

博士（医学）神尾公一

学位論文題名

ラット腎から分画した糖脂質硫酸転移酵素の性状とヒト癌における本酵素の関連

学位論文内容の要旨

I. 研究目的

糖鎖に硫酸基を結合する硫酸化糖脂質のうち最も代表的なガラクトシルセラミド3-硫酸(GalCer硫酸)は、特定の凝固因子や基底膜蛋白質と特異的に接着したり多機能プロテアーゼを活性化するなどその生理機能が注目されている。GalCer硫酸はGalCerを基質にPAPS(活性硫酸)から硫酸の転移を触媒するGolgi膜の糖脂質硫酸転移酵素によって合成される。腎細胞癌では本酵素が著しく亢進することが知られている。

本研究はラット腎より分画した糖脂質硫酸転移酵素の性状、なかんずくその基質特異性について、また、種々の臓器癌患者血清について本酵素活性を調べ、癌の病態との関連を調べたものである。

II. 実験方法

1. 糖脂質硫酸転移酵素の分画

ラット腎から蔗糖密度勾配超遠心を含む方法によってGolgiに富む画分を得、これを界面活性剤で可溶化した。可溶画分をDEAE-セルロースカラム、アビシン-セファロースカラムで分画し、このものについて性状を調べた。

2. 糖脂質硫酸転移酵素の活性測定法

反応液は基質糖脂質(GalCer、ラクトシルセラミド(LacCer)、ガラクトシルスフィンゴシン(GalSph)または、 $\omega$ -アミノ脂肪酸で置換したGalCer)、[ $^{35}$ S] PA PS、酵素蛋白及び、種々のコファクターを含む。反応後、DEAE A-25セファデックスカラム又は逆相カラムによって反応産物を単離し、 $^{35}$ Sを計測した。

### 3. 酵素の異同を調べるための競合試験

複数の硫酸化糖脂質の合成に働く硫酸転移酵素の異同を知るため、2つの基質の比を変えて、一定の終濃度とした混合基質について酵素反応を行ない、混合産物の生成量を測定した。酵素動力学論から、別々の酵素が2つの基質aとbに働く時の総反応速度v(t)は、 $v(t)=V_a, \text{max}/(1+K_a/[a])+V_b, \text{max}/(1+K_b/[b])$ 、同一酵素が異なる基質の硫酸化を触媒する時は、 $v(t)=V_a, \text{max}/\{1+K_a(1+[b]/K_b)/[a]\}+V_b, \text{max}/\{1+K_b(1+[a]/K_a)/[b]\}$ で示される。なお、 $K_a$ と $K_b$ は基質aとbの $K_m$ 、 $V_a, \text{max}$ と $V_b, \text{max}$ はそれぞれの $V_{\text{max}}$ を示す。

### 4. $\omega$ -アミノ脂肪酸を含むGalCerの合成

基質特異性を調べるために非天然の糖脂質を合成した。即ち、 $\omega$ -アミノカプロン酸と $\omega$ -アミノドデカン酸をそれぞれN-トリフルオロアセチル(TFAc)化 $\omega$ -アミノ脂肪酸に変え、GalCerから得たリゾ体(GalSph)と反応させた。この反応産物からTFAc基を解離して、各々 $\omega$ -アミノ脂肪酸結合GalCerを化学合成した。得られた生成物はNMRと薄層クロマトで確認した。この反応産物をセファロースゲルとカップリングさせたものも調製した。

## III. 結果

### 1. ラット腎から分画した糖脂質硫酸転移酵素の性状

部分精製酵素のGalCerに対する $K_m$ と $V_{\text{max}}$ はそれぞれ $26\sim54\mu\text{M}$ 、 $962\sim1563\text{pmol/mg}$ 蛋白であり、LacCerに関しては $K_m$ は $156\mu\text{M}$ 、 $V_{\text{max}}$ は $833\text{pmol/mg}$ 蛋白

であった。本酵素の基質特異性を天然糖脂質と人工糖脂質について調べた。本酵素は $\alpha$ -ヒドロキシ酸を含む GalCerを最良の基質とするが、グルコシルセラミド、アシアロGM<sub>2</sub>及びSM<sub>2</sub>の硫酸化は認められなかった。他方、人工基質として $\omega$ -アミノ脂肪酸を含むGalCerはアシル基を欠いた GalSphより優れた基質になる事が分った。人工糖脂質を結合したゲルにも有意な硫酸の取り込みが見られ、従って、このゲルは本酵素の精製にとって有効であることが示唆された。

## 2. 糖脂質硫酸転移酵素の異同

ラット腎酵素を用いた GalCerと LacCer、及びGalCerと GalSphの基質競合試験の結果、3者は同一の酵素により硫酸化される事が分った。ヒト腎細胞癌株でも GalCerと LacCerには同一の硫酸転移酵素が働く事が示された。

## 3. ヒト悪性腫瘍における糖脂質硫酸転移酵素レベル

Wilms腫瘍組織では本酵素活性が検出されず、腎癌でも組織型により本酵素レベルは全く異なる事が分かった。

種々の臓器癌患者の血清について本酵素活性を調べたところ、肝細胞癌で高い症例が多く、その亢進は $\alpha$ -フェトプロテイン値と無関係で、また肝炎や肝硬変とも関連しなかった。

肝細胞癌患者血清中の本酵素活性の亢進にも拘らず、肝癌組織での亢進はなかった。

## IV. 考察

基質競合試験によって同じ酵素が異なる糖脂質を硫酸化することが示され、本酵素の基質特異性はかなり広いことが分かった。本酵素はGalSphにも働くが、ガラクトースやラクトースを硫酸化しないことから、基質として、分子中に $\beta$ -ガラクトース結合と少なくとも一本の炭化水素鎖(スフィンゴシン)を有することが必要である。

腎細胞癌の場合と異なり、肝癌患者では血清中の本酵素が高いにも拘らず、肝癌組織での亢進はなかった。その理由は分からぬが、肝癌はある液性因子を産生し、それが他組織の酵素を誘導する可能性が考えられる。

## 学位論文審査の要旨

主査教授 牧田 章

副査教授 西 信三

副査教授 石橋 輝雄

### 学位論文題名

ラット腎から分画した糖脂質硫酸転移酵素の性状と  
ヒト癌における本酵素の関連

硫酸化糖脂質の一つ、ガラクトシルセラミド-3-硫酸(GalCer 硫酸)は凝固因子や基底膜蛋白質と特異的に接着したり、多機能プロテアーゼを活性化するなど、その生理的機能が知られてきている。GalCer 硫酸は GalCer を基質に、活性硫酸(PAPS)から硫酸を転移する Golgi 膜の硫酸転移酵素によって合成される。本研究はラット腎から分画した糖脂質硫酸転移酵素の性状、ながんづくその基質特異性について、また、種々の臓器癌患者血清について本酵素を調べ、癌の病態との関連を追究したものである。

ラット腎から庶糖密度勾配法によって得た Golgi に富む画分を界面活性剤で可溶化し、DEAE およびアビジンをリガンドとするカラムクロマによって分画した酵素標品について以下の知見を得た。本酵素は  $\alpha$ -ヒドロキシ酸を含む GalCer を最良の基質とするがグルコジルセラミド、アシアロガングリオシド GM2(GA2)あるいは SM2 の硫酸化には働くなかった。従って、これらガングリオ系硫酸化糖脂質の合成は別の経路によるかまたは、別の硫酸転移酵素が働くとみられる。化学合成によって得た GalCer の脂肪酸  $\omega$  位にアミノ基を有する人工糖脂質も本酵素のよい基質となることが分かった。本酵素は、GalCer から脂肪酸を解離したガラクトシルスフィンゴシン(GalSph)をも硫酸化したが、

同一酵素が複数の糖脂質を基質とするのかそれとも、複数の糖脂質硫酸転移酵素が働くのか明確でない。そこで酵素キネティクスによる競合試験を行った。その結果、GalCer、GalSph およびラクトシルセラミドには同一の硫酸転移酵素が働くことが分かった。ガラクトースやラクトースは本酵素の基質とはなり得なかったので、本酵素の基質は  $\beta$ -結合したガラクトースと、少なくとも一本の炭化水素鎖を有することが必須である。

他方、腎細胞癌組織は本酵素の亢進により硫酸化糖脂質が蓄積することが知られており、本症の患者血清でも酵素活性が高い症例の多いことが知られている。腎のもう一つの悪性腫瘍である Wilms 腫瘍組織について本酵素を調べたところ、活性はほとんど検出できなかった。従って腎の悪性腫瘍は組織タイプによって本酵素のレベルは相反することが示された。種々の臓器癌(14種類)の患者血清について本酵素を測定したところ、肝細胞癌で高値を示す例が多くそのレベルは腎細胞癌患者を上まわっていた。本酵素の亢進と  $\alpha$  フェトプロテインとの相関はなく、 $\alpha$  フェトプロテイン陰性の患者でも高値を示した。しかしながら、肝癌組織では正常対照と同様、本酵素活性は極めて低かった。肝癌患者血清での高値の理由は分からぬが、肝癌に起因するある種の液性因子が他組織に働いて本酵素を誘導する可能性がある。

口頭発表に当たり、西 教授、石橋 教授より、糖脂質硫酸転移酵素の基質として用いた人工糖脂質は、本酵素のアフィニティクロマトのリガンドとなり得るか否か、肝癌患者において原発巣以外の組織では本酵素の活性はどうか、糖脂質の硫酸化には同一の酵素が働く機序を基質の競合試験でのみ調べているが、他の機序は考慮しなくてよいのか等の御質問があった。申請者は概ね適切な回答を行ったが、基質競合以外の機序の可能性については適切な回答がなされず、後日、石橋 教授の御指導を受けた。西 教授と石橋 教授により個別に審査をいただき合格と判定された。本研究は糖脂質硫酸転移酵素の性状とヒト癌との関連について知見を加えたものであり、学位論文としての価値を認めた。