

Title	牛肝 γ -Glutamyltranspeptidaseの精製と諸性質
Author(s)	古川, ますみ
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/33047
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名・(本籍)	吉 川 ますみ
学位の種類	医 学 博 士
学位記番号	第 5 5 4 8 号
学位授与の日付	昭和 57 年 3 月 3 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	牛肝 γ -Glutamyltranspeptidase の精製と諸性質
論文審査委員	(主査) 教授 坂本 幸哉 (副査) 教授 山野 俊雄 教授 萩原 文二

論 文 内 容 の 要 旨

〔目 的〕

γ -Glutamyltranspeptidase[EC 2. 3. 2. 2] (γ -GTP) は、 γ -Glutamyl化合物を加水分解すると同時に γ -Glutamyl基を他のアミノ酸やペプチドに転移する酵素である。Goldbarg らによれば種々の哺乳類における γ -GTPの臓器内分布は腎に最も高く脾がこれにつき、肝の活性は一般に低い。しかし、肝癌、胎児肝においては高活性を示す。従って肝癌、胎児肝と正常肝酵素との間の機能構造上の異同を論ずるためには正常肝の酵素の精製が必要とされるが、腎、肝癌などとは異なり活性が低いため精製がおくれていた。そこで正常肝としては比較的活性の高い牛肝から γ -GTPを精製しその酵素学的諸性質を明らかにすることを目的とした。

〔方法ならびに成績〕

I. 牛肝臓 γ -GTP の精製

新鮮な牛肝 750 g を用い Sucrose · Tris · EDTA buffer で 8 倍ホモジュネートを作った。19,000 rpm, 2 時間遠沈後顆粒画分をとった。これを Imidazole buffer に懸濁し, ml 当り 0.5 mg の Papain で 37°C 3 時間消化し, 30,000rpm, 1 時間遠沈後上清を取った。次に 60~90% 飽和で硫酸分画を行なった。この段階で Yield は 43% になったが 27 倍に精製された。次に Sephadex G-200 column chromatography を行なったが γ -GTP 活性は, void volume の約 1.6 倍の所に one peak で溶出された。次に Con A-Sepharose column chromatography を行なった。 γ -GTP 活性は Con A-Sepharose に吸着され, 0.1 M α -Methylmannoside を流すことにより溶出されてきた。この段階では γ -GTP は約 500 倍に精製された。次に DEAE-Cellulose に吸着させ pH 8.3 で 0~0.3 M NaCl の直線濃度勾

配をかけ chromatography を行なった所、活性の peak は NaCl 0.18 M 付近に現われた。続いて Sephacryl S-300 column chromatography にかけて。得られた標品に他の糖蛋白質の混在が認められたので、Preparative gel electrophoresis を行ない、比活性 978 $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg protein}$ 、約 24,000 倍に精製された酵素標品を得た。収率は 11% であった。

II. 精製酵素の諸性質

物理化学的性質

精製した酵素標品を 7.5% Polyacrylamide gel 電気泳動にかけると、蛋白、糖 (PAS)、 γ -GTP 活性各染色で一致する単一 band として得られ、約 110,000 の分子量を持つ糖蛋白であることが推定された。SDS 存在下で 7.5% Polyacrylamide gel 活性各染色で一致する単一 band として得られ、約 110,000 の分子量を持つ糖蛋白であることが推定された。SDS 存在下で 7.5% Polyacrylamide gel 電気泳動にかけると、2 つの subunit に分離し、large subunit が約 68,000、small subunit が約 27,000 の分子量を示し両 subunit 共、糖を含んでいた。

反応動力学的性質

この酵素の γ -L-Glutamyl-p-nitroanilide に対する K_m は 1.25 mM で Glycylglycine が γ -Glutamyl 基受容体として共存すると K_m は 0.8 mM となった。また γ -Glutamyl-p-nitroanilide に対する活性は GSH により拮抗的に阻害され K_i は 0.3 mM であった。

各種アミノ酸の受容体能

γ -Glutamyl 基受容体としてのペプチド、アミノ酸の特異性を調べた。Glycylglycine、L-Methionine、L-Glutamine が良い受容体であった。肝癌、胎児肝酵素で良い受容体であった L-Cysteine、L-Arginine は低い受容体能しかなかった。このことは正常組織酵素に共通の特性であると思われる。

γ -GTP の Phosphate-independent glutaminase 活性

ラット腎の γ -GTP には Phosphate-independent glutaminase 活性があることが知られている。牛肝 γ -GTP について調べてみると Maleate 存在下では非存在下での活性の約 6 倍の活性があったが、活性そのものは γ -GTP に比べてきわめて低く、人肝、人腎酵素と似た結果であった。

組成分析

アミノ酸には著しい特徴は見られなかったが、糖の組成は、中性糖 Mannose、Galactose (680、657 nmol/mg protein)、アミノ糖 Glucosamine、Galactosamine (570、158 nmol/mg protein)、シアル酸 (1250 nmol/mg protein) という今までに報告のない高い値を得た。

〔総括〕

1. γ -GTP を成熟牛肝臓から比活性 978 $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg protein}$ 、約 24,000 倍に精製した。電気泳動的に単一であり収率は 11% であった。
2. 分子量 110,000 の糖蛋白質で分子量 68,000 と 27,000 の糖ペプチドからなっていた。
3. 精製酵素のアミノ酸組成に顕著な特徴はなかったが、糖の組成は、中性糖 Mannose (680)、Galactose (657)、アミノ糖 Glucosamine (570)、Galactosamine (158)、シアル酸 (1250) (単位 nmol/mg protein) という他に報告をみない値を得た。

4. γ -Glutamyl-p-nitroanilide に対する K_m は 1.25 mM (GlyGly 共存時 K_m 0.8 mM), γ -Glutamyl-p-nitroanilide 分解に対する GSH の拮抗阻害の K_i は 0.3 mM であった。
5. γ -Glutamyl 受容体に対する本酵素の特異性をみると Glycylglycine, L-Methionine, L-Glutamine は良い受容体で, L-Cysteine, L-Arginine は低い受容体能しか示さなかった。
6. Phosphate-independent glutaminase 活性は, 本酵素においてきわめて低かった。

論文の審査結果の要旨

γ -Glutamyltranspeptidase は, 腎, 肝癌においては高活性を示すために, 高度に精製されている。肝癌酵素と対比させて癌酵素の特徴を探るためには, 正常肝からの精製が待たれていたが, 肝の活性はきわめて低いため, 精製が遅れていた。

本論文は, 正常肝としては比較的高い活性を有する牛肝を材料として単一にまで製製し, 酵素的諸性質を明らかにし, アミノ酸組成, 糖組成まで分析した点において高く評価される。