

Examination of the Subcellular Distribution of Tripeptide Aminopeptidase and Evaluation of its Clinical Usefulness in Human Serum

メタデータ	言語: jpn 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-23 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 神田, 進司 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1287

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博論第 10号	学位授与年月日	昭和61年 2月28日
氏名	神田進司		
論文題目	<p>Examination of the Subcellular Distribution of Tripeptide Aminopeptidase and Evaluation of its Clinical Usefulness in Human Serum (トリペプチドアミノペプチダーゼの細胞内分布の検討と血清中での臨床的意義について)</p>		

医学博士 神田進司

論文題目

Examination of the Subcellular Distribution of Tripeptide Aminopeptidase and Evaluation of its Clinical Usefulness in Human Serum

(トリペプチドアミノペプチダーゼの細胞内分布の検討と血清中での臨床的意義について)

論文の内容の要旨

〔はじめに〕

トリペプチドアミノペプチダーゼ(EC 3. 4. 11. 4、以下TAPと略す)は、トリペプチドのアミノ末端のペプチド結合を水解し、遊離のアミノ酸とジペプチドを生成するアミノペプチダーゼである。血清中にトリペプチド水解活性が存在し、ある種の病態で上昇することは古くから知られていた。しかし、血清中には種々のアミノペプチダーゼが存在し、トリペプチドを水解するため、これらのトリペプチド水解活性がTAPによるものなのか他のアミノペプチダーゼによるものなのか明らかではなかった。また、TAPの細胞内分布および臓器間分布についての報告もない。

副論文では、血漿中にTAPが存在することを示すとともに、それを部分精製し、酵素学的性質について検討した。本論文では、TAPと他のアミノペプチダーゼを電気泳動により分離・定量し、TAPの細胞内および臓器間分布を検討するとともに、これらの結果をもとに、血清中TAPの臨床的意義についても検討を加えた。

〔材料および方法〕

臓器は、手術時に摘出し、組織学的検査をした後の余剰部分を用いた。

トリペプチド水解活性は、L-ロイシルグリニルグリニンを基質とし、遊離するロイシンをロイシン脱水素酵素の共役下に、NADHの上昇として測定し求めた。また、生じたNADHをフォルマザン色素として発色させることにより、電気泳動後の活性染色を行った。電気泳動は、陽・陰両極にペロナル緩衝液を用いる連続緩衝液系と、陽極にトリス緩衝液、陰極にホウ酸緩衝液を用いる不連続緩衝液系の2法により行った。支持体にはセロゲル膜を用いた。

〔結果および考察〕

1. 電気泳動によるTAP活性の定量

部分精製したTAPと他のアミノペプチダーゼを種々の割合に混合し、電気泳動により分離後、活性染色を行い、デントメトリーにより得られた各分画比の定量性を検討した。いずれのアミノペプチダーゼも、互いの活性に一致する百分率が得られたことから、以下の実験では総トリペプチド水解活性にTAPの百分率を乗ずることによりTAP活性を算出した。

2. TAPの細胞内分布

肝臓5.2 gを用い、シロ糖濃度勾配遠心法により細胞分画を行った。ホモジネート中TAP活性の65%が可溶性分画に回収され、核・ミトコンドリアおよびマイクロソーム分画の活性は、いずれも0.2%以下であった。この結果は乳酸脱水素酵素(以下LDHと略す)とほぼ同様であり、したがって、TAPはLDHと同様可溶性分画に局在するものと考えられた。

3. TAPの臓器間分布

各種臓器のホモジネートを105,000×g、60分遠心し、その上清中のTAPおよびLDH活性を測定した。健常部では、いずれの臓器においてもTAP活性はLDH活性より低値であった。最も高いTAP活性は肝臓に認められた。胎児および癌組織においてもほぼ同様の結果が得られたが、両酵素とも成人健常組織に比べやや低値であった。末梢血中の赤血球およびリンパ球中においても、TAP活性はLDH活性より

低値であった。しかし、リンパ球中のTAP活性は、赤血球に比べ約22倍高値であった。

4. 血清中TAPの臨床的意義

健常人29名より求めた血清中TAPの正常値は、65-115 U/Lであった。患者血清中では、肝疾患・白血病および自己免疫疾患でTAP活性の上昇が認められた。肝疾患患者血清中のTAP活性は、アラニンアミノ転移酵素活性と良く相関した($r=0.854$)。固形腫瘍の患者血清中では、TAP活性の上昇は認められなかった。

以上の結果より、血清中TAPは肝細胞損傷の指標となること、また、白血病や自己免疫疾患と関連があることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

血清中には種々のアミノペプチダーゼ類が存在し、すでにその中の3種類の酵素は臨床検査に用いられている。血清には、トリペプチドを加水分解する活性もあるが、これはトリペプチドアミノペプチダーゼ(以下TAPと略す)が存在するためか、他のアミノペプチダーゼによるのかわかっていなかった。そこで、申請者はヒトの血清(漿)および臓器のTAPについて研究を行った。

審査委員会において、申請者によりなされた口頭発表と論文内容等について審議した結果、本論文の特徴として次の点が評価された。

1. TAPを他のアミノペプチダーゼ類と区別して特異的に測定する方法を開発している。
2. 血漿中のTAPを精製し、酵素学的性質を明らかにしている。
3. TAPの細胞内分布を調べ、可溶性分画に局在することを明らかにしている。
4. TAPの臓器間分布を調べている。TAP活性は広く種々の臓器に認められたが、特に肝臓に高い活性が認められた。末梢血球では、リンパ球中に高い活性が認められた。
5. 血清TAPの臨床的意義について検討している。肝疾患・白血病および自己免疫疾患でTAP活性の上昇が認められた。肝疾患についてはさらに詳しく検討し、アラニンアミノ転移酵素活性等との相関が議論された。血清TAPは肝細胞損傷の指標となる可能性が指摘された。

また、以下の点に関して、審査員と申請者との間に討論が行われた。

1. TAPの基質特異性は、テトラペプチド等もっと多種類のペプチドを用いて調べる必要があるのではないか。
2. 正常血清中に存在するTAPはなにに由来しているのか。
3. 肝腫瘍患者の血清においてTAP活性が上昇しているが、その理由はなにか。本当に肝細胞損傷にもとづくものなのか。
4. TAPの生理的意義はなにか。
5. 臨床検査法としてのTAP測定の将来の展望について。

以上の点について、申請者は概ね適切な回答をすると共に、残された問題については今後さらに追求する旨の回答がなされた。

以上の審議の結果、本審査委員会は本論文が学位授与に値する十分な内容を備えているものと全員一致で判定した。

論文審査担当者	主査	教授	藤本	大三郎		
	副査	教授	市山	新	副査	教授
	副査	助教授	金井	弘一	副査	助教授
					金子	栄蔵