



Title	ヒト脾γ-グルトミルトランスペプチダーゼの精製と性質の検討, ならびに免疫学的測定法の確立
Author(s)	益池, 正信
Citation	大阪大学, 1983, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/33544
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

氏 名 ・ (本籍)	益 池 正 信
学 位 の 種 類	医 学 博 士
学 位 記 番 号	第 5 9 2 3 号
学位授与の日付	昭 和 58 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	ヒト膵 γ -グルタミルトランスペプチダーゼの精製と性質の 検討, ならびに免疫学的測定法の確立
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 神前 五郎 (副査) 教 授 坂本 幸哉 教 授 宮井 潔

論 文 内 容 の 要 旨

〔目 的〕

γ -グルタミルトランスペプチターゼ (γ -GTP) はグルタチオンやペプチドの γ -グルタミル基を他のペプチドやアミノ酸に転移させる酵素である。臓器別分布をみると腎, 膵, 副睾丸, 肝などに分布しているが, ヒト膵の γ -GTPに関する研究はほとんどなされていない。本研究では先ずヒト膵 γ -GTPを精製してその性質を検討した。またこの精製標品を用いて膵 γ -GTP測定のためのラジオイムノアッセイ (RIA) 系を確立し, 従来の酵素学的測定法と免疫学的測定法による血中濃度測定と比較を試みた。

〔方法ならびに成績〕

活性の測定は, 基質として 5.2mM γ -L-glutamyl-p-nitroanilide (Glu-p-NA), 受容体として 30mM Gly·Glyを用い, 3mM barbital-酢酸緩衝液 (pH 8.0, 全容 1ml) 中で反応させ, 遊離する p-nitroaniline を 410nm で比色定量した。上記条件で, 37℃, 1 分間に 1 μ mole の p-nitroaniline を遊離させる酵素力を 1 単位とした。剖検時に得られた膵組織を薄片にし, 冷アセトン中に一夜浸漬後, 冷エーテルで洗滌して脱水, 脱脂したものを精製の原材料とした。膵に 20mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.6) を加えて homogenize して遠心分離, その沈渣を 1% TritonX-100 と 0.5% deoxycholate を含む同緩衝液中で可容化した。遠心分離後の上清を DEAE-cellulose カラム (pH 7.6) にかけると, 素通りする画分 (F-I) と吸着して 0.1M NaCl で溶出される画分 (F-II) とに分けられた。それぞれの画分についてその後, Hydroxyapatite, Bio-Gel A 1.5m, Con A-Sepharose のカラムクロマトを行って精製をすすめた。Con A の affinity に関しては F-II の方が F-I に比べて高かった。比

活性の最も上昇したのはF—IのCon A吸着画分で、可溶化したときに比べて115倍上昇し、回収率は7%であった。Bio-Gel滲過後の標品は電気泳動的に単一バンドで、蛋白と活性のバンドは一致した。等電点はF—Iが5.8、F—IIが4.0であった。これら2つの分画はともに分子量が90,000で、SDS電気泳動で2つのsubunitに分かれて61,000と27,000であった。受容体についてはGly·Glyが最もよく、L-cystine, L-glutamine, L-methionineの順であった。金属イオンではCa⁺⁺, Mg⁺⁺で影響を受けなかったが、Cu⁺⁺, Fe⁺⁺で活性が抑制された。至適pHはともに8.0で、pH5～10の間で安定であった。耐熱性は55℃まで安定であったが、60℃で50%失活した。最後のステップで量的に多く得られるF—IのCon A非吸着部(F—Ia)とF—IIのCon A吸着部(F—IIb)について、neuraminidase処理して電気泳動を行うと、F—Iaは処理後も移動度が変わらないのに対して、F—IIbは処理すると移動度が減少した。

RIA法のための抗ヒトγ-GTP血清はF—Iaを抗原としてモルモットにて作成した。標識はクロラミンT法では抗原性が損われるので、Conjugation methodにて行い、二抗体法によるRIA系を確立した。標準曲線は良好な用量反応相関を示し、8～500 ng/tubeの範囲でγ-GTPの測定が可能であった。ヒト血清、尿、胆汁、腎の希釈曲線と標準曲線はよく平行した。測定内および測定間変動係数はそれぞれ8.9%、12.1%であった。回収率は平均92.7%であった。動物血清との免疫交叉性はウマにわずかにみられたのみであった。標準溶液を本RIA系〔I〕と比色法〔E〕とで測定すると、一次の回帰式の関係が得られた。健康成人15例の血中immunoreactive γ-GTP量は、 $3.43 \pm 1.20 \mu\text{g/ml}$ (mean $\pm$ S.D.) であった。回帰式よりこれを酵素活性にすると、 $32.3 \pm 10.0 \text{ mU/ml}$ 〔I〕で、実際に比色法で測定した酵素活性は $15.3 \pm 7.7 \text{ mU/ml}$ 〔E〕であり、〔I〕/〔E〕比は2.11であった。肝胆および脾疾患患者の血清は、胆管癌や肝炎患者の一部で〔I〕/〔E〕比3.5以上の高値をとるものがあり、一方急性脾炎患者では低値をとった。

〔総括〕

- 1) ヒト脾γ-GTPを電気泳動的に単一バンドに精製した。
- 2) 脾γ-GTPはDEAE-celluloseで等電点の異なる2つの画分に分かれた(pI4.0と5.8)。これらの酵素学的および蛋白化学的性質は同一であった。分子量は90,000と推定され、SDS電気泳動で61,000と27,000の2つのsubunitに分かれた。受容体ではGly·Glyがよかった。Ca⁺⁺, Mg⁺⁺は活性に影響を与えなかった。至適pH8.0で、pH5～10の間で安定で、耐熱性は55℃までであった。
- 3) 等電点の相異はシアル酸含量の差によるものと推定された。
- 4) 脾γ-GTP測定のための2抗体法によるRIA系を確立した。本RIA系は感度、精度、再現性、特異性に優れ、回収率も良好であった。
- 5) 健康成人15例の平均は $3.43 \pm 1.20 \mu\text{g/ml}$ であった。
- 6) 標準酵素液の免疫学的測定〔I〕と酵素学的測定〔E〕結果の間には、一次の相関関係が得られたが、血中濃度の測定では正常人の〔I〕/〔E〕比は2.11であった。また胆管癌、肝炎患者の一部で〔I〕/〔E〕比は高値をとり、一方急性脾炎患者では低値をとった。

論文の審査結果の要旨

本研究はヒト膵臓より γ -グルタミルトランスペプチダーゼ (γ -GTP) の分離・精製をはじめて行い、また γ -GTPを免疫学的に測定するためのラジオアムノアッセイ系を確立したものである。

ヒト膵 γ -GTPの酵素化学的・蛋白化学的性質が明らかになり、また疾患によって血中の γ -GTP量とその活性値との間に差異のあることが見出された。

本研究はヒト膵 γ -GTPに関して新しい知見を加えるとともに、免疫学的測定法を確立したことにより肝胆道系および膵疾患の病態解明に今後役立つものであり、価値ある研究と考えられる。