ヒト腎細胞癌組織から得た N-acetyl- β , D-glucosaminidase A (NAG A) の酵素学的特性の検討

正常組織との比較, 特に糖鎖構造に関する検討を中心として

埼玉医科大学総合医療センター泌尿器科

吉 田 謙 一 郎

STUDY ON THE ENZYMATIC PROPERTIES OF N-ACETYL- β , D-GLUCOSAMINIDASE A (NAG A) FROM THE TISSUE OF RENAL CELL CARCINOMAS:

Comparison of the Enzymatic Properties with those of Normal Renal Tissues,
with Special Regard to Sugar-Chain Structures

Ken-ichiro Yoshida

Department of Urology, Saitama Medical Center of Saitama Medical School

The enzymatic properties of N-acetyl- β , D-glucosaminidase A (NAG A) partially purified from the tissues of seven cases of human renal cell carcinomas were studied individually and compared with those of normal renal tissues. In the carcinoma tissues, the K_m value of the enzyme toward a synthetic glucosaminide substrate was 0.180 ± 0.07 mM, the optimal pH of the enzyme ranged from pH 4.7 to 4.9 and the enzyme showed fairly stable for metal ions. These enzyme characteristics were similar to those of the normal tissues. On the contrary, the sugar-chain structures of the enzyme from the carcinoma tissues studied by lectin affinity chromatographies, were statistically different from those of the normal tissues. Namely, both complex type of sugar-chains as well as hybrid type sugar-chains without fucose linkage to the innermost N-acetylglucosamine (GlcNAc) were significantly increased in the enzyme from the carcinoma tissues, while high mannose type sugar-chains and hybrid type sugar-chains with fucose linkage to the innermost GlcNAc were significantly decreased in the carcinoma tissues compared to the normal tissues. These results indicate that the processing of sugar-chains of the enzyme has possibly changed in the carcinoma tissues.

Key words: NAG A, renal cell carcinoma, enzymatic properties

要旨: 7例のヒト腎細胞癌組織より部分精製された NAG A について個々にその酵素学的特性を検討し, 正常組織由来との違いを比較検討した。腎細胞癌組織では合成グルコサミナイド基質に対し 0.18 ± 0.07 mM の K_m 値を示し, 至適 pH は 4.7~4.9 であり, 金属イオンに対し比較的安定であった。これらの特性は正常組織由来のそれと類似した。これに対しレクチンアフィニティークロマトグラフィーを用いた腎細胞癌由来の NAG A の糖鎖構造の検討では, 統計学的にみて正常組織由来の糖鎖構造とは違いがみられた。すなわち腎細胞癌由来では複合型糖鎖と最内側のアセチルグルコサミンにフコース残基を持たない混成型糖鎖が有意に増加したが, 高マンノース型糖鎖や最内側のアセチルグルコサミンにフコース残基を持つ混成型糖鎖は有意に低下した。これらの事実は腎細胞癌組織において NAG A 糖鎖のプロセッシングに明らかな変化が起きていることを示したものと思われた。

キーワード: NAG A, 腎細胞癌, 酵素学的特性

結 言

N-acetyl- β , D-glucosaminidase (NAG) は lysosome 酵素であり, A, B で代表される isoenzyme

が存在する^{1)~5)}。これら isoenzyme の活性比は臓器により異なり^{5)~7)}, 腎組織では A 分画 (NAG A) が高い活性比を示す⁷⁾。著者はこの NAG A を正常腎組織か

ら精製し、その酵素学的特性について asparagine (Asn) 結合糖鎖構造様式を含め本学会誌に報告⁸⁾したが、今回腎細胞癌組織における本酵素につきその酵素学的特性を検討し、正常腎組織との違いについて検討したので報告する。

実験方法

1. 試薬

Sephacryl S-400, Concanavalin A (Con A) sepharose 4B, Q-sepharose は Pharmacia 社より購入した。Wheat germ agglutinin (WGA) agarose は E.Y. laboratory 社より購入した。ミニコン簡易濃縮器は Amicon 社より購入した。また蛋白測定用のキットは Biorad 社より購入した。NAG 活性測定には「NAG テストシオノギ」を用いた。その他の試薬は全て Sigma 社製の analytical grade のものを用いた。

2. 組織とその調整

腎の癌組織および正常組織については腎細胞癌にて根治的全摘術を施行された7症例より得た。予め患者からは本研究のため摘除組織の一部を用いることにつき了解を得た。年齢は45歳から72歳までで平均62歳であり、摘除標本の病理学的検索ではいずれも grade 1 の clear cell carcinoma であった。摘除腎はただちに氷冷とし、それより壊死組織を除いた癌組織および正常組織の一部を得た。組織は秤量後細切し、予め氷冷にした150mM の NaCl を含む4倍量のトリス塩酸緩衝液 (pH 7.4) 中にて homogenate を作成した。homogenate は20,000×G にて30分間遠心し、その上澄である crude extract を得、それより NAG A の部分精製を行った。

3. column の調整と NAG A の部分精製

NAG A の部分精製は Sephacryl S-400 と Q-sepharose を用いた column chromatography により行った。前者は crude extract からの NAG の部分精製に用い、後者は部分精製された NAG からの A 分画の分離に用いた。すなわち Sephacryl S-400 は100mM のトリス塩酸緩衝液 (pH 7.4) にて膨化させた後、内径2.7cm、高さ100cm の column に添加し、同じ緩衝液にて平衡化させた後、crude extract を添加後、毎分0.8 ml の流速にて溶出した。Q-sepharose は10mM のリン酸緩衝液 (pH 7.4) にて膨化させた後、内径2.7cm、高さ45cm の column に添加し、同じ緩衝液にて平衡化させた後、Sephacryl S-400 で得られた NAG の活性分画を添加後、NaCl を0~500mM と漸次増加させる濃度勾配法を用い溶出した。いずれの column も1分画

を4ml とし fraction collector にて溶出液を採取した。以上の操作は4℃にて行った。また溶出液の濃縮にはミニコン簡易濃縮器を用いた。

4. lectin affinity column の作製と検体分離法

Con A sepharose および WGA agarose は内径0.5 cm、高さ10cm の column にそれぞれ充填した後、1 mM の $MgCl_2$ と同濃度の $CaCl_2$ および10 μ M の $ZnCl_2$ を含む10mM のトリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) にて平衡化し、lectin affinity column を作製し chromatography を行った。Con A column の溶出は NAG A をミニコン簡易濃縮器にておよそ500mU/ml に調整した後添加し、室温にて3時間放置後溶出し、Con A に対する親和性の違いから NAG A を次の3分画に分けた。すなわち Con A に結合せずトリス塩酸緩衝液にてそのまま溶出される分画 (Con A 非結合分画：分画 I)、Con A に結合するためトリス塩酸緩衝液では溶出されず、10mM の α -methyl-D-mannoside (α -MM) を含む上記緩衝液にて競合溶出される分画 (Con A 弱結合分画：分画 II)、10mM の α -MM を含む上記緩衝液では溶出されず、500mM の α -MM を含むトリス塩酸緩衝液にて競合溶出される分画 (Con A 強結合分画：分画 III) に分けた。Con A 強結合分画はさらに WGA column に添加し室温にて3時間放置後、WGA に結合せずトリス塩酸緩衝液にてそのまま溶出される分画 (分画 IIIa) と、WGA に結合した後500mM の N-acetylglucosamine (GlcNAc) を含むトリス塩酸緩衝液で溶出される分画 (分画 IIIb) に分けた (Fig. 1)。なお lectin affinity chromatography においては1分画を1ml として採取した。

5. 酵素学的特性の検討

Km 値の算定は個々の症例の正常腎組織と癌組織につき行った。酵素源とし Sephacryl S-400 と Q-sepharose にて部分精製された NAG A を用い、基質濃度を2.75 μ M から2.75mM まで変化させつつ反応させ、その活性値と基質濃度から Lineweaver-Burk plot にて Km 値を算出した。

至適 pH の検討には基質溶解液として2種の異なる緩衝液を用いた。pH 3.0から7.5まではクエン酸リン酸緩衝液を用い、pH 7.2から8.2まではトリス塩酸緩衝液を用いた。酵素源添加後に pH を測定し、その pH をもって反応系の pH とした。

金属イオンに対する安定性について1価金属については反応系の最終濃度が150mM になるよう調整し、2価および3価金属イオンでは最終濃度が5mM にな

Fig. 1 Fractionation of NAG A by lectin affinity chromatography.

Fraction I, II and III were separated by Con A sepharose chromatography. Fraction IIIa and IIIb were separated by WGA agarose chromatography.

るよう調整した。

6. NAG 活性の測定

NAG 活性の測定は「NAG テストシノギ」を用いた。この原理は基質として人工の sodium-cresol-sulfonphthaleiny-N-acetyl-β, D-glucosaminide(MCP-NAG) を用い, NAG の酵素反応により生ずる m-cresol purple を測定するもので, 1 分間に1μmol の m-cresol purple を生成する酵素量を1unit とするものである⁹⁾。すなわち2.75mM の MCP-NAG 1ml に50 mM のクエン酸緩衝液 (pH 4.9) を加え37℃にて15分間加熱後, これに試料50μl を加え37℃にて更に15分間反応させた後, 反応停止液である0.3M の炭酸ナトリウムを2.0ml 添加し発色させ, 1 時間以内に580nm にて吸光度測定を行った。lectin affinity chromatography および酵素学的特性の検討には実験系を duplicate するとともに, 各試料当たり 3 回の活性測定を行い, その平均値を求めその活性値とした。なお intraassay および interassay CV 値はいずれも 3 %未満であった。

7. 蛋白定量

蛋白定量はウシ血清アルブミンを標準蛋白とし, Biorad 社の測定用キットを用いた。

8. 統計処理

上記の検索は癌組織, 正常組織とも 7 例につき行い,

Table 1 Comparison of enzymatic properties of NAG A from renal cell carcinomas to those of normal renal tissues

	Carcinoma tissues	Normal tissues
NAG activity (U/mg protein)	130.4±73.1	79.9±11.3
Km value(mM)	0.180±0.07	0.177±0.05
Optimal pH	4.7~4.9	4.7~4.9
Stability to metal ions		
KCl (150mM)*	96±3%**	98±4%**
LiCl (150mM)*	98±6%**	101±5%**
CaCl ₂ (5mM)*	104±6%**	99±3%**
MnCl ₂ (5mM)*	80±4%**	84±8%**
AlCl ₃ (5mM)*	102±3%**	97±3%**

*: Final concentration in the incubation medium is indicated.

**: % of original activity (mean±S.D) is expressed.

測定値は平均値±標準偏差で表した。また有意差検定は Fisher-Behrens test を用い p<0.05 をもって有意差とした。

結 果

1. 癌組織および正常組織由来の NAG A 活性, Km 値, 至適 pH および金属イオンに対する安定性の比較

Table 1 に上記の結果を示す。癌組織および正常組織の Q-sepharose 後の A 分画における NAG 活性は前者で12.6~233.1U/mg protein と広い範囲を示し, その平均は130.4±73.1U/mg protein であった。後者は63.1~90.7U/mg protein と比較的均一した値を示し, その平均は79.9±11.3U/mg protein であった。両組織群間の NAG 活性には有意差は認められなかった。

Km 値についてみると癌組織の NAG A では MCP-NAG に対し0.170~0.190mM の値を示し, その平均は0.180±0.07mM であり, 正常組織では0.171~0.182mM の値を示し, その平均は0.177±0.05mM であった。両群の Km 値はともに均一した値を示し, 両群の Km 値の平均に統計学的有意差はみられなかった。

至適 pH は両組織の NAG A とも pH 4.7~4.9 と, 同様の値を示した。金属イオンに対する安定性についてみると, 両組織由来の NAG A とも MnCl₂ に対しやや活性値の低下を示したが, この他の金属イオンに対しては両組織由来ともほとんど影響を受けず, 両組織の NAG A には金属イオンに対する感受性に差は見ら

Table 2 Studies on sugar-chains of NAG A by lectin affinity chromatographies

Fraction	Affinity to lectin		Structure of sugar-chains	Type of sugar-chain
	Con A	WG A		
I	—		$\begin{array}{l} R \searrow_6 \text{Man}\alpha 1 \\ R \nearrow_2 \text{Man}\alpha 1 \searrow_6 \text{Man}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow \text{Asn} \\ R \searrow_6 \text{Man}\alpha 1 \\ R \nearrow_2 \text{Man}\alpha 1 \end{array}$	multiantennary
			$\begin{array}{l} R \rightarrow 2\text{Man}\alpha 1 \searrow_6 \text{Man}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow \text{Asn} \\ R \rightarrow 2\text{Man}\alpha 1 \nearrow_3 \text{GlcNAc} \end{array}$	biantennary type with bisecting GlcNAc
II	+		$\begin{array}{l} R \rightarrow 2\text{Man}\alpha 1 \searrow_6 \text{Man}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow \text{Asn} \\ R \rightarrow 2\text{Man}\alpha 1 \nearrow_3 \end{array}$	biantennary type
IIIa	++	—	$\begin{array}{l} \text{Man}\alpha 1 \searrow_6 \text{Man}\alpha 1 \\ \text{Man}\alpha 1 \nearrow_3 \text{Man}\alpha 1 \searrow_6 \text{Man}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow \text{Asn} \\ \text{Man}\alpha 1 \nearrow_3 \end{array}$	high mannose type
			$\begin{array}{l} \text{Man}\alpha 1 \searrow_6 \text{Man}\alpha 1 \\ \text{Man}\alpha 1 \nearrow_3 \text{Man}\alpha 1 \searrow_6 \text{Man}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow \text{Asn} \\ R \rightarrow \text{Man}\alpha 1 \nearrow_3 \text{Fuc}\alpha 1 \end{array}$	hybrid type with fucose residue
IIIb	++	+	$\begin{array}{l} \text{Man}\alpha 1 \searrow_6 \text{Man}\alpha 1 \\ \text{Man}\alpha 1 \nearrow_3 \text{Man}\alpha 1 \searrow_6 \text{Man}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow \text{Asn} \\ R \rightarrow 2\text{Man}\alpha 1 \nearrow_3 \end{array}$	hybrid type without fucose residue

R: $\pm$ NeuAc α 2 $\rightarrow$ 6Gal β 1 $\rightarrow$ 4GlcNAc β 1, NeuAc: N-acetyl-neuraminic acid, Man: Mannose
Gal: Galactosamine, GlcNAc: N-acetyl-glucosamine

れなかった。

2. 癌組織および正常組織における NAG A の Asn 結合糖鎖の比較

Con A sepharose および WGA agarose による affinity chromatography 後の NAG A の recovery は前者で $86.8 \pm 5.4\%$ 、後者で $84.8 \pm 6.3\%$ であった。chromatography 後の I ~ IIIb の各分画の占める割合はそれぞれの分画中の NAG 活性を、chromatography 後回収した NAG の総活性で除し求めた。

Table 2 に Con A sepharose と WGA agarose の affinity chromatography の組み合わせからみた I ~ IIIb の各分画の Asn 結合糖鎖の特徴を示す。Con A 非結合分画である分画 I には Asn 結合糖鎖が multiantennary complex type (多枝複合型) を示すものと、糖鎖の基本構造は biantennary complex type (二枝複合型) であるが、その core 部の mannose (Man) に GlcNAc が β 1-4 結合 (bisecting GlcNAc) したものが含まれる。Con A 弱結合分画である分画 II には bisecting GlcNAc を持たない二枝複合型が含まれる。Con A 強結合分画のうち WGA と結合しない分画である IIIa には high mannose type (高マンノース型) と、Asn 結合の GlcNAc (最内側の GlcNAc) に

fucose 残基が結合した hybrid type (混成型) が含まれる。Con A と WGA の両者に強く結合する IIIb 分画には最内側の GlcNAc に fucose 残基を持たない混成型が含まれる。

由来組織の違いからみた各分画の総活性に対する比率をみると、癌組織の I 分画は $6.1 \sim 30.7\%$ の値を示し、その平均は $18.4 \pm 9.2\%$ であり、II 分画は $3.1 \sim 18.2\%$ の値を示し、その平均は $10.8 \pm 6.0\%$ であり、IIIa 分画は $34.0 \sim 80.4\%$ の値を示し、その平均は $48.0 \pm 12.8\%$ であり、IIIb 分画は $16.0 \sim 31.6\%$ の値を示し、その平均は $23.5 \pm 5.9\%$ であった。一方、正常組織においては I 分画は $4.8 \sim 6.0\%$ の値を示し、その平均は $5.4 \pm 0.4\%$ であり、II 分画は $0.8 \sim 1.6\%$ の値を示し、その平均は $1.2 \pm 0.3\%$ であり、IIIa 分画は $74.0 \sim 80.4\%$ の値を示し、その平均は $78.2 \pm 2.4\%$ であり、IIIb 分画は $13.6 \sim 19.0\%$ の値を示し、その平均は $15.1 \pm 2.0\%$ であった。両組織とも IIIa 分画が最も高く、次いで IIIb 分画、I 分画と続き、II 分画が最も少ない比率を示した。個々の分画における両群の比較では、癌組織では I, II, IIIb 分画が正常組織に比し有意に増加しているが、IIIa 分画では有意に低下していることが示された (Fig. 2)。しかし両群における各分画

Fig. 2 Relative amounts of NAG A in the fractions separated by lectin affinity chromatographies.

Enzyme activities in each fraction were divided by the total NAG activities recovered.

■ : NAG from renal cell carcinoma tissues.

□ : NAG from normal renal tissues. * : $p < 0.05$

の活性値(絶対値)の比較では、癌組織における NAG 活性(絶対値)が症例間で大きく異なるため正常組織と有意差はみられなかった。

考 案

ヒト各臓器にはその組織を代表する酵素が存在する。骨における alkaline phosphatase (ALP), 前立腺における acid phosphatase (ACP), 肝臓における γ -glutamyl transpeptidase (γ -GTP), 腎臓における NAG などがそれにあたる。これらの酵素の体液中での変動は疾患の特定や病勢判断の指標として用いられているが、これら酵素の質的变化、特に癌化にもとづく酵素の糖鎖構造の変化については γ -GTP^{10)~14)}を除けばほとんど検討されていない。そこで今回、腎組織で高い活性を示す NAG A について、先に本学会誌に報告⁸⁾した正常腎組織からの NAG A の酵素学的特性の検討法に準じ、癌組織についてもその検討を行い両者の違いにつき検討を試みた。

今回検討した正常組織からの NAG A の酵素学的特性を先の報告⁸⁾と比較すると、基質に対する K_m 値, 至適 pH, 金属イオンに対する耐性, 糖鎖構造の特徴においてその一致がみられ、正常組織における今回の検討は先の報告を再確認する結果となった。癌組織から得られた NAG A についてその酵素反応の特性について

みると、基質に対する K_m 値, 至適 pH, あるいは金属イオンに対する安定性は正常組織由来の酵素反応と極めて類似した結果を示した。これは本酵素が癌組織に存在しても基質親和性, 触媒反応という酵素反応系において、正常組織のそれと質的違いがないことを示したものと解釈される。ある酵素につきその酵素学的特性を正常組織と癌組織由来とで比較検討した報告は少ない。わずかに腎臓, 肝臓の γ -GTP についての報告^{10)~14)}がみられるが、これらの報告では両組織において酵素反応系に質的違いを認めていない。今回の NAG A もそれと同様の結果であった。

糖鎖はそれが結合する蛋白分子が窒素である場合と酸素である場合の2つに大別され、前者の結合型を N-glycoside 結合とよび Asn 結合糖鎖がこれにあたる。NAG を含め lysosome 酵素は全てこの Asn 結合糖鎖を示す¹⁵⁾。Asn 結合糖鎖はその糖鎖構造の違いや、特定糖鎖の存在により lectin に対する結合能が異なる¹⁶⁾。このため lectin affinity column を組み合わせることより、Asn 結合糖鎖の構造解析が可能となる¹⁷⁾¹⁸⁾。今回糖鎖構造の解析に Con A と WGA を用いたが、これら lectin の糖鎖に対する結合性は下記のごとくである。

Con A は Asn 結合糖鎖を構成する α -Man のうち、C-3, 4, 6 位の水酸基が未置換である α -Man の分子数が多いほど、その糖鎖と強く結合する。Con A に結合するには C-3, 4, 6 位の水酸基が未置換である α -Man が少なくとも2残基以上なければならない。多枝複合型はこの条件を満たさないため Con A に結合しない。二枝複合型はこの条件を満たすため結合するが、二枝複合型であっても core 部の Man に GlcNAc が β 1-4 結合した構造 (bisecting GlcNAc) を有するものは例外的に Con A と結合しない。高マンノース型と混成型では α -Man のうち C-3, 4, 6 位の水酸基が未置換のものが3残基以上存在するため Con A に強く結合する。一方 WGA は混成型に親和性を有するが高マンノース型や最内側の GlcNAc に fucose 残基が存在する糖鎖とは結合しない。以上より Asn 結合糖鎖は Con A column で分別後、WGA column を追加することにより Table 2 の4分画に分けられる。

lysosome 酵素の糖鎖は一般的に高マンノース型のみとされてきたが、最近複合型糖鎖も存在することが報告⁸⁾¹⁹⁾されている。今回検討したごとく腎細胞癌由来の NAG A にも複合型糖鎖や混成型糖鎖を有するもののあることが示されたが、更に腎細胞癌組織におい

てはそれらの占める割合は正常組織由来と異なり、複合型と最内側の GlcNAc に fucose 残基を持たない混成型が有意に増加しており、高マンノース型と最内側の GlcNAc に fucose 残基を持つ混成型は有意に低下していることが示された。今回の検討では癌組織の量的制約から酵素の純化が行えず、そのため癌化にともなう NAG A のリン酸化糖鎖の増加²⁰⁾については検討できなかったが、腎細胞癌組織における NAG A の Asn 結合糖鎖は肝臓癌や腎細胞癌の γ -GTP¹⁴⁾²¹⁾、あるいは肝臓癌や大網の悪性中皮腫での ALP²²⁾で報告されているごとく、正常細胞とは異なる糖鎖の processing²³⁾を受けていることが示唆された。

癌化にともなう糖鎖構造の変化は細胞膜²⁴⁾や腫瘍マーカー²⁵⁾²⁶⁾について、その特異的な変化が報告されている。今回、NAG A については lectin によるパターン分類で終わったが、NAG A を単一蛋白に精製後ヒドラジン分解を行えば、Asn 結合糖鎖をより詳細に検討することが可能である。今後この点につき検討したいと考えている。

結 語

腎細胞癌組織と正常腎組織の NAG A ではその酵素反応に質的差は認めないが、Asn 結合糖鎖には両者に明らかな違いが見られた。

なお本研究の一部は文部省科学研究費一般研究 C 課題番号 02670717 による。

文 献

- 1) Verpoorte, J.A.: Purification of two β -N-acetyl-D-glucosaminidases from beef spleen. *J. Biol. Chem.*, 247, 4787—4793, 1972.
- 2) Srivastava, S.K., Awasthi, Y.C., Yoshida, A. and Beutler, E.: Studies on human β -D-N-acetylhexosaminidases I. purification and properties. *J. Biol. Chem.*, 249, 2043—2048, 1974.
- 3) Wiktorowicz, J.E., Awasthi, Y.C., Kurosky, A. and Srivastava, S.K.: Purification and properties of human kidney-cortex hexosaminidases A and B. *Biochem. J.*, 165, 49—53, 1977.
- 4) Parkes, H.C., Stirling, J.L. and Calvo, P.: Affinity purification and subunit structures of β -N-acetylhexosaminidase A and B from boar epididymis. *Biochem. J.*, 219, 1009—1015, 1984.
- 5) Kapur, K. and Gupta, G.S.: Purification, biochemical properties and active sites of N-acetyl- β -D-hexosaminidases human seminal plasma. *Biochem. J.*, 236, 103—109, 1986.
- 6) 吉田謙一郎, 小林信幸, 内島 豊, 齊藤 博: ヒト精漿中の N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG) isoenzyme の分離, およびその酵素学的特性についての検討. *日泌尿会誌*, 80, 1625—1631, 1989.
- 7) 安達高久, 川嶋秀紀, 森 勝志, 田中重人, 浅川正純, 安本亮二, 前川正信: 精路に関する臓器での N-acetyl- β -glucosaminidase (NAG) isoenzyme について. *日泌尿会誌*, 80, 245—248, 1989.
- 8) 吉田謙一郎: ヒト腎組織からの N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG) A の精製およびその酵素学的特性の検討. *日泌尿会誌*, 83, 1254—1262, 1992.
- 9) Noto, A., Ogawa, Y., Mori, S., Yoshioka, M., Kitakaze, T., Hori, T., Nakamura, M. and Miyake, Y.: Simple, rapid spectrophotometry of urinary N-acetyl- β -D-glucosaminidase, with use of new chromogenic substrate. *Clin. Chem.*, 29, 1713—1716, 1983.
- 10) Hada, T., Higashino, K., Yamamoto, H., Okochi, T., Sumikawa, K. and Yamamura, Y.: A novel γ -glutamyl transpeptidase in renal carcinoma in comparison with normal kidney enzyme. *Clin. Chim. Acta.*, 85, 267—277, 1978.
- 11) Tsuchida, S., Hoshino, K., Sato, T., Ito, N. and Sato, K.: Purification of γ -glutamyltransferases from rat hepatomas and hyperplastic hepatic nodules, and comparison with the enzyme from rat kidney. *Cancer Res.*, 39, 4200—4205, 1979.
- 12) Yamamoto, H., Sumikawa, K., Hada, T., Higashino, K. and Yamamura, Y.: γ -glutamyltransferase from human hepatoma tissue in comparison with normal liver enzyme. *Clin. Chim. Acta.*, 111, 229—237, 1981.
- 13) Selvaraj, P. and Balasubramanian, K.A.: Soluble forms of γ -glutamyltransferase in human adult liver, fetal liver, and primary hepatoma compared. *Clin. Chem.*, 29, 90—95, 1983.
- 14) Arai, K., Yoshida, K.-I., Komoda, T., Kobayashi, N. and Sakagishi, Y.: Differences in the enzymatic nature and the sugar-chain structure of γ -glutamyl transferase between normal and carcinomatous human kidney and prostate. *Clin. Chim. Acta.*, 210, 35—46, 1992.
- 15) 山下克子, 水落次男, 田井 直, 高崎誠一: 糖タンパク質の構造決定. 続生化学実験講座 4, 複合糖質研究法 I, 大沢利昭, 木幡 陽, 山科郁男編, 第 1 版, p. 153—259, 東京化学同人, 東京, 1985.
- 16) 辻 勉, 大沢利昭: 糖タンパク質の分離精製. 続生化学実験講座 4, 複合糖質研究法 I, 大沢利昭, 木幡 陽, 山科郁男編, 第 1 版, p. 3—37, 東京化学同人, 東京, 1985.
- 17) Cummings, R.D. and Kornfeld, S.: Fractination of asparagine-linked oligosaccharides by

- serial lectin-agarose affinity chromatography. J. Biol. Chem., 257, 11235—11240, 1982.
- 18) 小山岩雄, 菰田二一: レクチンアフィニティークロマトグラフィーの有用性—アルカリ性フォスファターゼの糖鎖構造. 医学のあゆみ, 142, 453—456, 1987.
 - 19) Kozutumi, Y., Nakano, Y., Teramura, T., Kawasaki, T., Yamashina, I., Mutsaers, J.H.G. M., Halbeek, H.V. and Vliegthart, J.F.G.: Structures of oligomannoside chains of α -mannosidase from porcine kidney. J. Biochem., 99, 1253—1265, 1986.
 - 20) Fujita, M., Taniguchi, N., Makita, A. and Oikawa, K.: Cancer-associated alteration of β -glucuronidase in human lung cancer: Elevated activity and increased phosphorylation. Gann, 75, 508—517, 1984.
 - 21) Hitoi, A., Yamashita, K., Ohkawa, J. and Kobata, A.: Application of a phaseolus vulgaris erythroagglutinating lectin agarose column for the specific detection of human hepatoma γ -glutamyl transpeptidase in serum. Gann, 75, 301—304, 1984.
 - 22) Koyama, I., Miura, M., Matsuzaki, H., Sakagishi, Y. and Komoda, T.: Sugarchain heterogeneity of human alkaline phosphatase: Differences between normal and tumor-associated isoenzymes. J. Chromatogr., 413, 65—78, 1987.
 - 23) 加藤敬太郎, 和田郁夫: リソゾーム酵素のプロセシング. 代謝, 24, 99—111, 1987.
 - 24) 瀧 孝雄, 松本 亮: 糖脂質糖鎖のがん性変化とモノクローン抗体. 生化学, 61, 177—193, 1989.
 - 25) 木幡 陽: 糖蛋白質糖鎖にみられる癌性変化—絨毛性腺刺激ホルモンに関する研究を中心として—. Oncologia, 14, 77—88, 1985.
 - 26) 杉立市兵衛, 石黒達也: α -フェトプロテインの糖側鎖構造とその分子異性に関する研究—原発性肝癌と良性肝疾患の相違—. 日癌誌, 23, 1732—1739, 1988.

(1993年4月21日受付, 7月9日受理)