6. γ -グルタミルトランスぺプチダーゼの糖鎖構造*

— その癌性変化 —

山下克子**・人位 晃**・谷口直之***・横沢紀子***・木幡 陽**

序 論

γ -グルタミルトランスぺプチダーゼ (γ -GTP) はグルタチオンを始めとした γ -グルタミルペプチドの γ -グルタミル残基を他のアミノ酸やペプチドに転移する膜結合酵素である。この酵素は大小二つの不均一なサブユニットから構成されており、両サブユニット共、アスパラギン結合糖鎖を含んでいる。大サブユニットは膜を貫通しており、その細胞外部分に結合して存在する小サブユニットに酵素活性中心がある。この酵素は各種動物の諸臓器の上皮細胞に広く分布し、アミノ酸の輸送に関与していると考えられている¹⁾。

この様な γ -GTP の本来の機能に関する興味の他に、 γ -GTP は癌のマーカー酵素として注目されて来ている。1972年、Fiala ら²⁾ が 3'-methyl-4-dimethylamino-azobenzene で誘導したラット肝癌の γ -GTP 活性が正常肝の50倍にも達することを発見し、さらに、その前癌状態とみなされる過形成結節においても γ -GTP 活性が上昇することを見出した³⁾。それ以来癌組織で産生される γ -GTP の性状に関して多くの報告がなされている。谷口⁴⁾ はラット肝癌で産生される γ -GTP の等電点が 3.0 と正常の γ -GTP より低いことを見出した。同様の等電点の低下傾向はラット乳癌⁵⁾ や腎臓癌^{6,7)} の γ -GTP でも観察され、これらの酵素をシアリダーゼ消化すると等電点がアルカリ側に移り正常の酵素のシアリダーゼ消化物の等電点に近くなることが観察されている。これらの知見から癌化による γ -GTP の変化は糖鎖部分に起っている可能性が高いと考えられる様になった。

一方我々はこれまでに癌化に伴う糖蛋白質糖鎖の変化について相反する二つの現象を観察し報告して来た。その一つは表面膜糖蛋白質糖鎖において癌化に伴い側鎖の

数が増大する現象であり⁸⁾、もう一つは分泌性糖蛋白質であるアミラーゼの糖鎖において組織の癌化に伴い糖鎖不全が起っている現象である⁹⁾。

すでに述べた様に γ -GTP は表面膜内在性の部分とこれに結合した酵素活性を有する部分から構成されており両サブユニット共糖鎖を持っているので、これらの糖鎖が産生細胞のガン化によってどの様に变化するかということは興味深い問題である。そこで我々はまず手始めに γ -GTP の糖鎖の実態を明らかにする目的で比較的精製の容易なラットおよびウシの腎臓由来の γ -GTP の糖鎖の構造研究を実施した^{10,11)}。その結果両者共基本的に同じ糖鎖構造を持っており、約 10% は高マンノース型糖鎖、その他の大部分は β -マンノース残基に β 1 $\rightarrow$ 4 結合した N-アセチルグルコサミン (bisect GlcNAc と略す) を含む 2, 3, 4 本側鎖および Gal β 1 $\rightarrow$ GlcNAc のくり返し構造をもった 4 本側鎖の複合型糖鎖で、かつ側鎖部分にかなりの数の未完成糖鎖をもつ極めて不均一な糖鎖であることが判明した。この研究により、 γ -GTP の糖鎖は他の糖蛋白質にくらべて、種特異性が非常に少ないという注目すべき知見が得られたのである。更に、その後マウスの肝臓の γ -GTP の糖鎖を調べた研究により、この酵素の糖鎖には bisect GlcNAc が一切含まれないということが判明した¹²⁾。すなわち γ -GTP の臓器特異性は大きいのである。そこで我々は γ -GTP 糖鎖の癌化に伴う変化は同一臓器で調べることが必要不可欠と考えてラット肝臓とラット腹水肝癌 AH-66 を材料に精製した γ -GTP につきその糖鎖を比較研究した。

実験材料および方法

1. γ -GTP の精製

AH-66 細胞 (湿容量, 200 ml) をホモジナイズし 0.2

* The carbohydrate moieties of γ -glutamyltranspeptidase: structural changes in cancerous tissue.

** Katsuko Yamashita, Akira Hitoi, Akira Kobata, 神戸大学医学部第 1 生化学教室。

*** Naoyuki Taniguchi, Noriko Yokosawa, 北海道大学医学部癌研究施設生化学部門。

(94) 生物物理化学

% Lubrol WX で抽出した。抽出液に硫酸を加えて 50% 飽和として粗 γ -GTP を沈殿させ、次いで沈殿物を 50% アセトンで脱脂した。この沈殿物を 1% sodium deoxycholate 存在下でホモジナイズし、7% ブロメラインで 60 分間消化した。この様にして可溶化した γ -GTP を DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィー、ついでセファデックス G-100 ゲルクロマトグラフィーで精製し、比活性、428 units/mg 蛋白の γ -GTP を 12% の収率で得た¹³⁾。

正常ラット肝 (4 kg) も AH-66 細胞と同様に Lubrol WX 抽出、硫酸沈殿、アセトン処理した後に、1% Triton X-100 で可溶化した γ -GTP を抗 γ -GTP-抗体 (ラット腎 γ -GTP に対して) を用いた免疫アフィニティークロマトグラフィーにより 9.3×10^4 倍に精製した。かくして得られた酵素は比活性、440 units/mg 蛋白で収率は 3.1% であった。両酵素共、SDS-PAGE にかけて Coomassie blue で染色すると小および大サブユニットのバンドのみが検出された。

2. アスパラギン結合糖鎖の遊離

ラット腹水肝癌 AH-66 細胞由来の γ -GTP (750 μ g) あるいは正常ラット肝由来の γ -GTP (170 μ g) に 0.3 ml の無水ヒドラジンを加えて 100°C、8 時間、ヒドラジン分解し¹⁴⁾、アスパラギン結合糖鎖を少糖として遊離した後 N-アセチル化した。この少糖混合物に内部標準として乳糖 10 n mol を加えて NaB^3H_4 で還元し ^3H -標識した少糖を得た。乳糖にとり込まれた活性をもとに算出した ^3H の比活性にもとづき計算すると、1 モルあたりの糖鎖数は AH-66 γ -GTP では 14 モル、正常ラット肝 γ -GTP では 3.7 モルとなった。

3. 少糖の分画

遊離した少糖は pH 5.4 の高圧汙紙電気泳動 (緩衝液、ピリジン：酢酸：水 = 3 : 1 : 387) および 400 メッシュ以下の Bio-Gel P-4 を用いたカラムクロマトグラフィー¹⁵⁾ (長さ：2 m, 直径：2 cm, カラム温度：55°C, 展開溶媒：蒸留水, 流量：0.6 ml/min) で分画した。

4. 分析方法

単糖の配列順序とそのアノマー構造は *Arthrobacter* 由来のシアリダーゼ、ナタ豆および肺炎双球菌由来の β -ガラクトシダーゼと β -N-アセチルヘキソサミニダーゼ、ナタ豆 α -マンノシダーゼ、 β -マンノシダーゼなどのエキソグリコシダーゼによる逐次分解によって決定した。

各単糖の結合位置はメチル化分析¹⁶⁾により決定した。尚メチル化単糖の GC-MS による分析に際してガスクロ

マトグラフィーの充てん剤には 5% OV-17-Gaschrom Q あるいは 5% OV-210-Gaschrom Q を用いた。

結 果

1. ラット AH-66 腹水肝癌細胞 γ -GTP の糖鎖

AH-66 細胞由来の γ -GTP から一連の反応によって得られた ^3H -標識少糖を、pH 5.4 の高圧汙紙電気泳動にかけると、Fig. 1 A に示す様な結果が得られた。すなわち約 30% は中性糖 (N) に、残り 70% は A1~A4 までの少くとも 4 個の酸性画分に分離した。これら酸性少

Fig. 1. Paper electrophoresis of the radioactive oligosaccharides liberated from hepatoma γ -GTP (A) and rat liver γ -GTP (B) by hydrazinolysis.

Paper electrophoresis was performed at pH 5.4 using pyridine-acetate buffer at potential of 74 V/cm for 90 min.

糖は全てシアリダーゼの徹底消化により中性糖 (A1N~A4N と名付ける) となり、さらに、シアリダーゼの部分消化の結果から判断すると、A1 はモノシアリル体、A2 はジシアリル体、A3 はトリシアリル体、A4 はテトラシアリル体であった。さらに Concanavalin A-セファロースカラムにかけると A3N と A4N はカラムを素通りしたが N、A1N および A2N の各画分は同カラムを素通りする画分 [Con A(-)] とカラムに吸着し 0.1 M α -メチルマンノシドで溶出する画分 [Con A(+)] の二個に分画された。かくして得られた合計 8 個の画分を Bio-Gel P-4 カラムにかけると Fig. 2 の様な分画パターンが得られた。N-Con A(+) 画分は 5 個の成分 (Fig. 2 A) に、N-Con A(-)、A1N-Con A(+) および A1N-Con A(-) 画分はそれぞれ 3 個の成分に (Fig. 2 B, 2 C, 2 D), A2N-Con A(+) 画分および A2N-Con A

Fig. 2. Bio-Gel P-4 column chromatography of oligosaccharides N and A1N~A4N. The arrows indicate the eluting positions of glucose oligomers.

(-) 画分はそれぞれ 2 (Fig. 2E) および 4 成分 (Fig. 2F) にわかれた。N-Con A (+) 画分の 5 個の成分 (M5~M9) はマンノース α 1-2 結合を特異的に加水分解する *Aspergillus saitoi* の α -マンノシダーゼ消化で Man₅, GlcNAc₂OT の溶出位置に収れんされる (Fig. 2A 点線) ことより, Fig. 3 に示す様な高マンノース型糖鎖であることが判明した。残りの成分は Bio-Gel P-4 カラムにおける溶出位置により a から j の 10 個の少糖に分類され, いずれも Man₃・GlcNAc₂ あるいは Man₃・GlcNAc・Fuc・GlcNAc をコア構造としてガラクトースあるいは N-アセチルグルコサミンが数残基結合した複合型少糖であることが明らかとなった。

Fig. 3. Summary of the structures of oligosaccharides liberated from hepatoma γ -GTP and their percentage molar ratio.

ガラクトースおよび N-アセチルグルコサミンの anomeric 構造, 結合位置および結合数はメチル化分析および基質特異性の明瞭なエキソグリコシダーゼの逐次分解法を駆使して決定した。これらのデータにさらにシアル酸の結合位置の分析結果を加えて, AH-66 細胞 γ -GTP の糖鎖構造は Fig. 3 の様に要約することが出来た。この中には 10 数パーセントの高マンノース型と 40% の bisect GlcNAc を含む 2 本鎖少糖が存在する。また, 2 本鎖少糖が全結合糖鎖の 60% にも達し, ガラクトースまで完成していない未完成糖鎖が多いのが特徴である。

2. 正常ラット肝 γ -GTP の糖鎖

ラット肝臓由来の γ -GTP から遊離したトリチウム標識少糖は, pH 5.4 の高圧紙電気泳動により, S1 から S6 の 6 個の酸性画分にわかれ (Fig. 1B), いずれも AH-66 γ -GTP の酸性画分と同様にシアリダーゼ消化で中性となった。S1 と S2 はモノシアリル体, S3, S4, S5 はジシアリル体, S6 はトリシアリル体であることはシアリダーゼの部分消化により確かめられた。次にシアリダーゼ消化によって得られた S1N から S6N までの画分をそれぞれ Bio-Gel P-4 カラムでさらに分画すると, S1N と S3N 画分は 5 (Fig. 4A) および 4 成分 (Fig. 4C) にわかれ, 残りの画分はそれぞれ 2 成分 (Fig. 4B, D, E と F) にわかれた。それぞれの成分は Bio-Gel P-4 カラムにおける溶出位置から a から h の 8

Fig. 4. Bio-Gel P-4 column chromatography of oligosaccharides S1N~S6N.

個の少糖に分類された。それぞれを逐次グリコシダーゼ消化法を中心にして構造を決定した結果、Fig. 5に示すようにいずれもガラクトースまで完成した典型的な2本鎖から4本鎖の複合型少糖とGal β →GlcNAcくり返し構造を含む3および4本鎖少糖であることが明らかとなった。これらはいずれも bisect GlcNAcを含んでおらず、3本鎖および4本鎖少糖が全体の60%近くを占める。

考 察

以上の実験結果を基に正常ラット肝とAH-66肝癌由来 γ -GTP の糖鎖の特徴を Table 1 に要約した。際立った特色は両者共、免疫学的性質および蛋白の一次構造が同一であるにもかかわらず、1モル蛋白あたりの糖鎖の結合数が著しく異なり、AH-66 肝癌由来の γ -GTP 糖鎖数は正常の約4倍になっている。また、酸性糖鎖の比率は正常肝由来 γ -GTP では100%で、AH-66 γ -GTP では70%であるが、1モル酵素あたりのシアル酸残基数は肝癌では3倍高くなっている。この結果は、正常ラット腎 γ -GTP のうち等電点の異なる isozymic form 間で蛋白の一次構造が同一であるにもかかわらず、シアル酸の数ばかりでなく結合している糖鎖数まで異なっているという事実と関連があると考えられる¹⁷⁾。すなわち、癌組織においては、極めて片寄った isozymic form が大量に合成されていることを示唆している。

さらに糖鎖構造も質的に異なり、AH-66 細胞由来の γ -GTP では正常肝 γ -GTP では見られない高マンノース型糖鎖と bisect GlcNAc を含んだ2本鎖少糖が現われて来ている。これは癌化に伴い糖鎖の processing が抑制されると共に、正常時では抑制されているグリコシルトランスフェラーゼ活性が新たに出現して来たことを示している。またくり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 のそれよりも少なくなっていることから、いわゆる“糖鎖不全現象”が起っていると考えられる。この事実は γ -GTP が膜結合酵素であるにもかかわらず糖脂質¹⁸⁾や分泌性糖蛋白質であるアミラーゼの糖鎖の癌化に伴う変化と同じ挙動をすることを示す点で興味深い。 γ -GTP は他の膜結合糖蛋白質と異り大サブユニットのN-末端側で膜に結合しており、この点で真の膜結合蛋白質とは異った性質を持っているからである。その意味から γ -GTP の生合成機構の研究は大変興味のあるものとなる。

糖鎖の不全或いは側鎖数の増加という一見逆の変化が

Fig. 5. Summary of structures of oligosaccharides liberated from rat liver γ -GTP.

Table 1. Characteristics of asparagine-linked sugar chains between normal rat liver γ -GTP and rat AH-66 hepatoma cell γ -GTP.

	AH-66 Hepatoma	Normal Liver
Numbers of sugar chains (mol/mol enzyme)	14.0	3.7
% of Acidic sugar chains	72	100
Monosialyl derivatives	27	41
Disialyl "	30	36
Trisialyl "	8	13
Tetrasialyl "	7	0
Sialic acid contents (mol/mol enzyme)	19.5	6.0
Types of sugar chains (% molar ratio)		
High mannose type	16	0
Complex type	84	100
Biantennary	59	42
(Bisected biantennary)	(39)	(0)
Triantennary	13	33
Tetraantennary	12	11
Tri- and tetra-antennary containing repeating structure	0	14

癌化によって引き起こされてはいるが、これを更に高次の立場から見れば“糖鎖の癌性変化とはそれぞれの種や臓器で統制のとれた合成系からの逸脱によって引き起こされるものである”という結論になる。この逸脱の鍵になるのは何か、これが現在我々の当面している主題と考えられる。

文 献

- 1) Meister, A. and Tate, S.S. : Ann. Rev. Biochem., 559, 1976.
- 2) Fiala, S. and Fiala, E. S. : J. Natl. Cancer Inst., 48 : 1393, 1972.
- 3) Fiala, S. and Fiala, E. S. : J. Natl. Cancer Inst., 51 : 151, 1973.
- 4) Taniguchi, N. : J. Biochem., 75 : 473, 1974.
- 5) Jaken, S. and Mason, M. : Proc. Natl. Acad. Sci., 75 : 1750, 1978.
- 6) Hada, T. et al. : Clin. Clim. Acta., 85 : 267, 1978.
- 7) Yamamoto, H. et al. : Clin. Clim. Acta., 111 : 229, 1981.
- 8) Takasaki, S. et al. : Biochem. Biophys. Res. Commun., 92 : 735, 1980.
- 9) Yamashita, K. et al. : J. Biochem., 90 : 1281, 1981.
- 10) Yamashita, K. et al. : J. Biol. Chem., 258 : 1098, 1983.
- 11) Yamashita, K. et al. : J. Biochem., 93 : 135 (1983).

- 12) 山下克子他：投稿準備中。
- 13) Yokosawa, N. et al. : Oncodevelop. Biol. Med., 2 : 165, 1981.
- 14) Takasaki, S. et al. : Methods Enzymol., 83 : 263, 1982.
- 15) Yamashita, K. et al. : Methods Enzymol., 83, 105, 1982.
- 16) Endo, Y. et al. : J. Biochem., 85 : 669, 1979.
- 17) 山下克子他：第5回糖質シンポジウム講演要旨集, 56, 1982.
- 18) Hakomori, S. : Biochim. Biophys. Acta, 417 : 55, 1975.

Summary

The structures of sugar chains of γ -glutamyl transpeptidases (γ -GTP) purified from rat liver and rat ascites AH-66 hepatoma were comparatively studied. The number of sugar chains in one molecule of hepatoma γ -GTP was approximately four times higher than that of liver γ -GTP. Only acidic sugar chains were found in liver γ -GTP, while hepatoma enzyme contained approximately 30% of neutral sugar chains which were high mannose type and complex type. The acidic sugar chains of liver γ -GTP were sialylated bi-, tri-, tetraantennary sugar chains and tetraantennary sugar chains with Gal β 1→GlcNAc repeating outer chains. In contrast, no Gal β 1→GlcNAc repeating outer chain was found in the acidic sugar chains of hepatoma enzyme. No

(98) 生物物理化学

bisect N-acetylglucosamine residue was found in the sugar chains of liver enzyme like liver enzymes of other animals, while some of hepatoma enzyme did contain this residue. Furthermore, some of the outer chain moieties of the complex type sugar chains of hepatoma γ -GTP did not contain galactose residue indicating that the deletion phenomena as found in the glycolipids

of cancerous tissues were included in the biosynthesis of these sugar chains. These results indicate that the glycosylation of hepatoma γ -GTP is not strictly controlled as in the case of liver γ -GTP.

Key words : γ -glutamyltranspeptidase, hepatoma, asparagine-linked sugar chains