



Title	牛肝 γ -Glutamyltranspeptidase の精製と諸性質
Author(s)	古川, ますみ
Citation	大阪大学, 1982, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/33047
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

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名・(本籍) 吉川 ますみ
 学位の種類 医学博士
 学位記番号 第 5548 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。Goldbergらによれば種々の哺乳類における γ -GTPの臟器内分布は腎に最も高く臍がこれにつき、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750gを用いSucrose・Tris・EDTA bufferで8倍ホモジネートを作った。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当たり0.5mg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%飽和硫酸アミニウム画分を行なった。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、0.1Mα-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pH8.3で0~0.3M 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 Sephadryl S-300 column chromatography にかけた。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 μ moles/min/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单一 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单一 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つたが、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 μ moles/min/mg protein、約24,000倍に精製した。電気泳動的に单一であり収率は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 の糖ペプタイドからなっていた。
3. 精製酵素のアミノ酸組成に顕著な特徴はなかつたが、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、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、精製が遅っていた。

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单一にまで製製し、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。