OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Ehrlich腹水癌細胞のγ-Glutamyltransferase活性とアミノ酸輸送
Author(s)	塩崎, 裕
Citation	大阪大学, 1977, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/31924
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【25】

氏名・(本籍)	塩崎　裕
学位の種類	医学博士
学位記番号	第4033号
学位授与の日付	昭和52年7月27日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位論文題目	Ehrlich腹水癌細胞のγ-Glutamyltransferase活性とアミノ酸輸送
論文審査委員	(主査) 教授 坂本　幸哉 (副査) 教授 田中　武彦　教授 北川　正保

論文内容の要旨

〔目　的〕

我々の教室で継代されてきた2種のEhrlich腹水癌細胞(EAT細胞)のγ-Glutamyltransferase(γ-GT)活性が約10倍違うことに注目しEAT細胞のアミノ酸(L－Methionine)輸送にγ-GTが関与している可能性を検討した。

〔方法ならびに成績〕

Ⅰ，γ-GT活性とその性質

(1) 2種の細胞からえたホモジェネートのγ-GT活性は，1分間にmg蛋白当り形成されるp-Nitroaniline のnmole 数で表わすとHG(γ-GT活性の高い細胞)で1.9± 0.43 (0.61 ± 0.12)，LG(γ-GT活性の低い細胞)では0.2± 0.03 (0.047± 0.01)となった。〔( )は水解活性を表わす〕。基質であるGlutathione(GSH)含量は細胞1 g中に含まれるμmole数で表わしてHGで0.78± 0.11 LGでは1.19 ± 0.18 となりγ-GT活性の高い細胞の方がGSH含量が少ない事が分った。

(2) γ-GT活性に対する種々のアミノ酸，ペピチドの促進効果をみるとGlycylglycine で著しく活性化されたが，アミノ酸のうちではL-Methionine が最も大きな促進効果を示し，次いでHGではL-Arginine, L-Cysteine, L-Phenylalanine LGではL-Glutamate, L-Cysteine, L-Arginine の順であった。ペプチド，アミノ酸による促進効果はHGよりもLGで顕著であった。

(3) γ-GTの基質に対する親和性をしらべると，L-Methionine, γ-Glutamyl-p-nitroanilide

に対するみかけのKm値は何れもmM水準にあり，HG，LG間に大差はなかった。

(4) ホモジェネートの示したγ-GT総括性の約90%は顆粒画分に見出され，上清には検出できなかった。

(5) γ-GT分子に結合することが知られているCon Aは，γ-GT活性にほとんど影響を示さなかったが，アミノ酸とりこみを阻害するCytochalasin Bは低濃度で部分的な阻害を示した。HG，LG両者の間に大差はない。

Ⅱ．細胞によるL-Methionineのとりくみ

(1) γ-GTのγ-Glutamyl基受容体としてL-Methionineが最もすぐれていたので，細胞浮遊液によるL-Methionineのとりくみをみた。γ-GT活性の低いLGの方がHGよりも単位蛋白量当りのとりこみ活性が高かった。(LG: 1.98 ± 0.19，HG: 1.10 ± 0.17 n moles/min)。とりこみは少なくとも4分まではほぼ直線的に進行し，細胞濃度に依存していた。生理的濃度に近い0.1 mML-Methionineの存在下では，とりこみは標準条件で用いた1mMの場合の約80—95%の活性を示した。

(2) アミノ酸輸送にγ-GT及びGSHが関与しているかどうかを調べるために阻害剤の効果をみた。GSH酸化剤のDiamideによってHG，LGによるL-Methionineとりこみは同様に阻害された。とりこみはGSH合成の阻害剤でありMethionine sulfoximineによってもおさえられた。γ-GTのtranspeptidation反応をおさえhydrolysis活性を増加する薬剤であるMaleateやγ-GTのγ-Glutamyl基供与体結合位に作用する6—Diazo-5-oxo-L-norleucineも顕著な阻害効果を示した。

Ⅲ．γ-GTの誘導形成

ラット肝でγ-GTはBu_2 cAMPによって上昇するという報告があるが，EAT細胞ではin vivoでもin vitroでもBu_2 cAMPによるγ-GTの活性化は起らなかった。しかしラット肝同様Ehrich腹水癌の宿主マウス肝臓ではBu_2 cAMPによってγ-GTの活性化がみられた。

〔総　括〕

(1) γ-GT活性に約10倍の差があるEAT細胞を用いてγ-GTの酵素学的性質と細胞のアミノ酸輸送能を比較し両者の間に有機的関係があるかどうかを検討した。

(2) L-Methionineとりこみ活性の高いLG細胞ではGSH濃度が高く種々アミノ酸によるγ-GT活性の促進効果も大であり，またγ-GTのtranspeptidation活性を阻害するMaleateや6-Diazo-5-oxo-L-norleucineによるアミノ酸酸とりこみが顕著に阻害される。これらの結果はL-Methionineとりこみにγ-GTが関与している可能性を示唆している様である。

(3) しかしL-Methionineとりこみ活性の高いLG細胞の方がγ-GT活性が低く，生理的アミノ酸濃度でのL-Methionineとりこみ活性とγ-GTのアミノ酸へのγ-Glutamyl基転活性を比較すると前者がはるかに高い。

(4) 従ってEAT細胞では，MeisterやOrlowskiがいくつかの哺乳動物組織で提唱しているよう

なγ-GTがアミノ酸輸送に関与しているという可能性は全くは否定できないものの主役を演じているという結論は得られなかった。

論文の審査結果の要旨

γ-Glutamyltransferase(γ-GT)活性を異にする2種のマウスEhrlich腹水癌細胞(EAT)を用いて，Meister, Orlowskiが提唱するようなγ-Glutamyl cycleがEATでもアミノ酸輸送の主たる系であるかどうかを検討した興味ある研究である。(1) γ-GT活性がL-Methionineにより著しく促進され，(2) EAT細胞によるL-Methionineとりこみが，細胞内のGlutathione量の低下やγ-GT活性の阻害によって顕著におさえられるという観察は本細胞のアミノ酸輸送にγ-Glutamyl cycleが関与しているという考えを支持するものである。しかし最終的にはこれがアミノ酸輸送の主経路であると結論するのには，(1) γ-GT活性の低い細胞でL-Methionineとりこみ活性が高く(2)とりこみ活性が生理的条件下では細胞ホモジェネートを用いて測ったγ-GT活性よりも高い。等，定量的観点から未解決の点があることを明らかにし，細胞膜に結合し物質輸送に関与していると考えられる酵素(系)の機能研究に内在する問題点を指摘した。以上本論文は博士論文に値するものと評価される。