ヒト腎 Glutathione S-transferase の研究

—生化学的ならびにヒト胎児における組織化学的検討—

北海道大学医学部泌尿器科学教室 小 杉 雅 郎
(主任: 小柳知彦教授)

STUDIES ON GLUTATHIONE S-TRANSFERASE IN HUMAN KIDNEY

—Biochemical Characterization and Immunohistochemical Study in Human Embryonal Tissue—

Masao Kosugi

Department of Urology, Hokkaido University School of Medicine

(Director: Prof. T. Koyanagi)

Glutathione S-transferase (EC, 2,5,1,18) was purified from human kidney. The purification was a four-step procedure; 105,000G, 60 min centrifugation of the homogenate, ammonium sulfate precipitation, DEAE cellulose, GSH-affinity column. The molecular weight of the subunit was calculated as 19,000 by the relative mobility. The isoelectric point of the enzyme was 11.1 by the isoelectric focusing.

The human fetal tissue specimens from 5 to 12 weeks were stained by peroxidase antiperoxidase method (PAP) using the primary antibody obtained from an immunized rabbit. The enzyme staining was observed mainly in the liver, kidney and adrenal gland.

- 1) Diffuse staining of hepatic cells was already noted at 5 weeks, and remained to 12 weeks.
- 2) Metanephros was not stained before 7 weeks. After 8 weeks, the renal proximal tubules began to be stained.
- 3) The adrenal gland was stained in the fetal cortex at 5 weeks, and after 7 weeks strong stained nuclei were also observed in fetal cortical cells.

Special discussion was made on the glutathione S-transferase activity in the fetal adrenal cortex by referring to probable feto-specific steroidal metabolism.

要旨: ヒト腎より glutathione S-transferase (EC 2.5.1.18) を、腎細胞質分画 (105,000G, 60分間遠沈後上清)、硫酸分画、DEAE セルロース、GSH-affinity column の順で精製した。酵素のサブユニット分子量は19,000、等電点は pH 11.1 であった。ウサギに免疫して得られた抗体を用い酵素抗体法 (PAP 法) による組織化学的手法で、主にヒト胎児 (5~12週) の肝・腎・副腎を観察した。

- 1) 肝は5週時よりすでに肝細胞全体に、びまん性に存在が認められ、12週まで同様所見であった。
- 2) 後腎は7週まで腎内の局在は認められず、8週以降、近位尿細管に局在が認められた。
- 3) 副腎は5週時より胎生皮質部に局在を示し、特に7週以降、所々核も濃染する細胞が出現した。

以上の知見の中、副腎胎生皮質に glutathione S-transferase が局在する事は新知見と言え、胎生期特有のステロイドホルモン代謝を担う胎生皮質の生理的役割を解明する上でも重要な事と考えられた。

結 言

Glutathione S-transferase (EC 2.5.1.18) (以下 GST と略す) は、広く生物界に存在する酵素で、さまざまな領域で研究されてきている。医学領域においては、従来主に実験動物 (特に肝臓) について研究されてきた。その基本的性質としては、多様な物質を基質とし

た塩基性蛋白で、動物種・臓器間で種族特異性のある事等が知られている。近年、ヒト各種臓器 (肝¹⁾・赤血球²⁾・肺³⁾など)・ラット胎盤⁴⁾の GST の精製・研究がさかんになるにつれ、従来から知られていた塩基性の酵素のみならず、中性あるいは酸性の酵素蛋白の存在も知られる様になり、さらには各種悪性腫瘍に関して、

Fig. 1 Glutathione metabolic pathway [文献52), 53) より引用]

腫瘍マーカーとしての可能性も追求されつつある。

本酵素の生理学的役割として、従来よりメルカプツール酸合成経路への最初の段階に必要な酵素⁵⁾として、生体に有害な物質を代謝し、主に解毒作用に関するものとされている (Fig. 1)。しかし、本酵素はいわゆる多反応性酵素としての基質特異性を有し、その生理学的役割に関しては未だ究明不十分と言わざるを得ない。近年、GST がステロイド二重結合の異性化を触媒する Δ^5 -3-ketosteroid isomerase (E5.3.3.1.) と同一物であるとする指摘⁶⁾もあり、さらに GST の泌尿器科領域における臓器内分布^{7)~9)} (腎の近位尿細管・副腎網状層・辜丸 Leydig 細胞) を考えると、GST がステロイドホルモンの代謝に深く関係しているのではないかと推測が生まれる。未だヒト腎組織より精製された GST の報告は散見されず、ヒト腎由来の GST を研究する事は、本酵素の生理学的役割・臨床的有用性を究明する上でも重要であると考えられることから、著者は今回、ヒト腎より GST を精製して、その抗体を作製し、ヒト胎児組織内の局在と出現時期を検討した。

対象組織ならびに方法

I. 対象組織

1) ヒト腎組織

酵素精製用の材料として、腎盂腫瘍にて適出した正常腎実質組織を用いた。また細胞内分画研究用には、上記正常腎実質組織 2 例と、腎細胞癌で摘出した腎細胞癌組織 3 例を用いた。すべて摘出後すみやかに液体窒素にて凍結後、 -70°C にて使用まで保存した。

2) ヒト胎児組織

5~12週 (在胎期間) までの胎児組織のホルマリン固定パラフィン包埋薄切標本を用いた。なお在胎期間

の算定は頭尾長径 (crown rump length) 測定による当教室の松野論文¹⁰⁾と同一である。

II. 方法

A. 測定方法および酵素の精製

1) 活性測定法

測定は浅岡・高橋ら¹¹⁾の方法に準じて行なった。O-ジニトロベンゼン、還元型グルタチオンを基質とし、 37°C 、15分間反応後、遊離した亜硝酸をジアゾ結合させ540nm にて比色定量した ($41,000\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ at 540 nm)。

2) 蛋白量の測定

蛋白量の測定は Lowry ら¹²⁾の方法に従い、ウシの血清アルブミンを用いた標準曲線より算出した。

3) 細胞内分画の方法

Fig. 2に示した様に、組織を細断後、3倍容の16.7 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0) に入れ、glass-teflon homogenizer にて homogenize し (4°C)、27,000G、10分間遠沈後の沈殿物 (核・ミトコンドリア・ライソゾーム) と上清を分離し、その上清を105,000G、60分間遠沈し、沈殿物 (ミクロソーム) と上清 (細胞質分画) とに分けた。各々の分画の蛋白量の測定と酵素活性測定を行なった。なお、本研究の buffer にはすべて1mM-EDTA-4Na・250mM sucrose・0.1mM PMSF (phenyl methylsulfonyl fluoride) を含む。

4) 酵素の精製

i) 細胞質分画の分離

ヒト腎実質組織 (60g) を105,000G、60分間遠沈後上清を集めた。

ii) 硫安分画

上記上清100ml 当り、66g の硫安 (90% 飽和) を加え、10,000G、30分間遠沈後の沈殿を、10mM-Tris HCl buffer (pH 8.0) に溶かし、同 buffer で2昼夜透析を

Fig. 2 Preparation of subcellular fractions. (Ms: microsome, Cys: cytosol, Nucl: nucleus, Mt: mitochondria, Lys: Lysosome)

行ない、10,000G、20分間遠沈後の上清を集めた。

iii) DEAE セルロース・カラムクロマトグラフィー
上記の上清を10mM-Tris HCl buffer (pH 8.0) で平衡化した DEAE セルロース (DE-52, Whatman) カラム (1.5×8cm) にかけて、pass through 分画 (peak I) と溶出分画 (KCl linear gradient) (peak II) とに分けた (Fig. 4)。

iv) GSH-アフィニティー・クロマトグラフィー

Simons・Jaget ら¹³⁾の方法に準じて作成した GSH-affinity column に、上記の peak I 分画をかけ、溶出分画 (50mM-Tris HCl buffer, pH 9.0, 5mM GSH を含む) を集めた (Fig. 5)。

5) ポリアクリルアミドゲル電気泳動

10%に調整した分離ゲルにて、SDS (sodium dodecyl sulfate) 処理した上記試料を dual vertical slab gel electrophoresis cell (Bio-Rad model 220, Bio-Rad Labo.) にて50V、16時間泳動した。

6) 等電点分画

Vesterberg ら¹⁴⁾の方法に従って1%アンホライン (pH 3.5~10) を用いて110mlの等電点カラムにて4℃以下、500V 定電圧にて48時間泳動し、2ml ずつ分注後、pH・酵素活性・蛋白量 (A_{280}) を測定した。

7) 抗体の作成と精製

精製した酵素をウサギに、蛋白量にして1回0.5mg を Freund の complete adjuvant と emulsion にし、1週毎に3回、さらに追加免疫として2週毎に2回皮下注した。得られた抗血清を、ヒト血清蛋白を固定化した Sepharose-4B カラムにかけて、さらに Protein A-Sepharose CL-4B を用いて IgG にまで精製した。免疫電気泳動上、一般血清蛋白とは沈降線を形成しない事を確認した後、PAP 法の一次抗体として用いた。なお、これとは別にラット肝 GST (Sigma 社より購入) もウサギに免疫し、この抗体も同様に IgG にまで精製した。

8) 組織化学的手法 (PAP 法)

Sternberger¹⁵⁾の方法に従って、標本を脱パラフィン後、一次抗体を80倍希釈して行なった。DeLellis ら¹⁶⁾の方法により対照実験を行なった。

結 果

1) 酵素活性の細胞内分布

正常腎部 (2例)、腎細胞癌 (3例) とともに細胞内における活性分布は似ており、総活性の約60%が細胞質分画に存在した (Fig. 3)。

2) 酵素の精製

DEAE セルロースカラムの未吸着部 peak I と、吸着部 peak II とに分けた (Fig. 4)。peak I をさらに GSH-affinity カラムを行ない結合した分画を集めた (Fig. 5)。affinity カラムに結合した分画は、最初の細胞質分画の蛋白量の約1.5%の蛋白量であった。精製の要約を Table 1 に示した。

Fig. 3 Distribution of glutathione S-transferase activity among the subcellular fractions of human kidney

A, B: normal kidney, C, D, E: renal cell carcinoma, NML: nuclei, mitochondria, lysosomes, Ms: microsomes, C: cytosol relative specific activity (% of activity in a given fraction/% of protein in that fraction)

Fig. 4 DEAE cellulose column chromatography

Fig. 5 Affinity chromatography with GSH-Sepharose 6B column

Table 1 Summary of purification of GST from human kidney

Step	Total Protein (mg)	Total activity (μmol/min)	Specific activity (n mol/min/mg)	Yield (%)	Purification (fold)
105,000 G super	11,800	531	45.0	100	1
Ammonium sulfate	2,400	130	54.0	24.5	1.2
DEAE cellulose (peak I)	132	49.8	377.3	9.4	8.4
Affinity chromatography	18	35.3	1961.1	6.6	43.7

3) 酵素の性質

酵素精製過程における等電点分画の状況を Fig. 6 に示した。細胞質分画においては、活性の二大ピークが pH 9.3 と 11.1 にあり、その他に pH 4.2 に小さなピークが存在した。この中で、affinity カラムに結合した分画は pI 11.1 の分画であり、これを精製酵素とした。

SDS-PAGE において、精製された酵素サブユニットは一本のバンドであり (Fig. 7)、その分子量は約 19,000 と計算された (Fig. 8)。

4) 抗体の性質

前述の様に IgG にまで精製した抗体は、もちろんヒト腎 GST とは Ouchtalney 法上沈降線を形成するが、ラット肝由来 GST とも沈降線を形成した。逆にラット肝由来 GST に対する抗体はヒト腎 GST とも沈降線を形成し、互いに交叉反応のある事がわかった (Fig. 9)。

Fig. 6 Profile of the isoelectric focusing through the purification steps

① cytosol fraction (105,000G supernatant), ② unbound fraction of GSH-Sepharose 6B column, ③ binding fraction of GSH-Sepharose 6B column

5) 胎児組織内の GST の局在と出現時期

ヒト胎児組織標本を PAP 法にて処理後、ヘマトキシリンにて対比染色を行ない、主に後腎・副腎・肝を観察した (Table 2)。

i) 後腎

後腎組織は 7 週まで GST の局在は認められず、8 週より尿細管原基の上皮細胞に局在が認められ (Fig. 10a, b, 11), 11 週・12 週 (Fig. 12) では近位尿細管に局在が認められた。

Fig. 7 Polyacrylamide gel electrophoresis in 10% sodium dodecyl sulfate

1. 105,000G supernatant, 2. Salt precipitation (90% ammonium sulfate), 3. DEAE cellulose (peak I), 4. GSH-Sepharose 6B affinity column MP: marker protein (molecular weights are indicated)

ii) 副腎

5週時すでに副腎中央部の胎生皮質の細胞質に局在が認められた。7週では胎生皮質の細胞質に加え、所々核にも局在が認められた。8週以降では胎生皮質部での局在及び永久皮質との区別がさらに明瞭となった (Fig. 10a, 10b)。

iii) 肝

5週時すでに肝細胞全体に、細胞質にびまん性に GST の存在が認められた。7週では、しだいに肝細胞索を形成しつつあり、8週では、しだいに中心静脈が明瞭となった。肝細胞全体の細胞質に局在が認められたが、副腎胎生皮質に認められた様な核内の局在は認められなかった。

iv) その他の組織

腸管の内腔上皮細胞は7週より局在を示し、8週ではかなり明瞭に局在が認められた。肺は7週まで、中腎・性腺原基 (gonad) は8週までの観察では局在はなかった。

考 察

1) グルタチオン S-トランスフェラーゼについて
グルタチオン S-トランスフェラーゼ (EC 2.5.1.18)

Fig. 8 Determination of the molecular weight of purified GST subunit from human kidney

1. α -Lactalbumin 14,400, 2. Trypsin inhibitor 20,100, 3. Carbonic anhydrase 30,000, 4. Ovalbumin 43,000, 5. Albumin 67,000, 6. Phosphorylase b 94,000

Fig. 9 Cross reactivities of anti-human kidney GST antibody and anti-rat liver GST antibody

1. anti-human kidney GST antibody, 2. human kidney GST, 3. anti-rat liver GST antibody, 4. rat liver GST

は各種反応物質と還元型グルタチオン (GSH) との抱合を触媒する酵素である。その生理学的役割として、以前よりメルカプツール酸合成経路の最初の段階に関わる酵素⁵⁾として、生体に有害な物質を代謝し、解毒作用をつかさどるとされている (Fig. 1)。従来その基質の多様性から、アリール¹⁷⁾、アルキル¹⁸⁾、アルケン¹⁹⁾、エポキシド²⁰⁾、トランスフェラーゼなど別々の酵素の存在が考えられていた⁵²⁾が、最近の研究により、各酵素が相互に重複する広い基質特異性を有する事が知られ、この様な分類の無意味さが明らかとなり、現在 GST として一括されている。

Table 2 胎児標本における局在性と出現時期のまとめ

妊娠週	頭尾長	後 腎	副 腎	肝	腸 管
5 W	15 mm	染色性(-)	fetal cortex 部細胞に極く弱い染色性(+)	肝細胞全体にびまん性に染色性(+)	染色性(-)
7 W	27 mm	染色性(-)	fetal cortex 部細胞の染色性(+) fetal cortex 内に所々、核の濃染する細胞が出現	しだいに肝細胞索を形成しつつあり、染色性(+)	内腔上皮細胞にやや染色性(+)
8 W	40 mm	collecting tubules 上皮細胞にやや染色性(+)	Permanent cortex との区別明瞭となり、fetal cortex 部の染色性(+)	中心静脈が明瞭となり、肝細胞の染色性(+)	内腔上皮細胞の染色(+)
11W	50 mm	convoluted tubules 部の染色性(+)	同 上		
12W	65 mm	近位尿細管の染色性(+)			
新生児		近位尿細管の染色性(+)	fetal cortex 部の染色性(+) 核の濃染する細胞が、櫛状層の内層にわずかに認められる		

Fig. 10a Metanephros and adrenal gland of 8w. fetus (CRL : 40mm)
M : metanephros, P : permanent cortex, F : fetal cortex
胎生皮質 (F) に局在が認められる。

Fig. 10b Fig. 10a の模式図。副腎部は、点線の外側部の永久皮質 (P) と内側の胎生皮質 (F) に明瞭に区別される。

Fig. 11 Metanephros of 8w. fetus (CRL : 40mm)
尿細管 (U) に局在が認められる。

一方、以前よりラット肝に種々の疎水性化合物（ビリルビンなど）と非共有結合する蛋白質の存在が知られ、リガンディン²¹⁾と名づけられ研究されてきた。さらにこの蛋白質は、以前より知られていた carcinogen binding protein, cortisol metabolite binding protein, Y protein と同一物質である事²²⁾が知られ、さらに GST 活性を有する事が解明され、リガンディンと言う名称・定義があいまいなものとなってきた。現在なお GST とリガンディンとの異同に関しては議論があるが、一般的には広義では GST と同じ意味に、狭義

Fig. 12 Metanephros of 12w. fetus (CRL: 65mm)
近位尿管に局在が認められる。

ではラット肝の GST-B,あるいは GST-L₂²³⁾と同一物質と解釈されている。

一方 GST は、いわゆる多反応性酵素としての広い基質特異性を有しており、多数の結合物質が知られている。チオシアネート分解活性²⁴⁾、チオリシス活性²⁵⁾、有機ニトレートエステル還元活性²⁴⁾、イソメラーゼ活性⁹⁾(Δ^5 -3-ケトステロイド、マレイルアセトン、マレイル酢酸)、ペルオキシダーゼ活性²⁶⁾などが知られており、単なるグルタチオン抱合以外の多彩な生理学的作用をしのばせる。

GST の活性測定には多数の人工基質が用いられ、一般には Habig ら⁵⁾の報告にもある様に、1-クロロ-2, 4-ジストロベンゼンに対する活性が最も高く頻用されるが、今回の著者の検討では、多数の試料を測定する際の経時的活性低下を考慮し、ほぼ同時に多数の試料を処理できる浅岡・高橋ら¹¹⁾の方法は実用的と考え、O-ジニトロベンゼンに対する活性ピークを集めた。ただラット腎 GST の研究でも基質の違いにより、活性ピークの等電点に差のある事も報告²⁷⁾されており、ヒト腎 GST の基質特異性に関する検討も今後なされるべきと考える。

臓器内分布としては、各種動物において、肝にその活性が最も高く、その他、脾臓・腎臓・肺・脳・筋肉・胎盤など広い分布を示している。特に泌尿器科領域においては、副腎の網状層・腎近位尿管・睪丸 Leydig 細胞にその局在がある事⁷⁾が知られており、前述の Δ^5 -3-ケトステロイドイソメラーゼ (EC 5.3.3.1) 活性⁹⁾を有している点と考えると何らかの形でステロイドホルモンの代謝と深く関係しているのではないかと推測が生まれ、本研究開始の動機ともなった。

細胞内所在は、ラット肝で総活性の約80%が細胞質分画にあり²⁸⁾、ブタ脳で総活性の約60%が細胞質分画にあるとの報告²⁹⁾もある。今回の検討でも、正常腎実質組織・腎細胞癌組織ともに約60%の活性が細胞質分画に存在した。また最近、ミクロソーム³⁰⁾、ミトコンドリア³²⁾での GST の研究もなされており、膜系における物質移動に関与しているのではないかと推測もある。

GST の一般的生化学的性質として、塩基性蛋白質であり陰イオン交換体による分離が一般的である事より、DEAE セルロース及び GSH アフィニティーカラムを使用して分離した。今回の精製過程において、DEAE セルロースカラムの吸着部 (GSH アフィニティーカラムには結合せず、等電点は4.2) が腎由来 GST のアイソザイムと考えるか、組織に混入していた赤血球由来の GST (等電点がほぼ等しい事²⁾より) と考えるかは問題であり、さらに GSH アフィニティーカラムに結合せずに流出してきた分画 (等電点9.5) も腎由来 GST のアイソザイムと考えてよいかなど、今後の研究課題を残したものと考える。今回は GSH アフィニティーカラムに結合した分画 (等電点11.1) を精製腎由来 GST とした。ヒト腎における GST の報告は未だ見られず比較できないが、今まで報告された他種・他臓器由来の GST と比較してもかなり塩基性の

Table 3 各種の精製された GST の性質 [文献52) より引用]

起 源	酵 素	pI	Subunit 分子量 ($\times 10^3$)	分子量 ($\times 10^3$)	文 献
ラット肝	AA	10	25	45	43)
	A	8.9	25	46	
	B	9.8	25	47	
	C	8	25	47	
	E	7.3	25	40	
ヒ ト 肝	α	7.8	25	49	1), 44)
	β	8.25	25	49	
	γ	8.55	25	49	
	δ	8.75	25	49	
	ϵ	8.8	25	48	
ヒト赤血球	ρ	4.7	—	—	2)
サル 肝	IV	—	24	48	45)
ブ タ 肝	リガンディン	—	25	55	46)
		—	27	52	47)
マウス肝		8.5~9.0	23	47	48)
ヒツジ肝		—	—	40	49)
ヒツジ肺	SL 2	9.8~9.9	—	45	50)
ラット心臓		6.8, 6.3, 4.9	—	—	51)
ヒ ト 肺		4.9	22	45	3)
		9.2	24	—	
ブ タ 脳		—	22	43	29)
ラット腎	リガンディン	8.9	22	44	31)
ヒ ト 腎		11.1	19	—	(著者)

蛋白質であり (Table 3), SDS-PAGE によるサブユニット分子量は約19,000と従来報告されている GST サブユニットよりもやや小さい分子量であった。

GST における免疫学的交叉反応に関する研究はまだ少ないと思われるが, kirsch ら³¹⁾は, ラット腎リガンディンに対する抗体を作成し, これがラット肝リガンディンとも沈降線を形成すると報告している。また Hebig ら⁵⁾によると, ラット肝由来 GST の中でも A に対する抗体は C とは沈降線を形成するが, B や E とは反応しないとしており, 今後, 蛋白分子構造の解明と共に検討されるべき課題と考える。

2) ヒト胎児組織内の局在, 特に副腎胎生皮質について

Sternberger¹⁵⁾の PAP 法は, 凍結切片に比し, 永久標本として保存でき, 抗原の局在・巣状病変も明確に診断可能な鋭敏な手法である。しかし, 抗原と抗体との結合性を利用して抗体を重ねていく性質上, 染色性の程度そのものが必ずしも抗原量の多寡を反映するものとは言えない³²⁾。今回の検討では, DeLellis ら¹⁶⁾の方法により対照実験を行ない, false positive な染色性の無い事は確認しており, すべて同一条件下に施行した。

肝は成人において最も酵素活性の高い臓器で, 胎児組織においても 5 週時よりすでに肝細胞全体に存在した。各種肝疾患における血清値レベルの上昇も報告³³⁾されており, 将来泌尿器科疾患時の血清レベルを論じる場合には, 肝疾患の有無は必ず留意すべき事項と思われる。

後腎においては, 8 週より尿細管上皮細胞に局在が認められる。この事は同時期より後腎尿の分泌が開始されるとする報告¹⁰⁾に照らすと, この時期の尿細管分化のある程度の成熟性を表現しているものと考えられる。成人腎においては GST は近位尿細管にその活性は局在⁷⁾しており, 近位尿細管由来とされる腎細胞癌組織中の GST の局在と, 組織学的異型度との関係等に関しては, 次報で報告する予定である。

性腺原基 (Gonad) は 8 週までの観察では局在を認めず, この時期の性腺はようやく morphogenesis が始まったばかりで, 睾丸も男性化の次段階である Müller 氏管の消退やアンドロゲン生成等が始まっていない時期である事を考慮すれば納得のいく事と思われる。いずれにしても睾丸では Leydig 細胞に活性のある事が知られており⁷⁹⁾, Leydig 細胞のステロイド産生能が 3 カ月頃より出現し, 4 カ月頃に最大の発育を示す事を考慮すれば, 睾丸発生過程における GST の局在を

更に在胎日数の長い標本にて検討する事は, そのステロイド代謝に果たす役割を知る上でも非常に意義深いと考える。

副腎では胎生皮質に GST の局在が認められた。胎児の副腎は成人の副腎皮質に分化する永久皮質 permanent cortex と, その内層にある胎生皮質 fetal cortex とにヒトでは明瞭に区別される。胎生皮質は胎児副腎の大部分を占め, 出生前まで増大を続け, 出生後は約 6 カ月で生理的退縮を起こす事が知られている。永久皮質は出生後より徐々に柵状の配列を形成し始め, 1 歳頃よりその外層が“glomeruloid” structure を形成し始め, Dhom³⁴⁾によると, 12~14 歳頃までに網状層も形成される。胎生皮質は出生後より退縮し, 6 カ月頃には毛細血管を混じった膠原線維組織となる。この胎生皮質の胎児における役割・生理的退縮の機序に関しては詳細は不明である。出生前の胎児副腎におけるステロイドホルモン合成に関しては, 各分画の量的な比が成人とはかなり異なる事が知られており, 胎盤機能との関係で, いわゆる fetoplacental unit の一部としての胎生期特有のステロイド代謝が存在する。一方, 胎生皮質は無脳児では 20 週以降ほとんど退縮してしまう事実³⁵⁾や, ACTH の作用で形態学的に free の ribosome が増加する事³⁶⁾などより, 胎生皮質は何らかの間脳下垂体系の調節を受けていると考えられる。

酵素学的知見として, 胎生皮質には sulphotransferase 活性が成人の 4~5 倍ある事が知られており³⁷⁾, ステロイドホルモンを sulpho conjugation し, より水溶性にしている事は, fetoplacental unit におけるステロイド代謝に重要な役割を果たしていると考えられている。3 β -hydroxysteroid dehydrogenase 活性は成人に比し活性の低い事が知られており³⁸⁾, 永久皮質における glucocorticoid 産生がある程度制限されているとの説³⁹⁾もある。

胎生皮質は各種ステロイドホルモンの代謝 (inactivation, transfer 等)を行なっている場であるとも考えられ, 胎児副腎で 16 α -hydroxylase 活性が高い事⁴⁰⁾もこの事と重要な関連があると思われる。今回の検討で GST が胎生皮質に局在していた事実は, 以前より知られておる胎生皮質の細胞がエオジン好性に染色される事とも関連すると考える。胎生皮質の細胞は電顕的には Johannisson³⁶⁾によれば, 滑面小胞体・ミトコンドリア・ゴルジ小体の豊富な事が知られており, 今後さらに膜系の GST の研究・免疫電顕的研究が必要と思われる。

3) 今後の GST 研究の有用性について

GST は前述の様に、生化学的にも未解決の問題も多く、研究課題は山積している。泌尿器科領域に関連した事項として、腎移植後の急性尿細管壊死 (ATN) 時に尿中に GST が出現するとの報告⁴⁾、腎動脈撮影後に尿中 GST が増加するとの報告⁴²⁾などがあり、何らかの機序での腎尿細管障害時に尿中・血中に出現している可能性があり、各種腎疾患における血清レベルの検討も今後の研究課題となろう。

近年、化学発癌過程において発癌剤の解毒代謝 (グルタチオンは、アルキル化剤が DNA 分子をアルキル化する過程での拮抗物質と考えられている) に関与している GST について活発な研究がされており、発癌機構の解明・制癌剤の代謝に関する研究にも有用な酵素と考える。

結 語

1) ヒト腎組織よりグルタチオン S-トランスフェラーゼを精製した。サブユニット分子量 19,000、等電点 pH 11.1 の特徴的な塩基性蛋白であった。

2) ヒト胎児組織では、肝・腎近位尿細管・副腎胎生皮質に局在が認められ、各々の出現時期につき論じた。

3) 副腎胎生皮質における GST の局在性を新知見として強調した。

本論文の要旨は、第 274 回日本泌尿器科学会北海道地方会において発表した。

稿を終えるに臨み、御指導・御校閲を賜った小柳知彦教授、北海道大学医学部生化学第 2 講座石橋輝雄助教授に深謝いたします。

また胎児標本の提出を快諾して下さいた現帯広厚生病院泌尿器科医長、松野正博士ならびに多大な実験の手助けをいただいた米田久美子さんに深謝いたします。

文 献

- 1) Kamisaka, K., Habig, W.H., Ketley, J.N., Arias, I.M. and Jakoby, W.B.: Multiple forms of human glutathione S-transferase and their affinity for bilirubin. *Eur. J. Biochem.*, **60**, 153—161, 1975.
- 2) Marcus, C.J., Habig, W.H. and Jakoby, W.B.: Glutathione transferase from human erythrocyte. *Arch. Biochem. Biophys.*, **188**, 287—293, 1978.
- 3) Partridge, C.A., Dao, D.D. and Awasthi, Y.C.: Glutathione S-transferases of lung: Purification and characterization of human lung glutathione S-transferases. *Lung.*, **162**, 27—36, 1984.
- 4) Sato, K., Kitahara, A., Satoh, K., Ishikawa, T.,

Tatematsu, M. and Ito, N.: The placental form of glutathione S-transferase as a new marker protein for preneoplasia in rat chemical hepatocarcinogenesis. *G.A.N.N.*, **75**, 199—202, 1984.

- 5) Habig, W.H., Pabst, M.J. and Jakoby, W.B.: Glutathione S-transferases-The first enzymatic step in macrapturic acid formation. *J. Biol. Chem.*, **249**, 7130—7139, 1974.
- 6) Benson, A.M., Talalay, P., Keen, J.H. and Jakoby, W.B.: Relationship between the soluble glutathione-dependent Δ^5 -3-ketosteroid isomerase and the glutathione S-transferases of the liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **74**, 158—162, 1977.
- 7) Campbell, J.A.H., Bass, N.M. and Kirsch, R.E.: Immunohistological localization of ligandin in human tissues. *Cancer*, **45**, 503—510, 1980.
- 8) Kraus, P. and Kloft, H.D.: The activity of glutathione S-transferases in various organs of the rat. *Enzyme*, **25**, 158—160, 1980.
- 9) Bannikov, G.A. and Tchipyseva, T.A.: Ligandin in steroidogenically active cells of rat gonads. *Br. J. Cancer*, **38**, 350—355, 1978.
- 10) 松野 正: 尿管および膀胱平滑筋の発生、分化の研究—尿管膀胱抗合部を中心として—。日泌尿会誌, **72**, 1245—1255, 1981.
- 11) Asaoka, K. and Takahashi, K.: A colorimetric assay of glutathione S-transferases using o-dinitrobenzene as a substrate. *J. Biochem.*, **94**, 1685—1688, 1983.
- 12) Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265—275, 1951.
- 13) Simons, P.C. and Vandder, Jagt, D.L.: Purification of glutathione S-transferases from human liver by glutathione-affinity chromatography. *Anal. Biochem.*, **82**, 334—341, 1977.
- 14) Vesterberg, O.: Synthesis and isoelectric fractionation of carrier ampholites. *Acta Chem. Scand.*, **23**, 2653—2666, 1969.
- 15) Sternberger, L.A.: The unlabeled antibody peroxidase-antiperoxidase (PAP) method. In *Immunocytochemistry*, 1st. ed. p. 104—169, John Wiley & Sons, New York, 1979.
- 16) DeLellis, R.A., Sternberger, L.A., Mann, R.B., Banke, P.M. and Nakane, P.K.: Immunoperoxidase technique in diagnostic pathology. *Am. J. Clin. Pathol.*, **71**, 483—488, 1979.
- 17) Grover, P.L. and Sims, P.: Conjugations with glutathione. *Biochem. J.*, **90**, 603—606, 1964.

- 18) Johnson, M.K.: A distinct enzyme of rat liver and kidney coupling glutathione with some aliphatic halogen compounds. *Biochem. J.*, **87**, 9p, 1963.
- 19) Chasseaud, L.F.: Distribution of enzyme that catalyse reactions of glutathione with $\alpha\beta$ -unsaturated compounds. *Biochem. J.*, **131**, 765–769, 1973.
- 20) Boyland, E. and Williams, K.: An enzyme catalysing the conjugation of epoxides with glutathione. *Biochem. J.*, **94**, 190–197, 1965.
- 21) Arias, I.M., Ohmi, N., Bhargava, M. and Listowsky, I.: Ligandin: An adventure in liver land. *Mole. Cell. Biochem.*, **29**, 71–80, 1980.
- 22) Litwack, G., Ketterer, B. and Arias, I.M.: Lignandin: A hepatic protein which binds steroids, bilirubin, carcinogens and a number of exogenous organic anions. *Nature*, **234**, 466–467, 1971.
- 23) Mannervik, B. and Jensson, H.: Binary combinations of four protein subunits with different catalytic specificities explain the relationship between six basic glutathione S-transferases in rat liver cytosol. *J. Biol. Chem.*, **257**, 9909–9912, 1982.
- 24) Habig, W.H., Keen, J.H. and Jacoby, W.B.: Glutathione S-transferase in the formation of cyanide from organic thiocyanates and as an organic nitrate reductase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **64**, 501–506, 1975.
- 25) Keen, J.H. and Jacoby, W.B.: Glutathione transferases. catalysis of nucleophilic reactions of glutathione. *J. Biol. Chem.*, **253**, 5654–5657, 1978.
- 26) Prohaska, J.R. and Ganther, H.E.: Glutathione peroxidase activity of glutathione-S-transferases purified from rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **76**, 437–445, 1977.
- 27) Hales, B.F., Jaeger, V. and Neims, A.H.: Isoelectric focusing of glutathione S-transferases from rat liver and kidney. *Biochem. J.*, **175**, 937–943, 1978.
- 28) Booth, J., Boyland, E. and Sims, P.: An enzyme from rat liver catalysing conjugations with glutathione. *Biochem. J.*, **79**, 516–524, 1961.
- 29) Asaoka, K. and Takahashi, K.: Purification and properties of porcine brain glutathione S-transferases. *J. Biochem.*, **94**, 1191–1199, 1983.
- 30) Friedberg, T., Bentley, P., Stasiecki, P., Glatt, H.R., Raphael, D. and Oesch, F.: The identification, solubilization, and characterization of microsome-associated Glutathione S-transferases. *J. Biol. Chem.*, **254**, 12028–12033, 1979.
- 31) Kirsh, R., Fleischer, G., Kamisaka, K. and Arias, I.M.: Structural and functional studies of ligandin, a major renal organic anion-binding protein. *J. Clin. Invest.*, **55**, 1009–1019, 1975.
- 32) Bigbee, J.W., Kosek, J.C. and Eng, L.F.: Effects of primary antiserum dilution on staining of "antigen-rich" tissues with the peroxidase antiperoxidase technique. *J. Histochem. Cytochem.*, **25**, 443–447, 1977.
- 33) Adachi, Y., Horii, K., Takahashi, Y., Tanihata, M., Ohba, Y. and Yamamoto, T.: Serum glutathione S-transferase activity in liver diseases. *Clinica Chim. Acta*, **106**, 243–255, 1980.
- 34) Dhom, G.: The prepuberal and puberal growth of the adrenal (Adrenarche). *Beitr. Pathol.*, **150**, 357–377, 1973.
- 35) Benirschke, K.: Adrenals in anencephaly and hydrocephaly. *Obst. Gynec.*, **8**, 412–425, 1956.
- 36) Johannisson, E.: Foetal adrenal cortex in human: its ultrastructure at different stages of development and in different functional states. *Acta Endocr.*, **58**(Suppl. 130), 7–107, 1968.
- 37) Cooke, B.A. and Taylor, P.D.: Site of dehydroepiandrosterone sulfate biosynthesis in the adrenal gland of the previsible foetus. *J. Endocr.*, **51**, 547–556, 1971.
- 38) Goldman, A.S., Yakovac, W.C. and Bongiovanni, A.M.: Development of activity of 3β -hydroxysteroid dehydrogenase in human fetal tissues and two anencephalic newborns. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **26**, 14–22, 1966.
- 39) Bloch, E. and Benirschke, K.: Synthesis in vitro of steroids by human fetal adrenal bland slices. *J. Biol. Chem.*, **234**, 1085–1089, 1959.
- 40) Matsumoto, K., Endo, H., Yamane, G., Kurachi, K. and Uozumi, T.: 16 α -hydroxylation of pregnenolone by human fetus. *Endocrinol. Jpn.*, **15**, 189–196, 1968.
- 41) Cho, S.I., Zalneraitis, B.S., Ohmi, N. and Arias, I.M.: Prediction of cadaver kidney function by ligandin analysis. *J. Surg. Res.*, **30**, 361–364, 1981.
- 42) Goldstein, E.J., Feinfeld, D.A., Fleischer, G.M. and Elkin, M.: Enzymatic evidence of renal tubular damage following renal angiography. *Radiology*, **121**, 617–619, 1976.
- 43) Boyer, T.D., Kenney, W.C. and Zakim, D.: Structural functional and hybridization studies of the glutathione S-transferases of rat liver.

- Bioch. Pharm., 32, 1843—1850, 1983.
- 44) Hayes, J.D., Gilligan, D., Chapman, B.J. and Beckett, G.J.: Purification of human hepatic glutathione S-transferases and the development of a radioimmunoassay for their measurement in plasma. *Clinica Chim. Acta*, 134, 107—121, 1983.
 - 45) Asaoka, K., Ito, H. and Takahashi, K.: Monomer glutathione S-aryltransferases. *J. Biochem.*, 82, 973—981, 1977.
 - 46) Trip, J.A.J., Van Dam, J., Tepper, T. and Que, G.S.: A simple procedure for the purification of porcine ligandine (Y-protein). *FEBS Lett*, 45, 6—10, 1974.
 - 47) Grahnen, A. and Sjöholm, I.: The preparation of ligandine with glutathione-S-transferase activity from porcine liver cytosol by affinity chromatography on bromosulphophthalein-Sepharose. *Eur. J. Biochem.*, 80, 573—580, 1977.
 - 48) Guddewar, M.B. and Dauterman, W.C.: Studies on a glutathione S-transferase preparation from mouse liver which conjugates chloro-striazine herbicides. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 12, 1—9, 1979.
 - 49) Hayakawa, T., Lemahieu, R.A. and Udenfriend, S.: Studies on glutathione-S-arene oxidase transferase—a sensitive assay and partial purification of the enzyme from sheep liver. *Arch. Biochem. Biophys.*, 162, 223—230, 1974.
 - 50) Christ-Hazelhof, E., Nugteren, D.H. and Van Dorp, D.A.: Conversions of prostaglandin endoperoxides by glutathione-S-transferases and serum albumins. *Biochim. Biophys. Acta*, 450, 450—461, 1976.
 - 51) Ishikawa, T. and Sies, H.: The isozyme pattern of glutathione S-transferase in rat heart. *FEBS Lett*, 169, 156—160, 1984.
 - 52) 高橋健治, 浅岡一雄: グルタチオン S-トランスフェラーゼとリガンディン. *代謝*, 17(12), 2139—2149, 1980.
 - 53) Rathbun, W.B., Sethna, S.S., Skelnik, D.L. and Bistner, S.I.: Glutathione metabolism in lenses of dogs and rabbits: Activities of five enzymes. *Exp. Eye Res.*, 36, 845—858, 1983.

(1984年12月28日受付)