

ヒト胃粘膜ガラクトース 転移酵素活性の研究

第一編

オボムコイドを基質とした 測定法の基礎的検討

岡山大学第一内科学教室（主任：長島秀夫教授）

香 川 俊 介

（昭和62年1月26日受稿）

Key word : human gastric mucosa
glycoprotein
UDP-galactosyltransferase
ovomucoid
N-acetylglucosamine

はじめに

胃粘膜糖蛋白質は、胃被蓋上皮より分泌され胃粘膜面に非攪拌層を形成し、物理的、化学的刺激より胃粘膜を保護しており¹⁾、その合成過程の最終段階で、胃被蓋上皮細胞のゴルジ装置に存在する一連の糖転移酵素群により糖を付加され完成する。この糖鎖は、胃粘膜防御因子の一つとして重要な機能を有していると考えられる²⁾。胃粘膜糖蛋白質の合成の制御機構は十分に解明されてはいないが、胃粘膜糖蛋白質は活発に生合成されると同時に常に酸、ペプシン等の攻撃因子による消化、分解を受けているものと考えられる。

従来、防御因子に影響する糖鎖構造として、ムチン型糖鎖のみが議論されて来たが、胃粘膜表面でムチン型以外の分泌糖蛋白質、および被蓋上皮表面の糖蛋白質のアスパラギン結合糖質も胃粘膜の防御、保持にかかわっている可能性がある。事実 Strous 等³⁾はラット胃粘膜内に少なくとも2種類のガラクトース転移酵素（以

下、UDP-Gal-T と略す）の存在する事を報告している。すなわちO-グリコシド結合糖鎖（ムチン型糖鎖）のみを持つアジアロ羊顎下腺ムチンを基質とする UDP-Gal-T と、N-グリコシド糖鎖（アスパラギン結合糖鎖）のみを持つオボムコイドを基質とする UDP-Gal-T である。

今回著者は、Strous³⁾らの方法を参考にヒト胃粘膜 UDP-Gal-T 活性測定法の基礎的検討を行った。活性測定基質として N-グリコシド結合糖鎖のみを持ちムチン型糖鎖を欠く、オボムコイドを用いた。

対象及び方法

1) 材料

以下のものを用いた。

UDP-[³H]-galactose (New England Nuclear), UDP-galactose, Type III -O ovomucoid (Sigma corp), α -galactosidase, β -galactosidase (SEIKAGAKU KOGYO)

2) 対象と方法

(1) 酵素溶液の作製

手術時得られた十二指腸潰瘍症例及び胃癌症例の健丈部を用いた。胃粘膜の処理方法は粘膜を摘出後直ちに氷冷した生理食塩水で洗浄し血液成分を除去した後、メスで剝離し湿重量の40倍0.25 Mのスクロースでホモジナイズし500×g, 10分遠心した後上清を酵素溶液とした。

(2) 酵素活性測定法

ガラクトース転移酵素活性の基質として未処理の Type III オボムコイドを用いた⁵⁾。測定条件の検討は Strous らの条件³⁾を参考にし、岡本の方法に準じ⁴⁾DISK 法で行った。蛋白量は、Lowry 法⁶⁾で測定した。

結 果

1) UDP-Gal-T 活性測定の至適条件

(1) オボムコイド量と UDP-Gal-T 活性.

UDP-Gal-T 活性は、反応溶液中オボムコイド 6.6mg protein/ml までは基質量に依存したが、それ以上では一定となった。(Fig. 1) 従って以下の標準測定法ではオボムコイド濃度 9.9mg protein/ml を用いた。

(2) 非標識 UDP-ガラクトース濃度と UDP-Gal-T 活性.

酵素活性は反応溶液中の UDP-ガラクトー

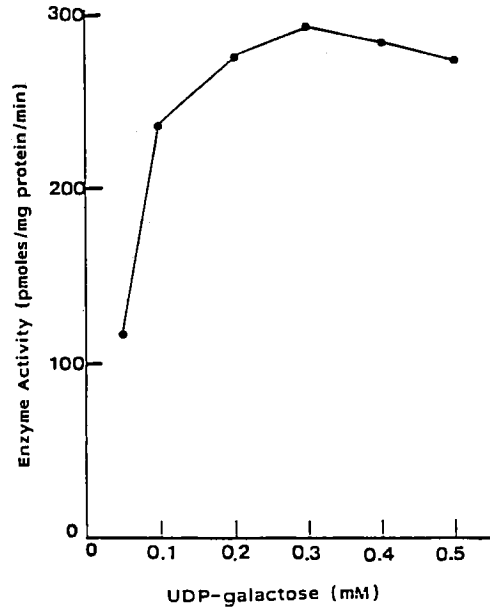


Fig. 2 Dependency of the UDP-galactosyltransferase activity on the galactose concentration.

ス濃度に依存した。0.3 mM で最も高い測定値となり、それ以上では軽い抑制が認められた。以下、標準測定では0.3 mM の UDP-ガラクトースを用いた。(Fig. 2)。

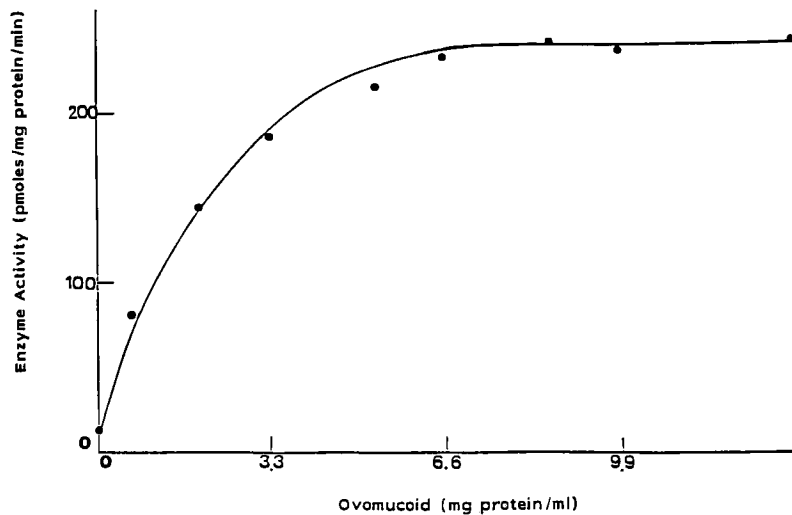


Fig. 1 Dependency of the UDP-galactosyltransferase activity on the ovomucoid concentration. UDP-galactosyltransferase was determined in the standard assay procedure. Ovomucoid was changed from 0 to 6.6 mg protein/ml.

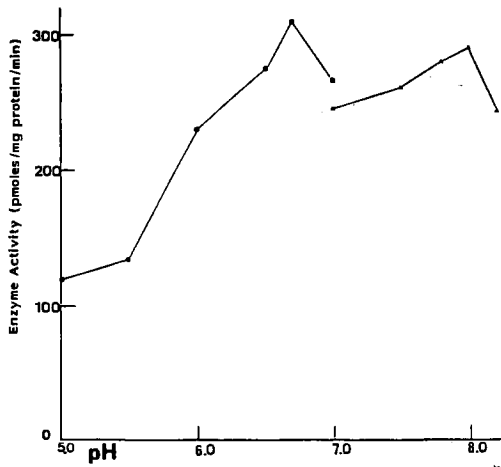


Fig. 3 pH dependency of the UDP-galactosyl-transferase activity. ● ; MES buffer, ▲ ; Tris-HCl buffer.

(3) pH の UDP-Gal-T 活性に与える影響.

pH 5.0-7.0 までを 50 mM MES 緩衝液で, また, pH 7.0-8.2 までを 50 mM Tris-HCl 緩衝液で, 検討した. 50 mM MES 緩衝液 pH 6.8 で最も高い活性が得られた (Fig. 3). 更に Tris-HCl 緩衝液 pH 8.0 にもうひとつのピークを認めた. 以下, 標準測定法では 50 mM

MES 緩衝液 pH 6.8 を用いた.

(4) MnCl_2 , Triton X-100, 2-Mercaptoethanol の UDP-Gal-T 活性に及ぼす影響.

Mn^{2+} 濃度は, 15 mM から 20 mM で UDP-Gal-T 活性は, プラトーを形成した (Fig. 4 (a)). 本酵素活性の発現には Mn^{2+} が必須であった. 標準測定法では, 15 mM を用いた. 反応溶液中に表面活性剤 Triton X-100 を加えることにより UDP-Gal-T 活性の上昇が認められた (Fig. 4 (b)). Triton X-100 濃度 1.5 mg/ml では無添加時に比べ, 酵素活性は約 160% 上昇した. また 2-Mercaptoethanol 非添加時酵素活性は, 85% に低下した.

(5) 反応時間, 酵素溶液蛋白量.

酵素活性は反応時間 90 分まで, また酵素溶液蛋白量は 20 μg から 100 μg まで直線状に上昇した (Fig. 5). 胃粘膜湿重量 5 mg 以上で酵素活性測定が可能であった.

以上の結果よりオボムコイドを基質とした UDP-Gal-T 活性の標準測定法として以下の条件が適当と考えられた.

30 μl の 50 mM MES buffer pH 6.8 中に, 5 mM, 2-mercaptoethanol, 15 mM MnCl_2 , 9.9 mg

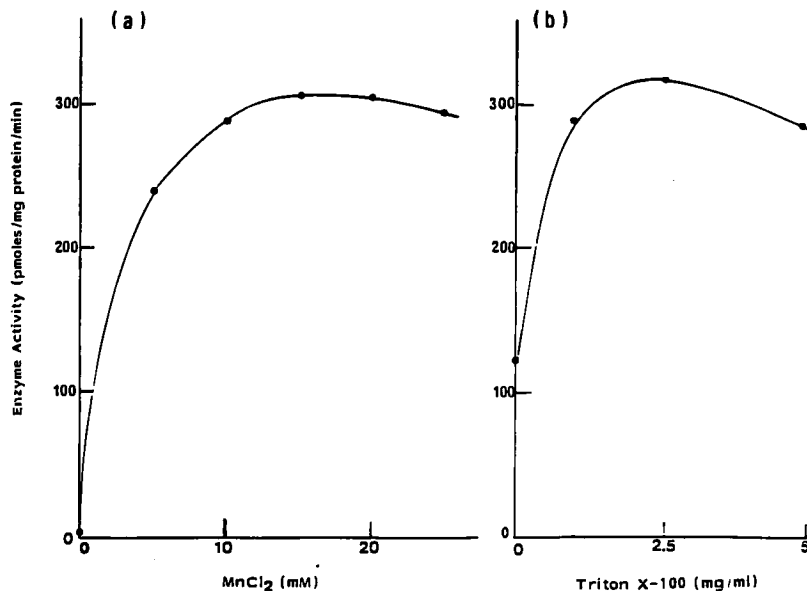


Fig. 4 Dependency of the UDP-galactosyltransferase activity on the Mn^{2+} concentration (a) and Triton X-100 concentration (b).

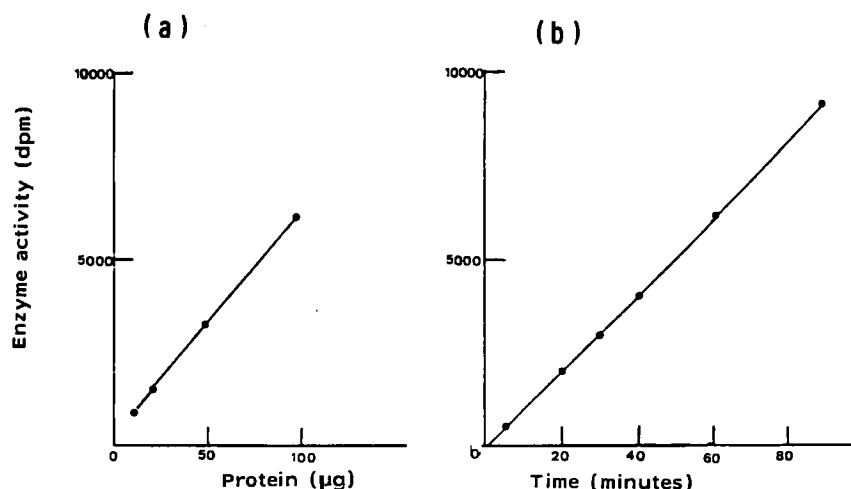


Fig. 5 Dependency of the UDP-galactosyltransferase activity on the amount of the enzyme protein(a) and the incubation time(b).

0.05M MES Buffer pH6.8
 5mM 2-Mercaptoethanol
 15mM MnCl₂
 1.5mg/ml Triton X-100
 0.3mM UDP-galactose
 1.7μCi/ml UDP-[³H]-galactose
 9.9mg protein/ml ovomucoid
 enzyme solution 20μl
 (final volume=50μl)

↓

incubate at 37°C for 20min
 ← 1ml of ice-cold 1%PTA in 0.5N HCl

↓

filter through paper filter

↓

wash with 5ml of 5%TCA

↓

dry

↓

count in 6ml ACSII

Fig. 6 Standard assay procedure of the UDP-galactosyltransferase.

/ml ovomucoid, 0.3 mM UDP-galactose, 1.7 μCi/ml UDP-[³H]-galactose, 1.5mg /ml Triton X-100 を含む基質溶液に20 μl の酵素溶液を加え総量50 μl とし37°C 20分よく振盪しながら反応させた。その後、直ちに氷冷した0.5規定塩酸中1%リンタングステン酸1mlを加え反応を停止させると同時に基質のオボムコイドを不溶化した。それを、Whatmann GF/B (直径2.4cm)

で濾紙上にアプライし、オボムコイドを5%トリクロル酢酸で吸引下に洗浄した後、濾紙を赤外線乾燥させ、濾紙上の放射活性を乳化シンチレーター ACS II 6 ml 中で測定した (Fig. 6)。

2) 反応産物の検討

(1) オボムコイドとガラクトースの結合の証明

オボムコイド、UDP-[³H] ガラクトースを基質とし、ヒト胃粘膜ホモジネートを酵素溶液として酵素反応を行わせた後、反応を停止し反応溶液を透析した。透析後 SDS-ポリアクリリミド電気泳動を行い更にフルオログラフィーを行ったものをレーン c) に示す。レーン a), b) におおの、a) オボムコイド、b) UDP-[³H] ガラクトースを欠く反応溶液のクマシーブルー染色を示す。反応産物中の放射活性はすべて分子量28,000ダルトンのオボムコイドに一致していた (Fig. 7)。

(2) オボムコイドとガラクトースの結合様式。

上記と同様の酵素反応産物を Sephadex G-50 column chromatography で分離するとオボムコイド結合分画がボイド分画に流出された (Fig. 8-a)。この分画を無処理あるいは、α-ガラクトシダーゼ処理⁷⁾、あるいは、β-ガラクトシダーゼ処理⁸⁾後再び同一のカラムに負荷したところ、無処理、またはα-ガラクトシダー

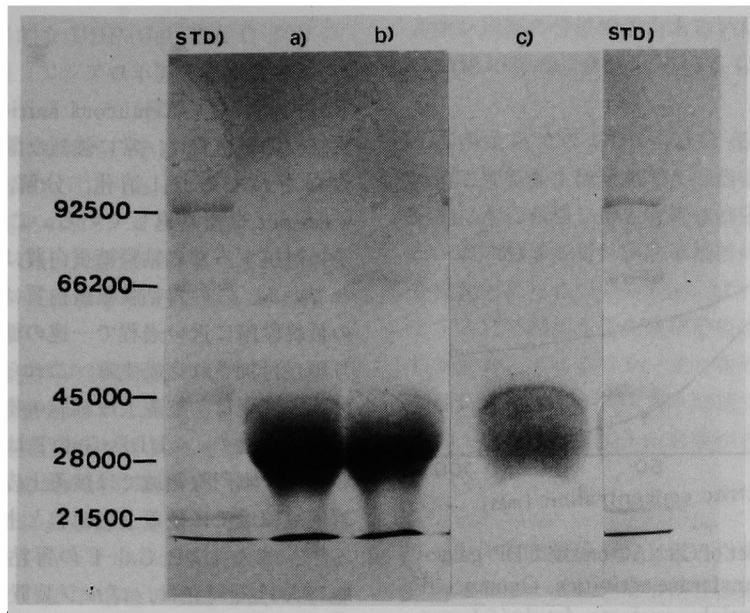


Fig. 7 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the reaction products. [^3H]-labelled reaction products were dialyzed and subjected to the electrophoresis.

STD) ; molecular weight standard

lane a) ; same amount of ovomucoid

lane b) ; reaction mixture without [^3H]-labelled galactose

lane c) ; fluorography of the reaction mixture

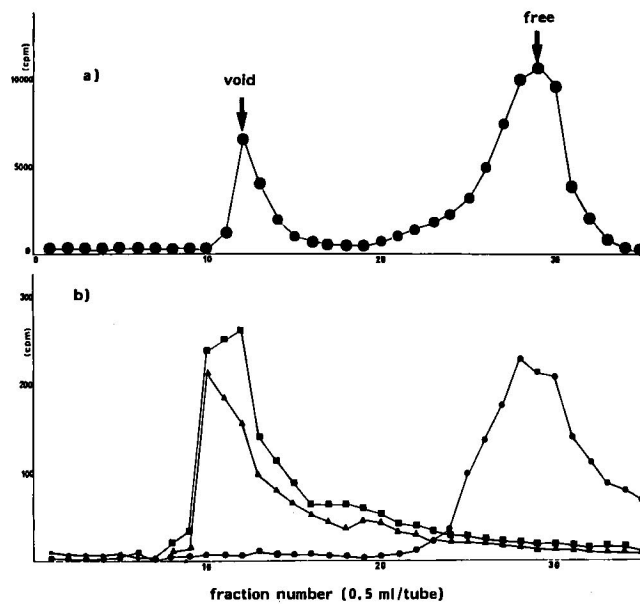


Fig. 8 Sephadex G-50 column chromatography of the reaction mixture. a) ; original reaction mixture. b) ; The void fraction of a) was reappplied on the same column after the β -galactosidase digestion (●), the α -galactosidase digestion (▲), or without treatment (■).

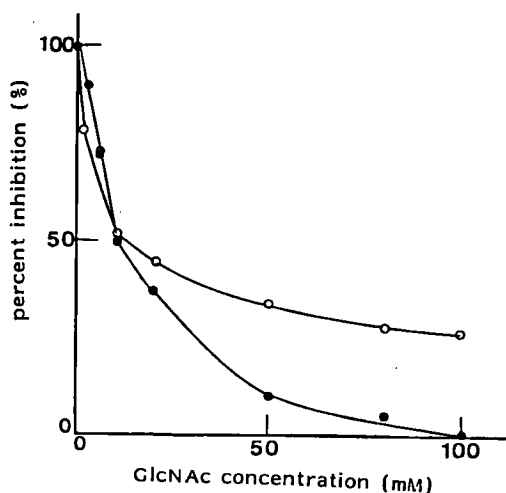


Fig. 9 The effect of GlcNAc on the UDP-galactosyltransferase activities. Ovomucoid (●) or asialo- α -galacto-fetuin (○) was used as substrate.

N-acetylglucosamine in the range of 0 to 100 mM was added to the standard assay mixture. Enzyme activity in the absence of GlcNAc was supposed to 100 % activity for each substrate.

ゼ処理の場合放射活性はボイド分画に排出されたが、 β -ガラクトシターゼ処理を行うと放射活性はすべて遊離の [3 H]-ガラクトースとして回収し得た (Fig. 8-b).

3) N-アセチルグリコサミンによる UDP-Gal-T 活性阻害 (Fig. 9).

標準 UDP-Gal-T 活性測定による酵素活性を100%とした。反応溶液中に遊離の GlcNAc を加えるとアシアロアガラクトフェツインを基質とした系では GlcNAc 100 mM で約70%酵素活性が抑制されたが、オボムコイドを基質とした系では100%抑制された。

4) 酵素活性の安定性.

無処理胃粘膜ホモジェネート上清を -70°C 2週間保存し酵素活性の変化を検討した。無処理のまま保存した場合酵素活性の低下は見られなかった。上清で保存すると5%の活性低下がみられた。上清を凍結と解凍を繰り返すたび一回毎に約10%の活性が失われた。

考 案

胃内腔において mucous harrier を形成する胃粘膜糖蛋白質は、常に強烈な酸、ペプシンにさらされており、消化、分解、運動による wash out を繰り返している。これらの攻撃因子に対抗するため粘膜糖蛋白質は活発に合成されている。この胃粘膜糖蛋白質は、その生合成の最終段階に近い過程で一連の糖転移酵素により糖が付加され完成する。これら一連の糖転移酵素の発現は、被蓋上皮細胞の指標酵素と考えられている⁹⁾。UDP-Gal-T は、ヒト胃においては、幽門腺領域では被蓋上皮細胞に、また胃底腺領域では被蓋上皮細胞と主細胞に存在する¹⁰⁾。また UDP-Gal-T の胃粘膜被蓋上皮細胞における局在は、ゴルジ装置にあることがラットで証明されている¹¹⁾。

今回、著者は、オボムコイドを基質としてヒト胃粘膜 UDP-Gal-T 活性の測定を試み、その測定条件の標準化を行った。オボムコイドは、分子量28,000のアスパラギン結合糖蛋白質で、UDP-Gal-T の基質となる N-アセチルグルコサミンを末端に有しており¹²⁾、基質として前処置無しで十分活性を持ち、アシアロアガラクトフェツインやアシアロ顎下腺ムチンと異なり一定の基質を得られる利点もあると考えられた。

酵素活性はマンガン存在下で活性化され、更に表面活性剤 Triton X-100, 2-mercaptoethanol により活性の上昇が認められた。主な結合産物は、オボムコイド末端の N-アセチルグルコサミンに β 結合した [3 H]-ガラクトースとオボムコイドであり、内因性アクセプターの影響はほとんど認めなかった。

従来ヒト胃粘膜 UDP-Gal-T 活性測定は測定基質として O-グリコシド結合糖鎖と N-グリコシド結合糖鎖を合わせ持つアシアロアガラクトフェツイン (以下 ASF と略す) を用いて行われて来た⁴⁾。しかし、基質特異性においてヒト血清¹³⁾、肺癌¹⁴⁾、大腸癌¹⁵⁾ の UDP-Gal-T は単一の酵素ではないことが解ってきた。また、Strous³⁾らによりラット胃粘膜においても N-グリコシド結合型糖鎖 (オボム

コイド)に特異的な UDP-Gal-T と O-グリコシド結合型糖鎖 (アシアロ羊顎下腺ムチン) に特異的な UDP-Gal-T の二種類の酵素が存在する事が明らかになった。そしてヒト胃粘膜にも同様に二種類の UDP-Gal-T が存在する事が考えられ、従来の ASF を用いて得られたヒト胃粘膜 UDP-Gal-T 測定の結果⁴⁾は、二種類の UDP-Gal-T の総和を測定したものであったと考えられる。

従って、胃粘膜中の防御因子としての糖鎖の役割もムチン型糖鎖とアスパラギン結合 N-グリコシド結合型糖鎖及びそれらの酵素活性を別々に測定する必要がある。

今回の研究では、基質として N-グリコシド結合型糖鎖のみを持つオボムコイドを用いてヒト胃粘膜 UDP-Gal-T 活性の測定を試み高い活性を得た。測定した酵素が O-グリコシド結合型糖鎖を基質とするものかどうか明らかではない。しかし、N-アセチルグルコサミンによる UDP-Gal-T 活性阻害が、オボムコイドを基質とした場合と ASF を基質とした場合では異なる事 (Fig. 9) が判明した。この事実は、おそらく今回測定した酵素は、N-グリコシド結合型糖鎖の N-アセチルグルコサミン残基にガラクトースが結合する作用を有するもので、いわゆるムチン型の N-アセチルガラクトサミン残基にガラクトースが結合するものと異なる事実を示していると考えられる。

胃粘膜糖蛋白の主成分であるムチンの糖鎖は、ガラクトース、N-アセチルガラクトサミン、N アセチルグルコサミン、フコース、シアル酸から成りマンノースを含まずムチン型糖鎖のみよりなっている³⁾。そして、ヒト胃粘膜ムチンはムチン型糖鎖のみを有している。¹⁷⁾ 従って今回測定した酵素は、胃粘膜ムチンの糖鎖合成自体に係わっているとは考え難い。おそらく

ムチン以外の分泌糖蛋白あるいは細胞膜糖蛋白の糖鎖の合成に係わっているものと考えられる。

本測定系での UDP-Gal-T 活性測定は、内視鏡下胃粘膜生検組織で十分測定可能であり臨床的に十分利用し得る有用な測定法と考えられた。この酵素が胃粘膜防御機構の上でどのような役割を果たしているのか、また胃潰瘍を初めとする胃粘膜病変発生及び治癒過程にどのようなにかかわっているのか、また薬剤投与によりどのように変動するか興味ある問題であり、今後さらに十分な検討を加える必要が考えられる。

ま と め

- 1) ヒト胃粘膜糖蛋白合成の指標として胃粘膜ガラクトース転移酵素活性測定の基礎的検討をおこなった。
- 2) 測定基質としてオボムコイドを用いた。オボムコイドは、前処置なしで十分活性を持ち、SDS-ポリアクリラミド電気泳動でガラクトースの受容体である事が証明された。
- 3) 反応溶液中のオボムコイド濃度は、6.6mg protein/ml でプラトーに達し 9.9mg protein/ml を用いた。至適 pH は、6.8 であり、強いマンガンイオンの必要性を認めた。
- 4) ガラクトースは、オボムコイド末端の N-アセチルグルコサミンに β 結合していた。

謝 辞

稿をおえるにあたり、御指導ならびに御校閲を賜りました長島秀夫教授に深甚なる謝意を表します。また御指導いただきました友田純博士に深謝いたします。なお本論文の要旨は、第44回消化器病学会中四国地方会、第72回日本消化器病学会総会にて発表した。

文 献

1. Hollander F: The two-component mucusbarrier. Arch Int Med (1954) 93, 107-120.
2. Allen A: Structure and function in gastric mucus. Adv. Exp. Med. Biol (1977) 89, 283-299.
3. Strous G J A M, Hendriks H G, Kramer M F: Role of galactosyl-transferases in rat gastric epithelial glycoprotein synthesis. Biochim Biophys Acta (1980) 613, 381-391.

4. 岡本伸: 胃疾患における胃粘膜内糖蛋白の生合成に関する研究. 日消誌 (1981) **78**, 1713-1719.
5. Tomimatu Y, Clary J J, Bartulovich J J: Physical characterization of ovomucoid, a trypsin and chymotrypsin inhibitor for chicken egg white. Arch Biochem Biophys (1966) **115**, 536-544.
6. Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, Randall R J: Protein measurement with Folin phenol reagent. J Biol Chem (1951) **193**, 265-275.
7. Suzuki H, Li S C, Li Y T: α -galactosidase from *Mortierella vinacea*. J Biol Chem (1970) **245**, 781-786.
8. Kornfeld R, Keller J, Baenziger J, Kornfeld S: The structure of glycopeptide of human γ G myeloma proteins. J Biol Chem (1971) **246**, 3259-3268.
9. 徳永昭: 生化学的にみた消化管の分化の研究. ラット胃体部および小腸粘膜上皮細胞の増殖と成熟分化について. 日消誌 (1975) **72**, 501-513.
10. Pestalozzi D M, Hess M, Berger E G: Immunohistochemical evidence for cell surface and Golgi localization of galactosyltransferase in human stomach, jejunum, liver and pancreas. J Histochem Cytochem (1982) **30** 1146-1152.
11. Poort C: *In situ* localization of galactosyltransferase in surface mucous cells of the rat stomach. J Histochem Cytochem (1977) **25**, 57-60.
12. Yamashita K, Kamerling J P, Kobata, K: Structural study of the carbohydrate moiety of hen ovomucoid. J Biol Chem (1982) **257**, 12809-12814.
13. Berger E G, Kozdrowski I, Weiser M M, Eijiden D M, Schiphorst E C M. Human serum galactosyltransferase: distinction, separation and product identification of two galactosyltransferase activities. Eur J Biochem (1987) **90**, 213-222.
14. Kijimoto-Ochiai S, Makita A, Kameya T, Kodama T, Arai E, Yoneyama, T: Elevation of glycoprotein galactosyltransferase activity in human lung cancer related to histological types. Cancer Res (1981) **41**, 2931-2935.
15. Kim Y S, Issacs R: Glycoprotein metabolism in inflammatory and neoplastic diseases of human colon. Cancer Res (1975) **35**, 2092-2097.
16. Schrager J, Oates M D G: The isolation and partial characterization of glycoprotein isolated from human gastric aspirates and from extracts of gastric mucosae. Biochim Biophys Acta (1977) **372**, 183-195.
17. Oates M D G, Rosbottom AC, Schrager J: Further investigations into the structure of human gastric mucin. The structural configuration of the oligosaccharide chains. Carbohydr Res (1974) **34**, 115-137.

A study on the galactosyltransferase activity of human gastric mucosa**Part 1. Assay conditions with ovomucoid as a substrate.****Shunsuke KAGAWA****The First Department of Internal Medicine,****Okayama University Medical School,****(Director: Prof. H. Nagashima)**

The conditions assaying for UDP-galactosyltransferase in human gastric mucosa was studied. Ovomucoid without any pretreatment was employed as a substrate. The optimal pH was 6.8. Manganese, 2-mercaptoethanol and Triton X-100 were required for maximum enzyme activity. In the standard assay; 20 μ l of enzyme solution was added to 30 μ l of 50 mM MES buffer containing 5 mM 2-mercaptoethanol, 15 mM MnCl_2 , 9.9mg protein/ ml ovomucoid , 0.3 mM UDP-galactose, 1.7 μCi / ml UDP-[^3H]-galactose and 1.5 mg/ ml Triton X-100, and incubation was carried out at 37 $^\circ\text{C}$ for 20 min. [^3H]-labelled ovomucoid was the only radioreactive reaction product detected. All galactose residue incorporated was liberated by β -galactosidase but not by α -galactosidase.