

## モルキオ症候群の酵素診断

藪 内 百 治  
 豊 徹  
 岡 田 伸 太 郎  
 (大阪大学医学部小児科)

モルキオ症候群は、コンドロイチン硫酸やケラタン硫酸が組織中に蓄積されるとともに、尿中への過剰排泄をみる先天代謝異常症である。本症の成因は、Matalon ら<sup>1)</sup>により、コンドロイチン-6-硫酸の分解に必要な N-acetylgalactosamine-6-スルファターゼ活性の低下症であることがみいだされた。この酵素活性の低下により、臨床的には著明な骨形成不全、生化学的には、組織中へのコンドロイチン-6-硫酸の蓄積をきたす事実は容易に理解できる。しかし本症には、前述のようにケラタン硫酸の代謝異常もみとめられるため、ケラタン硫酸の分解に必要な数種の酵素の一次的あるいは二次的な活性低下も伴うはずである。ケラタン硫酸の分解には、その構造から考えて、図1にみるように、 $\beta$ -galactosidase、 $\beta$ -hexosaminidase、Galactose-6-スルファターゼ、N-acetylglucosamine-6-スルファターゼなどの分解酵素の関与が考えられる。このうち  $\beta$ -galactosidase、 $\beta$ -hexosaminidase、N-acetylglucosamine-6-スルファターゼ活性は、モルキオ症候群の皮膚線維芽細胞では、その活性低下をみない点、および患者尿中に過剰に排泄されるケラタン硫酸由来のオリゴ糖の分析結果では、その末端構造として、Galactose-6-硫酸を示すものが多い点から推測して、Galactose-6-スルファターゼ活性の異常を考慮しなければならない。

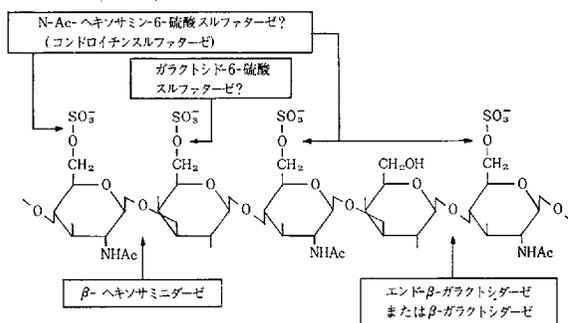


図1 C : ケラタン硫酸の分解酵素系

著者らは、ケラタン硫酸を酵素学的に分解することにより、Galactose-6-硫酸が非還元末端に位置するオリゴ糖 (Gal (6S)-GlcNAc (6S)-Gal) を作製し、モルキオ症候群由来の培養皮膚線維芽細胞中の Galactose-6-スルファターゼ活性測定用の基質としてもちいることにより、

モルキオ症候群の病態を明らかにすべく、以下の研究をおこなった。

## 方 法

### 基質の作製

(1) Galactose-6-スルファターゼ測定用の基質。軟骨由来のケラタン硫酸を、endo- $\beta$ -galactosidase により分解させ [GlcNAc (6S)-Gal (6S)]<sub>n</sub> を基本骨格とする種々のオリゴ糖を得る。Sephadex G-25 のゲル濾過法により、4糖画分を集める。この4糖画分に、ヒト腎臓から精製した N-acetylglucosamine-6-スルファターゼ、ナタ豆由来の  $\beta$ -hexosaminidase を作用させ、ゲル濾過をくりかえすことにより、Gal (6S)-GlcNAc (6S)-Galactose からなる3糖を得る。この還元末端を NaB [<sup>3</sup>H<sub>4</sub>] で還元標識させ、基質としてもちいる。

(2) N-acetylgalactosamine-6-スルファターゼ活性測定用の基質。Glössl らの方法<sup>2)</sup> にしたがって、GalNAc (6S)-GlcUA-GalNAc (6S) を得た。

(3) N-acetylglucosamine-6-スルファターゼ活性測定用の基質。前述のようにケラタン硫酸の endo- $\beta$ -galactosidase 分解物から、GlcNAc (6S)-Galactose からなる2糖を得、還元標識することにより、基質としてもちいた。

### 酵素活性の測定

(1) Galactose-6-スルファターゼ活性：25  $\mu$ l の酵素液 (タンパク量として20~60  $\mu$ g), 1.2 nmol (8,000 dpm) の基質, 7.5  $\mu$ l の 1 M, pH 4.0, Acetate buffer を加え、総量100  $\mu$ l とする。37°C中で、6~8時間反応させ、終了後、反応液を、AG 1 $\times$ 2 (Cl<sup>-</sup>型, 200~400 mesh) のミニカラムにアプライ。反応生成物 (Gal-GlcNAc (6S)-Gal-ol) を0.2 M, NaCl (5ml $\times$ 2) で溶出。シンチレーターを加え、放射能を測定する。

(2) GalNAc-6-スルファターゼ活性：Glössl らの方法に従った<sup>2)</sup>。

(3) GlcNAc-6-スルファターゼ活性：25~30  $\mu$ l の酵素液 (タンパク量として25~60  $\mu$ g), 0.8 nmol の基質 (70,000 dpm), 7.5  $\mu$ l の 1 M, pH 3.5, Acetate buffer を加え、総量100  $\mu$ l とし、37°C中で、15~18時間反応させる。終了後、反応液を AG 1 $\times$ 8 (Cl<sup>-</sup>型, 200~400 mesh) のミニカラムにアプライ。反応生成物 (GlcNAc-Gal-ol) を、5ml $\times$ 2 の蒸留水で溶出させる。

## 結 果

**基質の同定**：生成した、Gal (6S)-GlcNAc (6S)-Gal-ol は、Bio Gel P-2 (2 $\times$ 150 cm) のゲル濾過のパターン、および標準3糖が溶出される位置と一致をみたことから、〔3糖〕と確認できる (図2)。さらに高圧濾紙電気泳動法 (1.6 M Formic Acid, 60V/cm) による分離では、2つのピークが得られたが、標準品の disulfate $\cdot$ trisaccharide と同じ移動度を示したピークを濾紙から抽出し、酵素活性測定用の基質としてもちいることにした (図3)。

**培養皮膚線維芽細胞中の酵素活性**：表1にみるように、モルキオ症候群患者由来の皮膚線維芽細胞中の Galactose-6-スルファターゼおよび N-acetylgalactosamine-6-スルファターゼ活

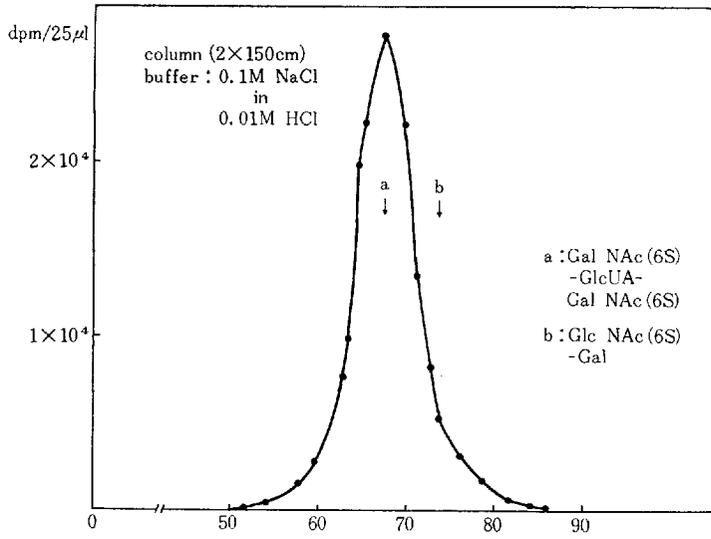


図2 Bio Gel P-2 Chromatography

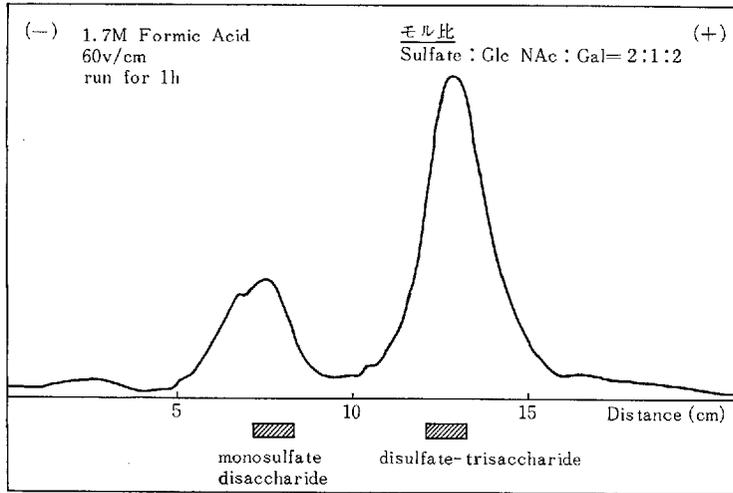


図3 High Voltage Electrophoresis

性は、ともに著明な低下をみた。両親の酵素活性は、正常対照の活性よりも低値を示した。

**Galactose-6-スルファターゼとN-acetyl galactosamine-6-スルファターゼの酵素学的性質の比較**：両酵素の性質を比較するため、ヒト胎盤から硫酸沈澱、コンカナバリリンA-セファローズカラムをもちいて、酵素を部分精製した。その結果、Galactose-6-スルファターゼ、N-acetylgalactosamine-6-スルファターゼとも約60%の回収率で、40倍に純化された酵素を得た。部分精製された両酵素につき、 $[SO_4^{2-}]$ 、 $[PO_4^{3-}]$  および種々の金属イオンに対する阻害効果

表1 Enzyme activities in skin fibroblasts

	Gal NAc- 6-S sulfatase*	Gal-6-S sulfatase**
Morquio Syndrome		
1.	1.04	0.513
2.	0.38	0.449
Heterozygotes		
1.	18.58	20.65
2.	23.54	26.08
3.	15.0	21.42
Control		
1.	25.14	22.13
2.	22.74	48.09
3.	20.70	25.25

\* : n mol/mg protein/h

\*\* : p mol/mg protein/h

を検討した結果、同じような効果が得られた。精製された酵素を 20 mM, pH 7.5 Tris-HCl buffer で平衡化させた DEAE セルロースカラム (bed volume 5 ml) にアプライし、60 ml の 0~0.6 M NaCl の勾配で酵素を溶出させた。Galactose-6-スルファターゼと N-acetylgalactosamine-6-スルファターゼ活性は、2つのピークをしめし、しかもその最大活性をしめす分画の一致をみた。ちなみに N-acetylglucosamine-6-スルファターゼ活性は、両酵素よりも後に溶出された。このカラムから得られた2つのピークの酵素活性の至適 pH は、Galactose-6-スルファターゼ、N-acetylgalactosamine-6-スルファターゼともに pH 4.0と一致をみた。

## 考 按

モルキオ症候群では、コンドロイチン-6-硫酸のみならずケラタン硫酸の代謝にも異常をみとめることから、ケラタン硫酸の分解に必要なスルファターゼー Galactose-6-スルファターゼーの異常は推測されてきた。DiFerrante ら<sup>3)</sup>は、Galactose および N-acetylgalactosamine の C-6 の位置に硫酸基のついた monosulfate-monosaccharide を作製し、モルキオ症候群由来の培養皮膚線維芽細胞中の N-acetylgalactosamine-6-スルファターゼおよび Galactose-6-スルファターゼ活性を測定した結果、両酵素ともに著明な活性低下をみた。しかし Glössl らは<sup>4)</sup>、ヒト胎盤から N-acetylgalactosamine-6-スルファターゼを分離精製し、その基質特異性を検討した結果、この高度に純化されたスルファターゼは、DiFerrante らのもちいた基質 (Galactose-6-硫酸) を全く分解できなかつたと報告しており、Galactose-6-スルファターゼと N-acetylgalactosamine-6-スルファターゼの関係については、一致した見解が得られていない。

われわれの結果では、コンドロイチン-6-硫酸およびケラタン硫酸由来のオリゴ糖を基質としてもちいることにより、モルキオ症候群では両酵素ともに著明な活性低下をみたこと、およ

びヒト胎盤から部分精製された両酵素の種々の物質に対する阻害効果, その活性測定の至適 pH および DEAE セルロースカラムでの溶出態度が一致をみたことから, Galactose-6-スルファターゼと N-acetylgalactosamine-6-スルファターゼは同一の遺伝子に支配されているものと考えられる。患者の両親(保因者)の酵素活性は, 正常対照と患者のレベルの中間値を示さなかったが, 正常対照のそれよりも低値であったことから, 検索例を増加させることにより, 保因者診断も可能になるものとする。

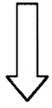
モルキオ症候群は単一の疾患でなく, 臨床的にも, 生化学的にも, heterogeneity の存在が知られており, ケラタン硫酸由来の種々の基質をもちいて, 酵素活性を測定することにより, その病態解明は可能となるであろう。

## ま と め

コンドロイチン-6-硫酸およびケラタン硫酸由来のオリゴ糖を酵素活性測定のための基質として作製し, N-acetylgalactosamine-6-スルファターゼおよび Galactose-6-スルファターゼ活性を測定した結果, モルキオ症候群では両者ともに著明な低下をみとめた。酵素学的性質の比較でも, その性質はよく一致していた。以上の事実から, 両酵素は同じ遺伝子に支配されているものと考えられる。

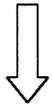
## 文 献

- 1) Matalon, R., Arbogast, B., Justice, P., Brandt, J.K. and Dorfman, A. : Morquio's syndrome : deficiency of a chondroitin sulfate N-acetylhexosamine sulfate sulfatase. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **61** : 759~765, 1974.
- 2) Glössl, J. and Kresse, H. : A sensitive procedure for the diagnosis of N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase deficiency in classical Morquio's disease. *Clin. Chim. Acta*, **88** : 111~119, 1978.
- 3) DiFerrante, N., Ginsberg, L.C., Donnelly, P.V., DiFerrante, D.T. and Caskey, D.T. : Deficiencies of glucosamine-6-sulfate or galactosamine-6-sulfate sulfatase are responsible for different mucopolysaccharidoses. *Science*, **199** : 79~81, 1978.
- 4) Glössl, J., Truppe, W. and Kresse, H. : Purification and properties of N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase from human placenta. *Biochem. J.*, **181** : 37~46, 1979.



## 検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用

論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



### まとめ

コンドロイチン - 6 - 硫酸およびケラタン硫酸由来のオリゴ糖を酵素活性測定のための基質として作製し, N-acetylgalactosamine-6 - スルファターゼおよび Galactose-6 - スルファターゼ活性を測定した結果, モルキオ症候群では両者ともに著明な低下をみとめた。酵素的性質の比較でも, その性質はよく一致していた。以上の事実から, 両酵素は同じ遺伝子に支配されているものと考えられる。