

Title	ヒト肝癌 γ -グルタミルトランスフェラーゼの精製と諸性質および糖鎖構造の検討
Author(s)	高見澤, 伊津子
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/35255
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

【18】

氏名・(本籍)	たかみさわいっ 高見澤伊津子
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 7209 号
学位授与の日付	昭和61年3月25日
学位授与の要件	医学研究科 生理系専攻 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	ヒト肝癌 γ -グルタミルトランスフェラーゼの精製と諸性質および糖鎖構造の検討
論文審査委員	(主査) 教授 坂本 幸哉 (副査) 教授 田中 武彦 教授 森 武貞

論 文 内 容 の 要 旨

(目 的)

γ -glutamyltransferase (GGT) は、肝癌のマーカー酵素として注目されている。GGTの癌性変化に関しては、種々の哺乳動物肝癌から精製された酵素について、酵素学的、免疫学的に検討されてきた。GGT分子には、asparagine結合型糖鎖が含まれているが、最近、糖鎖構造の癌性変化に関心が集まっている。正常肝GGTには見出されないbisecting N-acetylglucosamine (bisecting GlcNAc) 構造の出現が、肝癌に特異的ではないかという仮説も提示された。

著者は、ヒト肝癌GGTの癌性変化に興味を持った。本研究では、ヒト低分化型肝癌からGGTを精製し、諸性質を調べ、特にその糖鎖構造に癌特異的な変化が見られるか否かを検討した。

(方法ならびに成績)

(1) ヒト低分化型肝癌 (Edmondson grade III) を剖検によって得た。肝癌組織 70.4 g から papain 処理、60-90% 硫酸分画、DEAE-cellulose, Sephacryl S-300, 調製用 polyacrylamide gel 電気泳動 (PAGE) の各ステップにより、収率約 16%, 精製度約 532 倍, 比活性約 $64 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg protein}^{-1}$ の GGT を得た。

(2) 精製 GGT を 7.5% PAGE にかけると、GGT は、タンパク染色、PAS 染色、活性染色で一致する巾広いバンドとして得られ、みかけの分子量は、140,000 と計算された。精製 GGT を 0.1% SDS-10% PAGE にかけると、タンパク染色、PAS 染色で染まる 2 つのバンドが認められ、みかけの分子量は、それぞれ 64,000, 29,000 と計算された。

(3) γ -L-glutamyl-p-nitroanilide に対するみかけの K_m 値は、転移反応に至適の pH 8.6 で測定した場

合, glycyglycine存在下で 2.86 mM, glycyglycine非存在下で 4.00 mMであった。還元型グルタチオン (GSH) に対するみかけのKm値は, 水解反応に至適のpH 7.4 で測定した場合, glycyglycine非存在下で 0.08 mMであった。

(4) 転移反応における種々のアミノ酸の γ -glutamyl基受容体としての特異性を調べたところ, 生理的基質としては, L-cystineが最も良い受容体であった。

(5) 糖鎖構造の特徴を知るために, 3種のlectin affinity chromatographyを行なった。

i) Con A-Sepharose: 非吸着画分と, 0.1 M α -methyl-D-mannosideで溶出される吸着画分の総活性比は, 55%対45%で, 吸着画分の割合は, 正常ヒト肝GGTで報告されている値 (90%) より低かった。

ii) E-PHA-agarose: asparagine結合型糖鎖に bisecting GlcNAc残基があると, 一般にE-PHA-agarose affinity chromatographyにおいて, 溶出の遅延が認められるが, 本精製GGTでは, 遅延が認められなかった。

iii) Lotus-agarose: Lotus-agaroseは糖鎖の α -L-fucose残基と特異的に結合する。本精製GGTの大部分はLotus-agaroseに吸着せず, 0.05 M α -L-fucoseによって溶出される結合型は, わずか9%であった。従って, human chorionic gonadotropin (hCG) などで報告されているようなフコシル化の増加という癌性変化は, 本精製GGTには認められなかった。

(6) 本精製GGTを *Arthrobacter ureafaciens*のsialidaseで処理し, その効果をみた。7.6%PAGEにかけると, sialidase処理前に比べ, 電氣的易動度は小さくなった。sialidase処理GGTを, lectin affinity chromatographyにかけ, sialidase処理前の挙動と比較すると, sialidase処理により, Con A-Sepharose, Lotus-agaroseへの親和性がやや増加した。E-PHA-agaroseからの溶出パターンは, sialidase処理後も, はっきりとした遅延型のピークを示さず, bisecting GlcNAc残基は持っていないものと判断された。

(総括)

(1) ヒト低分化型肝癌から, GGTを約532倍に精製した。

(2) 7.5%PAGEにより, GGTはタンパク染色, PAS染色で一致する巾広いバンドとして得られ, 結合糖鎖の差異によると思われる酵素分子種の多様性が示された。SDS-PAGEにより, 分子量約64,000, 29,000の, いずれも糖鎖を含む大小2つのサブユニットからなることが示された。

(3) γ -L-glutamyl-p-nitroanilideに対するKm値は, glycyglycine存在下, 非存在下で, それぞれ2.86 mM, 4.00 mMと計算された。また, 生理的基質であるGSHに対する水解反応のKm値は0.08mMであった。

(4) 本精製GGTの転移活性中, 生理的基質としては, L-cystineが最も良い受容体であり, 肝癌GGTの特性を示した。

(5) 正常肝GGTに比べ, Con A-Sepharoseへの結合性が低下していた。Lotus-agaroseへの結合性から考えて, フコシル化の増加はみられないと思われた。E-PHA-agaroseからの溶出遅延は, sialidase処理によってもみられなかったので, 本精製GGT糖鎖には, bisecting GlcNAc残基はないと判断された。

論文の審査結果の要旨

本研究は肝癌のマーカー酵素として注目されている γ -glutamyltransferase (GGT) を、ヒト肝癌から精製し、諸性質を調べたものである。ヒト肝癌GGTの酵素分子多様性を示し、多様性の原因と考えられる糖鎖構造について検討し、糖鎖の癌性変化に関して新知見を加えたものとして、学位論文に値すると判断される。