を用いた Nakagawa and Tsuji<sup>14)</sup> の報告が認められるのみであった。

そこでわれわれは, 電気泳動にて分離した酵素に対して LA を基質とし, leucine dehydrogenase (L-leucine: NAD<sup>+</sup> oxidoreductase, deaminating, EC 1.4.1.9 以下 Leu DH と略) を共役させた方法で LAP を含めた

\* A quantitative staining method for human aminopeptidases using leucine dehydrogenase as coupling enzyme.

\*\* Shinji Kanda, Michihisa Manabe, Kayoko Sudō, Takashi Kanno, 浜松医科大学附属病院検査部。

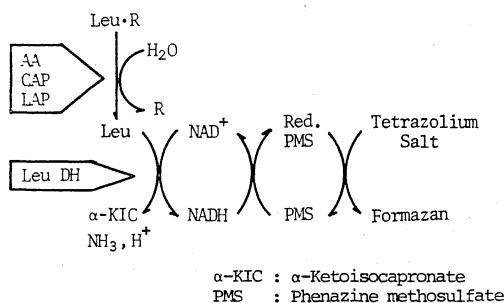
\*\*\* Shuji Shibata, 東洋紡績株式会社敦賀酵素工場研究室。

(受付 1981年6月1日)

aminopeptidase 活性を支持体上に染色し、定量的に観察する方法を考案した。この方法の設定条件および有用性について報告する。

## 原 理

本法の染色原理を下に示した。LA を基質とし、酵素活性にて遊離した L-leucine を Leu DH の共役下に PMS・MTT 系にて染色する方法である。



## 材料および方法

### 1. 材 料

血清試料は浜松医科大学附属病院検査部に検査依頼のあったものを用いた。

LAP および AA はヒト肝より、CAP はヒト胎盤より部分精製したものを用いた。精製は Niinobe and Fujii<sup>15)</sup> の方法にしたがい、組織の 20% (w/v) ホモジネイトを作成し、ブロメライン処理、超速心による上清分取、硫酸分画、および DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーの過程にて行った。精製後の酵素標品は  $-80^{\circ}\text{C}$  にて凍結保存した。

Leu DH は *Bacillus sphaericus* (IFO 3525) より部分精製したものを用いた。精製は Soda ら<sup>16)</sup> の方法に準じ、集菌し破碎した後、酢酸カルシウム処理、プロタミン処理、硫酸分画、および DEAE-セファロースカラムクロマトグラフィーの過程にて行った。酢酸カルシウム処理は終濃度 125 mM にて行った。精製後の酵素標品は 40% (w/w) ショ糖添加後凍結乾燥して保存した。この部分精製した酵素標品の比活性は 15.6 U/mg であった。

### 2. 酵素活性の測定

Aminopeptidase は LA を基質とした杉山ら<sup>3)</sup> の方法と、L-leucine-*p*-nitroanilide を基質とした Szasz ら<sup>6)</sup> の方法に準じて測定した。試薬は、前者にウルトレート・LAP (小野薬品)、後者にコンクマイトレート・LAP (中外製薬) を用いた。

Leu DH は 10 mM L-leucine を基質とし、 $\text{NAD}^{+}$  濃度 2.5 mM にて測定した。緩衝液は 100 mM 炭酸緩衝液 (pH 10.6) を用いた。

これらの酵素活性は LKB 2086 にて測定した。測定温度は  $37^{\circ}\text{C}$  とした。

### 3. 電気泳動

支持体にはセロゲル膜 (5 cm×6 cm, ケメترون) を用い、緩衝液は電気泳動用 バルビタール バッファー D (pH 8.6,  $\mu$  0.06, 第一化学薬品) を用いた。通電量はセロゲル膜 1 枚につき 5 mA とし、60 分泳動した。また、泳動中は冷却した。

### 4. 染色方法

活性染色は、染色用試薬 1.5 ml を東洋汙紙 No.1 (5 cm×5 cm, 2 枚重ね) に吸収させ、これにセロゲル膜を重ねて行った。インキュベーションは  $37^{\circ}\text{C}$ 、60 分とし、遮光・保温の条件にて行った。反応終了後の固定・脱色は 1% 酢酸溶液にて行った。LA, PMS, および MTT はシグマ社製を、また、 $\text{NAD}^{+}$  はオリエンタル酵母工業株式会社製を用いた。

L-leucyl-L-alanine, L-leucylglycine, L-leucyl-L-leucine および L-leucine-*p*-nitroanilide (いずれもシグマ) を基質とした活性染色も同様の方法にて行った。

L-leucine- $\beta$ -naphthylamide (シグマ) を基質としたジアゾ反応による AA および CAP の活性染色は、上述の方法による基質溶液とのインキュベーション終了後、1% 酢酸溶液に溶解した 0.05% (w/v) fast garnet GBC salt (シグマ) にて行った。基質濃度は 1 mM とし、100 mM 磷酸緩衝液 (pH 7.4) に溶解した。

### 5. デンシトメトリー

測定波長は 570 nm とした。デンシトメーターはクリニスキャン (ヘレナ) を用い、吸光度の積分値を測定した。また、必要に応じて基線の補正を行った。

## 結 果

### 1. 染色条件の設定

① 基質濃度および緩衝液：本法は杉山ら<sup>3)</sup> の総活性測定法と併せて用いることとし、同法に準じた条件設定を行った。すなわち、基質である LA の濃度は 23.4 mM とし、緩衝液は 80 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0, 10 mM  $\text{MgCl}_2$  添加) を用いた。

② PMS および MTT 濃度：塩谷ら<sup>17)</sup> の LDH アイソザイムの染色条件である PMS 0.05 mM および MTT 0.4 mM を基準に、その半量から 3 倍量まで増減し染色性との関係を検討した。その結果、半量で染色性が低下したが、1 倍量から 3 倍量では有意な差異が認められ

ず、本法においても塩谷らの条件にて必要かつ十分であった。

③ NAD<sup>+</sup> 濃度 : NAD<sup>+</sup> については、0.4 mm から 3.7 mm まで増減し検討した結果、添加量の増加に伴い、わずかな染色性の上昇が認められた。この現象は、NAD<sup>+</sup> 濃度に依存した Leu DH 活性の上昇に起因したものと思われた。そこで、NAD<sup>+</sup> 濃度は Leu DH の NAD<sup>+</sup> に対する親和性 ( $K_m=0.38\text{ mm}$ )<sup>18)</sup> を考慮し、約 4K<sub>m</sub> に相当する 1.5 mm とした。

④ Leu DH の添加量 : Leu DH の添加量と染色強度および定量性との関係を検討した。試料は、部分精製した AA を 20 IU/l から 180 IU/l まで希釈して用いた。各活性の試料をセロゲル膜 1 cm につき 2  $\mu$ l 塗布し、そのまま染色した後デンシトメトリーにて得られた

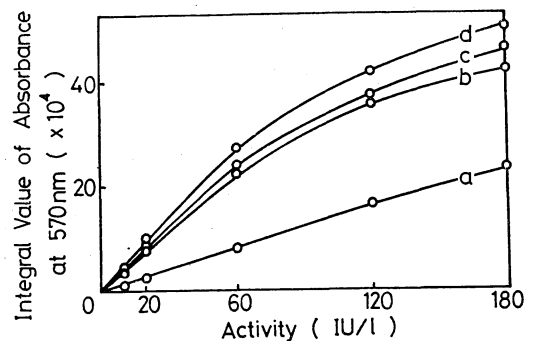


Fig. 1. Effect of Leu DH concentration on activity staining.

Two  $\mu$ l of partially purified AA was applied on Cellogel membrane within the length of 1 cm and activity staining was carried out. Leu DH was added as following.

a : 1U/strip, b : 3U/strip, c : 6U/strip, d : 9U/strip.

Table 1. Relationship between Leu DH activity and precision of integral value of absorbance at 570 nm.

Activity (IU/l)		10	20	60	120	180
1U/Strip	$\bar{X} (\times 10^4)$	8	23	79	164	231
	CV (%)	27	20	10	4	9
3U/Strip	$\bar{X} (\times 10^4)$	35	86	220	357	425
	CV (%)	14	5	4	6	5

(n = 4)

吸光度の積算値から作成した検量線を Fig. 1 に示した。セロゲル膜 1 枚につき 1 単位の Leu DH を添加した場合、活性値 120 IU/l の試料まで直線性が認められたが染色強度が弱いのにに対し、Leu DH を 3 単位に増加した場合、直線性は 60 IU/l までに低下し 120 IU/l では約 15%の直線からの偏位が認められたが、染色強度は著しく上昇した。また、3 単位を越える Leu DH の添加は染色性の上昇にあまり効果を示さなかった。分析精度についても Leu DH 添加量との関係を検討し Table 1 に結果を示した。Leu DH 3 単位の条件では測定値の精度が上昇し、分画しようとする活性が 20 IU/l 以上であれば CV 5%の再現性にて染色可能であった。これらの結果から Leu DH の添加量はセロゲル膜 1 枚につき 3 単位とした。

⑤ 試料の塗布量 : 上記の染色条件にて 60 IU/l の試料まで直線性が保障されたこと、妊婦以外の血清では少なくとも AA と LAP の 2 分画の分離が期待されること、さらに血清中の AA と CAP は巾広く分画され単位易動巾当りの活性が希釈されることを考慮し、試料の塗布量は総活性 120 IU/l につき 2  $\mu$ l とし、これを基準に活性に応じて増減することとした。

以上の結果から、試薬の調製ならびに染色条件は Table 2 のように設定した。

2. 電気泳動による aminopeptidase の分離

電気泳動にて分離した後、上記設定条件にて染色した aminopeptidase のザイモグラムを Fig. 2 に示した。部分精製した各 aminopeptidase の易動度を蛋白分画と比較すると、LAP は pre- $\beta$  分画、AA は pre- $\alpha_1$  分画、そ

Table 2. Reagents and condition for staining.

1. Reagents :

		Volume/Strip	Final concn.
LA	11.7 mg/ml	0.5 ml	23.4 mm
Leu DH	30.0 U/ml	0.1 ml	2000 IU/l
NAD <sup>+</sup>	16.0 mg/ml	0.1 ml	1.5 mm
MTT	1.0 mg/ml	0.25 ml	0.4 mm
PMS	0.15 mg/l	0.15 ml	0.05 mm
Tris-HCl buffer*		0.4 ml	80.0 mm
MgCl <sub>2</sub> *		—	10.0 mm

\* : 80 mm Tris-HCl buffer (pH 8.0) containing 10 mm MgCl<sub>2</sub>. All reagents were dissolved in the same buffer.

2. Sample size : 120 IU/l  $\times$  2  $\mu$ l/cm.

3. Incubation : 37°C, 60 min.

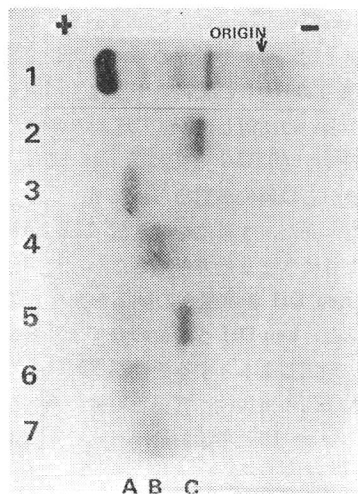


Fig. 2. Zymograms of aminopeptidases stained by the proposed method.

1 : protein staining, 2 : LAP, 3 : AA, 4 : CAP, 5 : serum of a patient with hepatitis, 6 : serum of a patient with obstructive liver disorder, 7 : serum obtained from a pregnant woman. LAP and AA were partially purified from human liver, and CAP was from human placenta as described in the text. AA was stained in the area of pre  $\alpha_1$ -globulin (A) and CAP was between  $\alpha_1$  and  $\alpha_2$ -globulin position (B). LAP was samely stained in the area of pre  $\beta$ -globulin (C).

して CAP は  $\alpha_1$  分画と  $\alpha_2$  分画間に染色され、デントメトリーにてそれぞれの分別定量が可能であった。これらの部分精製した aminopeptidase に対応する酵素活性は患者血清中でも同様に分画・染色され、肝炎患者では LAP が、閉塞性肝障害の患者血清では AA が、そして妊婦血清では CAP が主要な活性として上昇していることが解察された。

3. 正確度の検定

電気泳動から活性染色およびデントメトリーまでの全ての操作を通して本法の正確度を検討し、Table 3 にその結果を示した。試料は部分精製した活性既知の LAP、AA および CAP を 2 者ずつ混和して用いた。試料 A では 総活性 129 IU/l のうち AA 72 IU/l, LAP 57 IU/l であり、その理論的な分画値は 55.8% 対 44.2% であるが、2 回の分画操作後のデントメトリーにより 60% 対 40% および 52% 対 48% と分別定量され、若干の変動はあるが平均すると 56.0% 対 44.0% と理論値とよく一致する結果が得られた。試料 B、C についても同様に良好な結果が得られた。

Table 3. Fractionation of partially purified aminopeptidases by electrophoresis.

	Aminopeptidase [IU/l(%)]	Fraction value (%)		
		No. 1	No. 2	Average
Sample A (129 IU/l)	AA [72(55.8)]	60	52	56.0
	LAP [57(44.2)]	40	48	44.0
Sample B (127 IU/l)	CAP [71(55.9)]	56	52	54.0
	LAP [56(44.1)]	44	48	46.0
Sample C (143 IU/l)	AA [72(50.3)]	51	52	51.5
	CAP [71(49.7)]	49	48	48.5

4. 非特異反応による染色の影響

血清を試料とし染色した場合、塗布位置付近に非特異的な染色が認められた。これは LA 無添加の染色系でも染色されたが Leu DH を除いた系では消失した。Leu DH の基質となる L-leucine, L-isoleucine, L-valine および L-methionine<sup>18)</sup> を同一条件にて泳動した場合も同じ位置が染色された。したがって、この染色は amino-peptidase 活性によるものではなく、血清中の内因性アミノ酸によるものであると考えられた。また、この盲染色が aminopeptidase の定量に影響を及ぼすことはなかった。

一方、低活性の試料では染色性に難点があり、セロゲル膜の不均一性と同様に、わずかな背景の汚染が誤差の原因となった。この場合は基線を補正し、分画値を修正することが必要であった。

5. 各種 L-leucine-X を基質とした本法の応用

本法は酵素活性により L-leucine を遊離する基質であれば、LA 以外の基質にも応用可能である。Fig. 3 に各種基質に対する aminopeptidase のザイモグラムを示した。試料は部分精製した LAP、AA および CAP の 3 者を混和したものを用いた。AA と CAP はいずれの基質にも活性を示し染色されたが、L-leucylglycine では著しく活性が低下した。LAP は L-leucine-*p*-nitroanilide と L-leucine- $\beta$ -naphthylamide では殆んど染色されず、これらの基質に対しては活性を示さないことが判明した。

考 察

血清中の aminopeptidase を電気泳動により分画し、その多様性を検索する方法は Kowlessar ら<sup>19)</sup> により澱粉ゲルを用い、また、Smith ら<sup>20)</sup> により汙紙電気泳動を用いて行われたのが最初であるが、いずれも泳動後に支持体からのブロック抽出を行い、L-leucine- $\beta$ -naph-

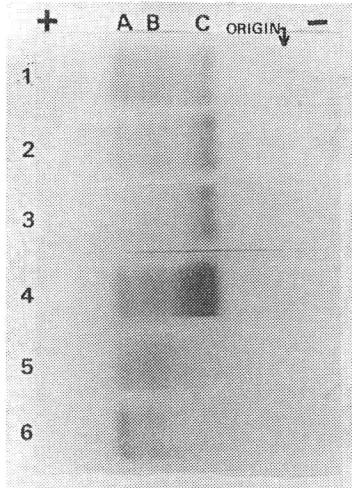


Fig. 3. Zymograms of partially purified aminopeptidases stained with various substrates.

Partially purified AA (A), CAP (B) and LAP (C) were mixed together, and separated again by electrophoresis on cellogel membrane. Then, activity staining was carried out with following substrates.

1: LA (23.4 mM), 2: L-leucyl-L-alanine (10 mM), 3: L-leucylglycine (10 mM), 4: L-leucyl-L-leucine (10 mM), 5: L-leucine-*p*-nitroanilide (4 mM), 6: L-leucine- $\beta$ -naphthylamide (1 mM).

1-5 were stained by the proposed method, and 6 was by diazotization method described in material and method. In the case of 5, L-leucine-*p*-nitroanilide was dissolved in water instead of the buffer solution.

thylamide を基質として活性を求める方法であった。同様の方法で Nakagawa and Tsuji<sup>14)</sup> は LA を基質とし LAP の活性帯を分画しているが、ザイモグラムを作成しデンストメトリーにて観察する方法は考案されていなかった。

一方、Folk and Burstone<sup>4)</sup> および Green ら<sup>5)</sup> により開発された L-leucine- $\beta$ -naphthylamide は組織化学的にも aminopeptidase の基質として用いられたが、<sup>21)</sup> 遊離した  $\beta$ -naphthylamide を呈色させる発色系は容易に泳動分析のザイモグラムの作成に応用可能な方法であった。この方法で Peters ら<sup>13)</sup> は L-alanine- $\beta$ -naphthylamide を基質として aminopeptidase の多様性を寒天ゲルを支持体として観察している。しかし、これらの合成基質では、基質特異性の点から可溶性分画の LAP を検出することは困難であった。<sup>7)</sup>

本法に示したように LA を基質として用い、amino-

peptidase を LAP, AA および CAP に分離し、定量的に活性染色したザイモグラムを作成出来たことは、これらの酵素の血中での変動をより明確に把握する方法が確立されたことを意味する。また、L-leucine-X の如き各種基質を用いた血清 aminopeptidase の多様性の解析も併せて実施可能である。今後は、本法を用いて aminopeptidase の臨床的応用について検討を進めたい。

本研究の一部は、第31回電気泳動学会総会にて報告した。また、研究費の一部は文部省科学研究費による助成を受けた。

## 文 献

- 1) 降矢 震他: 医化学シンポジウム, **3**: 246, 1963.
- 2) 奥田拓道他: 臨床化学シンポジウム, **11**: 151, 1971.
- 3) 杉山正康他: 臨床化学, **9**: 313, 1980.
- 4) Folk, J. E. and Burstone, M. S.: Proc. Soc. Exp. Med., **89**: 473, 1955.
- 5) Green, M. N. et al.: Arch. Biochem. Biophys., **57**: 458, 1955.
- 6) Szasz, G.: Am. J. Clin. Path., **47**: 607, 1967.
- 7) Patterson, E. K. et al.: J. Biol. Chem., **238**: 3611, 1963.
- 8) 田村禎通他: 臨床化学シンポジウム, **12**: 19, 1972.
- 9) Ito, S. et al.: Gastroenterologia Japonica, **10**: 20, 1975.
- 10) 神田進司他: 臨床化学シンポジウム, **19**: 206, 1979.
- 11) Lowrence, S. H. et al.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **105**: 572, 1960.
- 12) Page, E. W. et al.: Am. J. Obstet. Gynecol., **82**: 1090, 1961.
- 13) Paters, J. E. et al.: Clin. Chim. Acta, **19**: 277, 1968.
- 14) Nakagawa, S. and Tsuji, H.: Clin. Chim. Acta, **13**: 155, 1966.
- 15) Niinobe, M. and Fujii, S.: J. Biochem., **87**: 195, 1980.
- 16) Soda, K. et al.: Biochem. Biophys. Res. Commun., **44**: 931, 1971.
- 17) 塩谷実枝子他: 臨床病理, **19**: 469, 1971.
- 18) Ohshima, T. et al.: J. Biol. Chem., **253**: 5719, 1977.
- 19) Kowlessar, O. D. et al.: J. Clin. Invest., **39**: 671, 1960.
- 20) Smith, E. E. et al.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **110**: 683, 1962.
- 21) Burstone, M. S. and Folk, J. E.: J. Histochem. Cytochem.: **4**, 217, 1956.