

13・4 Idurono-Sulfatase の性質と酵素診断について

大阪大学医学部

藪 内 百 治
岡 田 伸太郎
豊 徹

ま え が き

Hunter 病は、Iduronate-Sulfatase の欠損により、ムコ多糖体の代謝障害をおこす先天性代謝異常症である。本症はヘパリン由来の Iduronosylsulfate-Anhydromannitol を基質として用いることにより、酵素診断が可能である。また羊水、培養羊水細胞により、出生前診断も可能なことが、Neufeld らにより報告された。本症は他の代謝異常症がそうであるように、軽症型と重症型、ならびに角膜混濁を欠く例、有する例などの亜型の存在が知られているが、その生化学的差違は不明であり、また Iduronate-Sulfatase そのものの性質についても、ほとんど知られていない。

研 究 目 的

ヒト肝から、Iduronate-Sulfatase を分離精製し、その生化学的性質を明らかにするとともに、Hunter 病患儿のそれと、酵素学的性質を比較し、本症の発症要因を明らかにしたい。また羊水、培養羊水細胞、胎児組織中の酵素活性を測定し、出生前診断の可能性を追求した。

研 究 方 法

剖検肝 300 g を 500 ml の 25 mM, pH 7.5, Tris-HCl 緩衝液にてホモジナイズし、14,000 G で遠沈後、Concanavallin A-Sepharose column により得られた酵素液を、reverse ammonium solubilization chromatography により分離した後、pH 5.3, 20 mM, 酢酸-酢酸ソーダ緩衝液により平衡化させた DEAE-Cellulose chromatography, Sephadex-G-200 gel filtration, および pH gradient による SP-Sephadex

chromatography により酵素を分離精製したのち、等電点分画、pH profile、 K_m 、 K_i 等を検討した。ついで得られた酵素学的性質をもとにして、Hunter 病に罹患していると考えられる胎児肝、脳、腎臓中の Iduronate-Sulfatase 活性を測定した。Iduronate-Sulfatase 活性の測定は、既に報告した方法によった。

研 究 成 果

DEAE-Cellulose chromatography では、Cellulose に非吸着性の酵素と、食塩濃度を増加させることにより、溶出される酵素の2つに分れた(図1)。Sephadex-G 200 によるゲル濾過では、 β -Hexosaminidase と Iduronate-Sulfatase との位置的關係から、その分子量は β -Hexosaminidase より小さいものと考えられる。SP-Sephadex chromatography では、図2のように、4つのピークが得られた。図2に示したように酵素をプールし、以下の検討をおこなった。pH 4~8の Ampholyte を用いての等電点分画では、pH 5.5に最大の活性を示す、巾の広い分画が得られた。これはおそらく SP-Sephadex column でみられる3つのピークを反映しているものと考えられる。pH profile の検討では、pH 4.0 附近に至適 pH を有していた。Lineweaver-Burk 直線から得られたみかけの K_m は、 $16.9 \mu\text{M}$ 、Nitrocatechol Sulfate に対しては競合的阻害をうけ、 K_i は、 3.1 mM であった。Hunter 病の患児をもつ母親から生れた胎児の出生前診断では、培養羊水細胞、胎児肝、脳、腎臓中の Iduronate-Sulfatase は、著明な活性低下を示し、胎児は affected fetus と診断できた(表1)。

考 察

Iduronate-Sulfatase は、デルマタン硫酸やヘパリン硫酸中の Iduronosylsulfate から硫酸を遊離するライソゾーム酵素であるが、その酵素学的性質については、ほとんど知られていない。Cantz や Neufeld らは、尿中からいわゆる Hunter-corrective factor を分離し、その分子量は、 $77,000 \sim 170,000$ 、またポリアクリルアミド電気泳動法により、荷電を異にする数種の因子に分かれたと報告している。今回の我々の検討でも、Sephadex

-G 200 によるゲル濾過から、肝 β -Hexosaminidase よりも、おくれて溶出されることからみて、その分子量は 100,000 以下と思われる。DEAE-Cellulose chromatography, SP-Sephadex chromatography の検討でも、数種の Isoenzyme が得られたことから、尿中の corrective factor と同じような知見が得られた。等電点分画法による検討でも、pH 5.5 附近に最大活性を示す巾広い（広い範囲の pH）分画を得たことからでもうらづけられた。出生前診断については、Neufeld らが、すでに羊水、培養羊水細胞を用いて報告している。今回の検索の結果でも、培養羊水細胞、胎児肝、脳、腎臓中の酵素活性の低下をみたことから、少なくとも羊水培養細胞を用いての出生前診断は可能であろう。すでに述べたように本酵素は多様性を示すが、これが本症の臨床的表現型の Heterogeneity を説明できるかどうかは、今後の検討を必要とするであろう。

要 約

Hunter 病は、Iduronate-Sulfatase の欠損症で臨床的に数種の variants が存在する。本酵素の酵素学的性質を研究するため、肝臓から酵素を分離して検討した結果、単一的なものではなく、数種の Isoenzyme の存在が考えられた。培養羊水細胞の本酵素活性を測定し、本症の胎児診断を行った。

文 献

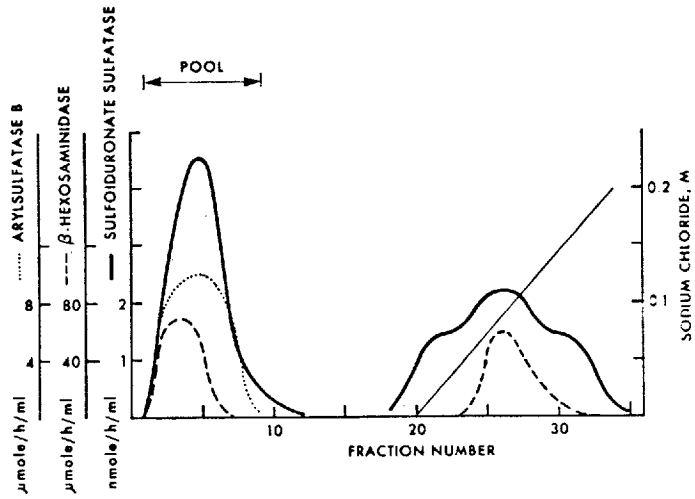
Tohru Yutaka, Arvan L. Fluharty, Richard L. Stevens and Hayato Kihara : Iduronate Sulfatase Analysis of Hair root For identification of Hunter Syndrome Heterozygotes. Am. J. Hum. Genet. (In Press)

表 1

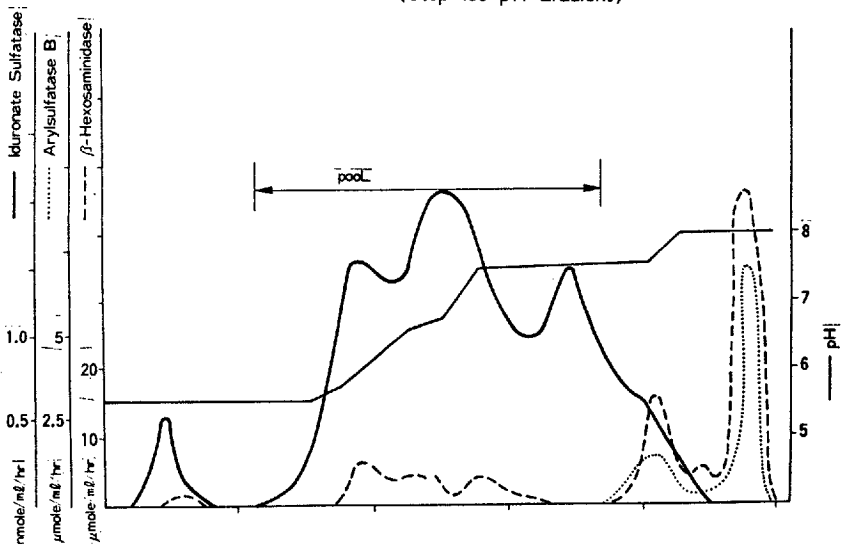
IDURONO SULFATASE ACTIVITY

	Activity <u>nmoles/mg/hr</u>
Cultured Skin Fibroblast patient of Hunter (brother of affected fetus)	0
Cultured Amniotic Fluid Cells	
affected fetus	0
I'cells fetus	0.34
normal	2.35
Liver	<u>nmoles/mg/12hrs</u>
affected fetus	0.099
normal (6M, ♀)	0.64
Brain	
affected fetus	0
normal (6M, ♀)	10.2
Kidney	
affected fetus	0.083
normal (6M, ♀)	1.95

☒ 1 DEAE-CELLULOSE CHROMATOGRAPHY



☒ 2 SP-SEPHADEX CHROMATOGRAPHY
(Stepwise pH Gradient)



↓ 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

まえがき

Hunter 病は, Iduronate-Sulfatase の欠損により, ムコ多糖体の代謝障害をおこす先天性代謝異常症である。本症はヘパリン由来の Idurono-sylsulfate-Anhydromannitol を基質として用いることにより, 酵素診断が可能である。また羊水, 培養羊水細胞により, 出生前診断も可能なことが, Neufeld らにより報告された。本症は他の代謝異常症がそうであるように, 軽症型と重症型, ならびに角膜混濁を欠く例, 有する例などの亜型の存在が知られているが, その生化学的差違は不明であり, また Iduronate-Sulfatase そのものの性質についても, ほとんど知られていない。