

GM₂- ガングリオシドーシスにおける ムコ多糖代謝に関する研究

藪 内 百 治

岡 田 伸 太 郎

豊 徹

(大阪大学医学部小児科)

GM₂-ガングリオシドーシスは、GM₂-ガングリオシドと呼ばれる糖脂質が体内に蓄積されるリソゾーム酵素異常症である。本症の病因が、Tay-Sachs 病では、 β -ヘキソサミニダーゼ A が、Sandhoff 病では、 β -ヘキソサミニダーゼ A および B 分画の活性低下にもとづくことはすでに報告されている¹⁾²⁾。しかしながら、本症で、その活性低下をみる β -ヘキソサミニダーゼが、上記の糖脂質のみならず、N-アセチルヘキソサミニド結合基をもつ、ムコ多糖や糖タンパク代謝にも密接に関連しているであろう事実は、まだ十二分に解明されていない。ムコ多糖体の分解に関与するヘキソサミニダーゼの作用については、Thompson³⁾ や Cantz ら⁴⁾ にすでに報告をみるが、彼らが利用した基質は多糖鎖からなり、しかも酵素活性測定方法は複雑であった。

今回、著者らは、コンドロイチン・6・硫酸を酵素学的に、ならびに化学的に分解することによって、Gal NAc-Glc UA-Gal NAc [³H] からなる脱硫酸化 3 糖を生成し、 β -ヘキソサミニダーゼ活性測定用の基質として使用することにより、GM₂-ガングリオシドーシス由来の培養皮膚線維芽細胞中の β -ヘキソサミニダーゼ活性を測定するとともに、この基質に対する酵素学的性質についての検討を試みた。

方 法

基質の作製：図 1 に示すごとく、Glössl らの方法⁵⁾ にしたがって、コンドロイチン・6・硫酸をヒアルロニダーゼ、 β -グルクロニダーゼにより漸次分解させ、Gal NAc (6S) Glc UA-Gal NAc (6S) からなる 3 糖を得、還元末端を [³H] で還元標識したのち、Kantor ら⁶⁾ の方法にしたがって、化学的に脱硫酸化させ、Gal NAc-Glc UA-Gal NAc [³H] からなる β -ヘキソサミニダーゼ活性測定用の基質を得た。

酵素活性の測定方法：20 μ l の酵素液（タンパク量として 20～60 μ g），20 μ l の基質（8 nmol/22,000 dpm），20 μ l の 0.2 M, pH 4.5 クエン酸—燐酸緩衝液を加え、総量 60 μ l とする。37°C 中で、6～8 時間反応させ、終了後、25 μ l の反応液を濾紙にスポット。濾紙クロマトグラム（展開液として、酢酸エチル：酢酸：水＝3：1：3）により、未分解な基質、(GalNAc-

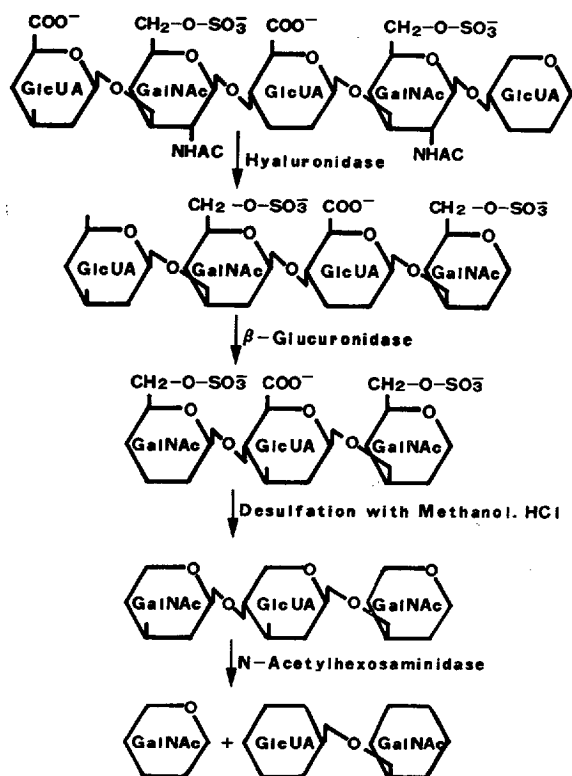


図1 コンドロイチン・6・硫酸からの基質の生成過程を示すシェーマ

GlcUA-Gal NAc) と、反応生成物 (Glc UA-Gal NAc) を分離する。沱紙を風乾したのち、1 cm 毎にカットし、各々の沱紙片中の放射能を 1 ml の水で溶出させ、液体シンチレーションカウンターで測定する。

結 果

基質の同定：生成された GalNAc-GlcUA-Gal NAc は、Bio Gel P-2 column (2×150 cm) のゲル沱過パターンおよび標準 3 糖が溶出される位置から「3 糖」と確認できた。沱紙クロマトグラム (isobutyric acid : 0.5 N NH₄OH = 5 : 3)、高圧沱紙電気泳動 (1.6 M ギ酸, 60 V/cm) のパターンからも単一物質であり、脱硫酸化されていることが認められた。

培養皮膚線維芽細胞中の酵素活性：基質を正常皮膚線維芽細胞ホモジネートにより、長時間分解させ、反応終了後、反応液を沱紙クロマトグラムで分解させると、図 2 に示されたように、未分解の基質よりも早く移動する新たなスポットが得られ、しかもこのスポットは標準 2 糖（乳糖）とほとんど同じ位置に移動した。このスポットは、基質が β -ヘキソサミニダーゼの作用により分解され、Gal NAc-Glc UA-Gal NAc → Gal NAc + Glc UA-Gal NAc からなる 2 糖が形成された結果と考えられる。

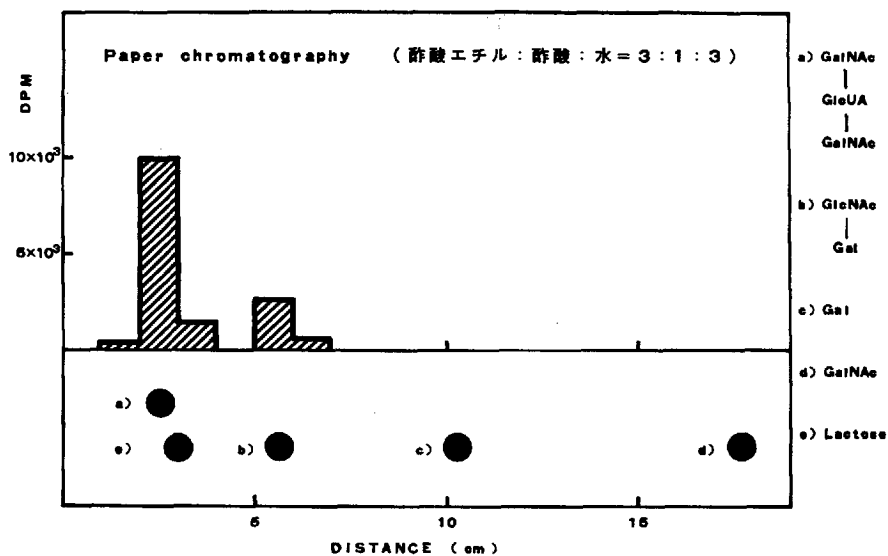


図2 培養皮膚線維芽細胞ホモジネートと基質を、長時間反応させたのち、反応生成物と未分解な基質の沱紙クロマトグラム。
(下段は、同時に展開した、標準品の位置を示す)

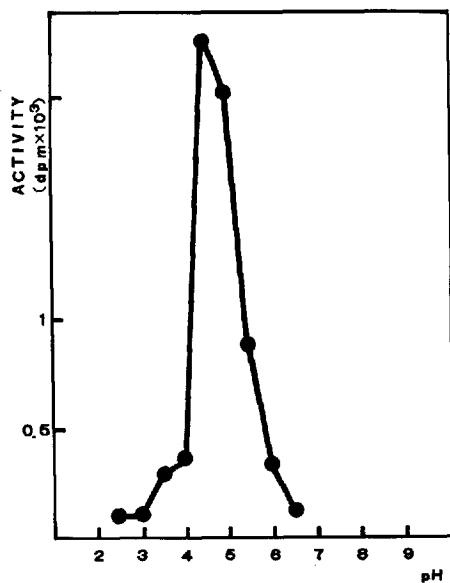


図3 β -ヘキソサミニダーゼ活性の至適 pH

酵素活性の至適条件：酵素活性と反応時間および反応液中加入された酵素タンパク量との関係は、反応時間は8時間まで、タンパク量は80 μ g まで、直線的な酵素活性との関係が得られた。0.2 M クエン酸-リン酸緩衝液をもちい、その pH を変えて、酵素活性の至適 pH をみると、pH 4.5 附近に最大活性が得られた (図3)。

表1 培養皮膚線維芽細胞中の β -ヘキソミニダーゼ活性
Enzyme Activity in Skin Fibroblast

	Chondroitin Sulfate β -Hex (nmol/mg/h)	4 MU- β -Hex (nmol/mg/h)	4 MU- β -Gal (nmol/mg/h)
Tay-Sachs	0.141	3357	464
Sandhoff			
1.	0.112	278	392
2.	0.216	220	403
I'cell			
1.	0.174	911	25.4
2.	0.134	971	33.7
Control			
1.	1.043	2935	489
2.	1.179	2609	477
3.	0.754	3110	382

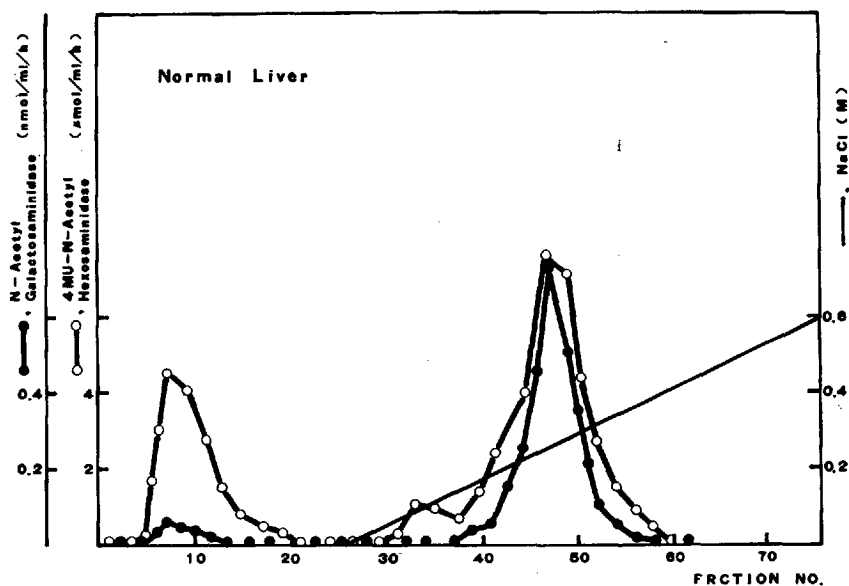


図4 正常肝 β -ヘキソサミニダーゼの DEAE-セルロースクロマトグラフィー

GM₂-ガングリオシドーシス 患者由来の培養皮膚線維芽細胞中の β -ヘキソサミニダーゼ活性: 表1に示すように, Tay-Sachs 病, Sandhoff 病, I' Cell 病では著明な酵素活性の低下をみた。一方, 人工基質である 4 MU-誘導体を基質として, β -ヘキソサミニダーゼ活性を測定すると, ヘキソサミニダーゼA活性のみの低下をみる Tay-Sachs 病では正常活性が得られ, ヘキソサミニダーゼAとBの両者が欠損をみる Sandhoff 病では, 著明な活性低下が得ら

れた。

肝臓由来 β -ヘキソサミニダーゼの基質特異性： β -ヘキソサミニダーゼはイオン交換カラムをもちいることにより、ヘキソサミニダーゼAとBの2つのアイソザイムの存在することが知られているが、コンドロイチン硫酸由来のオリゴ糖に対する両アイソザイムの基質特異性についてはほとんど報告がない。そこで、正常人および Tay-Sachs 病患児由来の剖検肝中のヘキソサミニダーゼAとBを DEAE-セルロースカラムをもちいて分画し、その基質特異性を検討した。図4にみるごとく、ヘキソサミニダーゼA活性のみが、コンドロイチン硫酸由来のオリゴ糖に作用し、ヘキソサミニダーゼB活性は、この基質にほとんど作用しないことがみいだされた。

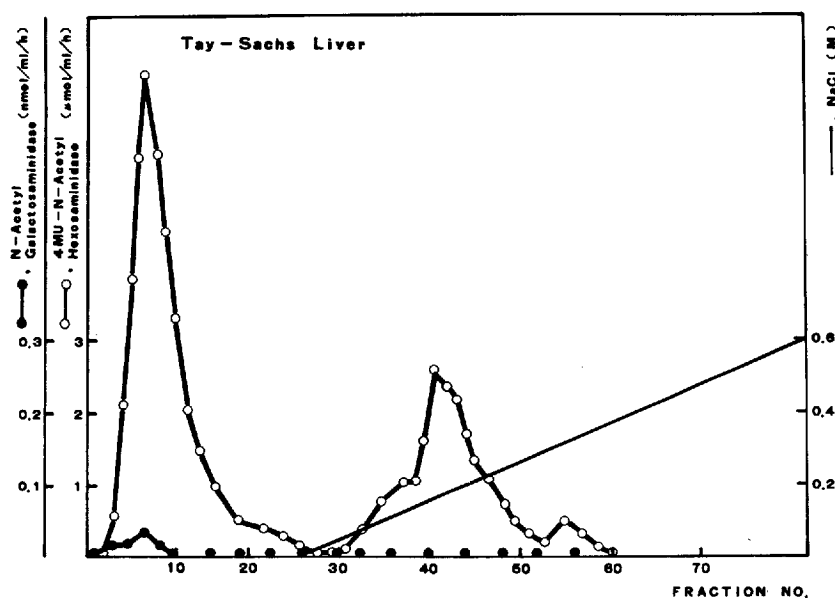


図5 Tay-Sachs 肝 β -ヘキソサミニダーゼの DEAE-セルロースクロマトグラフィー

考 按

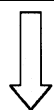
コンドロイチン硫酸に含まれる N-アセチルガラクトサミン基を酵素学的に加水分解させるためには、脱硫酸化された N-アセチルガラクトサミン基が、酵素の直接作用する非還元末端に位置する基質を作製する必要がある。今回、著者らが、コンドロイチン・6・硫酸を酵素学的および化学的に分解して得た基質は、Gal NAc-Glc UA-Gal NAc からなる構造を有しており、この基質をもちいて、培養皮膚線維芽細胞中の β -ヘキソサミニダーゼ活性を測定した結果、Tay-Sachs 病、Sandhoff 病、I' Cell 病では、著明なヘキソサミニダーゼ活性の低下を併うことがみいだされた。特に、Tay-Sachs 病では、ヘキソサミニダーゼB分画は残存しているにもかかわらず、コンドロイチン硫酸を分解する β -ヘキソサミニダーゼ活性の低下をみ

た事実、この基質に対するヘキソサミニダーゼアイソザイムの基質特異性を考えるにあたり興味深い結果である。陰イオン交換カラムをもちいて、ヘキソサミニダーゼAとBを分画し、各アイソザイムの基質に対する分解能を検討した結果でも、主としてヘキソサミニダーゼA活性が、この基質に作用し、ヘキソサミニダーゼB活性は、基質にほとんど作用しない事実ともよく一致している。

Tay-Sachs 病の酵素学的診断のためには、ヘキソサミニダーゼAとBをイオン交換カラムあるいは、加熱法などにより分画し、ヘキソサミニダーゼA活性の低下の有無で判断されてきたが、われわれが、今回作製した基質を利用すれば、そのような操作なしに、酵素学的診断が可能となろう。

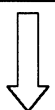
参 考 文 献

- 1) Okada, S. and O'Brien, J.S. : Tay-Sachs disease. : Generalized absence of a beta-D-N-acetylhexosaminidase component. *Science*, **59** : 698~700, 1969.
- 2) Sandhoff, K., Andreae, U. and Jatzewitz, H. : Deficient hexosaminidase activity in an exceptional case of Tay-Sachs disease with additional storage of kidney globoside in visceral organ. *Life Sci.*, **7** : 278~285, 1968.
- 3) Thompson, J.N., Stoolmiller, A.C. and Matalon, R. : N-acetyl-beta-hexosaminidase. : Role in the degradation of glycosaminoglucans. *Science*, **181** : 866~867, 1973.
- 4) Cantz, M. and Kresse, H. : Defective glycosaminoglycan Catabolism in Cultured fibroblasts and its correction by N-acetylhexosaminidase. *Europ. J. Biochem.*, **47** : 581~590, 1974.
- 5) Glössl, J. and Kresse, H. : A sensitive procedure for the diagnosis of N-acetyl galactosamine 6-sulfate sulfatase deficiency in the classical Morquio disease. *Clin. Chim. Acta.*, **88** : 111~119, 1978.
- 6) Kantor, T.G. and Schubert, M. : A new method for the desulfation of chondroitin sulfate. *J. Am. Chem. Soc.*, **79** : 152~153, 1957.



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



GM2-ガングリオシドーシスは、GM2-ガングリオシドと呼ばれる糖脂質が体内に蓄積されるリソゾーム酵素異常症である。本症の病因が、Tay - Sachs 病では、 β -ヘキソサミニダーゼ A が、Sandhoff 病では、 β -ヘキソサミニダーゼ A および B 分画の活性低下にもとづくことはすでに報告されている。しかしながら、本症で、その活性低下をみる β -ヘキソサミニダーゼが、上記の糖脂質のみならず、N-アセチルヘキソサミニド結合基をもつ、ムコ多糖や糖タンパク代謝にも密接に関連しているであろう事実は、まだ十二分に解明されていない。ムコ多糖体の分解に関与するヘキソサミニダーゼの作用については、Thompson や Cantz らにすでに報告をみるが、彼らが利用した基質は多糖鎖からなり、しかも酵素活性測定方法は複雑であった。

今回、著者らは、コンドロイチン・6・硫酸を酵素学的に、ならびに化学的に分解することによって、Gal NAc-Glc UA-Gal NAc [3H] からなる脱硫酸化 3 糖を生成し、 β -ヘキソサミニダーゼ活性測定用の基質として使用することにより、GM2-ガングリオシドーシス由来の培養皮膚線維芽細胞中の β -ヘキソサミニダーゼ活性を測定するとともに、この基質に対する酵素学的性質に関しての検討を試みた。