

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	
Issue Date	
oaire:version	
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

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 μ mole 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, ペプ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 K_m 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 総活性の約 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 のとりこみ

- (1) γ -GT の γ -Glutamyl 基受容体として L-Methionine が最もすぐれていたため, 細胞浮遊液による L-Methionine のとりこみをみた。 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 nmoles/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 mM L-Methionine の存在下では, とりこみは標準条件で用いた 1 mM 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 Ehrlich 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關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 Orłowski 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。