

GM₁-ガングリオシドーシスにおける ケラタン硫酸代謝について

藪 内 百 治
岡 田 伸 太 郎
豊 徹

(大阪大学医学部小児科)

GM₁-ガングリオシドーシスは、GM₁-ガングリオシドの糖鎖構造の代謝に必要な *exoglycosidase* のうち、 β -ガラクトース結合基に作用する β -ガラクトシダーゼの欠損症である。この酵素が、上記の糖脂質に作用するのみならず、ガラクトース結合基をもつ、糖タンパク質やプロテオグリカンの代謝にも関与している事実は、近年注目されるようになってきた。

一方、本症は、臨床的表現型をもとにして、タイプIとタイプIIの2型に分類されている。このうちタイプIはタイプIIにくらべて早期に発症し、肝脾腫や骨形成不全などの変化も重篤である。このような臨床症状は、おもに糖タンパクやプロテオグリカンの代謝障害にその病因がもとめられるものと考えられる。そこで著者らは、プロテオグリカンの一種であるケラタン硫酸を天然基質として、 β -ガラクトシダーゼ活性を測定した。これはタイプIIにおける臨床的表現型の差異を、生化学的アプローチにより解明できるのではないかと考えたためである。

方 法

基質の作製：ケラタン硫酸を β -ガラクトシダーゼ活性測定用の基質として利用するためには、酵素が作用する非還元末端に β -ガラクトース基が位置するオリゴ糖を作製する必要がある。そのためには、ケラタン硫酸をケラターゼにより分解させ、ゲル濾過法により4糖画分をみつめ、ついでヒト腎臓から粗精製した N-アセチルグルコサミン-6-硫酸スルファターゼ、およびナタ豆由来の N-アセチルヘキソサミニダーゼにより、上記の4糖を順次、酵素的に分解させたのち、ゲル濾過法、高圧濾紙電気泳動法により、Galactose-N-acetylglucosamine (6S)-[³H] Galactitol を抽出し、基質としてもちいた。

酵素活性の測定：20 μ l の酵素液、20 μ l の基質 (2.1 nmol/24,000 dpm) および 10 μ l, 0.2 M, pH 4.5, citrate-phosphate buffer を 37°C 下で、4~6 時間反応させる。boiling water にて反応を停止させ、遠沈したのち、上清 25 μ l を東洋濾紙 No.51A にスポットさせ、展開液として、酢酸エチル：酢酸：水：ピリジン=5：1：3：5 (v/v) をもちい、濾紙クロマトグラムをおこなう。作製した基質に β -ガラクトシダーゼが作用すると、

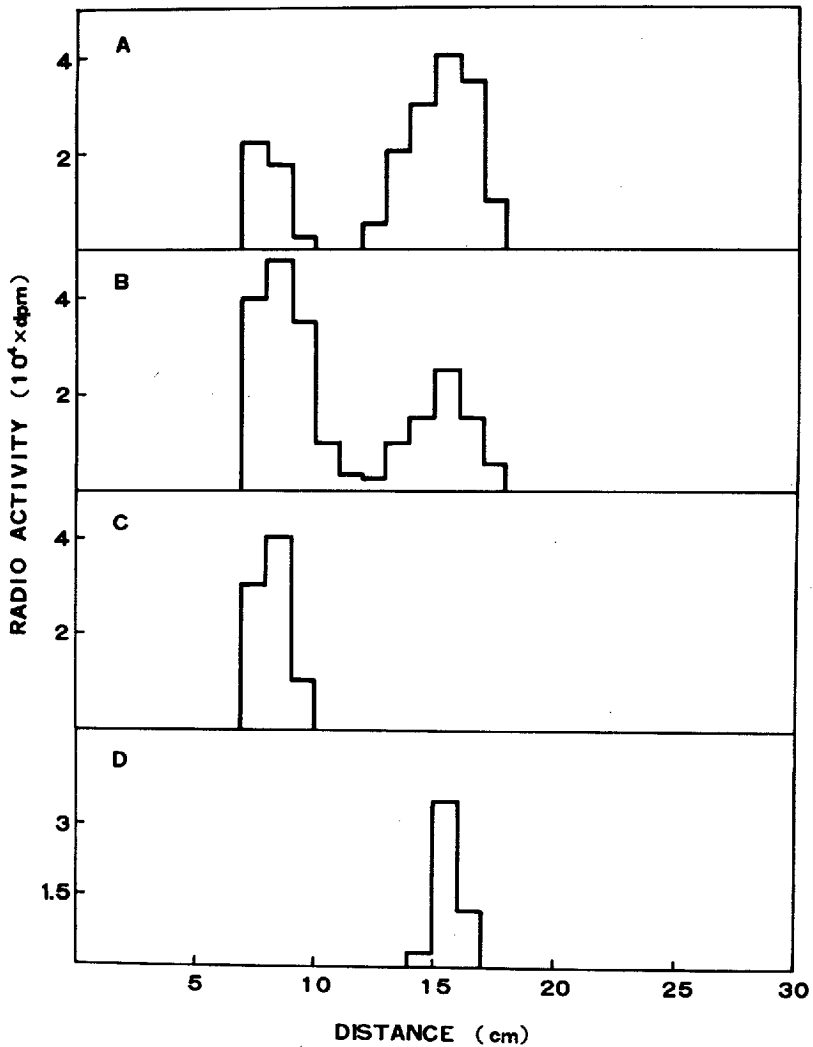
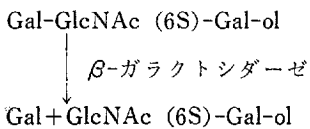


図1 作製した基質 (Gal-GlcNAc(6s)-Gal-ol) を、 β -ガラクトシダーゼにより分解をさせたのちの paper chromatography

- A) ホラ貝 β -ガラクトシダーゼと反応させた
- B) 培養皮膚線維芽細胞と反応させた
- C) 基質
- D) GlcNAc(6s)-Gal-ol (標準品)



の反応が進行する。そこで濾紙クロマトグラムにより、遊離された GlcNAc (6S) と未分解の Gal-GlcNAc (6S)-Gal-ol を分離させ、反応生成物である GalNAc (6S)-Gal-ol を濾紙から抽出し、その放射能をカウントすることにより、酵素活性値が得られる。

表1 培養皮膚線維芽細胞中の β -ガラクトシダーゼ活性

Genotype	Enzyme activity	
	4-methylumbelliferyl β -galactosidase	keratan sulfate β -galactosidase
Normal	378~690*(n=9)	2.11~3.53*(n=9)
GM ₁ -gangliosidosis		
Type I		
1	6.5	0.186
2	2.91	0.121
Type II		
1	1.73	0.163
2	17.5	0.488
Heterozygote of GM ₁ -gangliosidosis		
1	189	1.58
2	185	1.33
Mucopolipidosis II		
1	21.1	0.21
2	34.3	0.308
3	22.7	0.178
4	67.5	0.45
Mucopolipidosis III		
1	267.5	1.46
2	112.7	0.88
Mixtures of GM ₁ -gangliosidosis and normal**	172.1(159.8)	1.32(1.15)

* : 酵素活性は nmol/mg protein/h で表わした。

** : 正常細胞と GM₁-gangliosidosis の細胞を混合し、酵素活性を測定した。() は理論値を示す。

図1(A)は、酵素液として、ホラ貝 β -ガラクトシダーゼを、図1(B)は、皮膚線維芽細胞由来の酵素液をもちいた際の濾紙クロマトグラフィーである。いずれの場合も、原点から、15 cm 附近にあらたな放射能を有するスポットが得られ、この Rf は、標準品である GlcNAc (6S)-Gal-ol と一致をみた。

結 果

皮膚線維芽細胞中の β -ガラクトシダーゼ活性：表1に示したごとく、GM₁-ガングリオシドースタイプI 2例、タイプII 2例ともに、この基質に対する β -ガラクトシダーゼ活性は、

著明な低下をみた。多種のリソゾーム酵素活性の低下をみるムコリペドーシス II (I-cell 病) においても、 β -ガラクトシダーゼ活性は低下していた。GM₁-ガングリオシドーシス患者の両親から得られた線維芽細胞中の酵素活性は、正常対照の約 $\frac{1}{2}$ に低下していた。

考 按

GM₁-ガングリオシドーシスの患者から得られた剖検肝や脳においては、糖脂質である GM₁-ガングリオシドのみならず、オリゴ糖や糖タンパクの蓄積がみとめられ、しかも、それらの末端には、ガラクトース基が結合している。この事実は本症においてその活性低下を示す β -ガラクトシダーゼが糖脂質である GM₁-ガングリオシドの糖鎖に作用するだけでなく、赤血球膜由来の糖タンパク質やケラタン硫酸由来のムコ多糖の糖鎖にも作用することを示している。GM₁-ガングリオシドーシスの患者において、ケラタン硫酸の Galactose 基の分解に必要な β -ガラクトシダーゼ活性が低下をみたとの報告はまだない。著者らは、ケラタン硫酸を酵素的に分解させることにより、作製したオリゴ糖をもちいて、本患者から得られた培養皮膚線維芽細胞中の β -ガラクトシダーゼ活性を測定した結果、著明に酵素活性の低下していることを証明した。当初の目的とされた仮説—本症の二つの表現型のちがいが、ケラタン硫酸を分解する β -ガラクトシダーゼの酵素学的な差によって説明できないか？—は、実証できなかった。

最近の研究によれば、本症の患者の組織内に過剰蓄積をみたり、尿中に排泄される糖タンパク質やオリゴ糖の構造分析の結果、それらの糖鎖構造はケラタン硫酸にみられるくり返しの性質をもった糖鎖構造 (Gal-GlcNAc-Gal-GlcNAc) とは、性質を異にすることがみいだされた。従って、本症におけるケラタン硫酸代謝の障害は、直接的に肝脾腫や骨形成不全をもたらす原因とはなっていないものと考えたい。



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



GM1- ガングリオシドーシスは,GM1- ガングリオシドの糖鎖構造の代謝に必要な exoglycosidase のうち, β -ガラクトース結合基に作用する β -ガラクトシダーゼの欠損症である。この酵素が,上記の糖脂質に作用するのみならず,ガラクトース結合基をもつ,糖タンパク質やプロテオグリカンの代謝にも関与している事実は,近年注目されるようになってきた。

一方,本症は,臨床的表現型をもとにして,タイプⅠとタイプⅡの2型に分類されている。このうちタイプⅠはタイプⅡにくらべて早期に発症し,肝脾腫や骨形成不全などの変化も重篤である。このような臨床症状は,おもに糖タンパクやプロテオグリカンの代謝障害にその病因がもとめられるものと考えられる。そこで著者らは,プロテオグリカンの一種であるケラタン硫酸を天然基質として, β -ガラクトシダーゼ活性を測定した。これはタイプⅠにおける臨床的表現型の差異を,生化学的アプローチにより解明できるのではないかと考えたためである。