〔原 著〕

HeLa 細胞由来の Hep. 2 細胞株の産生する 変異型アルカリ性ホスファターゼ

小山岩雄*・Ricardo Makiya**・平野和行***・菰田二一†・Torgny Stigbrand**

SUMMARY

We purified an alkaline phosphatase (AP) from Hep. 2 substrain derived from HeLa cells, by immunoaffinity chromatography using the combination of anti-placental and anti-intestinal enzyme antibodies. The cell extract was applied to a column coupled with anti-intestinal AP monoclonal antibody. The enzyme was eluted, dialyzed and then applied to a column linked to anti-placental AP monoclonal antibody. Although the purified enzyme showed a single catalytically active band on conventional polyacrylamide gel electrophoresis, it was separated into two bands on SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. The N-terminal amino acid sequence up to 17th residue that the AP was an intermediate form of the placental and intestinal isozyme. The treatment of the Hep. 2 cell with phosphatidylinositol-specific phospholipase C stoichiometrically released the two different subunits of AP. These results clearly indicated that Hep. 2 cell can produce a unique AP consisting of the heterodimeric form of placental and intestinal subunits.

Key words: alkaline phosphatase, placental and intestinal isozymes, Hep.2 cell and heterodimer.

はじめに

ヒトアルカリ性ホスファターゼ (AP) はさまざまな組織で正常組織では臓器特異的に、またガン組織などでは異所的に発現されており、アイソザイムとしては少なくとも臓器非特異型 (UAP), 小腸型 (IAP), 胎盤型 (PAP) および胎盤様型 (PAP-like) の4種類に分類されている¹⁾. さらに IAP に関しても成人型と小腸様型 (IAP-like) と称される Kasahara isozyme を含めた胎児型 IAP は構造的に異なるようである²⁾.

PAP は他のアイソザイムと異なり、電気泳動的に多型性を示し、数多くの表現型が知られている. おももの SS, FF, II, SF, SI および FI 型の6種があり、

SI や FI 型については SS や FF 型と II 型との間のヘテロダイマーの可能性が考えられている³⁾.

一方, PAP および IAP からなるヘテロダイマーの存在は、株化された細胞、たとえば KB 細胞⁴⁾や FL 細胞⁵⁾の産生する AP について報告されている. しかし、これらの報告では PAP および IAP に対するポリクロナール抗体を用いた成績として報告されている. 両者 AP の遺伝子の相同性は 86% に達することが、近年知られていることから⁶⁾, 両者の免疫学的交差も考えられ、AP のヘテロダイマーの存在については現在なお、確実な証拠が得られていない.

しかし胃ガン由来の細胞株である HuG 1 細胞は PAP と IAP とのヘテロダイマーとして AP を産生している

Altered form of alkaline phosphatase produced by Hep.2 substrain derived from HeLa cells.

* Iwao Koyama; 埼玉医科大学短期大学臨床検査学科

** Ricardo Makiya, Torgny Stigbrand; Umeå 大学医学部

*** Kazuyuki Hirano; 岐阜薬科大学薬理学教室

† Tsugikazu Komoda; 埼玉医科大学第一生化学教室

Correspondence address: Iwao Koyama, Department of Medical Technology, Saitama Medical School Junior College, Morohongo, Moroyama, Iruma-gun, Saitama 350-04, Japan.

(受付 1992年10月30日, 受理 1992年12月14日)

ことが、精製標品を用いて最近報告された⁷⁾。さらに、Wray と Harris^{8,9)} は子宮頸ガンの上皮細胞株である HeLa 細胞由来の Hep. 2 細胞¹⁰⁾ の AP に対するモノクローナル抗体 (MoAb) を作成し、その抗体が PAP および IAP の両アイソザイムと反応することを見いだしている。これは Hep. 2 細胞の AP が両者からなるヘテロダイマーの存在を示唆するものであるが、彼らは Hep. 2 細胞から AP を精製して、その構造等からの検討は行っていない。

そこで今回、われわれは PAP および IAP に対する MoAb を用いたイムノアフィニティクロマトグラフィーによって、Hep. 2 細胞から AP を部分精製し、その構造上の差異について再評価を行った。

材料および実験方法

1. 培養細胞からの AP 部分精製

Hep. 2 細胞は 10% 胎児牛血清含有 Dulbecco の MEM 培地で培養増殖させた後、先の報告¹¹⁾に従ってホモジネートとし、*n*-ブタノールおよび冷アセトンを用いて、AP 粗抽出液を得た。

この粗抽出液をセファデックス G-200 カラムにのせて溶出された酵素画分に対して、イムノアフィニティクロマトグラフィー¹²⁾を行った。初めに IAP に対する MoAb である 2HIMS-1¹³⁾を固定化したカラムにのせ、得られた結合画分を透析した。次にこれを PAP に対する MoAb である HPMS-1¹³⁾を固定化したカラムにのせ、同様に AP を溶出させた。これを部分精製 AP 標品とした。

2. AP 活性測定および免疫学的同定法

AP 活性測定は先の報告¹²⁾に従って基質に *p*-ニトロフェニルリン酸を用いて行った。標準物質としての PAP は満期分娩胎盤¹²⁾から、成人型 IAP はヒト小腸¹¹⁾から、胎児型 IAP は胎便¹¹⁾から以前に精製したものを使用した。

その他の MoAb として 2HIMS-3¹³⁾をも使用した。2HIMS-1 は成人型および胎児型の両方の IAP と反応するが、2HIMS-3 は成人型 IAP とだけ反応する。一方、PAP に対する MoAb である H₇ と D₁₀ も使用した。H₇ および D₁₀ はおのの PAP の C 末端および N 末端領域にエピトープをもつ^{14,15)}。

抗 IAP あるいは抗 PAP 抗体と反応する Hep. 2 細胞 AP の酵素活性は、先に報告¹⁶⁾したように、抗マウス IgG 抗体をコートしたマイクロプレートを用いて 2HIMS-1 あるいは HPMS-1 を反応させた後、試料を加え、

各抗体に結合した酵素活性を測定した。

また、Hep. 2 細胞 AP と各種 MoAb との免疫反応性の試験は、同様に抗マウス IgG 抗体をコートしたマイクロプレートに各種希釈した MoAb を加えて反応させた後、酵素活性を合わせた精製 AP 標品を加え、各抗体に結合した AP の酵素活性を測定した。

3. AP の電気泳動法

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) 法¹⁷⁾は 15% ゲルを用いて、タンパク染色は銀染色にて行った。通常の PAGE には 7.5% ゲルを使用し、AP 活性染色は基質に 5-ブromo-3-インドリルリン酸 (BIP) を用いて行った¹⁸⁾。

また、Hep. 2 細胞がもつ二つの AP サブユニットを電気泳動的におのおの抽出し¹⁸⁾、ペプチドマップを行った¹⁹⁾。各試料を 0.1% SDS 存在下で V8 protease (10 μ g/ml) で 37°C、1 時間処理した後、SDS-PAGE を行い、各ペプチドバンドを銀染色にて検出した。

4. Con A アフィニティクロマトグラフィー

コンカナバリン A (Con A) に対する親和性は先の方法²⁰⁾に従って Con A-セファロースカラムを使用した。溶出液に 10 および 500 mM の α メチルマンノシドを用いて、AP 標品を 3 画分に分離溶出させた²¹⁾。すなわち、第 1 画分は Con A 非結合画分、第 2 画分は Con A 弱結合画分、第 3 画分は Con A 強結合画分である。

5. 培養細胞からの AP 放出

ホスファチジルイノシトール特異的ホスホリパーゼ C (PI-PLC) の 0.1 U/ml を Hep. 2 細胞 (1×10^6 個) の培養液中に添加した¹⁹⁾。一定時間後、培養上清中の PAP および IAP の測定を前述した免疫学的同定法にて行った。

結 果

1. Hep. 2 細胞 AP の精製

精製の第一段階にゲル濾過法を用いたが、その結果を Fig. 1 上図に示した。さらに酵素活性の認められた試験管番号 40 から 60 については、抗 PAP 抗体 (HPMS-1) および抗 IAP 抗体 (2HIMS-1) と反応する酵素活性も図内に示したが、Hep. 2 細胞が PAP および IAP の両方を発現していることは明らかである。しかし、抗 IAP 抗体と反応する活性ピークは高分子側に、また抗 PAP 抗体と反応する活性ピークは低分子側に存在した。総 AP 活性ピークは各抗体と反応したピークの中央に認められた。そこで、試験管番号 46 から 55 について PAGE を行った結果、Fig. 1 下図に示したように、3 本

Fig. 1. Gel filtration pattern of the crude extract from Hep. 2 cells on Sephadex G-200.

Upper panel: Elution profile of enzyme activities of the AP crude extract. Δ : total activity, $\circ$: activity reacting with the anti-PAP MoAb, and $\bullet$: activity reacting with the anti-IAP MoAb. Bottom panel: Electrophoretic patterns of respective fractions obtained by the gel filtration. The fractions (Nos. 46-55) were run on 7.5% polyacrylamide gel. Active bands were stained with BIP.

の活性バンドが検出された。易動度の早いバンドは高分子側で、易動度の遅いバンドは低分子側で、中央のバンドは分子量的にはその中間位で濃染された。

そこで AP 粗抽出物から抗 PAP 抗体カラムで得られた標品、抗 IAP 抗体カラムで得られた標品、さらに両抗体カラムを通して得られた標品について PAGE を行った。Fig. 2(A) に示すように、抗 IAP 抗体に結合した分画は、3本の活性バンドのうち、易動度の早いバンドと中央のバンドが、抗 PAP 抗体に結合した分画は易動度の遅いバンドと中央のバンドが検出された。しかし両抗体カラムに結合した分画は、中央のバンドだけが認められた。これらの結果から、易動度の早いバンドは IAP に由来し、易動度の遅いバンドは PAP に、中央のバンドはその両者からなるヘテロダイマーに由来すると考えられた。しかし通常の PAGE における成人型 IAP は PAP よりも易動度は遅いが、この Hep. 2 細胞の

IAP は易動度がより早く、また、結果は示していないが、シアリダーゼ感受性であった。

部分精製した標品について SDS-PAGE を行い、銀染色した結果、この AP は二つのサブユニットからなり、分子量的にはおのおの 63 および 72 kDa であった (Fig. 2(B), lane c). これはおのおの PAP および IAP の分子量²²⁾に相当した。この 63 kDa-サブユニットが 72 kDa-サブユニットの分解産物であるか否かを検討する目的で、各サブユニットを電気泳動的に分離抽出し、V8 protease によるペプチドマップを行った。Fig. 2(B) に示すように、両者の間に同一バンドも認められたが、63 kDa-サブユニットは 72 kDa-サブユニットよりも V8 protease に感受性があり、より低分子のペプチドバンドが検出された (lane d, e).

次に同一 AP 分子に IAP と PAP に対する両抗体が結合するか否かを検討する目的で、まず Hep. 2 細胞 AP を抗 PAP 抗体と反応させ、ゲル濾過法により、高分子となった抗 PAP 抗体結合 AP を調製した。結果は示していないが、この抗体複合物は抗 IAP 抗体とも反応した。このことは同一 AP 分子に両 MoAb が結合することを意味し、ヘテロダイマーとしての存在を示唆するものである。

2. Hep. 2 細胞 AP の N 末端アミノ酸配列

精製 AP 標品の 17 番目までの N 末端アミノ酸配列を決定した。PAP²³⁾ と IAP²⁴⁾ とは 1, 4, 10 および 15 番目のアミノ酸が異なるが、Hep. 2 細胞 AP は 1, 4 および 10 番目で、その両方のアミノ酸が含有比として 5:5 もしくは 6:4 で検出された (Table 1). PAP の 15 番目のアミノ酸は Glu であるが、PAP-like では Gln である⁶⁾。

3. 各種 MoAb との反応性

AP に対する各種 MoAb と Hep. 2 細胞 AP との反応性について検討した。Fig. 3 に示したように、Hep. 2 細胞 AP は成人型 IAP とだけ反応する抗体 (2HIMS-3) とは反応しなかったが、成人型および胎児型 IAP の両方に対する抗体 (2HIMP-1) とは、成人型 IAP と同程度に反応した。一方、抗 PAP MoAb である H₇ および D₁₀ に対しては、満期分娩胎盤で認められる PAP に比べて、低い反応性を示した。H₇ と D₁₀ は異なるエピトープをもつので^{14,15)}、これらの MoAb との反応性の相違は、Hep. 2 細胞が産生した AP と満期分娩胎盤が産生した PAP との構造上の相違を意味するのかも知れない。

さらに結果には示していないが、Hep. 2 細胞 AP は

Fig. 2. Electrophoretic patterns of APs from Hep. 2 cells.
(A) Zymograms of APs from Hep. 2 cell. Lane a: the crude extract, lane b: the AP bound to the anti-IAP MoAb column, lane c: the AP bound to the anti-PAP MoAb column, and lane d: the AP bound to both anti-IAP and anti-PLAP MoAb columns. APs were run on 7.5% polyacrylamide gel. Active bands were stained with BIP.
(B) Peptide maps of the two subunits isolated from the purified AP. The two subunits of the purified AP were isolated by preparative electrophoresis, then digested with V8 protease in the presence of SDS, and run on 15% polyacrylamide gel in the presence of SDS. Peptides were detected by silver-staining. Lane a: marker proteins for molecular weight determination, lane b: V8 protease used for digestion, lane c: the purified AP, lane d: 63 kDa-subunit, and lane e: 74 kDa-subunit.

Table 1. N-Terminal amino acid sequence of PAP, IAP and AP from Hep. 2 cells.

Source	Sequence														
PAP*	1	5	10	15											
IAP**	Val	Ile	Pro	Ala	Glu	Glu	Glu	Asn	Pro	Ala	Phe	Trp	Asn	Arg	Gln
Hep. 2	Ile	Val	Ile	Pro	Val	Glu	Glu	Glu	Asn	Pro	Ala	Phe	Trp	Asn	Arg

* J Biol Chem 1986; 261: 3112, ** Proc Natl Acad Sci 1987; 84: 695.

L-ロイシンに対する感受性²⁵⁾が, PAP および IAP よりも強く, また熱安定性²⁵⁾についても PAP よりも耐熱性であった。

4. Con A に対する親和性

Con A アフィニティクロマトグラフィーにおける PAP と IAP の溶出パターンが明らかに異なることは以前より報告してきた²⁶⁾。そこで今回, 得られた Hep. 2 細胞 AP の Con A に対する親和性について検討した。AP 標品を Con A カラムにて 3 分画に分離した後, 抗 IAP および抗 PAP 抗体と反応する AP 活性を測定した (Fig. 4C)。両抗体ともに強結合画分の増加という同一の溶出パターンを示し, Fig. 4A および B に示した

典型的な PAP および IAP とは明らかに異なった。

5. 培養細胞からの AP 遊離

器官培養組織や細胞を PI-PLC 処理することで, AP が容易に遊離するが, IAP は他の AP アイソザイムとは異なった遊離速度を示す²⁷⁾。これは膜での各 AP アイソザイムの結合様式の相違を意味する。そこで Hep. 2 細胞の PI-PLC 処理による AP 遊離速度について検討した。Hep. 2 細胞の培養液中に PI-PLC を添加し, 遊離した AP を抗 PAP および抗 IAP 抗体を用いて測定した。結果は示していないが, 両 AP は PI-PLC により, 同一速度で細胞から有意に遊離された。さらに遊離された AP について PAGE を行くと, Fig. 2 (A)

Fig. 3. Immunoreactivities of the purified AP with different MoAbs against PAP and IAP.

Different concentrations of respective MoAbs were allowed to react in 96-well plates coated with anti-mouse IgG antibodies at 37°C. After rinsing, enzyme activity was adjusted, and the enzyme was added to each well and incubated for 3 h at 37°C. After rinsing, activity was determined using *p*-nitrophenyl-phosphate as the substrate. Each point represents the mean of triplicate. ○: PAP, ●: the purified AP, ▲: adult IAP, △: fetal IAP (IAP-like).

の lane d に示されたものと同様の易動度をもつ 1 本の活性バンドとして検出された。

考 察

HeLa 細胞由来の Hep. 2 細胞株は IAP-like および PAP-like の両アイソザイムを発現し、その両者からなるヘテロダイマーとして AP を産生している可能性が以前より報告されてきた^{8,9)}。今回のわれわれの結果はそのヘテロダイマーの存在を支持するものである。すなわち、われわれは抗 IAP および抗 PAP 抗体を用いたイムノアフィニティクロマトグラフィーにより、両抗体に結合する AP を Hep. 2 細胞から精製し、構造的に再検討を行った。

この AP は SDS-PAGE の結果、分子量的には IAP および PAP に一致する二つのサブユニットからなり、両者のペプチドマップは明らかに異なることから、63 kDa-サブユニットは 72 kDa の分解産物でないと思われた。また、63 kDa-サブユニットは 72 kDa-サブユニットより V8 protease に感受性が高く、PAP は IAP よりも V8 protease 消化を受けやすい²⁸⁾ことから、63

kDa-サブユニットは PAP に、72 kDa-サブユニットは IAP に由来するものと考えられた。

さらに精製した Hep. 2 細胞 AP の 17 番目までのアミノ酸配列は、IAP および PAP の両方からなることが示された。しかし、Hep. 2 細胞 AP の 15 番目のアミノ酸配列は、PAP の Glu とは異なり、PAP-like⁶⁾ と同様の Gln であり、さらに L-ロイシンに対する感受性が IAP および PAP より高いことを考えると、Hep. 2 細胞で産生された PAP は満期分娩胎盤が産生した PAP とは異なり、PAP-like と考えられた。

また、この AP は成人型 IAP とだけ反応する抗体とは反応せず、成人型および胎児型 IAP の両方に反応する抗体とは反応すること、シアリダーゼに感受性があることから、Hep. 2 細胞 AP に含まれる IAP もまた、通常の成人型 IAP ではなく、IAP-like と考えられた。さらに、PAP に対するエピトープの異なる 2 種の MoAb との反応性について検討した結果、Hep. 2 細胞 AP は PAP より低い反応性を示した。これは PAP と Hep. 2 細胞 AP との構造上の相違を示唆するものかも

Fig. 4. Isolation of APs by Con A affinity chromatography.

(a) PAP, (b) IAP, and (c) the purified AP were applied to a Con A column. After the unbound fraction was eluted, two other fraction were eluted with 10 and 500 mM α -methylmannoside as indicated by the arrows. Each tube was assayed for activities reacting with anti-IAP (○) and anti-PAP MoAbs (●), respectively, (the inset (c)).

知れない。

一方、われわれは AP の糖鎖構造のヘテロジニティーに臓器特異性があることを、各種レクチンに対する親和性の相違として報告してきた²⁹⁾。満期分娩胎盤が産生する PAP とガン組織が産生する PAP-like との間にも、また PAP-like でもそれを産生する臓器の違いによって、たとえば正常な肺³⁰⁾や卵巣ガン組織³¹⁾でも糖鎖構造にヘテロジニティーがあるようである。この変化はさまざまな組織における小胞体やゴルジ体に存在するグリコシダーゼやグリコシルトランスフェラーゼの特異的あるいは異所的発現によって左右される³²⁾。したがって正常組織での糖鎖構造の臓器特異性がおおのの臓器で認められる。対して、ガン性変化した臓器や各種疾患での臓器は、病態の進行状況に従って、それに応じた糖鎖構造へと変化するものと思われる。今回の Hep. 2 細胞 AP の Con A カラムからの溶出パターンの結果では、その主成分が強結合画分で、Con A の糖結合特異性²¹⁾から考えると、高マンノース型あるいは混成型糖鎖からなる

ことが考えられる。合成が亢進している糖タンパク糖鎖のプロセッシングから考えれば、ガン組織の産生する AP が高マンノース型あるいは混成型糖鎖であることには矛盾はない。この要因としては、ガン組織特有の関連酵素の発現によるものと思われる。ともかく、Hep. 2 細胞 AP の Con A での結果が抗 IAP と抗 PAP 抗体で測定して同一であったことは、Hep. 2 細胞中 AP の糖鎖は本来の PAP あるいは IAP の糖鎖でなく、Hep. 2 細胞独特の糖鎖を同一分子内に保持していることが考えられる。

さらに PI-PLC 処理による PAP と IAP の遊離速度について検討した結果、両者は同等の速度で遊離され、電気泳動での活性バンドは 1 本であった。もし Hep. 2 細胞の PAP と IAP が別々に局在するならば、PI-PLC 処理によりおのおの AP の遊離速度の違いが明白であると考えられることから、Hep. 2 細胞では本来、その両者からなるガン組織特有のヘテロダイマーとして産生されている可能性が高い。アメリカ NIH の Chou らの未発表結果によると、UAP と PAP、または UAP と IAP とのヘテロダイマーは実験的に形成できないが、IAP と PAP とのヘテロダイマーは形成できるらしい。したがってヘテロダイマー形成には両サブユニットの相溶性が高いものでなければならないのであろう。こうしたヘテロマーに関する研究はガン性変化に関連する AP の発現および翻訳後の修飾および分泌機構等を解明することに今後役立つものと思われる。

Hep. 2 細胞の培養を続けてくださいました Ms. Elisabeth Naslund に感謝いたします。

本研究は Swedish Cancer Research Council (project No. 1387) および Umeå 大学の Lion's Foundation の補助によって行われたものであり、ここに付記して謝意を表する。

文 献

- 1) Stigbrand T. Present status and future trends of human alkaline phosphatases. In: Stigbrand T, Fishman WH, editors. Human alkaline phosphatase. New York: Alan R. Liss Inc., 1984: 3-14.
- 2) Endo T, Higashino K, Hada T, Imanishi M, Muratani K, Kochibe N, Kobata A. Structure of the asparagine-linked oligosaccharides of an alkaline phosphatase, Kasahara isozyme, purified from FL amnion cells. Cancer Res 1990; 50: 1079-84.

- 3) Millán JL, Beckman G, Jeppson A, Stigbrand T. Genetic variants of placental alkaline phosphatase as detected by a monoclonal antibody. *Hum Genet* 1982; 60: 145-9.
- 4) Ludueña MA, Sussman HH. Characterization of KB cell alkaline phosphatase. *J Biol Chem* 1976; 251: 2620-8.
- 5) Behrens CM, Enns CA, Sussman HH. Characterization of human foetal intestinal alkaline phosphatase. *Biochem J* 1983; 211: 553-8.
- 6) Millán JL, Manes T. Seminoma-derived Nagao isozyme is encoded by a germ-cell alkaline phosphatase gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 3024-8.
- 7) Imanishi H, Hada T, Muratani K, Hirano K, Higashino K. Expression of a hybrid form of alkaline phosphatase isoenzyme in a newly established cell line (HuG-1) from a gastric cancer patient. *Cancer Res* 1990; 50: 3408-12.
- 8) Wray LK, Harris H. Demonstration using monoclonal antibodies of interlocus heteromeric isozymes of human alkaline phosphatase. *J Immunol Methods* 1982; 55: 13-8.
- 9) Wray LK, Harris H. Monoclonal antibodies against placental-like and intestinal-like alkaline phosphatases in a malignant human cell line. *Eur J Biochem* 1984; 139: 503-8.
- 10) Benham FJ, Balaban G, Boccelli D, Harris H. Modulation of the expression of alkaline phosphatase genes in a human malignant cell line passaged through nude mice. *Int J Cancer* 1981; 28: 257-64.
- 11) Hirano K, Kusano T, Asai K, Hayashi K, Stigbrand T, Iino S, Millán JL. Evidence for the expression of a primitive intestinal-like alkaline phosphatase in the intestinal 407 cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; 156: 563-9.
- 12) Koyama I, Hirano K, Makiya R, Stindahl U, Stigbrand T. Purification and characterization of the placental-like alkaline phosphatase from ovarian epithelial tumours. *Br J Cancer* 1990; 60 Supl. X: 6-11.
- 13) Hirano K, Matsumoto H, Tanaka T, Iino S, Domar U, Stigbrand T. Specific assays for human alkaline phosphatase isozymes. *Clin Chim Acta* 1987; 166: 265-73.
- 14) Jemmerson R, Stigbrand T. Monoclonal antibodies block the trypsin cleavage site on human placental alkaline phosphatase. *FEBS Lett* 1984; 173: 357-9.
- 15) Jemmerson R, Millán JL, Klier G, Fishman WH. Monoclonal antibodies block the bromelain-mediated release of human placental alkaline phosphatase from cultured cancer cells. *FEBS Lett* 1985; 179: 316-20.
- 16) Koyama I, Stindahl U, Stigbrand T. Placental-like alkaline phosphatase from ovary and ascites of a patient with a malignant ovarian tumour. *Clin Chim Acta* 1990; 186: 295-300.
- 17) Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-5.
- 18) Koyama I, Arai Y, Miura M, Matsuzaki H, Sakagishi Y, Komoda T. Similarity of the sugar moiety of human alkaline phosphatases between the kidney cortex and duodenum, or medulla and ileum. *Clin Chim Acta* 1988; 173: 139-46.
- 19) Fujimori-Arai Y, Koyama I, Hirano K, Sakagishi Y, Komoda T. Purification and partial characterization of intestinal-like alkaline phosphatase in rabbit kidney. *Arch Biochem Biophys* 1991; 284: 320-5.
- 20) Koyama I, Sakagishi Y, Komoda T. Different lectin affinities in rat alkaline phosphatase isozymes. *J Chromatogr* 1986; 374: 51-9.
- 21) Cummings RD, Kornfeld S. Fractionation of asparagine-linked oligosaccharide by serial lectin affinity chromatography. *J Biol Chem* 1982; 257: 11235-40.
- 22) 荻田二一, 小山岩雄, 坂岸良克. 腫瘍または胎児型アルカリ性ホスファターゼとその血中出現機構. 蛋白質核酸酵素 1985; 30: 1408-20.
- 23) Millán JL. Molecular cloning and sequence analysis of human placental alkaline phosphatase. *J Biol Chem* 1986; 261: 3112-5.
- 24) Berger J, Granttini E, Hua J-C, Udenfriend S. Cloning and sequencing of human intestinal alkaline phosphatase cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 695-8.
- 25) Fishman WH. Oncotrophoblast gene expression, placental alkaline phosphatase. *Adv Cancer Res* 1987; 48: 1-35.
- 26) Koyama I, Miura M, Matsuzaki H, Sakagishi Y, Komoda T. Sugar-chain heterogeneity of human alkaline phosphatase. Differences between normal and tumour-associated isozymes. *J. Chromatogr* 1987; 413: 65-78.
- 27) 荻田二一, 坂岸良克. アルカリ性ホスファターゼ研究の進歩. 生物物理化学 1989; 33: 9-15.
- 28) McKenna MJ, Hamilton TA, Sussman HH. Comparison of human alkaline phosphatase isoenzymes. *Biochem J* 1979; 181: 67-73.
- 29) 小山岩雄, 荻田二一. レクチンレクチンアフィニティクロマトグラフィーの有用性. 医学のあゆみ 1987; 142: 453-6.
- 30) 小山岩雄, 荻田二一, Stigbrand T. ヒト胎盤型アルカリ性ホスファターゼの糖鎖構造のヘテロジェニティー. 埼玉医大短大紀要 1991; 1: 25-33.

- 31) Koyama I, Hirano K, Stindahl U, Stigbrand T. Glycosylation properties of the placental-like alkaline phosphatases synthesized in ovarian epithelial tumours. 1992; Submitted.
- 32) Kornfeld R, Kornfeld S. Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Ann Rev Biochem* 1985; 54: 631-64.

要 旨

HeLa 細胞由来の Hep. 2 細胞株からアルカリ性ホスファターゼ (AP) を、胎盤型あるいは小腸型 AP に対する二つのモノクローナル抗体を用いたイムノアフィニティクロマトグラフィーによって精製した。すなわち、細胞粗抽出液をまず抗小腸 AP 抗体カラムにのせ、溶

出された AP を次に抗胎盤 AP カラムにのせて精製した。得られた AP は SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動では二つのサブユニットからなり、通常のポリアクリルアミドゲル電気泳動では 1 本の活性バンドが認められた。17 番目までのアミノ酸配列は、Hep. 2 細胞 AP は胎盤型および小腸型 AP の中間型であった。さらに Hep. 2 細胞にホスファチジルイノシトール特異的ホスホリパーゼ C 処理を行うと、抗胎盤型および抗小腸型 AP 抗体と反応する AP が等量遊離された。これらの結果から、Hep. 2 細胞は胎盤型および小腸型 AP からなるヘテロダイマーとして AP を産生していることが考えられた。