

Studies on Purification and Some Properties
of γ -Glutamyltranspeptidase(γ -GTP) from
Human Hepatocellular Carcinoma(HCC)
-Comparison with the Enzyme from Human
Kidney

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/7952

ヒト肝細胞癌からの γ -GTP の精製とその性格に関する研究— 腎 γ -GTP との比較 —

金沢大学医学部内科学第一講座 (主任: 服部 信教授)

登 谷 大 修

(昭和62年4月11日受付)

肝細胞癌患者血清に特異的に出現する γ -glutamyltranspeptidase isoenzyme (novel γ -GTP) の性格を解明する一端として、各種分画法を用いてヒト肝細胞癌組織より γ -GTP を精製し、その物理化学的、免疫学的な性格を同様な方法で精製した正常腎 γ -GTP と比較検討した。基質に対する Km 値、至適 pH、各種金属イオンや EDTA による影響、各種アミノ酸のアクセプターとしての反応、耐熱性などの物理化学的性格において両者に明らかな差異はみられなかったが、電気泳動度、等電点、con A およびニューラミニダーゼに対する反応性には明らかな相違がみられた。家兎に免疫して作製した抗血清を用いた検討では、両者は免疫学的には区別されなかった。以上より肝細胞癌患者に特異な novel γ -GTP は主に糖鎖のプロセッシングの違いを反映した広義の意味での isoenzyme であると推察される。

Key words γ -Glutamyl transpeptidase, hepatocellular carcinoma (HCC), isoenzyme, carbohydrate moieties

γ -Glutamyl transpeptidase (γ -GTP) は、 γ -glutamyl peptide を水解すると同時に、その γ -glutamyl 基と他のアミノ酸やペプチドとの転移反応を解媒する膜結合酵素である。 γ -GTP の isoenzyme については 1965 年の Kokot ら¹⁾の報告以来種々の電気泳動法を用いて多くの研究がなされてきたが、臨床的意義のある成果は認められていなかった。一方、本酵素は各種の実験的研究より癌胎児性蛋白としての性格を有する事が示唆されており²⁾⁻⁵⁾澤武ら⁶⁾⁻⁸⁾はこの様な点に注目し、polyacrylamide gradient gel slab を用いた電気泳動法により肝細胞癌患者血清に特異的に出現する γ -GTP isoenzyme (novel γ -GTP) を見出し、その臨床的有用性を明らかにした。著者は、novel- γ -GTP の性格を解明する一端として肝細胞癌組織より γ -GTP を精製し、その物理化学的および免疫学的な性格を、正常腎 γ -GTP と比較して検討した。

材料及び方法

血清中に novel γ -GTP を認めた患者の剖検肝癌組

織および肝癌以外の患者の剖検腎を用いた。いずれも死亡後 6 時間以内に -20°C に凍結保存し、6 ヶ月以内の実験に供した。

I. γ -GTP 活性の測定

Orlowski ら¹⁰⁾の方法に従って γ -GTP 活性の測定を行なった。すなわち、基質緩衝液として γ -L-glutamyl- α -naphthylamide 45 mg, metorose TC-5 1.5 mg, glycyl-glycine 0.01 M, MgCl_2 0.0033 M を溶解した 0.03 M Tris-HCl 緩衝液 3 ml を用い、試料 50 μl を加え、 37°C にて 30 分インキュベーションし、0.1 N HCl 1 ml にて反応を停止した。さらに、10 分間放置後、日立製分光光度計 (200-20 型) にて 550 nm における吸光度を測定し、 γ -GTP 活性を算出した。

II. γ -GTP の精製

表 1, 2 に示すごとく肝癌組織よりの γ -GTP 抽出は Orlowski ら¹⁰⁾の方法を一部変更して行なった。まず凍結肝癌 (又は腎) 組織を 2 容の 0.08 MMgCl_2 中にて細切後、3 分間、ブレンダーにて処理した。これに 1N-NaOH を加え、pH を 10 に調整した後、 37°C に

Abbreviations: Con-A, concanavalin A; EDTA, ethylene diamine tetraacetic acid; HCC, hepatocellular carcinoma; PBS, phosphate buffer solution; PEG, poly ethylene glycol; γ -GTP, γ -glutamyl trans peptidase.

Table 1. Purification of γ -GTP from HCC

	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg)
Homogenate	103895	1569.3	0.011
Deoxycholate extract	8755	1463.1	0.167
Ammonium sulfate fractionation	418	569.6	1.362
Bromelain treatment	296	532.6	1.799
Ulto gel	30	418.9	13.96
DEAE Cellulose	13.5	223.4	16.55

Table 2. Purification of γ -GTP from kidney

	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg)
Homogenate	35100	8503.2	0.242
Deoxycholate extract	10780	4855.4	0.450
Ammonium sulfate fractionation	450	700.8	1.556
Bromelain treatment	405	785.8	1.940
Ulto gel	39	637.9	16.3
DEAE Cellulose	13	394.0	30.3

て2時間放置した。これを18,000 rpm, 4°Cにて30分間遠沈した後、沈渣を1.5%のdeoxycholate (DIFCO製, Detroit, Michigan, U.S.A.)と5% TritonX (Wako製, 大阪)を含む0.1 M Tris-HCl緩衝液 (pH 8.0)中にて48時間可溶化した。続いて、溶液を15,000 rpmで30分間遠沈し上清を透析膜を用い蒸留水中にて充分脱塩した後、polyethylene glycol (PEG, 20,000)を加えて濃縮した。脱塩濃縮した試料を0°Cに冷却し、同じく-20°Cに冷却した等容のアセトンを徐々に滴下混合した後、12,000 rpm 30分遠沈して沈澱を得た。この沈澱を0.1 M Tris-HCl緩衝液 (pH 8.0)に溶解後-20°Cにていったん凍結した後、室温にて融解し、0.04 Mのglutathione (P-L製, New York, U.S.A.)を加え、さらに56°Cにて10分間熱処理し、直ちに0°Cに冷却した。次に同液を18,000 rpmにて30分間遠沈した後、その上清を40%–90%の硫酸にて塩析し、沈澱を0.1 M Tris-HCl緩衝液 (pH 8.0)に溶解し、蒸留水にて前述のごとく脱塩、濃縮した。試料に10 mMの2-mercaptoethanolおよび試料の蛋白15 mgに対して1 mgのbromelain (NAKARAI製, 京都)を加えて37°C 1時間インキュベーションの後、Ulto gel ACA-34 (LKB製, Bromma, Sweden) (26×820 mm)にて0.1 M Tris-HCl (pH 8.1, 0.5 M NaCl)を用いてゲル濾過を行なった。各分画の γ -GTP活性を測定後、有活性分画を

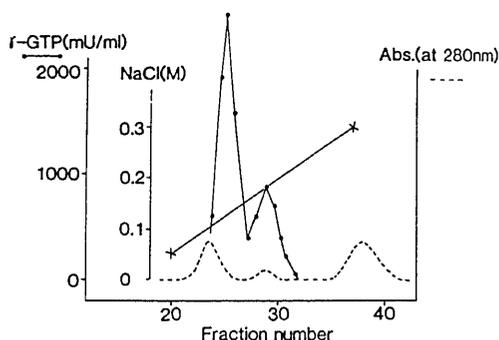


Fig. 1. DEAE-Sephadex column chromatography of the active fractions from Urtrigel ACA34. The flow rate was 40 ml/hr and 6 ml fractions were collected.

回収し、同様に脱塩濃縮後、DEAE-Sephadex (Pharmacia製, Uppsala, Sweden) (25×400 mm)にて0.01 M Tris-HCl (pH 8.0)を緩衝液とし、グラジエントミキサーにてNaCl濃度を連続的に0より0.5 Mまで変化させながらイオン交換クロマトグラフィーを行なった。溶出された分画の γ -GTP活性を測定し有活性分画を回収後、脱塩濃縮して部分精製材料とした (図1)。

III. ゲル電気泳動

ゲル電気泳動は既報の方法にて行なった⁷⁾。すなわ

ち、Pharmacia 社製電気泳動装置 500/100 を用い、polyacrylamide gradient gel 4/30 (Pharmacia 製) を支持体として 18 時間泳動した。泳動後ゲルを N- γ -L-glutamyl- α -naphthylamide (Wako 製), glycylglycine (Wako 製), $MgCl_2$ を混和した反応液中にて 2 時間反応させた後 fast garnet GBC (Sigma 製, St. Louis, Missouri, U.S.A.) にて染色した。

IV. 等電点電気泳動

等電点電気泳動は 110 ml カラム (LKB8100) を用い、50% 蔗糖液及び 40% ampholine (pH 3.5~10) にて行なった。1,200 V, 48 時間通電後、得られた各分画液 (4.4 ml) について、pH メーターによる pH 測定及び γ -GTP の活性測定を行なった。

V. Con A アフィニティークロマトグラフィー

Con A sepharose (Pharmacia 製) (26×400 mm) を用い、0.05 M Tris-HCl (pH 7.5) に 0.5 M NaCl, 1 mM $MnCl_2$, 1 mM $CaCl_2$ を溶解したものを緩衝液とした。また溶出液には 0.2 M α -methyl-D-mannopyranoside (P-L 製) を用いた。

VI. ニューラミニダーゼ処理

10 mM NaCl, 10 mM $MgCl_2$ を含む 100 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.5) にニューラミニダーゼ (Böehringer Mannheim 製, West, Germany) 1 mg/ml を溶解し、等容の試料を加え 37°C 16 時間インキュベートした。

VII. 免疫学的実験法

肝臓組織および腎臓組織から抽出した γ -GTP のイオン交換クロマトグラフィーの段階まで部分精製したものを、抗ヒト全血清を結合させた CNBr-activated

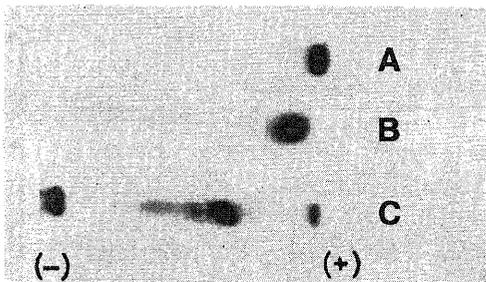


Fig. 2. Electrophoretic pattern of the purified γ -GTP fraction using 4-30 polyacrylamide gradient gel slab.

The amount of purified fraction applied to the gel was 25 μ l. Electrophoresis was performed at a constant voltage of 200v for 18hr in Tris-boric acid, pH 8.35.

(A) γ -GTP from HCC after DEAE Sephadex Chromatography.

(B) γ -GTP from kidney.

(C) Serum of HCC.

sepharose 4B による negative affinity chromatography (Pharmacia 製) (26×30 mm) を行い、夾雑蛋白を除去した。各試料 0.2 mg (蛋白) を 0.05 M リン酸緩衝液 (PBS) (pH 8.0) 1 ml に溶解し、等容の Freund's adjuvant (IATRON 製, 東京) を加え、ウサギに 2 週間毎 4 回皮下に注射した。注射終了より 10 日目に採血し、得られた血清より 50~33% の硫酸分画にて、IgG を分画し、抗血清として用いた。Ouchterlony double immunodiffusion test は各抗血清 20 μ l を使用し、各抗原 5 μ l にて 1% agar 上にて行なった。次に、各抗原 500 μ l に抗腎 γ -GTP 血清を、0, 10, 50, 100, 200 μ l 添加し、37°C 10 分間インキュベーションした後に各々の γ -GTP 活性を測定した。さらに 16 時間 4°C にて放置した後、10,000×g にて 10 分間遠沈し上清の γ -GTP を測定することにより肝臓 γ -GTP, Con A 吸着分画, Con A 非吸着分画および腎 γ -GTP に対する抗腎 γ -GTP 血清の活性阻害率を検討した。

VIII. 蛋白定量は Folin-Lowry 法を用いた¹¹⁾

成 績

I. γ -GTP の精製

表 1, 2 に示すごとくイオン交換クロマトグラフィー終了後、肝臓組織からは 16.6×10^3 mU/mg, 腎臓組織からは 30.3×10^3 mU/mg の γ -GTP 活性が得られた。この段階で各々を polyacrylamide gradient gel 電気泳動すると、図 2 に示す様に肝臓組織 γ -GTP はポストアルブミン領域の、血清 γ -GTP zymogram 上で I および I' と呼ぶ⁶⁾⁻⁹⁾ 部位に一致して、やや巾広く泳動された。一方、腎臓組織 γ -GTP はそれより陰極寄り

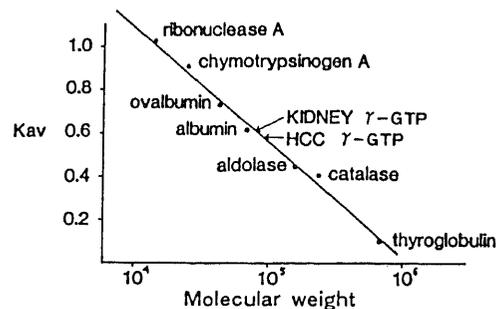


Fig. 3. Determination of molecular weight of γ -GTP.

Standards (aldolase, albumin, ribonuclease A, chymotrypsinogen A, ovalbumin, catalase, and thyroglobulin), purified γ -GTP, and Blue Dextran were chromatographed on a 1.6×70 cm column of Ultrogel ACA-34. The flow rate was maintained at 15 ml/hr.

のIIに近似した部位に泳動された。

II. 分子量

各組織 γ -GTP を ultrogel ACA-34 (LKB 製) (16×700 mm) を用い, aldolase, albumin, ribonuclease A, chymotrypsinogen A, ovalbumin, catalase, thyroglobulin をマーカーとして分子量を測定すると (図3), 肝癌 γ -GTP 約 92,000, 腎 γ -GTP 約 81,000 と算出された。

III. Km 値

L- γ -glutamyl-p-nitroanilide を基質として Lineweaver-Burk method¹²⁾により Km 値を測定すると, 肝癌 γ -GTP 1.44 mM, 腎 γ -GTP 1.55 mM であった。

IV. 至適 pH

至適 pH 測定は基質溶液を 1 N HCl および, 1 N NaOH により pH 6.0 から 9.5 の間で変化させて活

性を測定した。両者ともに至適 pH は 7.9 であり, 差は認められなかった。

V. 金属イオン効果

Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} 等の 2 価イオン, K^+ , Na^+ の 1 価陽イオンおよび EDTA による影響は各々の 0.1 M, 0.01 M 溶液を基質液として測定したが, 肝癌, 腎 γ -GTP とともに Mg^{2+} , Ca^{2+} , K^+ , Na^+ の存在下でわずかに活性が上昇する傾向がみられ, Zn^{2+} , EDTA により阻害される点で共通していた (表3)。

VI. 耐熱性

56°C, 58°C, 60°C における耐熱性についてみると, 両者ともに各温度, 各時間においてほぼ同様の活性低下を示し, 差は認められなかった (図4)。

VII. アミノ酸効果

γ -L-glutamyl- α -naphthylamide を γ -glutamyl 供給体とし種々のアミノ酸 20 mM を受容体として活性

Table 3. Effect of divalent cations and EDTA

Addition	Concentration (M)	Relative enzyme activity (%)	
		HCC	Kidney
None	—	100	100
Mg^{++}	10^{-2}	103	106
Ca^{++}	10^{-2}	117	116
K^+	10^{-1}	109	107
Na^+	10^{-2}	119	106
Zn^{++}	10^{-2}	37	40
EDTA	10^{-2}	79	90

The reaction mixture contained 1.0ml of substrate solution, 20 μ l of the enzyme and indicated concentrations of cations or EDTA. The activity was expressed as a percentage of that in the control experiment.

Table 4. Activity of γ -GTP in the presence of various acceptors

Acceptor (20mM)	Enzyme activity (%)	
	HCC	Kidney
None	100	100
Glycylglycine	180	128
Glycine	66	72
L-Leucine	112	102
L-Asparagine	102	96
L-Aspartic-acid	41	42
L-Glutamine	140	115
L-Glutamic-acid	48	49
L-Methionine	127	105
L-Alanine	108	94
L-Phenylalanine	86	79
L-Homoarginine	127	101

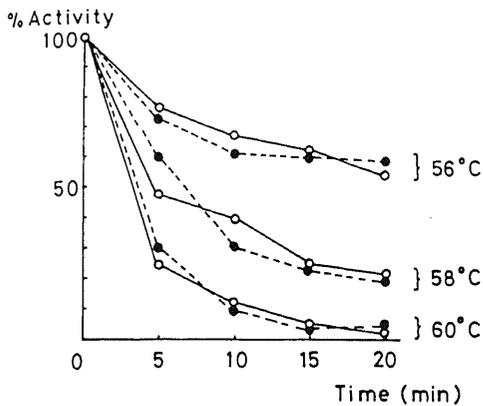


Fig. 4. Heat stability of the enzyme. The enzymes were incubated at 56°C, 58°C, or 60°C. At the time indicated, samples were removed and immediately assayed for the activity. ●—●, γ -GTP from HCC; ○—○, γ -GTP from kidney.

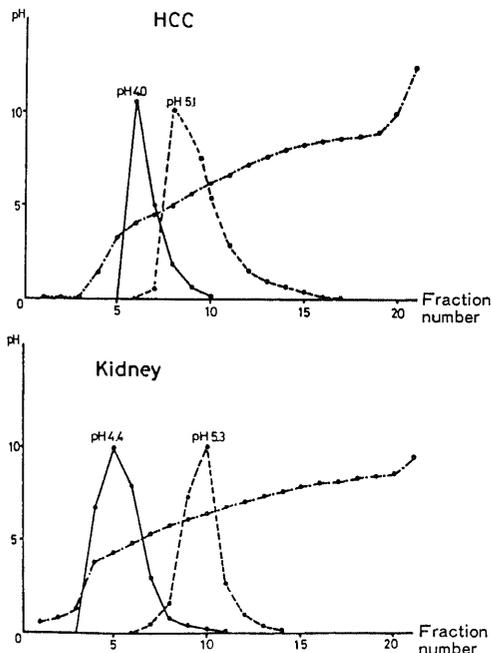


Fig. 5. Isoelectric focusing of the purified γ -GTP. Isoelectrofocusing experiments were carried out at a constant voltage (1,200V) for 48hrs in a 110 ml column (LKB 8100). The ampholyte carrier ampholyte (pH 3.5-10) was used. After focusing, fractions of 4.4 ml were collected. ●—●, before treatment with neuraminidase; ○—○, after treatment with neuraminidase.

を測定したところ, glycylglycine, L-glutamine で高度な活性の上昇を認めた。しかし, 肝癌, 腎 γ -GTP の間に明らかな差異はみられなかった (表 4)。

VIII. 等電点

ampholine を用いた等電点電気泳動では, 肝癌 γ -GTP は pI 4.0 前後であり, ニューラミニダーゼ処理により pI 5.1 に変化した。一方, 腎 γ -GTP は pI 4.4 の等電点を示したが, ニューラミニダーゼ処理により pI 5.3 に変化し, 処理前に比較して肝癌との等電点の差が小さくなった (図 5)。

IX. Con A アフィニティークロマトグラフィー

各々の γ -GTP を con A sepharose chromatography にて分離した結果を図 6 に示す。精製に用いた肝細胞癌によりその比率は違うが, 平均して肝癌 γ -GTP では 15% が con A 非吸着分画に, 残りの 85% は con A 吸着分画に溶出された。また, ニューラミニダーゼ処理前後においても吸着, 非吸着分画の割合に明らかな差はみられなかった。一方, 腎 γ -GTP は, 大部分が非吸着分画に溶出され, さらにニューラミニダーゼ処理後は逆にほとんどが con A 吸着分画に溶出された。con A にて分画された各々のピークを polyacrylamide gel 電気泳動すると図 7 に示すごとく肝癌 γ -GTP の con A 吸着分画は血清 γ -GTP zymogram の I の部位に, 非吸着分画はそのやや陰極よりの I' の部位に泳動され電気泳動上区別された。しかし, 腎 γ -GTP は con A 吸着, 非吸着分画ともに II に近似した位置に泳動され, 差は認めなかった。さらに, con A 吸着及び非吸着分画の各 γ -GTP をニューラミニダーゼ処理すると, 肝癌 γ -GTP はニューラミニダーゼ処理により con A 吸着, 非吸着分画ともにより陰極寄りへ泳動位置が移動し, 泳動上明らかな差異はみられなくなった。一方, 腎 γ -GTP は con A 吸着,

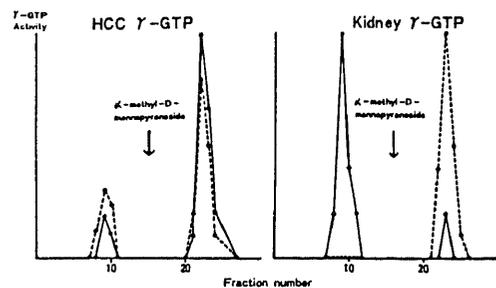


Fig. 6. con-A affinity chromatography of γ -GTP. Con-A affinity chromatography of the enzymes were carried out with Con-A-Sepharose as described in the MATERIALS AND METHOD. ●—●, before treatment with neuraminidase; ○—○, after treatment with neuraminidase.

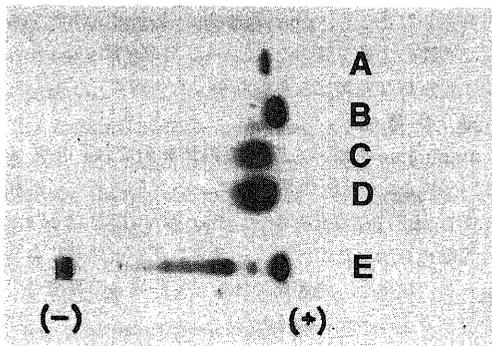


Fig. 7. Electrophoretic pattern of preparations from con-A affinity chromatography using 4-30% polyacrylamide gradient gel slab. (A) Con-A-unbound fraction from HCC. (B) Con-A-bound fraction from HCC. (C) Con-A-unbound fraction from Kidney. (D) Con-A-bound fraction from Kidney. (E) Serum of HCC.

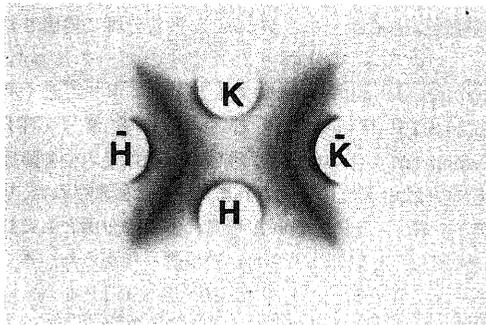


Fig. 8. Double immunodiffusion in agarose gel stained with γ -GTP activity.

Purified preparations of γ -GTP from HCC (H) and Kidney (K) and antisera against the γ -GTP purified from HCC (\bar{H}) and from Kidney (\bar{K}) are represented.

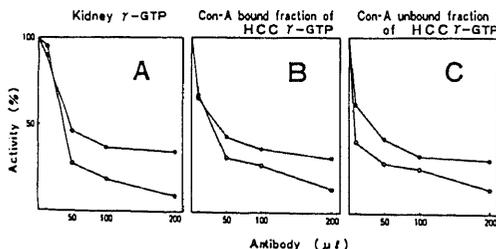


Fig. 9. Inhibition of γ -GTP activities by anti Kidney γ -GTP antibody.

Remaining γ -GTP activity of Kidney (A) Con-A bound fraction (B) and unbound fraction of HCC (C) before (●) and after (○) centrifugation.

非吸着分画ともにニューラミニダーゼ処理による泳動度の変化はみられず肝癌 γ -GTP と明らかな違いを示した。

X. 免疫学的性格

図8は抗原として肝癌 γ -GTP と腎 γ -GTP, 抗体として抗腎 γ -GTP ウサギ血清, 抗肝癌 γ -GTP ウサギ血清を用いた Ouchterlony double immunodiffusion test を示す。両者は互いに完全に融合する沈降線を形成し、共通の抗原性をもつ事が認められた。また、肝癌 γ -GTP を con A 吸着分画および非吸着分画に分けて Ouchterlony 法を行なうと、いずれも両抗体に同様に融合する沈降線を示した。次に、図9に抗腎 γ -GTP ウサギ血清を用いた活性阻害試験の結果を示す。肝癌 γ -GTP の con A 吸着分画および非吸着分画、さらに腎 γ -GTP はいずれも抗腎 γ -GTP ウサギ血清によって約70%の活性が阻害された。さらに、遠心後は活性の大部分が沈澱し、阻害がよりあきらかとなった。またこの活性阻害パターンも図9に示すごとく三者で類似していた。

考 察

哺乳動物では、肝の γ -GTP 活性は胎生期に最も高く、生後急激に下降し、健全な成熟肝ではその活性は極めて低い¹³⁾。一方、肝細胞癌では再び活性が増加し、患者血清でも著明な活性上昇を示す場合が多い。また、種々の実験肝癌の発癌過程において、前癌性病変ともいわれる過形成結節の時期に、すでに γ -GTP 活性の高度な増加が観察され、癌化が進行するに従い、活性が著明に上昇する事が示されている^{14)~16)}。このような事実より、肝細胞癌で増加する γ -GTP には癌胎児性蛋白としての性格を有するものと推察される。この様な点に注目した臨床的研究より、澤武ら^{9)~10)}は肝細胞癌に特異的に出現する血清 γ -GTP isoenzyme を見出し、novel γ -GTP isoenzyme と称している。本 isoenzyme はその特異性が高く、 α -fetoprotein の低あるいは非産生肝細胞癌にも検出され、腫瘍の進行度とも相関性が乏しいことなどより、臨床的意義の高い腫瘍マーカーであることが広く内外で認められている¹⁷⁾¹⁸⁾。しかし、本 isoenzyme の性格や出現機序については未だ明らかにされていない。その目的からいえばヒト正常肝より精製した γ -GTP と比較するのが望ましいのであるが、前述したごとく、正常肝の γ -GTP 活性は非常に低く、十分用量を得ることは極めて困難であることより、今回は正常腎より同様な方法で精製した γ -GTP と比較検討したわけである。

著者のイオン交換クロマトグラフィーの段階での部分精製した γ -GTP の酵素学的な性格をみると、基質

に対する Km 値, 至適 pH, 各種金属イオンや EDTA による影響, 耐熱性, さらには各種アミノ酸のアクセプターとしての反応などの物理化学的性質には肝細胞癌 γ -GTP と腎 γ -GTP の間には明らかな差異は認められていない。さらに, 家兎に免疫して得られた抗血清による免疫学的検討でも, 肝細胞癌 γ -GTP と腎 γ -GTP はともに抗肝細胞癌 γ -GTP 血清あるいは抗正常腎 γ -GTP 血清でほぼ同じように中和され, Ouchterlony 法でも互いに融合する沈降線が形成される。また, 肝細胞癌 γ -GTP は胎盤, 小腸, 副睾丸, 脾, 肝から抽出した γ -GTP とも共通の抗原性を有するという成績も得られている¹⁹⁾。この様に少なくともポリクロナールな抗体で検討する限り, 肝細胞癌 γ -GTP には免疫学的に特異な性状はみられない。

一方, 図 2, 図 6 に示したように, 電気泳動度と等電点には肝細胞癌 γ -GTP と腎 γ -GTP の間には明らかな差異がみられ, さらにニューラミニダーゼ処理後には, これらの移動度は変化するが, 両者は依然として異なっているという成績が得られている。また, con A の親和性においては, 腎 γ -GTP は con A 非吸着分画に大部分が溶出されるのに対し, 肝細胞癌 γ -GTP では, con A 非吸着分画は 15% 位で, 多くは con A 吸着性である。さらにニューラミニダーゼ処理後に con A の親和性をみると, 肝細胞癌 γ -GTP の場合は, 処理前後で親和性に明らかな変動はみられないのに対し, 腎 γ -GTP では処理後大部分が con A に吸着されるようになるなど, con A に対する親和性には両者に著明な差異がみられる。以上のように, 肝細胞癌と正常腎 γ -GTP の間には酵素学的および免疫学的性格において明らかな差異は認められない。さらに, 本稿では触れなかったが, 血清 γ -GTP isoenzyme の各分画に対する免疫学的検討においても, 特異, 非特異を問わず共通な抗原性を有するという成績が得られている¹⁹⁾。これらの成績より, novel γ -GTP は異なった遺伝子にコードされる一次構造の違った蛋白よりなる酵素という, 古典的な意味での isoenzyme の定義には一致しないことになる。しかしこのような定義には一致しない synzyme allozyme なども isoenzyme として扱い, 広義に解釈されているのが現状であり, novel γ -GTP もこのような範疇に入るものと考えられる。

最近, 哺乳動物における各臓器の γ -GTP は免疫学的に差異はなく, その糖鎖構造に相違のあることを示す成績が相次いで報告されている²⁰⁾²¹⁾。さらに Tsuchida ら²²⁾はラットの化学発癌剤による肝癌, 前癌性病変ともいわれる過形成結節, 腹水肝癌 AH-13, ヨークサック腫瘍から精製された γ -GTP は正常腎のものと同免疫学的に区別しえないが, シアル酸含量の高

い事を示している。著者の成績ではニューラミニダーゼ処理後も肝細胞癌 γ -GTP と腎 γ -GTP の電気泳動度や等電点は依然として違うことより, ヒトの癌化に伴う γ -GTP の異常はシアル酸含量の差異のみから説明しえないようである。Sato ら²³⁾はヒト肝癌と非癌部の肝組織由来の γ -GTP を比較し, 各種の物理化学的性質には差はないが, 肝癌の γ -GTP はグルコサミン含量が 3 倍高く, con A に対しては低いが, wheat-germ, PHA-E, cibacron blue に対しては高い親和性を有することを示している。これらの成績も著者の成績と同様に肝癌にみられる γ -GTP 癌性変化は蛋白部分ではなく, 主として糖鎖部分に起こっていることを示すものである。ひいては, 血清にみられる γ -GTP もこの様な糖鎖のプロセッシングの異常により生じた糖鎖構造の違いを反映した isoenzyme であると推察される。最近, Yamashita ら²⁴⁾により, ラット腹水肝癌 AH-66 とラット正常肝由来の γ -GTP の糖鎖構造が比較され, その癌性変化が明らかにされている。それによると, 量的には AH-66 の γ -GTP は 1 モル蛋白あたりの糖鎖結合数は正常の 4 倍, 1 モル酵素あたりのシアル酸残基数は正常の 3 倍に著増している。また, 質的には AH-66 由来の γ -GTP は正常肝 γ -GTP では見られない高マンノース型糖鎖と bisectGlcNAc を含んだ 2 本鎖少糖の出現していること, ならびに, 繰返し構造を含む糖鎖が消失し, 3 本鎖および 4 本鎖少糖の占める割合が正常 γ -GTP のそれよりも減少している点を特徴として挙げている。この様に, 動物では癌化に伴って起こる γ -GTP 糖鎖のプロセッシングの形成異常が具体的に明らかにされている。しかし, ヒトの肝細胞癌の γ -GTP ではどのような糖鎖構造が癌に特異的なのかは解明されていない。今後, このような問題が解決され, さらには, 特異な糖鎖を認識するモノクロナール抗体が開発されるならば, 本 isoenzyme の微量定量法も可能になり, さらに, その臨床的有用性が高まるものと思われる。

結 論

各種分画法を用いてヒト肝細胞癌組織および正常腎組織より γ -GTP を精製し, その物理化学的, 免疫学的性格を比較検討し, 以下の結論を得た。

1) 肝癌組織 γ -GTP と腎組織 γ -GTP の間には基質に対する Km 値, 至適 pH, 各種金属イオンや EDTA による影響, 各種アミノ酸のアクセプターとしての反応, 耐熱性などに明らかな差異はみられなかった。

2) 両者の間には, 電気泳動度, 等電点, con A およびニューラミニダーゼに対する反応性に明らかな相

違がみられた。

3) 肝癌組織 γ -GTP および腎組織 γ -GTP は免疫学的に区別されなかった。

以上より肝細胞癌患者に特異な novel γ -GTP は主に糖鎖のプロセッシングの違いを反映した広義の意味での isoenzyme であると推察される。

謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導、御校閲を賜りました恩師服部信教授に深甚なる謝意を捧げます。また、直接御指導戴いた金沢大学がん研究所内科澤武紀雄教授に深謝致します。また御助言を戴いた埼玉県立がんセンター臨床検査部石井勝部長、終始御協力と御援助を戴いた第1内科消化器グループの諸先生に深謝致します。

なお本論文の要旨は、第16回日本肝臓学会総会(1980)、13th International Cancer Congress(1982)、10th Annual Meeting of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine(1982)において発表した。

文 献

- 1) Kokot, F. & Kuska, J.: Über die Bedeutung der γ -GTP in der klinischen Diagnostik. *Clin. Chim. Acta*, **II**, 118-121 (1965).
- 2) Fiala, S., Fiala, A. E., Keller, R. W. & Fiala, E. S.: Gamma glutamyl transpeptidase in colon cancer induced by 1,2-dimethylhydrazine. *Arch. Geschwulstforsch*, **47**, 117-122 (1977).
- 3) Fiala, S., Fiala, A. E. & Dixon, B.: γ -Glutamyl transpeptidase in transplantable, chemically induced rat hepatomas and "spontaneous" mouse hepatomas. *J. Natl. Cancer Inst.*, **48**, 1393-1401 (1972).
- 4) Taniguchi, N., Tsukada, Y., Mukuo, K. & Hirai, H.: Effect of hepatocarcinogenic azo dyes on glutathione and related enzymes in rat liver. *GANN*, **65**, 381-387 (1974).
- 5) Cameron, R., Kellen, J., Kolin, A., Malkin, A. & Farber, E.: γ -Glutamyltransferase in putative premalignant liver cell populations during hepatocarcinogenesis. *Cancer Res.*, **38**, 823-829 (1978).
- 6) 澤武紀雄, 中源雅俊, 米田正夫, 牧野 博, 亀田正二, 小林健一, 杉岡五郎, 服部 信, 石井 勝: 原発性肝癌患者血清に特異的に出現する γ -GTP isoenzyme. *肝臓*, **18**, 101-108 (1977).
- 7) Sawabu, N., Nakagen, M., Yoneda, M., Makino, H., Kameda, S., Kobayashi, K., Hattori, N. & Ishii, M.: Novel γ -glutamyl transpeptidase isoenzyme specifically found in sera of patients with hepatocellular carcinoma. *GANN*, **69**, 601-605 (1978).
- 8) Hattori, N., Sawabu, N., Nakagen, M., Ozaki, K., Wakabayashi, T., Yoneda, M. & Ishii, M.: Biochemistry of human liver cell carcinoma-special reference to novel γ -GTP isoenzyme specific to hepatocellular carcinoma. In N. Thatcher. *Advances in Medical Oncology, Research and Education, Digestive Cancer*, N. Thatcher vol, **9**, pp.119-128, Pergamon, Oxford, 1979.
- 9) Sawabu, N., Nakagen, M., Ozaki, K., Wakabayashi, T., Toya, D., Hattori, N. & Ishii, M.: Clinical evaluation of specific γ -GTP isoenzyme in patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer*, **51**, 327-331 (1983).
- 10) Orlowski, M. & Meister, A.: Isolation of γ -glutamyl transpeptidase from hog kidney. *J. Biol. Chem.*, **240**, 338-347 (1965).
- 11) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951).
- 12) Lineweaver, H. & Burk, D.: The Determination of enzyme dissociation constant. *J. Am. Chem. Soc.*, **56**, 658-667 (1934).
- 13) Albert, Z., Rzuclidlo, Z. & Starzyk, H.: Comparative biochemical and histochemical studies on the activity of γ -GTP in the organs of fetuses, newborns and adult rats. *Acta Histochem.*, **37**, 34-39 (1970).
- 14) Fiala, S. & Fiala, E. S.: Activation by chemical carcinogens of γ -GTP in rat and mouse liver. *J. Natl. Cancer Inst.*, **51**, 151-158 (1973).
- 15) Kalengayi, M. M. R. & Desmet, V. J.: Sequential histological and histochemical study of the rat liver during aflatoxin B₁-induced carcinogenesis. *Cancer Res.*, **35**, 2845-2852 (1975).
- 16) Kalengayi, M. M. R. & Desmet, V. J.: Sequential histological and histochemical study of the rat liver after single dose aflatoxin B₁ intoxication. *Cancer Res.*, **35**, 2836-2844 (1975).
- 17) Kojima, J., Kanatani, M., Nakamura, N., Kashiwagi, T., Tohjoh, F. & Akiyama, M.: Electrophoretic fractionation of serum γ -GTP in human hepatic cancer. *Clin. Chim. Acta*, **106**, 165-172 (1980).
- 18) Kew, M. C., Wolf, P., Whittaker, D. &

- Rowe, P.: Tumour-associated isoenzyme of γ -GTP in the serum of patients with hepatocellular carcinoma. *Br. J. Cancer*, **50**, 451-455 (1984).
- 19) Sawabu, N., Toya, D., Ozaki, K., Wakabayashi, T., Nakagen, M. & Hattori, N.: Clinical value and some properties of novel γ -GTP isoenzyme specific to sera of hepatocellular carcinoma. *GANN Monograph on Cancer Res.*, **29**, 291-298 (1983).
- 20) Iwami, K., Yasumoto, K., Fushiki, T., Takigawa, Y. & Mitsuda, H.: Bovine γ -glutamyl-transferases. *J. Biochem.*, **84**, 1237-1243 (1978).
- 21) Shaw, L. M., Petersen-Archer, L., London, J. J. & Marsh, E.: Electrophoretic, kinetic, and immunoinhibition properties of γ -GTP from various tissues compared. *Clin. Chem.*, **26**, 1523-1527 (1980).
- 22) Tsuchida, S., Hoshino, K., Sato, T., Ito, N. & Sato, K.: Purification of γ -GTP from rat hepatomas and hyperplastic nodules, and comparison with the enzyme from rat kidney. *Cancer Res.*, **39**, 4200-4205 (1979).
- 23) Sato, K., Tsuchida, S., Waragai, F., Yin, Z. & Ebina, T.: Properties of molecular forms of γ -GTP and uridine diphosphateglucuronyl-transferase as hepatic preneoplastic marker enzymes. *GANN Monograph on Cancer Res.*, **29**, 23-31 (1983).
- 24) Yamashita, K., Hitoi, A., Taniguchi, N., Yokosawa, N., Tsukada, Y. & Kobata, A.: Comparative study of the sugar chains of γ -GTP purified from rat liver and rat AH-66 hepatoma cells. *Cancer Res.*, **43**, 5059-5063 (1983).

Studies on Purification and Some Properties of γ -Glutamyltranspeptidase (γ -GTP) from Human Hepatocellular Carcinoma (HCC) - Comparison with the Enzyme from Human Kidney Daishu Toya, Department of Internal Medicine (I), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920 - *J. J. Cancer Med. Soc.*, **96**, 549-557 (1987)

Key words: γ -glutamyl transpeptidase, hepatocellular carcinoma (HCC), isoenzyme, carbohydrate moieties

Abstract

In order to elucidate characteristics of novel γ -GTP which was reported to be specific to sera of HCC in our previous publications, γ -GTP was purified from HCC tissues, and its physicochemical and immunological properties were compared with those of the normal adult kidney enzyme. The enzymes from HCC tissue and kidney were found to be similar or identical with respect to Km value for substrate, pH optimum, thermostability, effect of various amino acids as acceptors, behavior to cations or ethylenediaminetetraacetate, and immunological properties. However, the HCC tissue enzyme was distinguishable from the normal kidney enzyme in molecular weight, electrophoretic mobility before and after neuraminidase treatment, Con A affinity, sensitivity to neuraminidase and isoelectrophoretic point. The results support the conception that novel γ -GTP in sera of HCC patients is largely due to structural differences in the carbohydrate moieties.