

前立腺の解燐酵素に関する研究

(I) ヒト前立腺フォスフォモノエステラーゼの
精製とその免疫学的所見

長崎大学医学部泌尿器科教室 (主任: 近藤 厚教授)

大学院学生 齊 藤 泰

STUDIES ON POSTATIC PHOSPHATASE

(I) PURIFICATION AND IMMUNOLOGIC CERTIFICATION OF
HUMAN PROSTATIC PHOSPHOMONOESTERASE

Yutaka SAITO

*From the Department of Urology, Nagasaki University School of Medicine**(Director Prof. A. Kondo, M. D.)*

Prostatic phosphomonoesterase (prostatic PMEase) was purified by London's and Ostrowski's methods as follows. The first step is fullers' earth adsorption, the second step is fractionation with ammonium sulfate, the third step is DEAE cellulose column chromatography and the fourth step is rechromatography of a fraction obtained by the third step.

The purified prostatic PMEase was in homogeneous form electrophoretically and ultracentrifugally.

Four distinct peaks of protein were obtained by the DEAE cellulose column chromatography and the PMEase activity was exhibited in the three peaks except the first peak. Each peak of the purified materials by the DEAE cellulose column chromatography was examined by immunoelectrophoresis with antihuman prostatic PMEase serum of the rabbit. The PMEase of peak II migrates to the cathode, that of peak III migrates slightly to the anode and that of peak IV migrates to the anode more than that of peak III. It was found by immunoelectrophoresis that the prostatic PMEase which was in homogeneous form electrophoretically and ultracentrifugally, contained always siderophilin.

Each PMEase fraction of the three peaks was examined on the enzymatic properties such as optimal pH, Michael's constant and inhibition test. The enzymatic properties of each PMEase fraction were slightly different each other.

緒 言

前立腺癌患者において、その血清中の酸性フォスフォモノエステラーゼ (PMEase) 活性値が上昇する場合のある事はよく知られている。しかし血清中の PMEase は前立腺由来のものだけではない。女性の血清中にさえこの酵素は証明され、血球や各種臓器に由来する酵素が混在

しているはずであり、最近では PMEase の isozym^{1) 2) 3)}の研究も行なわれている。また前立腺癌の場合でも一般に早期の症例では PMEase 値の上昇は見られず、転移 (特に骨転移) をおこした場合に著明な上昇が見られるので早期発見の診断的価値は少ないとされている。また症例によって上昇の程度に差異があり、必ずしも一定の傾向を把握する事が出来ない 従っ

て前立腺癌の診断に当っては、前立腺に特異的な PMEase を検出する事が要求される。Abul-Fadl(1949)⁴⁾は前立腺性 PMEase の特性として *l*-tartrate によって特異的に活性が阻害される事を認め、由来臨床的にもこの方法によって前立腺 PMEase の測定⁵⁾が行なわれている。しかしこの方法も精製酵素について実験する場合とちがって、臨床検査として血清をそのまま検体として測定する場合には、その成績を厳密に前立腺性のものと断定するにはなお疑問の余地がある。

法医学領域で精液の証明法として前立腺 PMEase の検出が行なわれている。しかしヒト前立腺以外にも自然界には PMEase が広く存在しており、特に植物中には化学的定量によっては前立腺 PMEase と識別不能の多量の PMEase を含有するものがある。このヒト前立腺 PMEase と他の PMEase との鑑別に Suyama und Sawada⁶⁾はヒト前立腺組織から PMEase を精製し、これを抗原として家兎を免疫して抗ヒト前立腺 PMEase 免疫家兎血清の作製に成功し、容易にヒト精液中の前立腺 PMEase を検出し得ることを報告した。

著者はこの事実に着目し、泌尿器科臨床において、前立腺 PMEase と血清中の他の PMEase との識別が上記の抗ヒト前立腺 PMEase 免疫血清の利用によって可能であるかどうかを追究する目的で、まず基礎実験として前立腺組織からの PMEase 精製法の再検討を行なった。さらに酵素を抗原として用いる場合には当然他の抗原の混入が問題となるので、精製過程の各段階において寒天電気泳動法および免疫電気泳動法を用いて免疫学的にその精製度を検討すると同時に、化学的に各分画の PMEase 活性を定量し、至適 pH、阻害実験、Km (Michaelis の恒数) の測定等の酵素学的特性を検査して極めて興味ある知見を得たのでここに報告する。

実験材料

(a) PMEase の精製

1. 前立腺組織：手術的剔出あるいは剖検により採取した新鮮な前立腺組織を -20°C で凍結保存して用いた。

2. 0.2M acetate buffer(pH 5.0)：抽出用緩衝液。
3. 1M acetate buffer (pH 4.0)：酵素を酸性白土に吸着させる緩衝液。
4. 0.02M citrate buffer (pH 7.0)：酸性白土に吸着された酵素を溶出させる緩衝液。
5. 酸性白土：萩原⁷⁾の記載に従い活性化して用いた。
6. 硫酸アンモニウム：硫安分画用。
7. diethylaminoethylcellulose (DEAE-cellulose)：column chromatography に用い、溶出液として 0.0175M phosphate buffer (pH 7.0), 0.05M phosphate buffer, 0.1M phosphate buffer を用いた。
8. 透析用セロファンチューブ

(b) 電気泳動および免疫泳動

1. 電気泳動および免疫泳動装置：LKB 社製。
2. Special Noble Agar (Difco)：電気泳動および免疫泳動の medium として用いた。
3. barbital-natrium(Merk製)：veronal buffer (pH 8.2) に使用。
4. amido black 10B：電気泳動および免疫泳動後の染色剤。
5. SM 試薬⁸⁾：免疫電気泳動後 PMEase 沈降線の染色に用いた。
6. 抗ヒト血清蛋白質免疫家兎血清 (Behringwerke 製)：免疫泳動に用いた。
7. 抗ヒトトランスフィリン免疫家兎血清 (Behringwerke 製)：免疫泳動に用いた。

(c) 酵素活性測定

1. 基質：0.01M disodium p-nitrophenyl phosphate 溶液を使用。
2. 1N NaCO_3 ：酵素反応停止および発色に用いた。

3. 0.2M acetate buffer (pH 5.0)

(d) 至適 pH 測定

1. 各種薬剤の PMEases におよぼす影響の測定
 MgSO_4 , CaCl_2 , FeSO_4 , CuSO_4 , ZnSO_4 , $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, HgCl_2 , AgNO_3 , KCN , NaF , I_2 , H_2O_2 , HCHO , p-chloromercuribenzoate(p-CMB), *l*-tartaric acid, モノヨード酢酸の16種類を用いた。特にモノヨード酢酸は石油エーテル処理により再結晶したのを用いた。

(e) Km の測定

1. 基質として sodium- β -glycerophosphate を使用し、モリブデン試薬および aminonaphtholsulfon 酸試薬を用いた。

2. 基質として disodium phenylphosphate を併用し, phenol 試薬および20%炭酸ソーダ溶液を用いた。

3. 基質として disodium p-nitrophenyl phosphate を使用した。

実験方法

1. 酵素の精製

精製の方法は London⁹⁾ および Ostrowski¹⁰⁾ 等の行なった方法を用いた。

凍結保存した前立腺組織 560 g をとり, その外側の結合組織を注意深く安全剃刀で取り除いて捨て, 前立腺組織を可及的に薄く切り, 前立腺組織 1 g に対して 3ml の割合に 0.2M acetate buffer (pH 5.0) を加え, 48時間低温室で酵素の抽出を行なう。その後綿布で濾過して濾液 (I) を別の容器に採り, さらに残渣 1 g に対して 2ml の割合で前記緩衝液を加えて48時間抽出を行ない綿布で濾過して濾液 (II) を採取する。濾液 (I) と濾液 (II) を合して透析用セロファンチューブに容れ低温室 (3°C) で蒸留水に対して 24時間透析を行なう。透析後 3,000r.p.m. 15分間遠沈し, この上清 (I) 1,800ml に対し, Tween 80 を 5% の割合に含んだ 1M acetate buffer (pH 4.0) 200ml を加えた後, さらに活性化された酸性白土 70 g (上清 (I) 1,800ml に対して) を加え inert protein を除く。24時間低温室に放置して 9,000r.p.m. 15分間遠沈し上清 (II) をとり, 沈渣に上清 (I) 1,800ml に対し 1ℓ の割合に Tween 80 を 1% に含んだ 0.02M citrate buffer (pH 7.0) を加え10分間攪はんし, さらに24時間抽出後 6,000r.p.m. 15分間遠沈し, その上清 (III) と上清 (II) を合して透析用セロファンチューブに容れ低温室で全量が1/4になるまで濃縮する。この濃縮液を 6,000r.p.m. 15分間遠沈し, この上清 (IV) に硫酸アンモニウムの飽和溶液を加えて 40% 飽和にする。1夜放置後 6,000r.p.m. 20分間遠沈すると上部に Tween 80 が集まるのでこれを除き, さらに硫酸アンモニウムを加えて55%飽和にする。1夜放置後 6,000r.p.m. 20分間遠沈し上清 (V) を採り, この上清をさらに68%硫酸アンモニウム飽和にする。白色沈澱が生じ, 1夜放置後 6,000r.p.m. 20分間遠沈し, この沈渣を 0.2M acetate buffer (pH 5.0) 20ml に溶解する。この溶液を透析用セロファンチューブに容れ, 蒸留水に対して透析を行なう (すなわちネスラーの試薬で外液に NH_4^+ を認めなくなるまで透析を行なう。) 透析後 6,000r.p.m. 20分間遠沈してこの上清を column chromatography の試料とする。

次に DEAE-cellulose を純水で十分に洗い, 1/10 N NaOH に分散させ 2時間放置後ガラスフィルターを用い純水で再び十分に洗う。さらに 1/10N HCl に分散し 2時間放置後同様に純水で洗う。最後に再び 1/10N NaOH に分散し 2時間放置後純水で洗い, column chromatography の starting buffer である 0.0175M phosphate buffer (pH 7.0) に分散し, pH が 7.0 になるまでこの buffer で洗う。

column (4×20cm) を用意し, 低温室で層を作らないように DEAE-cellulose を column につめる。層ができていないことを確かめた後 starting buffer 200ml を流して column を洗い, buffer が DEAE-cellulose column の上端 2~3mm の高さとなった時, 上記の試料を静かに重層する。試料が 1~2mm の高さになった時静かに 0.0175M phosphate buffer (pH 7.0) を流す。毎分 0.5~0.6ml の流速で 5ml 宛フラクションコレクターで採取する。光電光度計 (日立 EPU2A 型) で吸光度を波長 280m μ で測定し, Peak (I) を過ぎて蛋白量が減少したら 0.5M phosphate buffer (pH 6.0) に変える。最初と同様に吸光度を測定し Peak (III) を過ぎて蛋白量が減少したら 0.1M phosphate buffer (pH 6.0) に変える。PMEase の簡易検出には SM 試薬を用いて予め PMEase の存在する分画を確認後, あらためて p-nitrophenyl phosphate¹¹⁾ を基質とし 0.2M の acetate buffer (pH 5.0) を用いて酵素活性を定量した。これらを図 1 に示す

0.05M phosphate buffer (pH 6.0) によって生じた Peak (III) の前半部をとり, 再び column (2×20cm) に DEAE-cellulose を前記の如くつめて, 同じ buffer で rechromatography を行ない, 吸光度 (280 m μ), PMEase 活性を測定すると図 2 に示す結果を得た。

2. 抗 PMEase 免疫家兎血清の作製

rechromatography によって得られた PMEase のうち, 他の蛋白質の混在の少ない前半部に溶出された PMEase を凍結乾燥したものをを用いる。家兎 1Kg に対して PMEase 2mg の割合に生食水 2ml に溶解し, Freund の adjuvant 2ml の中に充分乳化させた後家兎の大腿部に 7日ごとに筋注する。4回目の注射が終った後1週間してから試験採血し, 抗体のできかたを調べ, 抗体価が低い場合はもう1度追加免疫を行ない, 2週間後に全採血して血清のみを凍結乾燥して保存する。

3. 抗ヒト精漿免疫家兎血清の作製

精漿 2ml を Freund の adjuvant 2ml に乳化し,

表1 酵素精製法

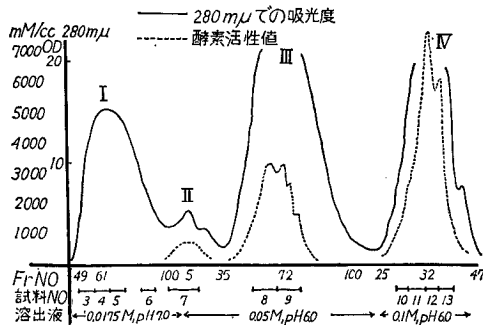
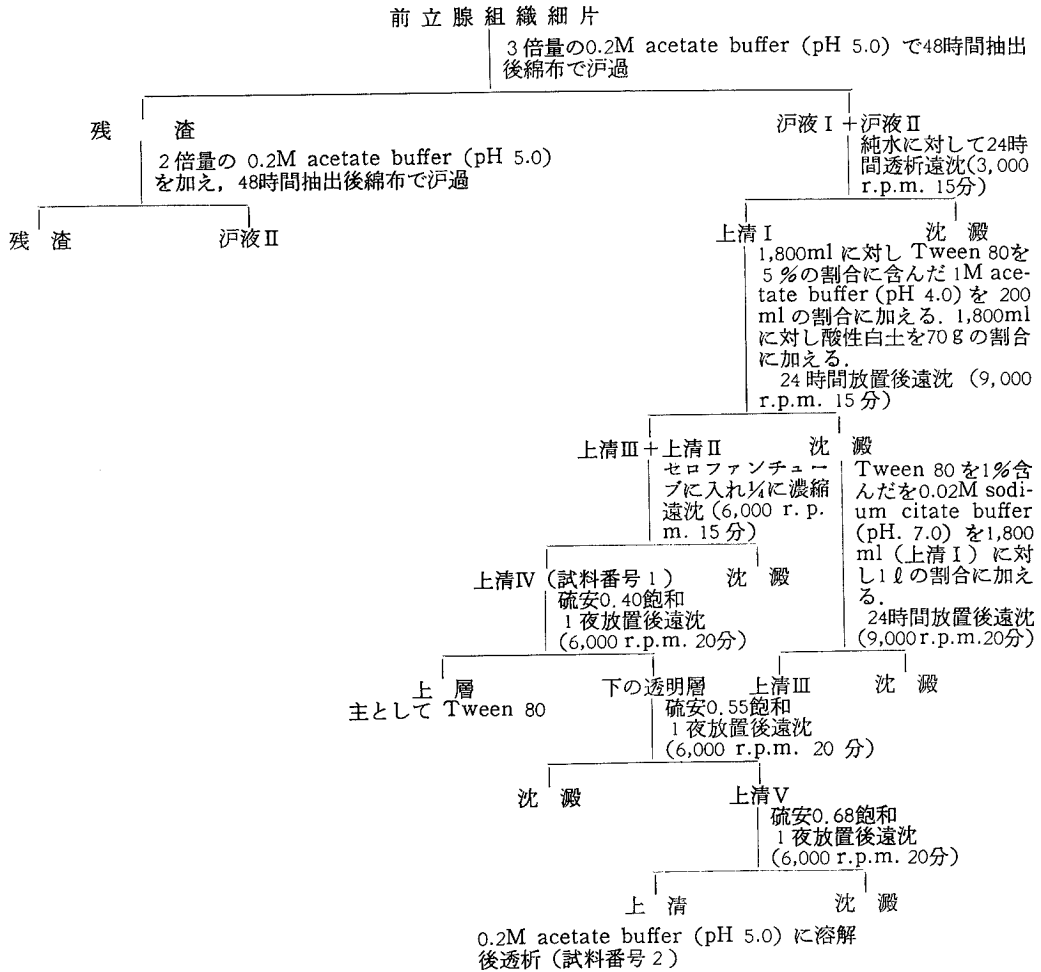


図1 DEAE-cellulose column chromatography の溶出曲線

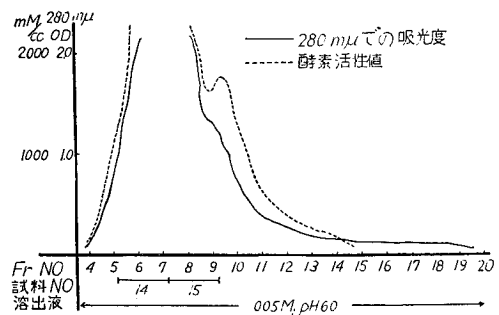


図2 試料 No. 8 を rechromatography した場合の溶出曲線

家兎の大腿部に7日ごとに4回筋注する。抗体価を調べ最終免疫後2週間たってから採血し、血清のみを凍結乾燥して保存する。

4. 電気泳動ならびに免疫電気泳動

Special Noble Agar (Difco) を veronal buffer (pH 8.2) に1.2%の割合に溶解し、LKBの電気泳動装置のプレートにこれを流す。量は1枚のガラス板に対し2.5mlで、固化した後パンチャーで穴を開ける。試料を7%の濃度に蒸留水に溶かし各穴に入れて泳動を行なう。200ボルトの定電圧で2時間泳動を行なった後、1枚はそのまま amido black 10B の染色液で染色を行ない。他はさらに免疫泳動を行なうために溝を作り、各種の抗血清すなわち抗ヒト血清免疫血清、抗ヒト精漿免疫血清、抗ヒト前立腺 PMEase 免疫血清を入れて15°C位の一定の温度のところに48時間diffusionした後buffer saline液(pH 7.5)で充分に余剰の蛋白質を洗い落とす。その後 amido black 10B で染色し3%酢酸溶液で洗い室温で乾燥する。抗ヒト前立腺 PMEase 免疫血清および抗ヒト精漿免疫血清に対して生じた沈降線は須山等¹²⁾の方法により、diazonium-o-dianisidine と α -naphthylphosphoric acid を用いて染色した後直ちに amido black 10B で二重染色を行なった。

5. 分離した各 PMEase の性状検査

(a) 至適 pH

pH2.0 から pH3.0 までの溶液は0.2M 酢酸ナトリウムと0.1M HCl で作製し、pH3.2 から pH 6.2 までは0.2M 酢酸と0.2M 酢酸ナトリウムで作製した。

これらの各種 pH 溶液 4ml に0.01M disodium p-nitrophenyl phosphate 溶液を1ml 加えさらに各分画の PMEase 溶液 0.2ml 加えた後30分間37°C 恒温槽の中で反応させ、30分後に1N NaCO₃ 溶液 2ml を加え、402m μ の波長で吸光度を測定する。

(b) 各種薬剤の影響

前岡¹³⁾は精液中の PMEase を硫酸分画法にて精製して各種薬剤の影響を調べておるが、著者も前記16種の薬剤を同じように調製して、精液を対照にして精製した前立腺 PMEase に使用した。至適 pH 測定により試料 No. 7 は pH3.8、試料 No. 8 は pH 5.3、試料 No. 11 は pH2.7 と pH4.6、試料 No. 14 は pH 3.8 と pH5.4 のそれぞれ0.2M acetate buffer を用いた。buffer 3.48ml に基質 1ml を加え、薬剤 0.52 ml を加えた後 PMEase 溶液 0.2ml を加えて37°C 恒温槽中で30分間反応させ、30分後に1N Na₂CO₃ 溶液 2ml 加え 402m μ の波長で吸光度測定した。薬剤の濃度は反応溶液中のモル濃度であり、阻害率および

活性促進率は、薬剤添加時の酵素活性値から薬剤の代りに buffer を加えた対照の酵素活性値を減じて、この差の対照に対する百分率で示し、(−)は阻害を、(+)は促進を表わしている。

(c) Michaelis の恒数の測定

sodium- β -glycerophosphate を基質とする Shinowara-Jones-Reinhart 法¹⁴⁾、disodium phenylphosphate を基質とする King and Armstrong 法¹⁵⁾、disodium p-nitrophenyl phosphate を基質とする Bessey-Lowry-Brock 法¹¹⁾を用い、反応速度が基質濃度に関係となる零次の反応で、Lineweaver & Burk¹⁶⁾の方法に従って反応速度と基質濃度との関係を求めた。

(d) 沈降測定

試料 No. 14 の PMEase を0.2M acetate buffer に0.5%の割合に溶解し、Spinco 超遠心機で60,000 r.p.m. で沈降分析を行なった。

実験成績

1. 酵素の精製

DEAE-cellulose column chromatography を行ない、波長 280m μ での吸光度および酵素活性を調べると図1のように、溶出液を変えることにより大きな三つの蛋白の Peak が得られた。Ostrowski¹⁰⁾等と異なり Peak I と Peak III の間に小さなもう1つの Peak II が見られ、これに一致して酵素活性も認められた。IIIとIVの Peak にも酵素活性が認められた。Peak III を rechromatography すると図2のように、0.0175M phosphate buffer (pH7.0) では蛋白および酵素活性の Peak が現れず、0.05M phosphate buffer (pH6.0) に変えることによって蛋白および酵素活性の Peak が現れた。

2. 電気泳動ならびに免疫電気泳動

試料 No. 1、試料 No. 2 を電気泳動ならびに免疫電気泳動を行なうと図3のようになる。すなわち前立腺抽出液を濃縮し硫酸分画を行なうと、 γ グロブリンに相当する部分が除かれる。

column chromatography を行なうと、図4のように硫酸分画で残存していた γ グロブリンに相当する部分が漸次溶出されている。しかし PMEase は溶出されていない。

Peak II になると PMEase が出現し、図5のように原点より陰極側に泳動されている。

Peak III の試料 No. 8 になると、今まで見られなかったアルブミンが現れてくる。図6のように PMEase は試料 No. 7 と異り原点よりやや陽極側に泳

動されている。さらに試料 No. 9 になるとアルブミンの量が増加してくる。

Peak IV になると図7のようにアルブミン量がさらに増加する。PMEase は Peak III の PMEase よりさらに陽極側に泳動され、試料 No. 7 の PMEase と対称の位置を占める。

試料 No. 8 を rechromatography すると図8のようにアルブミンの混在がほとんどなくなる。しかしながらトランスフィリンは消失していない。試料 No. 15 になると再びアルブミンの混在が認められるようになる。

3. 至適 pH

試料 No. 7 の酵素活性と pH との関係を見ると、図9のように pH 3.8, 4.4, 5.0, 5.9 に Peak を有する多峰性の曲線が得られたが、pH 3.8 での酵素活性が最高値を示した。

試料 No. 8 は図10のように pH 3.8, pH 4.4, 5.3 に Peak を有する曲線が得られ、pH 5.3 での酵素活性が最高値を示した。

試料 No. 11 は図11のように pH 2.7 と4.6に Peak を有するが、pH 3.1 と4.6の間には多数の凹凸を見る。

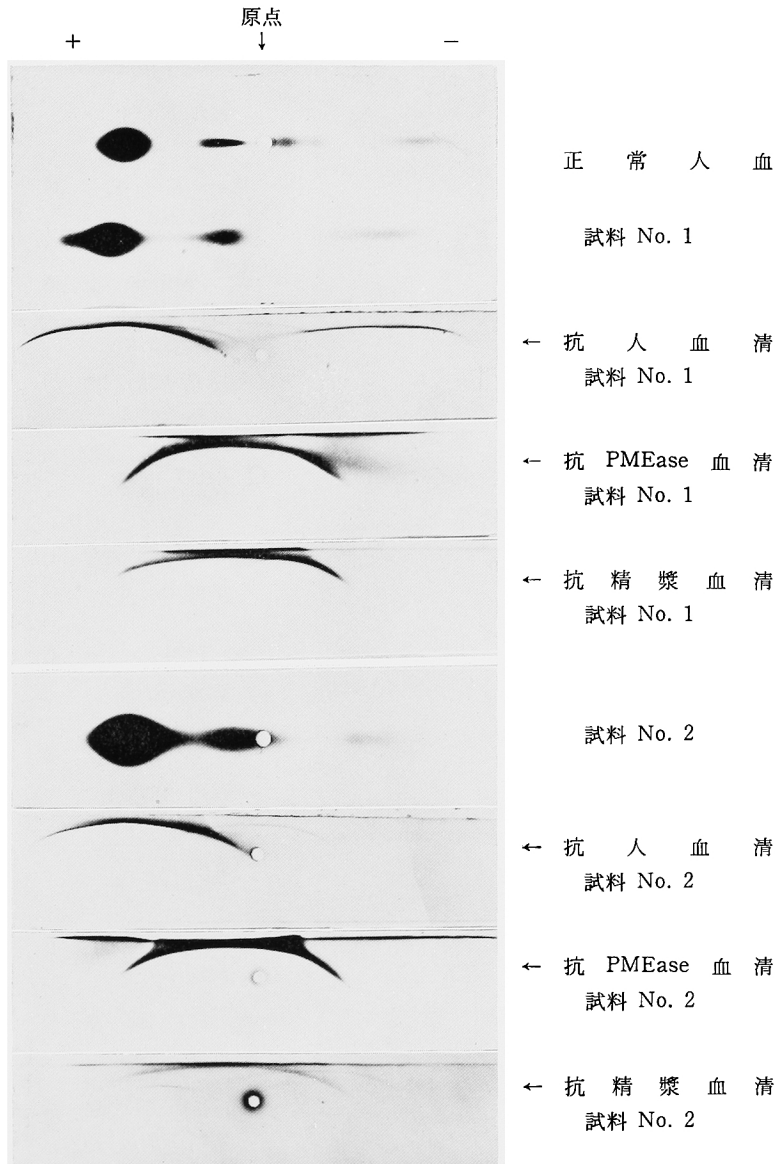


図3 電気泳動ならびに免疫電気泳動

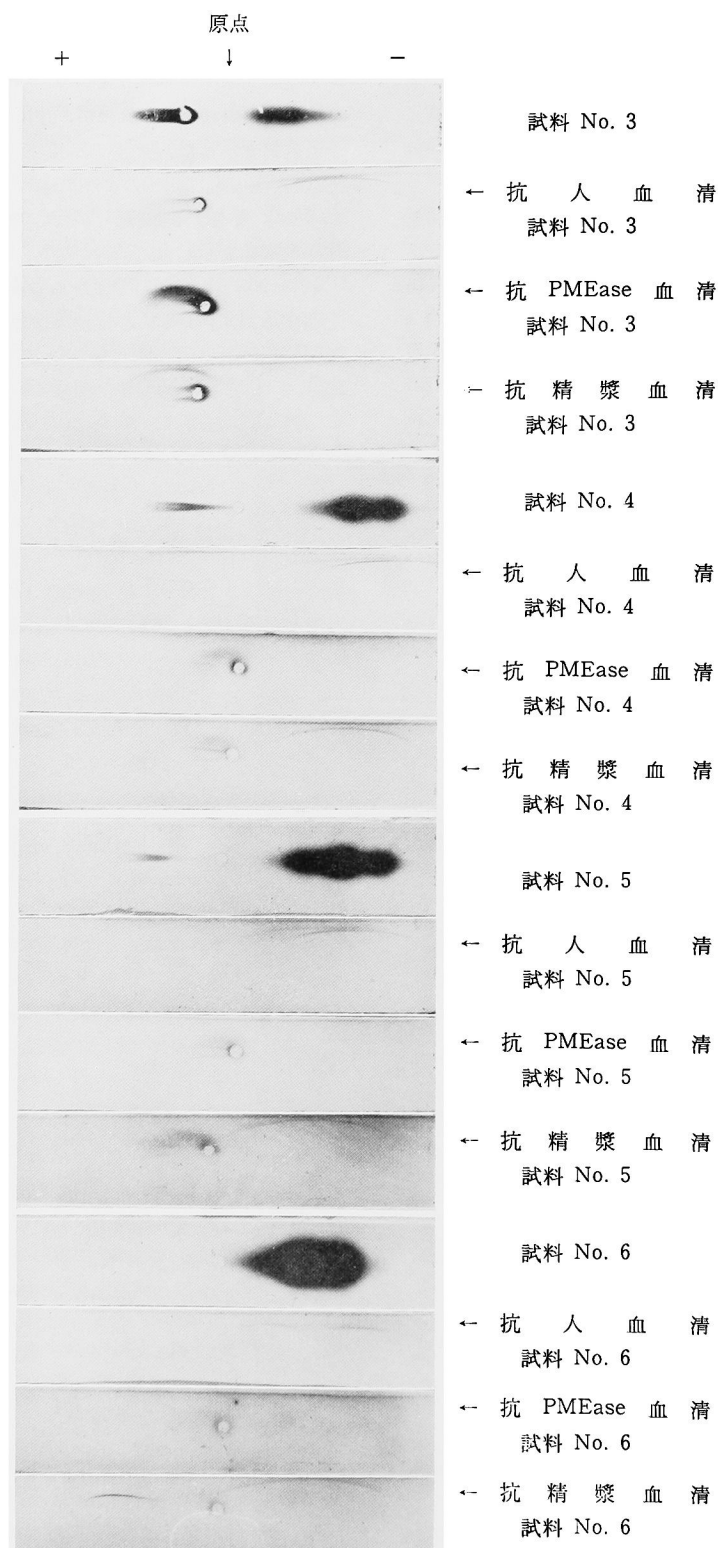


図4 電気泳動ならびに免疫電気泳動

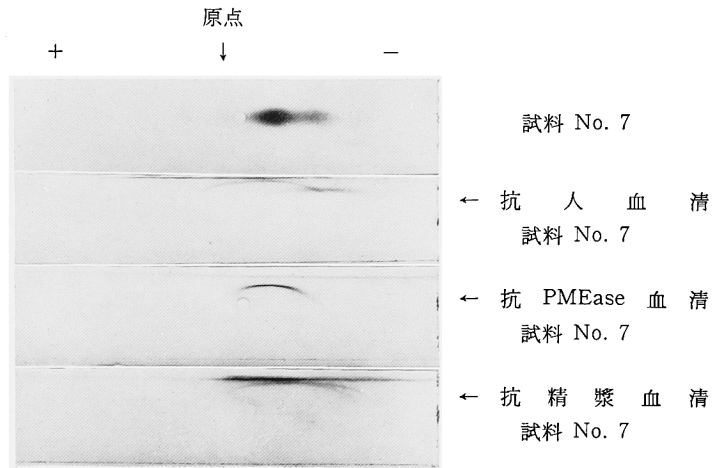


図5 電気泳動ならびに免疫電気泳動

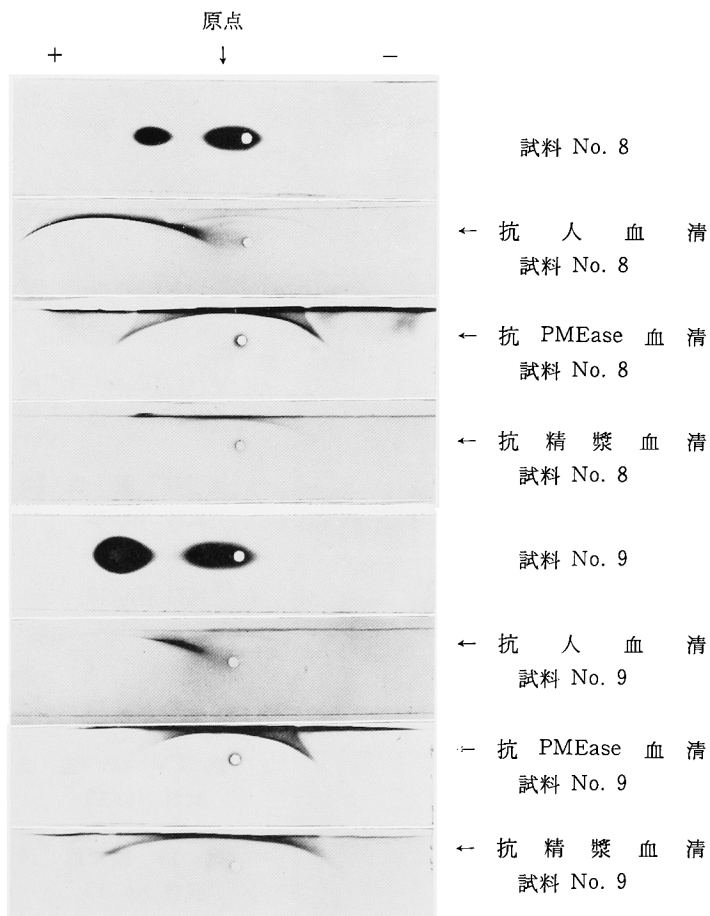


図6 電気泳動ならびに免疫電気泳動

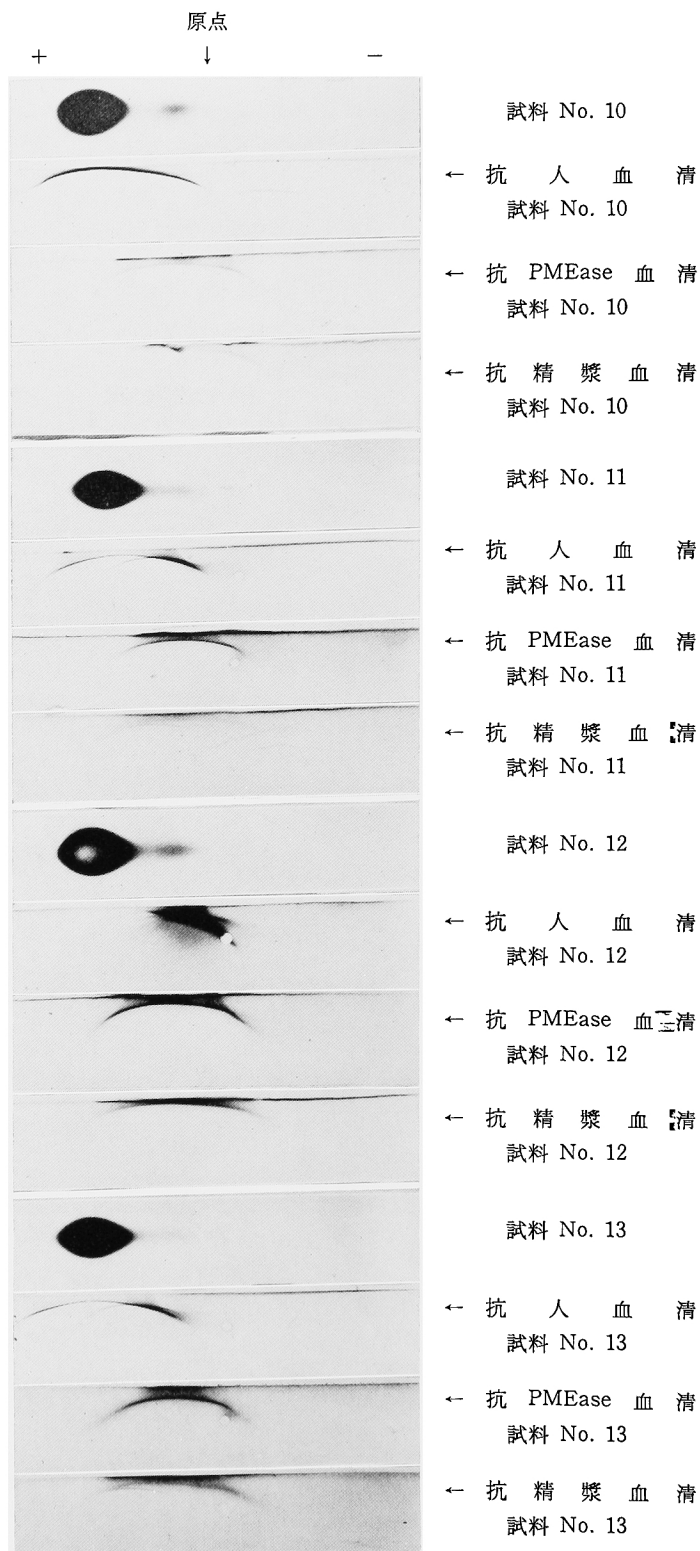


図7 電気泳動ならびに免疫電気泳動

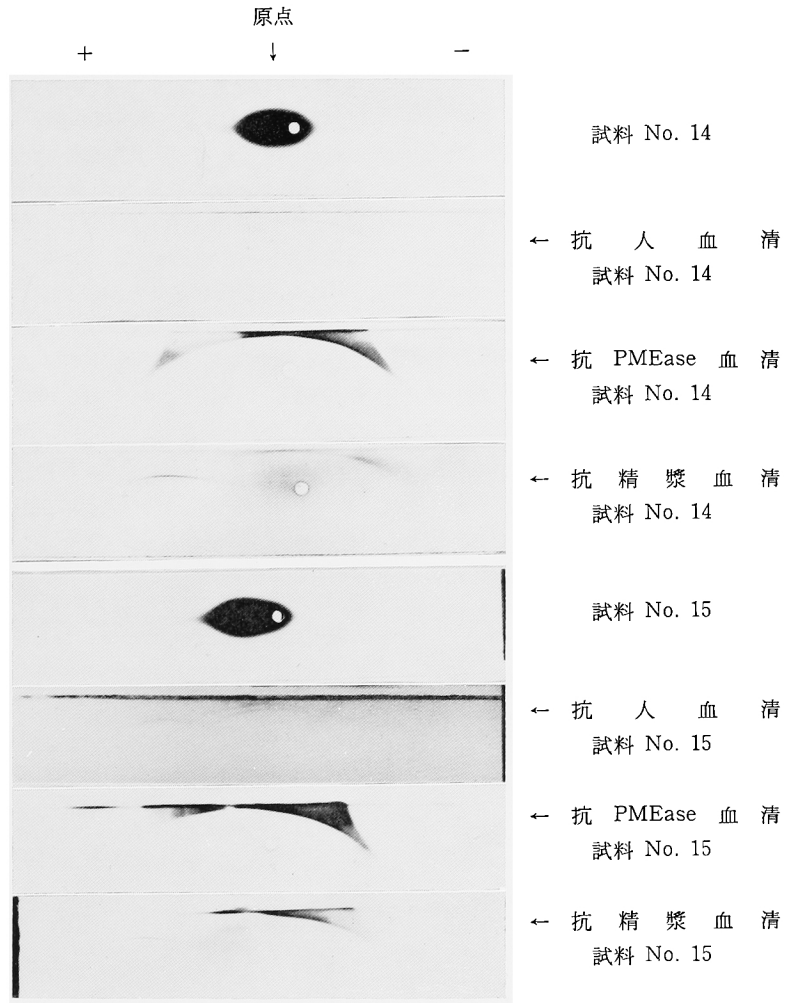


図8 電気泳動ならびに免疫電気泳動

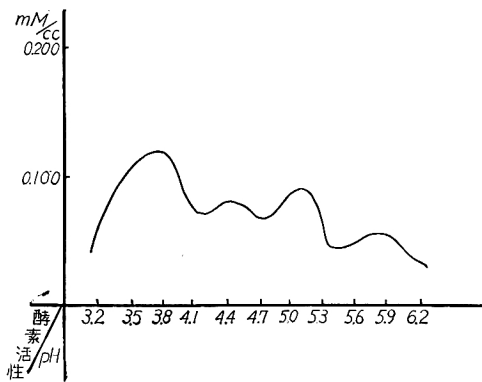


図9 試料 No. 7 の酵素活性と pH との関係

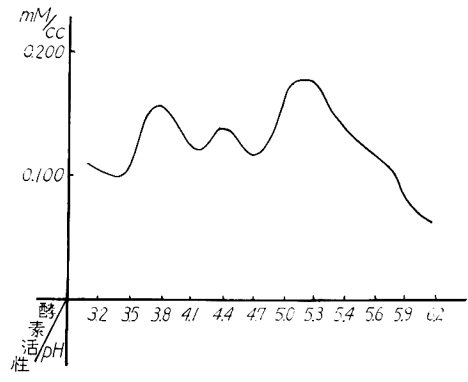


図10 試料 No. 8 の酵素活性と pH との関係

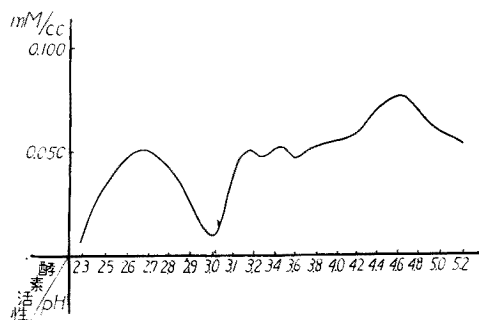


図11 試料 No. 11 の酵素活性と pH との関係

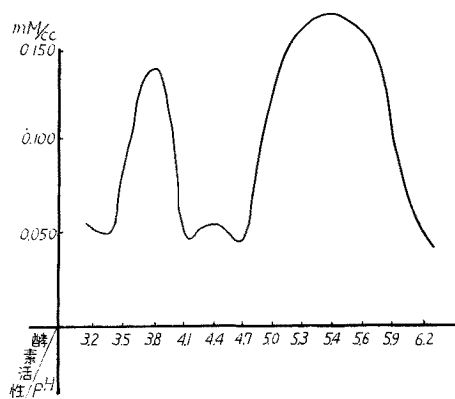
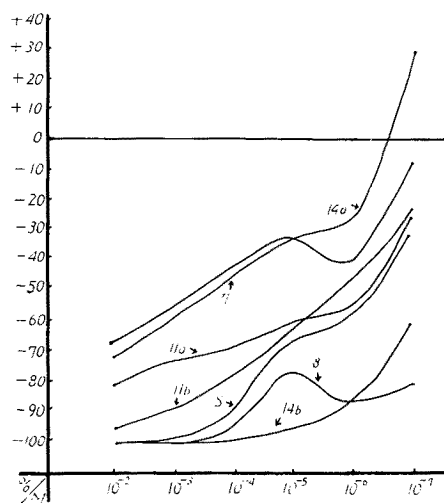


図12 試料 No. 14 の酵素活性と pH との関係

図13 Hg^{2+} と酵素活性との関係

S—精液, 7—試料 No. 7 の PMEase, 8—試料 No. 8 の PMEase, 11a—試料 No. 11 の PMEase で pH 2.7 の場合, 11b—試料 No. 11 の PMEase で pH 4.6 の場合, 14a—試料 No. 14 の PMEase で pH 3.8 の場合, 14b—試料 No. 14 の PMEase で pH 5.4 の場合.

試料 No. 14 は pH 3.8 と 5.4 に高い Peak を見るが, 図12のように試料 No. 8 で認められた pH 4.4 での Peak は非常に低くなっている.

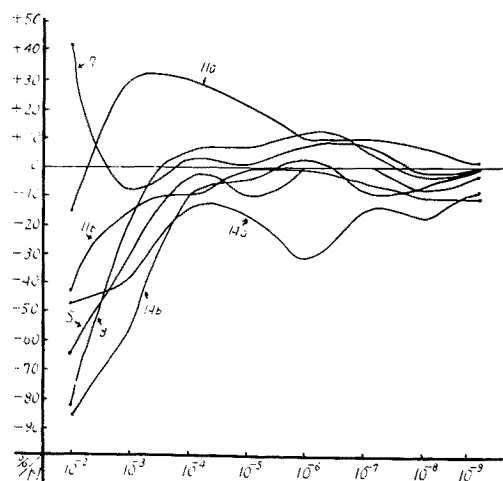
4. 酵素に対する各種薬剤の影響

試料 No. 11 で pH 2.7 の場合を 11a, pH 4.6 の場合を 11b とし, 試料 No. 14 で pH 3.8 の場合を 14a, pH 5.4 の場合を 14b とし, 対照として測定した精液を S として表わした.

HgCl_2 の影響をみると, 図13のように 8, 14b は 10^{-4}M でも 100% 近い阻害が見られ, 対照の S より強く阻害されている. 11b も 10^{-3}M で 90% の阻害が見られるが, 7, 11a, 14a 等は 10^{-3}M では 80% 以下の阻害しか見られない.

$\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ の影響をみると, 図14のように 7 は 10^{-2}M で 40% の促進が見られるが, それ以下の濃度ではほとんど影響されなくなる. 11a は 10^{-2}M で軽度阻害されるが, $10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}\text{M}$ では 20~30% の促進が認められる. 11b, 14a 等は 10^{-2}M で 50% 以下の阻害しか見られないが, 8, 14b 等は 80% 以上の阻害が見られ, 対照の S は 65% の阻害であった.

I_2 の影響を見ると図15のように, 7 は 10^{-3}M で 87% の阻害であるが, 10^{-7}M でも 48% の阻害が見られる. 11a, 11b, 14a 等も 10^{-6}M になっても 50% 以上の阻害が見られるが, 10^{-7}M になるとほとんど影

図14 Pb^{2+} と酵素活性との関係

S—精液, 7—試料 No. 7 の PMEase, 8—試料 No. 8 の PMEase, 11a—試料 No. 11 の PMEase で pH 2.7 の場合, 11b—試料 No. 11 の PMEase で pH 4.6 の場合, 14a—試料 No. 14 の PMEase で pH 3.8 の場合, 14b—試料 No. 14 の PMEase で pH 5.4 の場合.

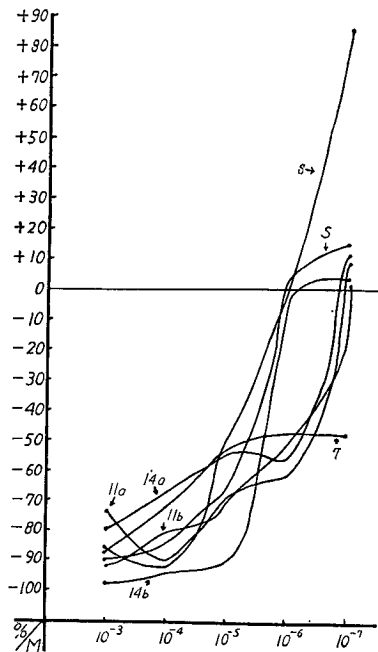


図15 I_2 と酵素活性との関係

S—精液，7—試料 No. 7 の PMEase，8—試料 No. 8 の PMEase，11a—試料 No. 11 の PMEase で pH 2.7 の場合，11b—試料 No. 11 の PMEase で pH 4.6 の場合，14a—試料 No. 14 で pH 3.8 の場合，14b—試料 No. 14 の PMEase で pH 5.4 の場合。

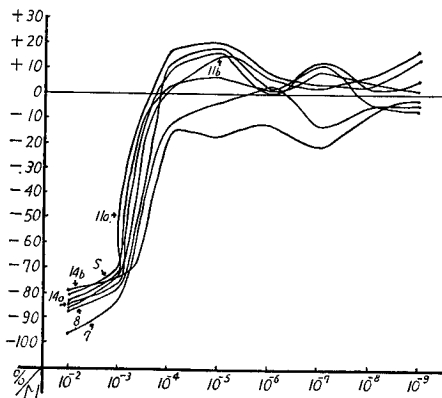


図16 F^- と酵素活性との関係

S—精液，7—試料 No. 7 の PMEase，8—試料 No. 8 の PMEase，11a—試料 No. 11 の PMEase で pH 2.7 の場合，11b—試料 No. 11 の PMEase で pH 4.6 の場合，14a—試料 No. 14 の PMEase で pH 3.8 の場合，14b—試料 No. 14 の PMEase で pH 5.4 の場合。

響が見られなくなる。8，14b，S等は $10^{-5}M$ までは50%以上の阻害が認められるが， $10^{-6}M$ では影響がなくなり，8のみ $10^{-7}M$ となると強い促進作用が認められた。

NaF の影響を見ると図16のように， $10^{-3}M$ 以上では70%以上の阻害が見られるが， $10^{-4}M$ になるとほとんど影響がなくなる。

p-CMB の影響は，図17のように $10^{-3}M$ では全ての試料が90%～100%阻害されるが11bのみ $10^{-4}M$ で急激に阻害が減少し，他の試料は70%以上の阻害が見られる。

$AgNO_3$ の影響は，図18のように全ての試料が $10^{-2}M$ では90%以上阻害され， $10^{-3}M$ では7，14aが74%阻害されるが，11a，11b，8，14b，S等は90%以上阻害される。 $10^{-4}M$ でも全ての試料が60%以上阻害されている。

酒石酸の影響は図19のように全ての試料が $10^{-2}M$ で90%かそれ以上の阻害が見られるが， $10^{-5}M$ で14aを除いてほとんど影響がなくなるのに，14aは $10^{-4}M$ から酵素活性が促進され $10^{-5}M$ では強い促進が見られた。

$CuSO_4$ の影響は図20のように，14bのみ $10^{-3}M$ で90%近い促進が見られるが，他の試料は30%以下の促進であった。

$MgSO_4$ の影響を見ると図21のように，7は $10^{-4}M$ で62%の阻害がみられ， $10^{-3}M$ 以下では影響がなく

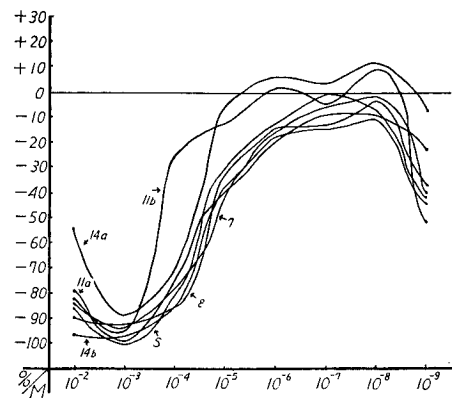
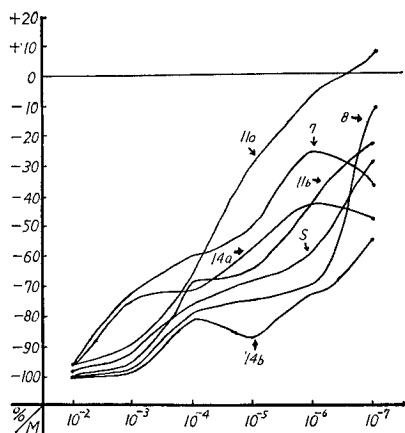
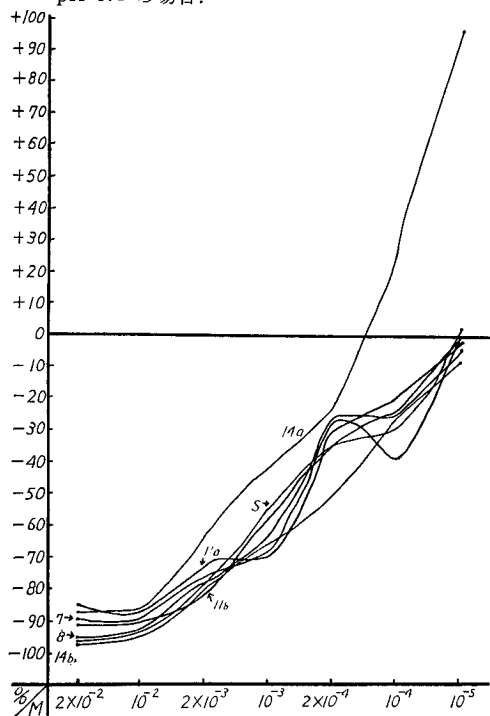


図17 p-CMB と酵素活性との関係

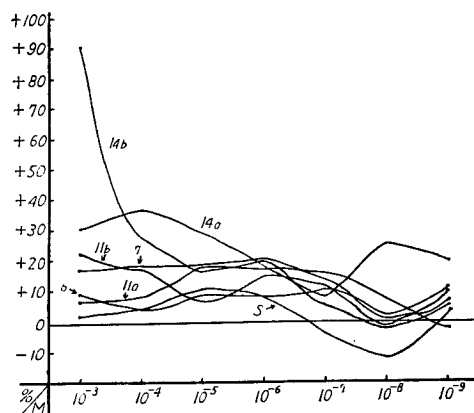
S—精液，7—試料 No. 7 の PMEase，8—試料 No. 8 の PMEase，11a—試料 No. 11 の PMEase で pH 2.7 の場合，11b—試料 No. 11 の PMEase で pH 4.6 の場合，14a—試料 No. 14 の PMEase で pH 3.8 の場合，14b—試料 No. 14 の PMEase で pH 5.4 の場合。

図18 Ag^+ と酵素活性との関係

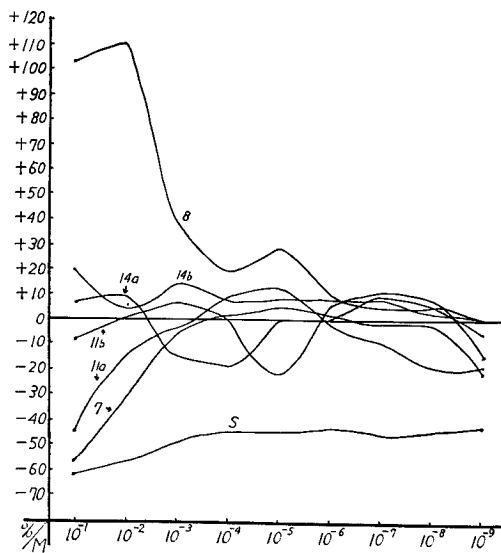
S—精液，7—試料 No. 7 の PMEase，8—試料 No. 8 の PMEase，11a—試料 No. 11 の PMEase で pH 2.7 の場合，11b—試料 No. 11 の PMEase で pH 4.6 の場合，14a—試料 No. 14 の PMEase で pH 3.8 の場合，14b—試料 No. 14 の PMEase で pH 5.4 の場合。

図19 l 酒石酸と酵素活性との関係

S—精液，7—試料 No. 7 の PMEase，8—試料 No. 8 の PMEase，11a—試料 No. 11 の PMEase で pH 2.7 の場合，11b—試料 No. 11 の PMEase で pH 4.6 の場合，14a—試料 No. 14 の PMEase で pH 3.8 の場合，14b—試料 No. 14 の PMEase で pH 5.4 の場合。

図20 Cu^{2+} と酵素活性との関係

S—精液，7—試料 No. 7 の PMEase，8—試料 No. 8 の PMEase，11a—試料 No. 11 の PMEase で pH 2.7 の場合，11b—試料 No. 11 の PMEase で pH 4.6 の場合，14a—試料 No. 14 の PMEase で pH 3.8 の場合，14b—試料 No. 14 の PMEase で pH 5.4 の場合。

図21 Mg^{2+} と酵素活性との関係

S—精液，7—試料 No. 7 の PMEase，8—試料 No. 8 の PMEase，11a—試料 No. 11 の PMEase で pH 2.7 の場合，11b—試料 No. 11 の PMEase で pH 4.6 の場合，14a—試料 No. 14 の PMEase で pH 3.8 の場合，14b—試料 No. 14 の PMEase で pH 5.4 の場合。

なる。11aも $10^{-1}M$ で45%の阻害が認められるが、 $10^{-2}M$ 以下では影響なくなる。11b, 14a, 14b等はほとんど影響が認められない。8は $10^{-1}M$, $10^{-2}M$ で強い促進が見られ、 $10^{-4}M$ になるとほとんど影響がなくなる。対照のSは、 $10^{-1}M$ で57%の阻害が見られ、 $10^{-3}M$ でも43%の阻害が認められた。

$FeSO_4$ の影響は図22のように、7が $10^{-4}M$ で30%、14aが $10^{-3}M$ で47%の阻害を認め、11bが $10^{-3}M$ で37%の促進を認める外は影響を認めない。

$CaCl_2$ の影響は図23のように、11a, 14a, 14b等が $10^{-2}M$ で50%以上の促進を認めるが、 $10^{-3}M$ になると影響がなくなる。 $10^{-2}M$ で8は46%、11bは33%、7は37%の促進を認めるが、対照のSはほとんど影響を認めない。

$ZnSO_4$ の影響は図24のように、14aが $10^{-2}M$ で78%、 $10^{-3}M$ で51%の促進が認められるが、他の試料は影響を見ない。

モノヨード酢酸の影響は図25のように、全ての試料に影響を認めなかった。

$HCHO$ の影響は図26のように、11aが59%、14aが46%、8が42%の促進を $10^{-1}M$ で認めるが、 $10^{-2}M$ では影響を認めない。他の試料は全て影響を認めなかった。

H_2O_2 の影響は図27のように、14aで $10^{-2}M$ まで70%以上の促進が認められ、 $10^{-3}M$ で40%以下の促進

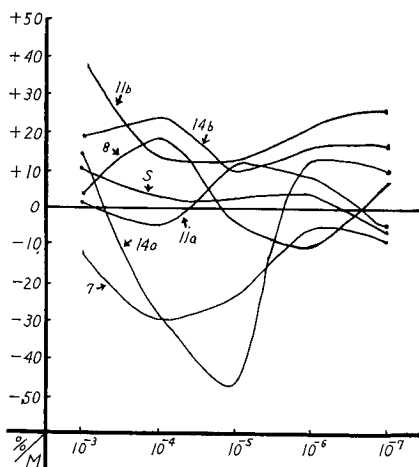


図22 Fe^{2+} と酵素活性との関係

S—精液、7—試料 No. 7 の PMEase, 8—試料 No. 8 の PMEase, 11a—試料 No. 11 の PMEase で pH 2.7 の場合、11b—試料 No. 11 の PMEase で pH 4.6 の場合、14a—試料 No. 14 の PMEase で pH 3.8 の場合、14b—試料 No. 14 の PMEase で pH 5.4 の場合。

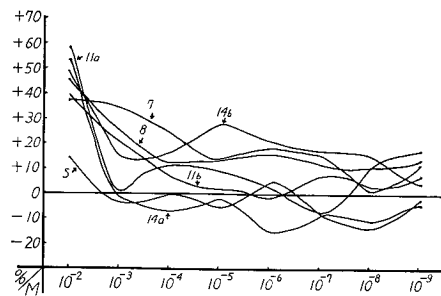


図23 Ca^{2+} と酵素活性との関係

S—精液、7—試料 No. 7 の PMEase, 8—試料 No. 8 の PMEase, 11a—試料 No. 11 の PMEase で pH 2.7 の場合、11b—試料 No. 11 の PMEase で pH 4.6 の場合、14a—試料 No. 14 の PMEase で pH 3.8 の場合、14b—試料 No. 14 の PMEase で pH 5.4 の場合。

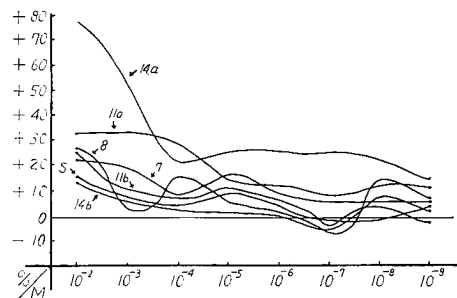


図24 Zn^{2+} と酵素活性との関係

S—精液、7—試料 No. 7 の PMEase, 8—試料 No. 8 の PMEase, 11a—試料 No. 11 の PMEase で pH 2.7 の場合、11b—試料 No. 11 の PMEase で pH 4.6 の場合、14a—試料 No. 14 の PMEase で pH 3.8 の場合、14b—試料 No. 14 の PMEase で pH 5.4 の場合。

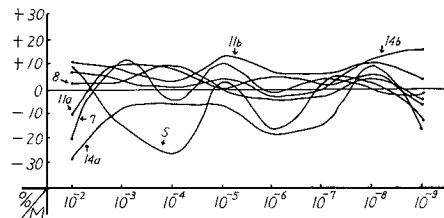


図25 モノヨード酢酸と酵素活性との関係

S—精液、7—試料 No. 7 の PMEase, 8—試料 No. 8 の PMEase, 11a—試料 No. 11 の PMEase で pH 2.7 の場合、11b—試料 No. 11 の PMEase で pH 4.6 の場合、14a—試料 No. 14 の PMEase で pH 3.8 の場合、14b—試料 No. 14 の PMEase で pH 5.4 の場合。

となる。対照の S が $10^{-1}M$ で 53% の促進が認められるが、他の試料は全てほとんど影響なかった。

KCN の影響は図 28 のように、対照の S が $10^{-2}M$ で 71%、7 が 63%、14a が 59%、11a が 48%、14b が 45%、8 が 44% の促進が認められるが、 $10^{-3}M$ になると 40% 以下になる。11b はほとんど影響を認めない。

5. Michaelis の恒数

表 2 に示すように、 β -glycerophosphate に対する Km 値は 14a、7、8、14b、11b、S、11a の順に、phenyl phosphate に対する Km 値は 14b、14a、8、11b、7、S、11a の順に、p-nitrophenyl

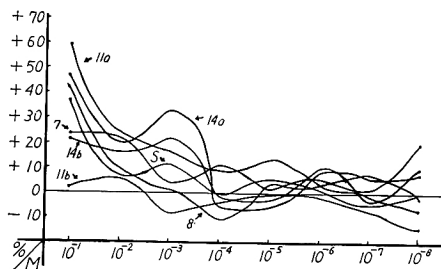


図 26 HCHO と酵素活性との関係

S—精液、7—試料 No. 7 の PMEase、8—試料 No. 8 の PMEase、11a—試料 No. 11 の PMEase で pH 2.7 の場合、11b—試料 No. 11 の PMEase で pH 4.6 の場合、14a—試料 No. 14 の PMEase で pH 3.8 の場合、14b—試料 No. 14 の PMEase で pH 5.4 の場合。

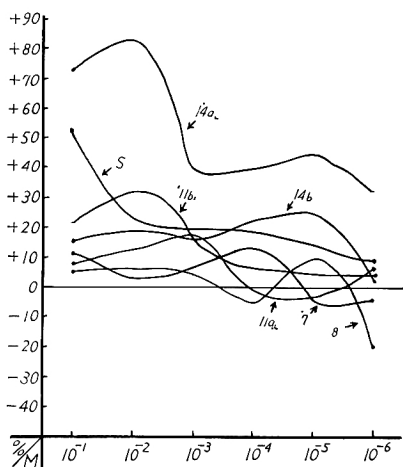


図 27 H_2O_2 と酵素活性との関係

S—精液、7—試料 No. 7 の PMEase、8—試料 No. 8 の PMEase、11a—試料 No. 11 の PMEase で pH 2.7 の場合、11b—試料 No. 11 の PMEase で pH 4.6 の場合、14a—試料 No. 14 の PMEase で pH 3.8 の場合、14b—試料 No. 14 の PMEase で pH 5.4 の場合。

phosphate に対する Km 値は 14b、8、S、14a、7、11a、11b の順にそれぞれ大きくなっている。

6. 沈降測定

図 29 のように左右対称の曲線が得られた。

表 2 Km 値

試料 No.	基質 pH	Na- β -glycerophosphate	disodium phenyl phosphate	p-nitrophenyl phosphate
7	3.8	$1.3 \times 10^{-3}M$	$8.3 \times 10^{-4}M$	$2.3 \times 10^{-5}M$
8	5.3	$1.8 \times 10^{-3}M$	$7.7 \times 10^{-4}M$	$1.8 \times 10^{-5}M$
11	2.7	$4.2 \times 10^{-3}M$	$11.1 \times 10^{-4}M$	$2.6 \times 10^{-5}M$
	4.6	$1.9 \times 10^{-3}M$	$7.7 \times 10^{-4}M$	$3.3 \times 10^{-5}M$
14	3.8	$0.5 \times 10^{-3}M$	$7.7 \times 10^{-4}M$	$2.3 \times 10^{-5}M$
	5.4	$1.8 \times 10^{-3}M$	$5.9 \times 10^{-4}M$	$1.4 \times 10^{-5}M$
S	5.0	$3.7 \times 10^{-3}M$	$9.1 \times 10^{-4}M$	$2.2 \times 10^{-5}M$

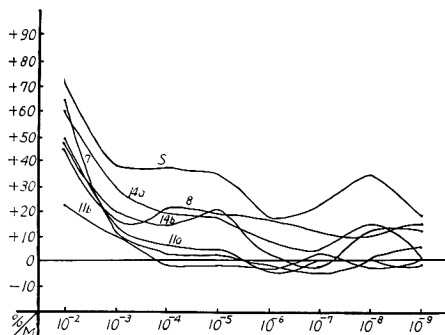


図 28 CN^- と酵素活性との関係

S—精液、7—試料 No. 7 の PMEase、8—試料 No. 8 の PMEase、11a—試料 No. 11 の PMEase で pH 2.7 の場合、11b—試料 No. 11 の PMEase で pH 4.6 の場合、14a—試料 No. 14 の PMEase で pH 3.8 の場合、14b—試料 No. 14 の PMEase で pH 5.4 の場合。

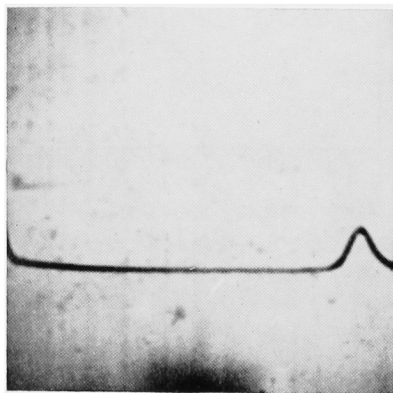


図 29 沈降分析

考 察

前立腺 PMEase の精製は 現在迄色々試みられ、蛋白質の変性が少なく、酵素以外の蛋白質の混在が少ない方法へと改良されて来た。Boman¹⁷⁾は Dowex 50 を用いた column chromatography を行ない、電気泳動的にも、超遠心法的にも homogeneous な酵素を得たと報告している。London¹⁸⁾等は XE 69 を用いて精製を行ない、PMEase の結晶化に成功したと報告している。Ostrowski 等¹⁰⁾は DEAE-cellulose を用いて PMEase の精製を行ない、澱粉ゲル電気泳動を行ない homogeneous であったと報告している。更に Ostrowski¹⁰⁾は DEAE-cellulose column chromatography の後、再び CM-cellulose による column chromatography を行ない、これを分析用超遠心機にかけて PMEase の分子量を計算し、95,800 と報告している。須山等⁶⁾は London 等の行なった精製方法で PMEase を精製し、家兎に注射して PMEase に対する免疫血清を作った。著者は電気泳動的にも、超遠心法的にも homogeneous であるものが、免疫学的にも homogeneous であるかどうかを調べる目的でこの実験を行なった。

DEAE-cellulose column chromatography を行なうと、図 1 のように Ostrowski 等¹⁰⁾の報告には見られない Peak II と、それに一致して PMEase の活性が見られた。免疫電気泳動によって、Peak II の PMEase には γ グロブリンに相当する部分の混在が認められ、Peak III の PMEase にはアルブミンの混在が認められた。Myrbäck²⁰⁾は精製した PMEase は、アルブミンの性質を有する蛋白質だと報告しているが、Ostrowski 等¹⁰⁾も Peak IV の PMEase には、260m μ の波長で最高の吸光度を有するものがあり、また澱粉ゲル電気泳動の態度や至適 pH 等が異なることから、違った蛋白かまたは PMEase が不活性蛋白質等と結合したものだろと述べている。著者も免疫電気泳動の態度を、試料 No. 8, 11, 14 等と比較し、Peak IV の PMEase はアルブミンと強く結合しているのではないかと思う。

Peak II, III, IV の PMEase の電気泳動ならびに免疫電気泳動の態度を比較してみると、図 5, 6, 7 に見られるように、Peak III の PMEase は原点よりやや陽極側に、Peak IV の PMEase は Peak III の PMEase より更に陽極側に泳動されているのに反して、Peak II の PMEase は原点より陰極側に泳動されている。この相違は、各 PMEase が全く異なった蛋白かまたは不活性蛋白との結合のためと推測される。

Peak III の PMEase に混在するアルブミンは、更に同じ方法で rechromatography を行なうと、図 8 のように電気泳動では 1 つのスポットとして現れ、殆んど除かれているが、更に免疫泳動を行なうとトランスフィリンの混在が認められる。須山は第 48 次日本法医学会総会で、精製した PMEase が超遠心法により左右対称の沈降曲線が得られるにもかかわらず、分子量 9 万のトランスフィリンの混在が証明されることから、PMEase の分子量が 9 万内外であるという私見を述べている。著者も No. 14 の試料を分析用超遠心機にかけた所、トランスフィリンの混在があるにもかかわらず全く同じように左右対称の曲線が得られ、PMEase の分子量がトランスフィリンに近いものと思われる。

至適 pH では、前岡¹³⁾は精液の PMEase の至適 pH を測定し、 β -glycerophosphate を基質とした場合 5.4、phenyl phosphate を基質とした場合 5.5 と報告しており、Ostrowski 等¹⁰⁾は前立腺の PMEase について、p-nitrophenyl phosphate を基質として測定し、4.8 と報告している。図 9, 10, 11, 12 のように、著者の測定では一峰性の曲線は得られず、2~4 の Peak が認められた。精製の過程で PMEase が変性して、このような結果が得られることも考え、手術によって剔出した前立腺を凍結し、薄く切り 0.2M acetate buffer (pH 5.0) で抽出した液で至適 pH を測定した。pH 3.8, 5.0, 5.6 に Peak を有する三峰性の曲線が得られ、このことから考え前立腺には種類の異なる PMEase が存在するのではないかと思われる。

各種薬剤の影響を見てみると、前岡¹³⁾は Fe^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 等も精液の PMEase を 10^{-2}M の濃

度で50~80%阻害すると報告しており, Fishman 等²¹⁾も Fe^{2+} は acetate buffer を用いると80%の阻害を認め, Cu^{2+} は8%の阻害を認めたと報告しているが, 著者の実験では阻害よりむしろ促進作用を認めた. Fishman 等は Mg^{2+} については影響なし, わずかの促進作用と報告しているが, 図21のように試料 No. 8 は強く促進されているが, これを rechromatography した試料 No. 14 は殆んど影響がなくなっている. I_2 , NaF, p-CMB, l 酒石酸等によって, 各試料は阻害の程度に差こそあれ全て強く阻害されている. Reiner 等²²⁾は F^- の阻害作用が基質濃度や, 酵素溶液中の不活性蛋白質によって違った値を示すと報告している. また Tanford²³⁾は金属イオンとアルブミンの結合におよぼす pH の影響を報告し, pH 5.0 近くから Pb^{2+} , Zn^{2+} 等は蛋白質と結合し始めるが, Cu^{2+} は pH 3.0 近くから結合を認めると報告している. 薬剤の影響を検討する場合 pH 酵素溶液中の不活性蛋白質の量, 酵素蛋白の量, 薬剤の濃度等を考慮しなければならないと思う. 特に薬剤の作用効果が弱い場合に, 値が一定しないのもこれらの多くの因子が関与しているためと考える.

Km 値は, β -glycerphosphate を基質とした場合 $11a > s > 11b > 14b = 8 > 7 > 14a$ の順になり, Hudson²⁴⁾等は粗製酵素で 2.1×10^{-3} , 40倍精製酵素で 2.0×10^{-3} , 300倍精製酵素で 2.4×10^{-3} と報告し, 精製の度合と Km の値は関係ないと述べているが, 著者の実験でもこれに近い値を示し, 精製の度合とは無関係であった. phenyl phosphate を基質とした場合は, $11a > s > 7 > 8 = 11b = 14b > 14a$ の順となり, Hudson 等²⁴⁾の報告では, 粗製酵素で 1.8×10^{-4} , 40倍精製酵素で 2.0×10^{-4} , 300倍精製酵素で 1.5×10^{-4} となっており, Schmidt²⁵⁾は30倍精製酵素で 7.5×10^{-4} , 300倍精製酵素で 1.5×10^{-4} と報告している. 著者の結果は諸家の報告より大きい, Hudson²⁴⁾等は基質の中の Na^+ , 酵素を保存している間にガラス容器から出て来るイオン等が反応を阻害するので高い値が出るので, ethylenediamine tetraacetate のように金属イオン

と強く結合する物質を用いると, イオン影響を除けると報告している. p-nitrophenyl phosphate を基質とした場合は, $11b > 11a > 7 = 14a > s > 8 > 14b$ の順となり, Kilsheimer 等²⁶⁾は pH3.33~pH5.45 の間では Km 値は安定しており, $2.3 \times 10^{-5} \sim 4.8 \times 10^{-5}$ の範囲にあると報告している. 須山²⁷⁾は人精液中の PMEase で, 1.5×10^{-5} と報告しているが, 著者の結果もこれらの値に一致する結果を得た.

結 論

ヒト前立腺組織より London および Ostrowski 等の方法によって前立腺 PMEase の分離精製を行なった.

column chromatography により酵素活性の存在する II, III, IV の3つの Peak を分離した. 第II Peak の PMEase は今迄の報告には見られないものであった.

第III Peak の分画を更に rechromatography を行ない, 前半の最も酵素活性の強い分画を採取して, 家兎を免疫し抗ヒト前立腺 PMEase 免疫血清を作製した.

各分画について寒天ゲル電気泳動を行なうと共に, 抗ヒト前立腺 PMEase, 精漿, 各種血清成分の家兎免疫血清を用いて免疫電気泳動を行なった.

各分画について至適 pH, 薬物による阻害実験, Michaelis の恒数の測定を行ない, 酵素学的特性を検討した.

Peak II の PMEase は他の分画とは対称的に陰極側に泳動し, 至適 pH は3.8に最高の活性を有する Peak の外に, 4.4, 5.0, 5.9 にも Peak を有する曲線が得られた. 薬剤の影響は 10^{-2}M で Hg^{2+} が68%, l 酒石酸が92%, F^- が96%, Ag^+ が99%の阻害を示し, CN^- は68%の促進を示し, 10^{-3}M で I_2 が87%, p-CMB が94%の阻害を示した. Km 値は β -glycerophosphate, phenyl phosphate, p-nitrophenyl phosphate の順に 1.3×10^{-3} , 8.3×10^{-4} , 2.3×10^{-5} であった.

Peak III の PMEase は電気泳動ならびに免疫電気泳動で, 原点よりわずかに陽極に泳動さ

れ、至適 pH は 3.8, 4.4, 5.3 に Peak を有し、pH 5.3 での活性値が最高であった。薬剤の影響は $10^{-2}M$ で Pb^{2+} が 83%, F^{-} 87%, l 酒石酸が 96%, Ag^{+} , Hg^{2+} が 100% の阻害を示し、 Mg^{2+} が 99% の促進を示した。 $10^{-3}M$ で I_2 が 86%, p-CMB が 93% の阻害を示した。Km 値は β -glycerophosphate, phenyl phosphate, p-nitrophenyl phosphate の順に 1.8×10^{-3} , 7.7×10^{-4} , 1.8×10^{-5} であった。

Peak IV の PMEase は電気泳動ならびに免疫電気泳動で、Peak III の PMEase より更に陽極で、Peak II の PMEase と対称の位置に泳動された。至適 pH は 2.7 と 4.6 に Peak を有する曲線を得、各種薬剤の影響は pH 2.7 で濃度が $10^{-2}M$ で Hg^{2+} に 82%, F^{-} に 84%, l 酒石酸に 89%, Ag^{+} に 97% の阻害を示し、 Ca^{2+} に 58%, $HCHO$ に 59% の促進を示した。 $10^{-3}M$ の濃度で I_2 に 73%, p-CMB に 79% の阻害を示した。pH 4.6 で濃度が $10^{-2}M$ で F^{-} に 86%, l 酒石酸に 92%, Hg^{2+} に 95%, Ag^{+} 99% の阻害を示し、 $10^{-3}M$ の濃度で I_2 に 92%, p-CMB に 83% の阻害を示した。Km 値は β -glycerophosphate, phenyl phosphate, p-nitrophenyl phosphate の順に、pH 2.7 で 4.2×10^{-3} , 11.1×10^{-4} , 2.6×10^{-5} pH 4.6 で 1.9×10^{-3} , 7.7×10^{-4} , 3.3×10^{-5} であった。

Peak III の分画を更に rechromatography を行なうと、電気泳動で 1 つのスポットとして現れ、超遠心法でも左右対称の沈降曲線が得られたが、免疫電気泳動を行なうとトランスフィリンの混在が認められ、これを分離することは出来なかった。至適 pH は 3.8 と 5.4 に Peak を認め、各種薬剤の影響は pH 3.8 で濃度が $10^{-2}M$ で Hg^{2+} に 73%, F^{-} に 80%, l 酒石酸に 88%, Ag^{+} に 97% の阻害を示し、 H_2O_2 に 83%, Ca^{2+} に 52%, Zn^{2+} に 78%, CN^{-} に 59% の促進を示し、 $10^{-3}M$ の濃度で I_2 に 79%, p-CMB に 54% の阻害を示した。pH 5.4 で濃度が $10^{-2}M$ で F^{-} に 85%, Pb^{2+} に 87%, l 酒石酸に 98%, Ag^{+} と Hg^{2+} に 100% の阻害を示し、 Cu^{2+} に 50% の促進を示した。 $10^{-3}M$ の濃度で I_2 に 98%, p-CMB に 97% の阻害を示し、 Cu^{2+} に 90%

の促進を示した。Km 値は β -glycerophosphate, phenyl phosphate, p-nitrophenyl phosphate の順に pH 3.8 で 0.5×10^{-3} , 7.7×10^{-4} , 1.4×10^{-5} pH 5.4 で 1.8×10^{-3} , 5.9×10^{-4} , 1.4×10^{-5} であった。

稿を終るに臨み、実験を直接御指導賜わった岐阜大学医学部法医学教室須山弘文教授ならびに教室員各位に心から感謝申し上げます。

文 献

- 1) Angeletti, P., Moore, B., Sontzeff, V. and Gayle, R. : Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **108** : 53, 1961.
- 2) Lawrence, S. H., Melnick, P. J. and Weimer, H. E. : Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **105** : 572, 1960.
- 3) 高橋・和嶋・水島 : 医学と生物学, **66** : 306, 1963.
- 4) Abdul-Fadl, M. A. M. and King, E. J. : Biochem. J., **45** : 51, 1949.
- 5) Fishman, W. H. and Lerner, F. : J. Biol. Chem., **200** : 89, 1953.
- 6) H. Suyama und H. Sawada : Dtsch. Z. Ges. Gerichtl. Med., **53** : 175, 1963.
- 7) 萩原 : 酵素研究法, 1 巻, 141, 朝倉書店, 東京, 1960.
- 8) 須山・沢田・山田 西浦 : 科警研報告, **12** : 473, 1959.
- 9) London, M., Sommer, A. and Hudson, P. B. : J. Biol. Chem. **216** : 81, 1955.
- 10) Ostrowski, W. and A. Tsugita : Arch. Biochem. and Biophys., **94** : 68, 1961.
- 11) Bessey, O. A., Lowry, O. H. and Brock, M. J. : J. Biol. Chem., **164** : 321, 1946.
- 12) 須山 : 日法医誌, **18** : 166, 1964.
- 13) 前岡 : 岐阜医紀, **8** : 946, 1960.
- 14) Shinowara, G. Y., Jones, L. M. and Reinhardt, H. L. : J. Biol. Chem., **142** : 921, 1942.
- 15) King, E. J. and Armstrong, A. R. : Canad. M. A. J., **31** : 376, 1936.
- 16) Lineweaver, H. and Burk, D. : J. Am. Chem. Soc., **56** : 658, 1934.
- 17) Boman, H. G. : Biochem. Biophys. Acta, **16** : 245, 1955.

- 18) London, M., Sommer, A. and Hudson, P. B. : J. Biol. Chem., **216** : 81, 1955.
- 19) Ostrowski, W. : Biochem. Biophys. Acta, **105** : 196, 1965.
- 20) Boyer, P. D., Lardy, H. and Myrbäck, K. : The Enzymes, Vol. 5, 45, Academic Press ; New York, 1961.
- 21) Fishman, W. H. and Davidson, H. M. : Methods of Biochemical Analysis, Vol. IV, 260, Interscience Publishers. New York, 1957.
- 22) Reiner, J. M., Tsuboi, K. K. and Hudson, P. B. : Arch. Biochem. and Biophys., **56** : 165, 1955.
- 23) Tanford, C. : J. Am. Chem. Soc., **74** : 211, 1952.
- 24) Tsuboi, K. K. and Hudson, P. B. : Arch. Biochem. and Biophys., **55** : 191, 1955.
- 25) Schmidt, G. : The Enzymes, Vol. 5, 40, Academic Press., New York, 1961.
- 26) Kilsheimer, G. S. and Axelrod, B. : J. Biol. Chem., **227** : 879, 1957.
- 27) 須山：蛋白質核酸酵素, **9** : 11, 1964.

(1966年3月26日受付)