

# ヒト $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase の 分子生物学的研究

新潟大学脳研究所神経内科学部門（主任：宮武 正教授）

山内 豊明

Molecular Cloning and Expression of Human  
 $\alpha$ -N-Acetylgalactosaminidase cDNA

Toyoaki YAMAUCHI

*Department of Neurology, Brain Research Institute,  
Niigata University, Niigata*

*(Director: Prof. Tadashi MIYATAKE)*

A sialidase deficiency has been described in several diseases including mucopolidosis I, cherry-red spot-myoclonus syndrome, galactosialidosis and I-cell disease. Mechanisms of the sialidase deficiency, however, is still unclear due to the extreme difficulty of purification of human sialidase. In order to better understand molecular mechanisms of the sialidase deficiency, a human sialidase has been purified from placenta. On SDS-PAGE analysis, the purified sialidase fraction contains five protein bands with apparent molecular weight of 78 kDa, 64 kDa, 46 kDa, 30 kDa and 20 kDa. The 64 kDa protein is  $\beta$ -galactosidase itself, and the 20kDa and 30kDa proteins are known as "protective protein" and its precursor protein. To elucidate the function of the 46 kDa protein, molecular cloning of cDNA for the 46 kDa protein was conducted. Partial amino acid sequences were obtained from tryptic peptides of the 46kDa protein and two oligonucleotide probes were synthesized. On screening of cDNA libraries with the oligonucleotide probes, a full-length cDNA has been isolated. The identity of the cDNAs were confirmed by complete colinearity between the deduced amino acid sequence and chemically determined amino acid sequence of the 46 kDa protein. Furthermore, the identity was also confirmed by western blotting analysis of the fusion protein made by *E. coli*.

The full-length cDNA, pcD2-HS1225 codes for 411 amino acids with the first 17 residues representing a putative signal peptide. The predicted amino acid sequence shows striking homology with human  $\alpha$ -galactosidase A and yeast  $\alpha$ -galactosidase,

---

Reprint requests to: Toyoaki YAMAUCHI,  
Department of Neurology, Brain Research  
Institute, Niigata University, Niigata City,  
951, JAPAN.

別刷請求先：〒951 新潟市旭町通り1-757  
新潟大学脳研究所神経内科学部門

山内豊明

suggesting that the 46 kDa protein is a protein related to  $\alpha$ -galactosidase A. An isoenzyme of  $\alpha$ -galactosidase A has been identified as  $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase ( $\alpha$ -galactosidase B). To elucidate the function of the 46 kDa protein, the analysis of  $\alpha$ -galactosidase and  $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase activities of the purified 46 kDa protein as well as in COS cells transfected with cDNAs for the 46 kDa protein was therefore performed. The purified 46 kDa protein did show  $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase activity toward *p*-nitrophenyl- $\alpha$ -N-acetylgalactosaminide as well as  $\alpha$ -galactosidase activity toward 4-methylumbelliferyl- $\alpha$ -galactopyranoside. Hydroxylapatite column chromatography confirmed the identity of the 46 kDa protein as  $\alpha$ -galactosidase B ( $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase). COS cells transfected with pcD2-HS1207, pcD2-HS1225 and pcD2-HS1237 showed marked increase of  $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase activity as well as  $\alpha$ -galactosidase activity. SP-Sephadex column chromatography demonstrated that the expressed  $\alpha$ -galactosidase activity behaves as  $\alpha$ -galactosidase B, which is in good agreement with previous suggestion that  $\alpha$ -galactosidase B is in reality  $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase. The COS cells transfected with pcD2-HS1225 also shows  $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase activity toward Forssman hapten, asialo-bovine submandibular mucin and asialo-porcine gastric mucin, confirming the previous findings that the  $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase has a broad substrate specificity. It was concluded that the 46 kDa protein associated with the sialidase fraction, is  $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase.

Recently a deficiency of the  $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase in human has been reported. The patients with the  $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase deficiency excrete large amount of amino acid glycosides. To elucidate the mechanisms of urinary excretion of amino acid glycosides,  $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase activity toward urinary amino acid glycosides was investigated. The structure of the major amino acid glycosides has been determined to be NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$ 1-Ser(Thr), NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3(NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4GalNAc $\beta$ 1-6)GalNAc $\alpha$ 1-Ser(Thr), NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3(NeuAc $\alpha$ 2-6)GalNAc $\alpha$ 1-Ser(Thr) and NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3(NeuAc $\alpha$ 2-6)GalNAc $\alpha$ 1-Thr-Pro.  $\alpha$ -GalNAc-Ser(Thr)-DNS, prepared from the NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$ 1-Ser(Thr), NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3(NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4GalNAc $\beta$ 1-6)GalNAc $\alpha$ 1-Ser(Thr), NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3(NeuAc $\alpha$ 2-6)GalNAc $\alpha$ 1-Ser(Thr) was shown to be hydrolyzed by the  $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase expressed in the COS cells transfected with pcD2-HS1225. Amino acid glycosides, NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$ 1-Ser(Thr), NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3(NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4GalNAc $\beta$ 1-6)GalNAc $\alpha$ 1-Ser(Thr), NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3(NeuAc $\alpha$ 2-6)GalNAc $\alpha$ 1-Ser(Thr) cannot be cleaved by the  $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase. The result suggests that addition of sialic acid and galactose to GalNAc $\alpha$ 1-Ser(Thr) might take place after the degradation of GalNAc $\alpha$ 1-Ser(Thr) is blocked due to the  $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase deficiency.

---

Key words: human  $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase, human  $\alpha$ -galactosidase B, molecular cloning, expression, lysosomal enzyme deficiency  
ヒト  $\alpha$ -N-アセチルガクトサミニダーゼ, ヒト  $\alpha$ -ガラクトシダーゼ B, 遺伝子クローニング, 発現, ライソゾーム酵素欠損症

## 序 論

ヒトのライソゾームシアリダーゼ活性の低下する疾患としてはムコリビドーシス I, cherry-red spot-myoclonus syndrome, ガラクトシアリドーシス, I-cell 病などのいくつかの疾患が知られている<sup>1)2)3)4)5)</sup>。しかしながら、シアリダーゼタンパクはその精製が非常に困難なためシアリダーゼのものについての検討は十分なされていない。そこでヒトにおけるシアリダーゼの解析をする目的にまずヒトシアリダーゼを精製<sup>6)7)</sup>、その精製画分に含まれるタンパクの characterization を行い、さらにそのタンパクをコードしている遺伝子構造を明らかにすることが必要であると考えた。

精製シアリダーゼ画分を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分析を行ったところ分子量 78 kDa, 64 kDa, 46 kDa, 30 kDa, 20 kDa の主なる 5 本のタンパクバンドを与えた。このうち、64 kDa のタンパクは  $\beta$ -ガラクトシダーゼであり<sup>8)9)</sup>、30 kDa および 20 kDa のタンパクは  $\beta$ -ガラクトシダーゼおよびシアリダーゼの活性発現およびその安定化に不可欠ないわゆる“protective protein”である<sup>10)11)12)</sup>。したがって 78 kDa, 46 kDa のタンパクがシアリダーゼの構成成分を成すのではないかと考えられたが、シアリダーゼ活性を有したままのおおのタンパクを精製することはできなかった。そこで機能の不明な未知の 46 kDa のタンパクについて cDNA クローニングと詳細な解析を行ったところ、 $\alpha$ -galactosidase A との相同性を手がかりに、この 46 kDa タンパクは  $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase ( $\alpha$ -galactosidase B) であることを明らかにした<sup>13)14)15)16)17)</sup>。

従来からの研究からこの  $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase が広範囲な基質特異性を有することが示唆されてきていたが<sup>18)19)20)</sup>、この 46 kDa タンパクの cDNA を用いた発現系を用いてその基質特異性を詳細に検討した。

最近、この  $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase の欠損症が報告され<sup>21)22)</sup>、これらの症例において尿中に大量に排泄される amino acid glycosides の構造が決定された<sup>23)</sup>。そこでこの発現系を用いることによりこれら尿中 amino acid glycosides がどのような代謝障害によっているかについての解析も行った。

## 研究材料および方法

### 1. 部分アミノ酸配列の解析

精製したシアリダーゼ画分<sup>6)7)</sup> からそのコンポーネン

トの一つと考えられる 46 kDa の糖タンパクを精製単離しその N 末端およびトリプシン分解物から Applied Biosystems Inc. の Automated sequencer model 470 A を用いて部分アミノ酸配列を 2 つ決定した。

### 2. 46 kDa タンパクの cDNA クローニング

得られた部分アミノ酸配列をもとにヒトの codon usage frequency<sup>24)25)</sup> を参考にして、それぞれのアミノ酸に一つのコドンをあてがい、33 mer の長さの unique oligonucleotide probe (oligonucleotide 1; 5' CCAC-TCGGCGAAGGTCTGGGCGTCTGCACCAC) と、もう一つのアミノ酸配列からは、全ての可能性を考慮した complete mixture の oligonucleotide probe (oligonucleotide 2; 5' GCCCATNGGNGGNGT(CT)TGNAAG, 5' GCCCATNGGNGGNGT(CT)TGCAA) を Applied Biosystems Inc. の Automated DNA Synthesizer model 381A を用いて作成した。Clontech Laboratories から購入したヒト肺線維芽細胞の cDNA ライブラリーをオリゴヌクレオチド 1 を用いて比較的 low stringent な条件 (50°C, 6 × SSC (1 × SSC: 150 mM NaCl, 15 mM sodium citrate)) でハイブリダイゼーションを行い、得られた 12 個の putative cDNA clones に対して更にオリゴヌクレオチド 2 でハイブリダイズするクローンを同定するという方法にてその両者のプローブにハイブリダイズするクローン ( $\lambda$ -HS1013) を単離した。さらにこのクローンの 5' 側をプローブとして用い米国 National Institute of Mental Health の岡山博人博士から供与されたヒト皮膚線維芽細胞から作製した pcD2 cDNA ライブラリーをスクリーニングした<sup>26)</sup>。

### 3. cDNA の塩基配列の解析

クローニングで得られたクローンのインサートを pUC 19 にサブクローン化した。制限酵素断片、あるいは、Bal 31 nuclease, exonuclease III による種々の長さの deletion を持つ subclone を得、dideoxynucleotide chain terminator 法 (Sanger 法)<sup>27)28)29)</sup> を用いてその全塩基配列を決定した。

### 4. 相同性の検討

Genetyx コンピュータープログラムを用いて GeneBank (release 57.0) 及び EMBL (release 16.0) のデータバンクに対して相同性の検索を行った。

### 5. Hydroxylapatite column chromatography

$p$ -Aminophenylthio- $\beta$ -D-galactose-CH-Sepharose affinity column chromatography で得られた画分<sup>16)</sup> を 1 mM の NaCl を含む 0.01 M のリン酸緩衝液 (pH 6.5) に対して透析し、同緩衝液で平衡化された Hydroxyl-

apatite HPLC column に apply し 0 から 60 mM のリン酸緩衝液 (pH 6.5) の linear gradient で溶出した<sup>30)</sup>.

## 6. COS 細胞における一過性発現

10% ウシ胎児血清を含んだダルベッコ変法イーグル培地を用いて transfection 24時間前に COS 細胞を 25 cm<sup>2</sup> のフラスコに各々 7 × 10<sup>5</sup> 個となるようにまき、リン酸カルシウム法<sup>18)26)31)</sup> に基づき 1 フラスコ当り 20 μg の plasmid DNA の共沈澱を作成し培地に加えた。60時間後に harvest し、cell pellet を 1 ml の蒸留水で懸濁しポリトロンマイクロホモゲナイザーを用いてホモゲナイズし、酵素活性の測定を行った。

## 7. 酵素活性の測定

### (a) 人工基質

α-galactosidase 活性は 40 mM の 4-methylumbelliferyl-α-galactopyranoside (4-MU-α-Gal) を含む 0.2 M のクエン酸緩衝液 (pH 4.8) 200 μl に 35 μg の酵素タンパクを含む水溶液 100 μl を酵素源として加え、37°C で 20 分間インキュベーションし遊離した 4-methylumbelliferone を蛍光光度計を用いて測定した。

α-N-acetylgalactosaminidase 活性は 8 mM の *p*-nitrophenyl-N-acetyl-α-galactosaminide (pNP-GalNAc) を含む 0.2 M のクエン酸緩衝液 (pH 4.8) 100 μl に 35 μg の酵素タンパクを含む水溶液 200 μl を酵素源として加え、37°C で 60 分間インキュベーションし遊離した *p*-nitrophenol を 400 nm の吸光度を吸光度計を用いて測定した<sup>19)32)</sup>。

### (b) Forssman hapten

非還元末端の N-acetylgalactosamine を <sup>3</sup>H でラベルしたイヌ腸管由来の Forssman hapten 20 μg (23000 dpm) を 300 μg の sodium taurocholate (Carbiochem Lot No. 810-173) を含む 0.33 M のクエン酸リン酸緩衝液 (pH 4.5) 30 μl に溶解し、490 μg の酵素タンパクを含む水溶液 170 μl を加え、37°C で 1, 3, 5 及び 15 時間のインキュベーションを行い、Folch 分配後、遊離した N-acetylgalactosamine の放射活性を測定した<sup>33)</sup>。

### (c) 尿中 amino acid glycosides

α-N-acetylgalactosaminidase 欠損症患者尿中 amino acid glycosides から精製した GalNAcα1-Ser(Thr) を dansyl 化した GalNAcα1-Ser(Thr)-DNS を基質として α-N-acetylgalactosaminidase 活性を以下の方法にて測定した。

1.5 nmole の GalNAcα1-Ser(Thr)-DNS および 44

μg の酵素タンパクを含む 0.05 M のクエン酸緩衝液 (pH 5.0) 100 μl を 37°C で 12 時間ないし 24 時間インキュベーションし遊離した Ser(Thr)-DNS を逆相 HPLC にて分離測定した<sup>23)</sup>。

### (d) アシアロ牛顎下腺ムチン及びアシアロ豚胃粘膜ムチン

アシアロ化した牛顎下腺ムチンおよびアシアロ化した豚胃粘膜ムチンに対する α-N-acetylgalactosaminidase 活性を以下の方法にて測定した。

アシアロ化した牛顎下腺ムチンまたはアシアロ化した豚胃粘膜ムチン 500 μg および酵素タンパク (pNP-GalNAc) に対して 3761 nmoles/min./ml の酵素活性をもつヒト胎盤糖タンパク画分 5 μl または COS 細胞のホモジネート 200 μl) を含む 0.067 M の酢酸緩衝液 (pH 5.0) 300 μl をインキュベーションし、遊離した N-acetylgalactosamine を Reissing 法<sup>34)</sup> にて測定した。

## 8. SP-Sephadex C-50 イオン交換カラムクロマトグラフィー

ヒト胎盤の糖タンパク画分及び COS 細胞の糖タンパク画分を 35 mM の酢酸緩衝液 (pH 5.0) で平衡化した SP-Sephadex カラム (0.8 × 4 cm) に apply し、0 から 1 M の NaCl の linear gradient によりクロマトグラフィーを行った<sup>35)</sup>。

## 9. messenger RNA の解析

HeLa 細胞、ヒト線維芽細胞、ヒト肝臓およびヒト脳より total RNA を抽出しオリゴ dT カラムクロマトグラフィーにより poly A(+) RNA を単離した<sup>36)</sup>。75 mM KCl, 10 mM DTT および 5 mM MgCl<sub>2</sub> を含む 50 mM TrisHCl (pH 8.3) 中で 5 μg の poly A (+) RNA を鋳型とし、プライマーとしてオリゴ dT (1 mg/ml) を 2 μl 用い、MuLV (murine leukemia virus) reverse transcriptase (Bethesda Research Laboratory, Gaithersburg, MD, U.S.A.) を用いて総容積 45 μl で 37°C, 1 時間インキュベーションし complementary DNA を合成した。合成産物を直接用いて、polymerase chain reaction (PCR)<sup>37)38)</sup> を行った。2 つの oligonucleotides (primer 1; 5' GCTGCTCATTGGGAAC-TTTG, primer 2; 5' GCTAGCCTTGGACAGAG) は Applied Biosystems Inc. の Automated DNA synthesizer model 391 を用いて作成した。PCR は denaturation (93°C, 30秒), annealing (55°C, 30秒), extension (72°C, 3分) を 30 回繰り返した。PCR 産物を 1.8% アガロースゲル電気泳動をし、ethidium bromide 染色し、さらに、Southern blotting 後、pcD2-HS1204

の KpnI 断片 (nucleotides 850-1608) をプローブとしてハイブリダイゼーションを行った。

## 結 果

### 1. 46 kDa タンパクの cDNA クローニング

cDNA のスクリーニングは、46 kDa タンパクのトリプシン分解により得られた部分アミノ酸配列は degeneracy の高いコドンを含むアミノ酸が多く含まれていたために、ヒトの codon usage frequency を利用して、各々のアミノ酸に一つのコドン当てがうことにより unique な配列をもつ 33 mer の oligonucleotide (oligonucleotide 1) を合成して、スクリーニングを行った。ハイブリダイゼーションは、 $6 \times \text{SSC}$  中で  $50^\circ\text{C}$  という低い stringency で行い、12個の putative clones を得た。これらのクローンについて、更に、別のアミノ酸配列から合成した、complete mixture からなる第2の oligonucleotide probe (oligonucleotide 2) を用い

てハイブリダイゼーションを行ったところ、両方の oligonucleotide probe にハイブリダイズするクローン 2HS1013 が得られた。その塩基配列の解析から2つの tryptic peptides のアミノ酸配列と完璧な colinearity が認められ、46 kDa タンパクをコードする cDNA としての identity が証明された (図 1: 下線部)。更に、この cDNA を reading frame を合わせて pUC19 の multicloning site に挿入し、lacZ の  $\alpha$ -peptide との fusion protein として大腸菌 JM83 で発現させ、Western blotting により解析を行ったところ、46 kDa タンパクに対する抗体に反応するタンパクが発現していることが確認されこのクローンの 46 kDa タンパクをコードする cDNA としての identity を裏付ける結果が得られた (図 2)。

最初にスクリーニングを行った Clontech Laboratories 社のヒト線維芽細胞 cDNA ライブラリーには full-length の cDNA が含まれていなかったために、米国 National

CAGAGCCCAACACATACAGCTGATACACGCAGACCAGATCTGGTCAGGTCCTCGGAAGCTGAGTCCAGAGCG	ATG CTG CTG AAG ACA GTG CTC TTG CTG GGA CAT	105
	Met Leu Leu Lys Thr Val Leu Leu Leu Gly His	11
GTG GCC CAG GTG CTG ATG CTG GAC AAT GGG CTC CTG CAG ACA CCA CCC ATG GGC TGG CTG GCC TGG GAA CGC TTC CGC TGC AAC ATT		192
Val Ala Gln Val Leu Met, <u>Leu Asp Asn Gly Leu Leu Gln Thr Pro Pro Met Gly Trp Leu Ala Trp Glu</u> Arg Phe Arg Cys Asn Ile		40
AAC TGT GAT GAG GAC CCA AAG AAC TGC ATA AGT GAA CAG CTC TTC ATG GAG ATG GCT GAC CGG ATG GCA CAG GAT GGA TGG CGG GAC		279
Asn Cys Asp Glu Asp Pro Lys Asn Cys Ile Ser Glu Gln Leu Phe Met Glu Met Ala Asp Arg Met Ala Gln Asp Gly Trp Arg Asp		69
ATG GGC TAC ACA TAC CTC AAC ATT GAT GAC TGC TGG ATC GGT GGT CGC GAT GCC AGT GGC CGC CTG ATG CCG GAT CCC AAG CGC TTC		366
Met Gly Tyr Thr Tyr Leu Asn Ile Asp Asp Cys Trp Ile Gly Gly Arg Asp Ala Ser Gly Arg Leu Met Pro Asp Pro Lys Arg Phe		98
CCT CAT GGC ATT CCT TTC CTG GCT GAC TAC GTT CAC TCC CTG GGC CTG AAG TTG GGT ATC TAC GCG GAC ATG GGC AAC TTC ACC TGC		453
Pro His Gly Ile Pro Phe Leu Ala Asp Tyr Val His Ser Leu Gly Leu Lys Leu Gly Ile Tyr Ala Asp Met Gly, <u>Arg Phe Thr Cys</u>		127
ATG GGT TAC CCA GGC ACC ACA CTG GAC AAG GTG GTC CAG GAT GCT CAG ACC TTC GCC GAG TGG AAG GTA GAC ATG CTC AAG CTG GAT		540
Met Gly Tyr Pro Gly Thr Thr Leu Asp Lys, <u>Val Val Gln Asp Ala Gln Thr Phe Ala Glu Trp Lys</u> , Val Asp Met Leu Lys Leu Asp		156
GGC TGC TTC TCC ACC CCC GAG GAG CGG GCC CAG GGG TAC CCC AAG ATG GCT GCT GCC CTG AAT GCC ACA GGC CGC CCC ATC GCC TTC		627
Gly Cys Phe Ser Thr Pro Glu Glu Arg Ala Gln Gly Tyr Pro Lys Met Ala Ala Ala Leu Asn Ala Thr Gly Arg Pro Ile Ala Phe		185
TCC TGC AGC TGG CCA GCC TAT GAA GCG GGC CTC CCC CCA AGG GTG AAC TAC AGT CTG CTG GCG GAC ATC TGC AAC CTC TGG CGT AAC		714
Ser Cys Ser Trp Pro Ala Tyr Pro Pro Arg Val Asn Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Ile Cys Asn Leu Trp Arg Asn		214
IAT GAT GAC ATC CAG GAC TCC TGG TGG AGC GTG CTC TCC ATC CTG AAT TGG TTC GTG GAC CAG CAG ATA CTG CAG CCA GTG GCC		801
Tyr Asp Asp Ile Gln Asp Ser Trp Trp Ser Val Leu Ser Ile Leu Asn Trp Phe Val Glu His Gln Asp Ile Leu Gln Pro Val Ala		243
GGC CCT GGG CAC TGG AAT GAC CCT GAC ATG CTG CTC ATT GGG AAC TIT GGT CTC AGC TTA GAG CAA TCC CGG GCC CAG ATG GCC CTG		888
Gly Pro Gly His Trp Asn Asp Pro Asp Met Leu Leu Ile Gly Asn Phe Gly Leu Ser Leu Glu Gln Ser Arg Ala Gln Met Ala Leu		272
TGG ACG GTG CTG GCA GCC CCC CTC TTG ATG TCC ACA GAC CTG CGT ACC ATC TCC GCC CAG AAC ATG GAC ATT CTG CAG AAT CCA CTC		975
Trp Thr Val Leu Ala Ala Pro Leu Leu Met Ser Thr Asp Leu Arg Thr Ile Ser Ala Gln Asn Met Asp Ile Leu Gln Asn Pro Leu		301
ATG ATC AAA ATC AAC CAG GAT CCC TTA GGC ATC CAG GGA CGC AGG ATT CAC AAG GAA AAA TCT CTC ATC GAA GTG TAC ATG CGG CCT		1062
Met Ile Lys Ile Asn Gln Asp Pro Leu Gly Ile Gln Gly Arg Arg Ile His Lys Glu Lys Ser Leu Ile Glu Val Tyr Met Arg Pro		330
CTG TCC AAC AAG GCT AGC GCC TTA GTC TTC TTC AGC TGC AGG ACC GAT ATG CCT TAT CGC TAC CAC TCC TCC CTT GGC CAG CTG AAC		1149
Leu Ser Asn Lys Ala Ser Ala Leu Val Phe Phe Ser Cys Arg Thr Asp Met Pro Tyr Arg Tyr His Ser Ser Leu Gly Gln Leu Asn		379
TTC ACC GGG TCI GTG ATA TAT GAG GCC CAG GAC GTC TAC TCA GGT GAC ATC ATC AGT GGC CTC CGA GAT GAA ACC AAC TTC ACA GTG		1236
Gly Thr Gly Ser Val Ile Tyr Glu Ala Gln Asp Val Tyr Ser Gly Asp Ile Ser Gly Leu Thr Asn Phe Thr Val		388
ATC ATC AAC CCT TCA GGG GTA GTG ATG TGG TAC CTG TAT CCC ATC AAG AAC CTG GAG ATG TCC CAG CAG TGAGGAGCTGGGACATGTGACAG		1328
Ile Ile Asn Pro Ser Gly Val Val Met Trp Tyr Leu Tyr Pro Ile Lys Asn Leu Glu Met Ser Gln Gln		
GCTGTGGTGGCACCCTAGGCTAGACCATTGGACCTTGGCATGCCAGGGCAAGTGGGGAGGTTCTCTGCTCCCGAGGCCCTGCTCGGTGACTGACCCCATCATACCCAAAGTGCA		1444
ATCTCAGCGCCAGGTTCTATGCCCTTGCCAAGCGTAACCCCTCTTGGAACTCTTTTGGGGCAATTTTCTGTGGCCCTTCTGGCCCTACTTCCATGTGCGCAGCCCCACAGAC		1360
GTGTGCTGAGCAACTCGCCAGCCCTCTGAGCTCCATGCCATCAGGACTCTAGCCTCTGACCTTGTGACTCTGAAATCAGGATTTGGAAGTTTTCGAATTAGAGTAGAGAGA		1676
TCTGACCTCTTGGCAGGAATGCCCATGGATCATGTGATTGGCTTTTCTACCATAGAGGCCCTTGCAGCCCTGATACCACCTGGGAGTGAGGGTCAACAAGGAGACCTTGGCTCCCT		1792
CAGGTAC <u>CAATAA</u> CCTGTTCTTAAATC(A) <sub>n</sub>		

図 1 ヒト  $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase cDNA (pcD2HS-1225) の全塩基配列<sup>16)</sup>

下線部は化学的に決定されたアミノ酸配列、矢印は signal peptide cleavage site, ダイヤモンドは N 結合型糖鎖付加可能部位、四角は polyadenylation signal を示す。

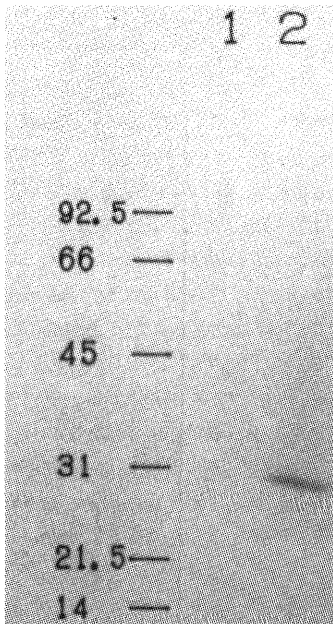


図2 pUC19を用いた fusion protein の発現

レーン1は pUC19, レーン2は λHS1013 を pUC19 に組み込んだもの。

Institute of Mental Health の岡山博人博士から pcD2 ベクターを用いて作られたヒト線維芽細胞の cDNA ライブラリー<sup>26)</sup> の供与を受け、このライブラリーのスクリーニングから、6つの全長と思われる cDNA を単離した。これらのうちで最長の pcD2-HS1204 の塩基配列の解析を行ったところ poly A tail, consensus の polyadenylation signal を有し、46 kDa タンパクをコードする唯一の open reading frame が存在し、translation initiation site と考えられる ATG の上流に in frame

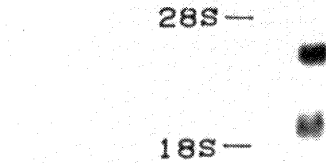


図3 HeLa 細胞 poly(A) RNA を用いた Northern 解析  
pcD2-HS1204 をプローブとし 2.2kb のバンドに相当する全長の cDNA が得られたことを示す。

の終始コドンが存在し、HeLa 細胞の polyA (+) RNA を用いた Northern blotting の結果 (図3) を合わせて、全長の cDNA が得られたと考えられた。なお、図3 で高分子側の RNA については、スプライシング前の nuclear transcript の可能性が考えられるが、結論は得られていない。

2. 46 kDa タンパクは α-N-acetylgalactosaminidase である

相同性の検索の結果、この pcD2-HS1204 はヒト α-ガラクトシダーゼ A<sup>39) 40)</sup> 及び酵母 α-ガラクトシダーゼ<sup>41)</sup> との間に非常に高い相同性が認められ、pcD2-HS1204 から予想されるアミノ酸配列とヒト α-ガラクトシダーゼ A および酵母 α-ガラクトシダーゼのアミノ酸配列との間には各々 50.6%, 31.8% と非常に高い相同性を認めた。この結果から、46 kDa タンパクが α-ガラクトシダーゼ A に関連の深いタンパクであることが示唆され、従来から α-ガラクトシダーゼ A のアイソエンザイムとして知られている α-N-acetylgalactosaminidase (α-galactosidase B) である可能性が示唆され、精製 46

表1 46kDa タンパクの精製と α-N-acetyl-galactosaminidase 活性<sup>14)</sup>

	total activity n moles/min	specific activity n moles/min/mg protein	ratio (α-NAG/α-Gal)	purification fold
glycoprotein fraction	255.8(120.5)*	0.105(0.0495)*	2.12	1
PATG	57.2( 15.0)	3.14 (0.905)	3.47	29.9
HPLC (Diol 300)	37.2( 9.3)	8.86 (2.22)	4.00	84.4
hydroxylapatite	28.2( 7.4)	17.6 (4.61)	3.82	167.6

\*, α-galactosidase activities are shown in parentheses.

α-NAG, α-N-acetylgalactosaminidase.

α-Gal, α-galactosidase.

PATG, p-aminophenylthio-β-D-galactose-CH-Sepharose chromatography.

kDa, および COS 細胞で 46 kDa タンパクをコードする cDNA を発現させ, その基質特異性を検討した.

46 kDa タンパクの精製の各ステップに於けるサンプルについての  $\alpha$ -ガラクトシダーゼ活性及び  $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase 活性を検討した (表 1). 46 kDa タンパクを含む画分において確かに  $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase 活性が存在し, 精製に伴い  $\alpha$ -ガラクトシダーゼ活性及び  $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase 活性はその比活性の上昇を認め, さらに  $\alpha$ -ガラクトシダーゼ活性と  $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase 活性との間の活性比についてはいずれのステップでもほぼ同じであった.

$\alpha$ -ガラクトシダーゼ A と  $\alpha$ -ガラクトシダーゼ B との区別の目的にて精製した 46 kDa タンパクの hydroxylapatite column chromatography を行ったところ, 従来の研究から  $\alpha$ -ガラクトシダーゼ A の溶出される画分には  $\alpha$ -ガラクトシダーゼ活性は認められず,  $\alpha$ -ガラクトシダーゼ B の認められる画分に単峰性のタンパクの溶出を認め, そのピークに一致して  $\alpha$ -ガラクトシダーゼ活性及び  $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase 活性を認めた (図 4-A). 更にそのピークの画分は SDS-PAGE 上 46 kDa の single band を認めた (図 4-B).

得られたクローン pcD2-HS1204, pcD2-HS1207, pcD2-HS1225, pcD2-HS1237 を用いて COS 細胞に

導入し transient expression の系にて発現を検討した. pcD2-HS1207, pcD2-HS1225, pcD2-HS1237 を transfect した COS 細胞ではコントロールに比べて各々 8.5, 13.5, 10.7 倍の  $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase の活性を示した. pcD2-HS1204 を transfect した場合には有意の活性発現は認められなかった (表 2).

ヒト胎盤糖タンパク画分の SP-Sephadex カラムクロマトグラフィーにおける挙動は図 5-A に示すとおりであり, 最初のピークには  $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase 活性および  $\alpha$ -galactosidase 活性の両者を認め 0.5 M NaCl で溶出されてくるもう一つのピークでは  $\alpha$ -galactosidase 活性のみを認めた. 以上のことは最初のピークは  $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase ( $\alpha$ -galactosidase B)

表 2 COS 細胞における  $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase 活性の発現<sup>16)</sup>

DNA	$\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase activity
None	1.2 $\pm$ 0.6 n moles/min./mg protein
pcD2-HS1204	1.4 $\pm$ 0.3
pcD2-HS1207	10.2 $\pm$ 3.4
pcD2-HS1225	16.2 $\pm$ 1.4
pcD2-HS1237	12.8 $\pm$ 2.3

Values are expressed as mean+S.E.M.

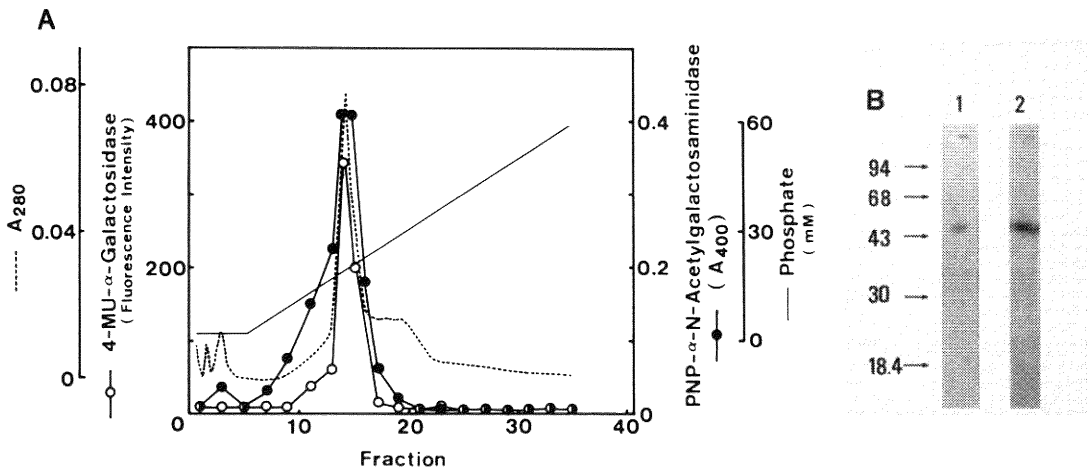
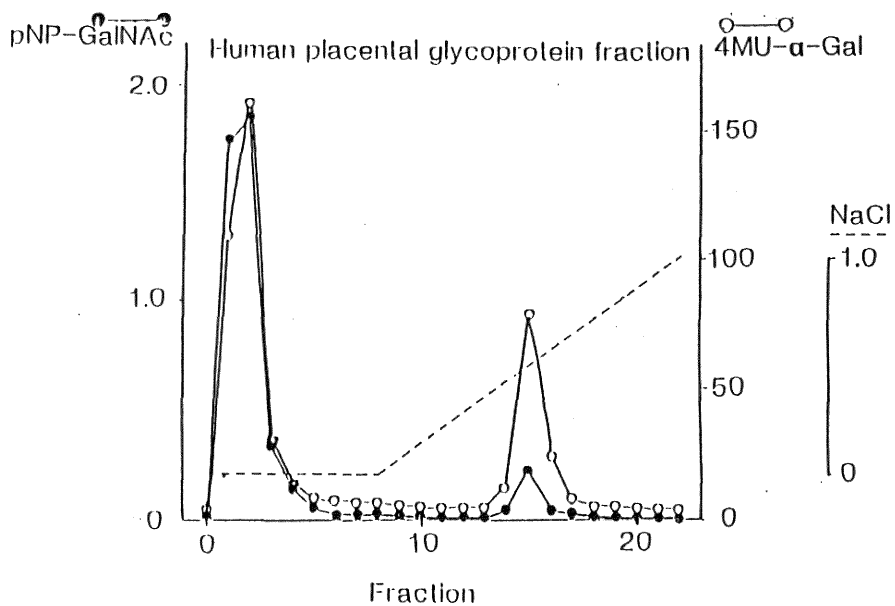


図 4 A. 46kDa タンパク画分の Hydroxylapatite column chromatography<sup>14)</sup>  
 ○—;  $\alpha$ -ガラクトシダーゼ活性  
 ●—;  $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase 活性  
 B. 46kDa タンパク画分の SDS-PAGE および抗46kDa タンパク抗体を用いた immunoblot による解析  
 レーン1はクマシーブルー染色, レーン2は抗46kDa タンパク抗体を用いた immunodetection.

A

## SP-Sephadex column chromatography



B

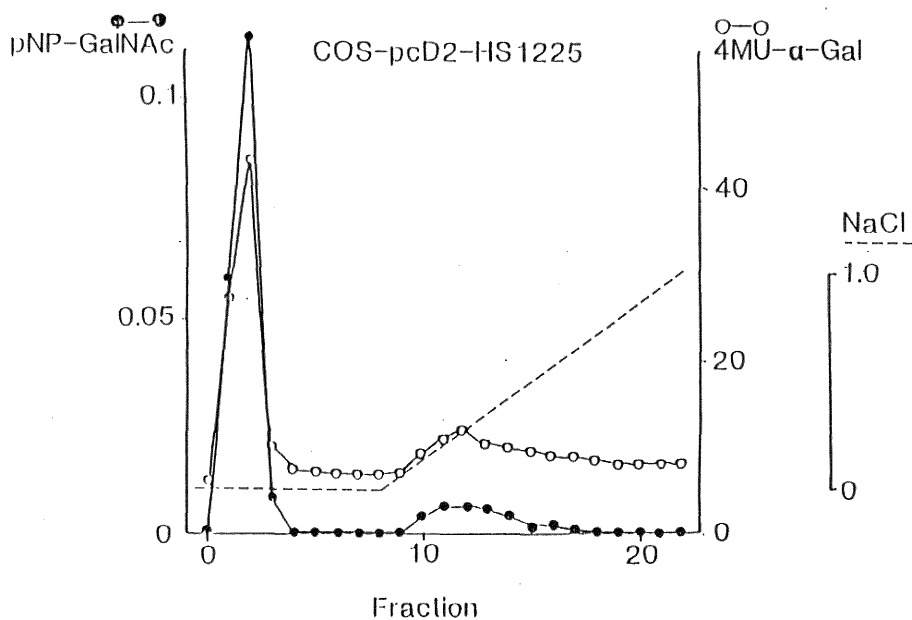


図5 A. ヒト胎盤糖タンパク画分の SP-Sephadex カラムクロマトグラフィー。  
 B. pcD2-HS1225 を transfect した COS 細胞の糖タンパク画分の SP-Sephadex カラムクロマトグラフィー。



を、もう一方のピークは  $\alpha$ -galactosidase A であることを示している<sup>35)</sup>。図 5-B には pcD2-HS1225 を transfect した COS 細胞の糖タンパク画分の SP-Sephadex カラムクロマトグラフィーを示した。この画分は  $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase ( $\alpha$ -galactosidase B) に相当する単一のピークを示した。

3. ヒト  $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase cDNA の塩基配列の解析

塩基配列の解析より、pcD2-HS1204 の塩基配列は、pcD2-HS1207、pcD2-HS1225 及び pcD2-HS1237 と比較すると図 6-A に示すように C 末端近傍に 70 bp の挿入配列を持ち、そのために pcD2-HS1207、pcD2-HS1225 及び pcD2-HS1237 の open reading frame との間において frame shift を認め、その結果挿入部

以降のアミノ酸配列が異なったものとなることが示された。この 70 bp の挿入配列はその挿入を認める部位の直上の配列と非常に高い相同性を持ち、さらにこの挿入配列の中には 5' CTGGATGCCTAAGGGATGCTG というモチーフの繰り返しを認めた(図 6-B, 6-C)。pcD2-HS1201、pcD2-HS1204 及び pcD2-HS1209 に於ける 5' 側及び 3' 側の非翻訳部位の塩基配列は同一のものであったが、これらの中で poly A tail の長さは異なっていた。ヒト皮膚線維芽細胞、HeLa 細胞、脳などの poly A(+) RNA をもととして逆転写酵素を用いて cDNA とした後、挿入部をさむようにして polymerase chain reaction を行い messenger RNA (mRNA) の種類を解析したところ大部分の mRNA は挿入配列を含まないものであることがわかった。

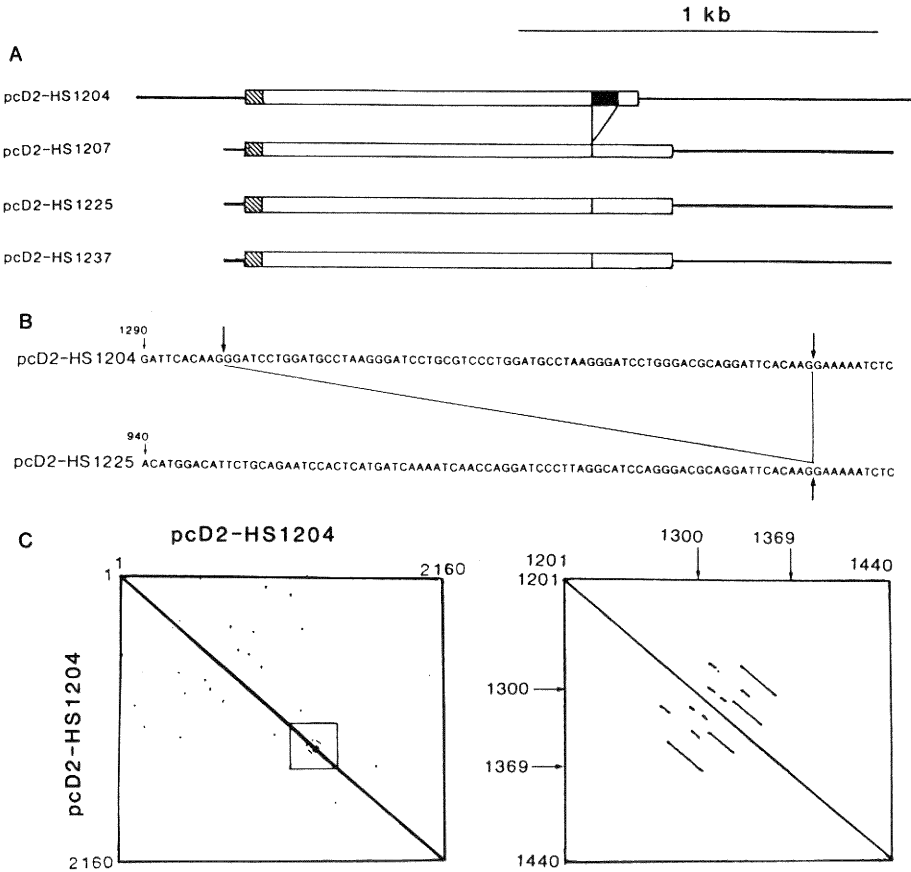


図 6 A. ヒト  $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase cDNA (pcD2-HS1204, pcD2-HS1207, pcD2-HS1225, pcD2-HS1237) の physical map.  
 B. pcD2-HS1204 に認められた 70bp の挿入配列。  
 C. pcD2-HS1204 の挿入部に認められた繰り返し配列のモチーフ<sup>16)</sup>。

図1に全長のヒト  $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase cDNA (pcD2-HS1225) の全塩基配列を示す。pcD2-HS1225 は1821塩基対からなり、poly A tail 及び consensus の polyadenylation signal 配列を認めた。46 kDa のタンパクをコードする唯一の open reading frame が存在し、この open reading frame は17個のアミノ酸からなるシグナルペプチドおよび成熟型のタンパクとして394個のアミノ酸をコードしている。下線部はアミノ末端およびトリプシン消化により得られたアミノ酸配列と完全に一致しているところである。コーディング部位内に6ヶ所のN結合型糖鎖付加可能部位が同定された。この pcDHS1225 はヒト  $\alpha$ -ガラクトシダーゼAと核酸で57.9%、アミノ酸で52.2%と高い相同性を認めた。また、その相同性は5'側で非常に高いことに比べ3'側では低いことがわかった。更にC末端の2つを除いた8つのシステイン残基がヒト  $\alpha$ -ガラクトシダーゼAとこの46 kDa 蛋白の間で保存されていた。

4. COS細胞における一過性発現系を用いた  $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase の基質特異性  
pcD2-HS1225 を transfect した COS 細胞は、pNP-GalNAc, Forssman hapten に対して 16.0, 0.0020

nmole/mg protein/min. の  $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase 活性を示した。4MU- $\alpha$ -Gal に対して 0.12 nmole/mg protein/min. の  $\alpha$ -galactosidase 活性を示した (図7)。

4MU- $\alpha$ -Gal に対する  $K_m$  値は COS 細胞そのものでは、1.43 mM であるのに対し、pcD2-HS1225 を transfect して発現する  $\alpha$ -galactosidase では 41.7 mM であった (図8)。天然基質として Forssman hapten,

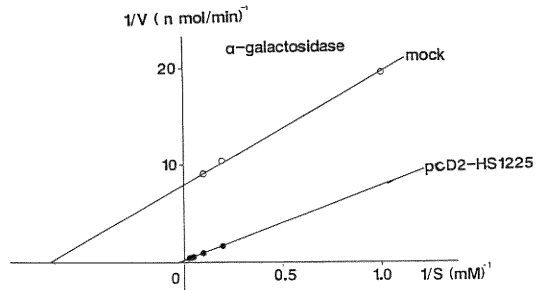


図8 4-methylumbelliferyl- $\alpha$ -galactopyranoside

●—; pcD2-HS1225 を transfect した COS 細胞。  
○—; mock transfect した COS 細胞。

$\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase     $\alpha$ -galactosidase    Forssman antigen

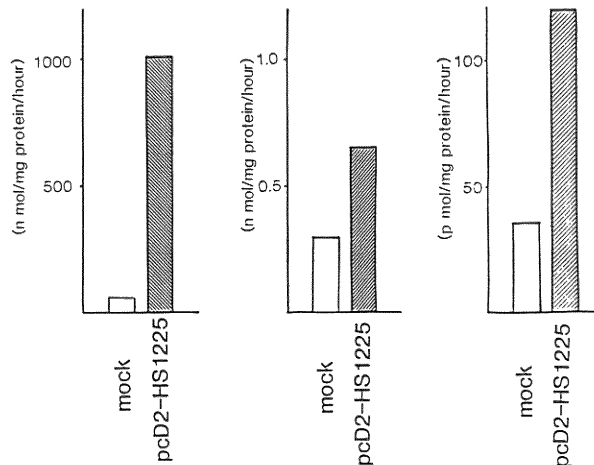


図7 pcD2-HS1225 を transfect した COS 細胞の pNP-N-acetyl- $\alpha$ -galactosaminide に対する  $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase 活性(左), 4MU- $\alpha$ -galactopyranoside に対する  $\alpha$ -galactosidase 活性(中央), および Forssman hapten に対する  $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase 活性(右)。

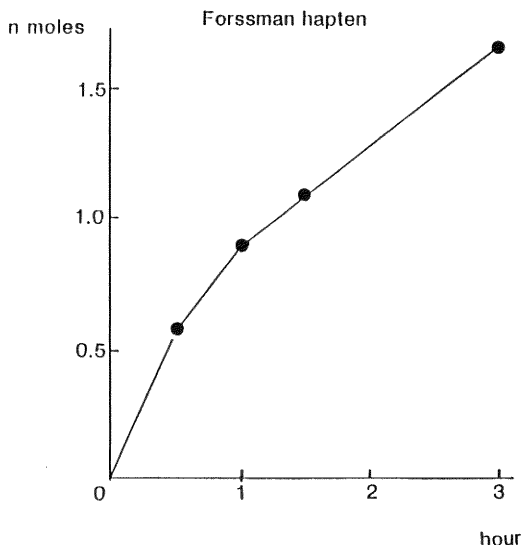


図9 pcD2-HS1225 を transfect した COS 細胞の Forssman hapten に対する  $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase 活性

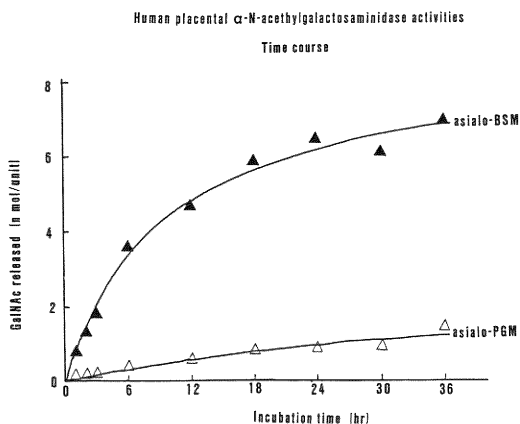


図10 pcD2-HS1225 を transfect した COS 細胞の各種ムチンに対する  $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase 活性

アシアロ化された牛頸下腺ムチン、同じくアシアロ化されたブタ胃粘膜ムチンに対し、pcD2-HS1225 を transfect した COS 細胞は  $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase を示すことが確認された (図9, 図10)。

5.  $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase ( $\alpha$ -galactosidase B) 欠損症の病態解析

本酵素欠損症患者の尿中から排泄された amino acid glycosides から調整した GalNAc $\alpha$ 1-Ser(Thr)-DNS

表3 pcD2-HS1225 を transfect したCOS 細胞の GalNAc $\alpha$ 1-Ser (Thr) に対する  $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase 活性

DNA	$\alpha$ -GalNAc-Ser (Thr)	hydrolyzed (p mole)
incubation time	12 hours	24 hours
none	4	9
pcD2-HS1225	11	38

を基質とし、pcD2-HS1225 を transfect した COS 細胞、あるいは mock transfect した COS 細胞を酵素源として酵素活性を検討したところ pcD2-HS1225 を transfect した COS 細胞は GalNAc $\alpha$ 1-Ser(Thr)-DNS に対して明らかに  $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase 活性を有していることが示された (表3)。 $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase 欠損症患者の尿中に排泄される amino acid glycosides (NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$ 1-Ser(Thr), NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3(NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4GalNAc $\beta$ 1-6)GalNAc $\alpha$ 1-Ser(Thr), NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3(NeuAc $\alpha$ 2-6)GalNAc $\alpha$ 1-Thr-Pro に対しては  $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase 活性は示さなかった。

考 察

ライソゾーム酵素の cDNA クローニングを行う際の第一の問題点はどの細胞をとっていてもメッセンジャー RNA の発現レベルが低く、抗体を用いるスクリーニングにせよ、オリゴヌクレオチドプローブによるスクリーニングを行うにせよ、多くの組換え体をスクリーニングする必要があり、その結果 false-positive のクローンを得る確率が高くなるという点にある。そこで考慮した点は、

- (1) ライソゾーム酵素の発現量の比較的高い細胞である線維芽細胞の cDNA ライブラリーを用いる。
- (2) 11アミノ酸からなる比較的長いアミノ酸部分配列が得られたので各アミノ酸に最も使用頻度の高いと思われるコドンをあてがい 33 mer という比較的長いオリゴヌクレオチドプローブを合成した。この 33 mer のうち10カ所が codon usage frequency を用いて決定された。スクリーニングの過程ではこのうち50~60%が正しければハイブリッド形成するような条件を設定して一次スクリーニングを行った。結果的には10カ所のうち7カ所までが正しいコドンであった。このような strategy では血液凝固因子のうちの Factor VIII の cDNA クロー

ニングをはじめ<sup>42)</sup>, 多くの cDNA クローニングで成功しており, きわめて有効な方法と考えられる.

ヒト  $\alpha$ -ガラクトシダーゼAとその isoenzyme として知られている酵素,  $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase ( $\alpha$ -galactosidase B) について表 2 にまとめた<sup>43)</sup>.  $\alpha$ -ガラクトシダーゼAの欠損する病態は Fabry 病として知られている<sup>43)</sup>. Fabry 病で残存する10~15%の  $\alpha$ -ガラクトシダーゼ活性は  $\alpha$ -ガラクトシダーゼAの isoenzyme である  $\alpha$ -ガラクトシダーゼB由来のものとされている.  $\alpha$ -ガラクトシダーゼBはその後の研究で比較的広範囲な基質特異性を持ち,  $\alpha$ -ガラクトシダーゼ活性も持つが, その酵素としての実態は  $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase であることがわかっている<sup>18)19)20)</sup>.

$\alpha$ -ガラクトシダーゼAは 49kDa の subunit からなる homodimer,  $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase は 48kDa の subunit からなる homodimer として報告されており, 基質特異性, myoinositol での inhibition, 熱安定性, DEAE column chromatography 及び hydroxylapatite column chromatography, SP-Sephadex イオン交換カラムクロマトグラフィーに於ける挙動などで区別される<sup>18)19)20)29)44)45)46)</sup>.

$\alpha$ -ガラクトシダーゼAについてはその全長 cDNA クローニングが報告されているが<sup>40)</sup>  $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase についてはその molecular cloning は未だ報告されておらず, 今回の報告が最初のものである.  $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase をコードする cDNA としての証明は, COS 細胞での発現, SP-Sephadex column chromatography により確認された.

2種類の cDNA が単離された点について, 特に挿入配列を含んだ pcD2-HS1204 は  $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase 活性を示さなかったことから, その生理的意義は不明である. RT-PCR の解析結果からは pcD2 cDNA ライブラリーではこの挿入配列を含むクローンが大多数であることが示されたが, HeLa 細胞, 脳においては挿入配列を含まない pcD2-HS1225 のタイプが大部分であることが示された.

$\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase のゲノム DNA の解析はまだ行っていないが,  $\alpha$ -ガラクトシダーゼAのゲノム DNA の塩基配列を詳細に解析するとこの挿入配列のある部分はちょうどエクソン6とエクソン7の境界に存在することが示される<sup>47)</sup>. 従って一つの可能性としては2種類のメッセンジャー RNA が alternative

表 4 ヒト  $\alpha$ -galactosidase A とヒト  $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase ( $\alpha$ -galactosidase B) の比較<sup>18)19)20)29)44)45)46)</sup>

	$\alpha$ -galactosidase A	$\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase ( $\alpha$ -galactosidase B)
M.W. (subunit)	49kDa	48kDa
structure	homodimeric	homodimeric
substrate	$\alpha$ -galactose	$\alpha$ -galactose
Km	3.4mM	20mM
substrate		$\alpha$ -N-acetylgalactosamine
Km		1mM
optimal pH	3.8~4.0	3.9~4.8
% of total $\alpha$ -galactosidase	80~90%	10~20%
myoinositol	inhibiting	non-inhibiting
heat stability	unstable	stable
DEAE column	pass through	eluated with 0.2M NaCl
hydroxylapatite column	eluated with 1mM phosphate	eluated with 15mM phosphate
SP-Sephadex column	eluated with 0.5M NaCl	pass through
deficiency	Fabry's disease	Schindler disease Kanzaki disease

表 5  $\alpha$ -N-acetylgalactosaminyl 基を含む glycoconjugates<sup>43)</sup>

	Structure	Trivial Name	References
Glycosphingolipids:	$\begin{array}{l} \text{GalNAc}\alpha(1\rightarrow3) \\ \text{Fuc}\alpha(1\rightarrow2) \end{array} \text{Gal}\beta(1\rightarrow3)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow3) \text{Gal}\beta(1\rightarrow4)\text{Glc}\beta(1\rightarrow1)\text{Cer}$	A <sup>B</sup> Type 1 chain	438-440
	$\begin{array}{l} \text{GalNAc}\alpha(1\rightarrow3) \\ \text{Fuc}\alpha(1\rightarrow2) \end{array} \text{Gal}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow3) \text{Gal}\beta(1\rightarrow4)\text{Glc}\beta(1\rightarrow1)\text{Cer}$	A <sup>B</sup> Type 2 chain	438-440
	$\text{GalNAc}\alpha(1\rightarrow3)\text{GalNAc}\beta(1\rightarrow3) \text{Gal}\alpha(1\rightarrow4)\text{Gal}\beta(1\rightarrow4)\text{Glc}\beta(1\rightarrow1)\text{Cer}$	Forsman antigen	441-444
Mucopolysaccharides:	$\begin{array}{l} R - \beta(1\rightarrow3)\text{Gal}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow6) \\ \text{NeuAc}\alpha(2\rightarrow3) \text{Gal}\beta(1\rightarrow3) \end{array} \text{GalNAc}(\alpha1\rightarrow) \text{O-Ser/Thr}$	Keratan sulfate, type II	437
O-Linked glycopeptides:	$\text{Gal}\beta(1\rightarrow3)\text{GalNAc}(\alpha1\rightarrow) \text{O-Ser/Thr}$		435, 436
	$\text{NeuAc}\alpha(2\rightarrow6) \text{GalNAc}(\alpha1\rightarrow) \text{O-Ser/Thr}$		436
	$\text{NeuAc}\alpha(2\rightarrow3) \text{Gal}\beta(1\rightarrow3)\text{GalNAc}(\alpha1\rightarrow) \text{O-Ser/Thr}$		436
	$\text{Fuc}\alpha(1\rightarrow2)\text{Gal}\beta(1\rightarrow3)\text{GalNAc}(\alpha1\rightarrow) \text{O-Ser/Thr}$		435, 445
	$\begin{array}{l} \text{Fuc}\alpha(1\rightarrow2) \text{Gal}\beta(1\rightarrow4) \text{GlcNAc}\beta(2\rightarrow6) \\ \text{Fuc}\alpha(1\rightarrow2) \text{Gal}\beta(1\rightarrow3) \end{array} \text{GalNAc}(\alpha1\rightarrow) \text{O-Ser/Thr}$		445
	$\begin{array}{l} \text{Gal}\beta(1\rightarrow4) \\ \text{Fuc}\alpha(1\rightarrow2) \end{array} \text{GlcNAc}\beta(2\rightarrow6) \text{GalNAc}(\alpha1\rightarrow) \text{O-Ser/Thr}$	SSEA-1 determinant	445
N-Linked glycopeptides:	$\begin{array}{l} \text{GalNAc}\alpha(1\rightarrow3) \\ \text{Fuc}\alpha(1\rightarrow2) \end{array} \text{Gal}\beta(1\rightarrow4) \text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow3)\text{Gal}\beta(1\rightarrow4)]_n \text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow6) \text{GalNAc}(\alpha1\rightarrow) \text{O-Ser/Thr}$	Blood group A mucin	435
	$\begin{array}{l} \text{Fuc}\alpha(1\rightarrow2) \text{Gal}\beta(1\rightarrow4) \text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow3)\text{Gal}\beta(1\rightarrow4)]_n \text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow3) \\ \text{NeuAc}\alpha(2\rightarrow6) \end{array} \text{GalNAc}(\alpha1\rightarrow) \text{O-Ser/Thr}$	Blood group A Hi glycopeptide	435
	$\begin{array}{l} \text{NeuACGal}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow6) \\ \text{[GlcNAc}\beta(1\rightarrow3)\text{Gal}\beta(1\rightarrow4)]_n \text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow4) \end{array} \text{Man}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc} \text{Asn}$		

splicing によって生じている可能性が考えられる。

またこの 70 bp の挿入配列はその挿入を認める部位の直上の配列と非常に高い相同性を持ち、更にこの挿入配列の中には 5' CTGGATGCCTAAGGGATGCTG という繰り返し配列を認めたが、これと類似の現象は erythrocyte ankyrin cDNA においても報告されている<sup>48)</sup>。

この  $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase は  $\alpha$ -ガラクトシダーゼ A の isoenzyme として発見され、精製された酵素は比較的広範囲な基質特異性を有すると報告されてきた<sup>18)19)20)</sup>。ヒトにおいて  $\alpha$ -N-acetylgalactosamine を持つ glycoconjugate が知られているが(表 5)、この  $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase cDNA を用いた発現実験により、本酵素が合成基質のみならず、糖タンパク、糖脂質、amino acid glycosides の全ての基質に対し、 $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase 活性を示すことが明らかになった。さらに本酵素は endo- $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase 活性は有しないことがわかった。

最近になり、この  $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase ( $\alpha$ -galactosidase B) 欠損の症例がドイツと本邦において報告され<sup>21)22)</sup>、これらの症例において尿中に大量に排

泄される amino acid glycosides についての構造が決定された<sup>23)</sup>(図 11)。これらの amino acid glycosides は O-結合型(ムチンタイプ)の sialylglucoaminoacid であり N-acetylgalactosamine が含まれてはいるが非還元末端には存在せずガラクトース、シアル酸が付加した形となっている。本酵素欠損症においてはシアリダーゼをはじめとする他のライソゾーム酵素には異常は認められず、これらの amino acid glycosides の生成機序

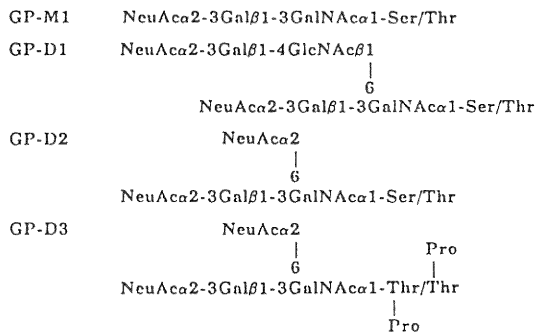


図 11 ヒト  $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase 欠損症に排泄される amino acid glycosides の構造<sup>23)</sup>

と  $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase 活性の欠損との関連については不明であった。今回の解析でこの  $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase には endo- $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase 活性は認められず、シアル酸、ガラクトースがはずれて N-acetylgalactosaminyl 基が非還元末端にきたときはじめて  $\alpha$  結合している N-acetylgalactosaminyl 基を分解することがわかった。このことは本酵素欠損症患者に認められる amino acid glycosides は、いったん GalNAc $\alpha$ 1-Ser(Thr) まで分解されたものが本酵素の欠損によりそれ以上分解されずにそれを core として、二次的にガラクトース、シアル酸が付加することにより生成された可能性を示している。類似の現象は asparatyglycosaminuria<sup>49)</sup> でも観察されており、本症の分子レベルでの病態解析の上で重要な知見と考えられた。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました宮武正教授に心から感謝の意を表します。また直接御指導いただきました辻省次助手に深く御礼申し上げます。更に、神経内科学部門小林央先生、神経薬理学部高橋康夫名誉教授、崎村建司助教授、自治医科大学神経内科学部門西澤正豊助教授、新潟薬科大学衛生化学教室宇田裕教授、平岩雅男助手、東京都立大学理学部生物化学奥山典生教授、磯辺俊明助教授、静岡県立大学薬学部生化学平林義雄助手らの諸先生に御指導、御助言を賜りましたことを深謝いたします。

尚、本研究の概要は、第5回国際先天代謝異常症学会（アメリカ，1990）、第15回国際炭水化合物学会（横浜，1990）、第41回アメリカ人類遺伝学会（シンシナティ，1990）等において発表した。

### 参 考 文 献

- 1) **Spranger, J. and Wiedemann, H.R.:** The Genetic Mucopolidoses. Diagnosis and Differential Diagnosis., *Humangenetik*, **9**: 113~139, 1970.
- 2) **Durand, P., Gatti, R., Cavalieri, S., Borrone, C., Tondeur, M., Michalski, J.C. and Strecker, M.:** Sialidosis (mucopolidosis I). *Helv. Pediat. Acta*, **32**: 391~400, 1977.
- 3) **Rapin, I., Glodfischer, S., Kazman, R., Engel, J. and O'Brien, J.:** The Cherry-Red Spot-Myoclonus Syndrome., *Ann. Neurol.*, **3**: 234~242, 1978.
- 4) **Miyatake, T., Yamada, T., Suzuki, M., Pallmann, B., Sandhoff, K., Ariga, T. and Atsumi, T.:** Sialidase Deficiency in Adult-type Neuronal Storage Disease., *FEBS Lett.*, **97**: 257~259, 1979.
- 5) **Miyatake, T., Atsumi, T., Obayashi, T., Mizumo, Y., Ando, S., Ariga, T., Matsui-Nakamura, K. and Yamada, T.:** Adult Type Neuronal Storage Disease with Neuraminidase Deficiency, *Ann. Neurolo.*, **6**: 323~244, 1979.
- 6) **Hiraiwa, M., Nishizawa, M., Uda, Y. and Miyatake, T.:** Human Placental Sialidase: Partial Purification and Characterization., *J. Biochem.*, **101**: 1273~1279, 1987.
- 7) **Hiraiwa, M., Nishizawa, M., Uda, Y., Nakajima, T. and Miyatake, T.:** Human Placental Sialidase: Further Purification and Characterization., *J. Biochem.*, **103**: 86~90, 1988.
- 8) **Norden, A.G.W., Tennant, L.L. and O'Brien, J.S.:** GM<sub>1</sub> Ganglioside  $\beta$ -Galactosidase A. Purification and Studies of The Enzyme from Human Liver., *J. Biol. Chem.*, **246**: 7969~7976, 1974.
- 9) **Frost, R.G., Holmes, E.W., Norden, A.G.W. and O'Brien, J.S.:** Characterization of Purified Human Liver Acid  $\beta$ -D-Galactosidase A<sub>2</sub> and A<sub>3</sub>. *Biochem. J.*, **175**: 181~188, 1978.
- 10) **d'Azzo, A., Hoogeveen, A., Reuser, A.D.J., Robinson, D. and Galjaard, H.:** Molecular Defect in Combined  $\beta$ -Galactosidase and Neuraminidase Deficiency in Man., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **79**: 4535~4539, 1982.
- 11) **Hoogeveen, A.T., Verheijen, F.W. and Galjaard, H.:** The Relation between Human Lysosomal  $\beta$ -Galactosidase and Its Protective Protein., *J. Biol. Chem.*, **258**: 12143~12146, 1983.
- 12) **Galjart, N.J., Gillemans, N., Harris, A., van der Horst, G.T., Verheijen, F.W., Galjaard, H. and d'Azzo, A.:** Expression of cDNA Encoding the Human "Protective Protein" Associated with Lysosomal  $\beta$ -Galactosidase and Neuraminidase: Homology to Yeast Proteases., *Cell*, **54**: 755~764, 1988.

- 13) 辻 省次, 山内豊明, 西澤正豊, 宮武 正, 平岩雅男, 宇田 裕, 崎村建司, 高橋康夫, 磯辺俊明, 奥山典生: ヒトシアリダーゼの分子生物学的研究, 厚生省遺伝性神経病発現の機構調節解明に関する研究班昭和63年度研究報告書, p.73~77, 1989.
- 14) **Tsuji, S., Yamauchi, T., Hiraiwa, M., Isobe, T., Okuyama, T., Sakimura, K., Takahashi, Y., Nishizawa, M., Uda, Y. and Miyatake, T.:** Molecular Cloning of Full-length cDNA for Human  $\alpha$ -N-Acetylgalactosaminidase ( $\alpha$ -Galactosidase B)., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **163**: 1498~1504, 1989.
- 15) 辻 省次, 山内豊明, 西澤正豊, 宮武 正, 平岩雅男, 宇田 裕, 崎村建司, 高橋康夫, 磯辺俊明, 奥山典生: ヒト  $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase の分子生物学的研究, 厚生省遺伝性神経病発現の機構調節解明に関する研究班平成元年度研究報告書, p. 59~64, 1990.
- 16) **Yamauchi, T., Hiraiwa, M., Kobayashi, H., Uda, Y., Miyatake, T. and Tsuji, S.:** Molecular Cloning of Two species of cDNAs for Human  $\alpha$ -N-Acetylgalactosaminidase and Expression in Mammalian Cells., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **170**: 231~237, 1990.
- 17) **Yamauchi, T., Hiraiwa, M., Hirabayashi, Y., Uda, Y., Miyatake, T. and Tsuji, S.:** Isolation and Expression of Human  $\alpha$ -N-Acetylgalactosaminidase cDNA., *Am. J., Hum. Genet.*, **47**: A170, 1990.
- 18) **Wigler, M., Pellicer, A., Silverstein, S. and Axel, R.:** Biochemical Transfer of Single-Copy Eucaryotic Genes Using Total Cellular DNA as Conor., *Cell*, **14**: 725~731, 1978.
- 19) **Beutler, E. and Kuhl, W.:** Purification and Properties of Human  $\alpha$ -Galactosidases., *J. Biol. Chem.*, **247**: 7195~7200, 1972.
- 20) **Dean, K.J., Sung, S.S. J. and Sweely, C.C.:** The Identification of  $\alpha$ -Galactosidase B from Human Liver as An  $\alpha$ -N-Acetylgalactosaminidase., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **77**: 1411~1417, 1977.
- 21) **van Digelen, O.P., Schindler, D., Kleijer, W.J., Huijmans, J.M.G., Galjaard, H., Linden, H.U., Peter-Katalinic, J., Egge, H., Dabrowski, U. and Cants, M.:** Lysosomal  $\alpha$ -N-Acetylgalactosaminidase Deficiency: A New Inherited Metabolic Disease., *Lancet I*, 804, 1987.
- 22) **Kanzaki, T., Yokota, M., Mizuno, N., Matsumoto, Y. and Hirabayashi, Y.:** Novel Lysosomal Glycoaminoacid Storage Disease with Angiokeratoma Corporis Diffusum., *Lancet I*, 875~877, 1989.
- 23) **Hirabayashi, Y., Matsumoto, Y., Matsumoto, M., Toida, T., Iida, N., Matsubara, T., Kanzaki, T., Yokota, M. and Ishizuka, I.:** Isolation and Characterization of Major Urinary Amino Acid O-Glycosides and a Dipeptide o-Glycoside from New Lysosomal Storage Disorder (Kanzaki Disease)., *J. Biol. Chem.*, **265**: 1693~1701, 1990.
- 24) **Jaye, M., de la Salle, H., Schamber, F., Balland, A., Kohli, V., Findeli, A., Tolstoshev, P. and Lecocq, J-P.:** Isolation of A Human Antihaemophilic Factor IX cDNA Clone Using A Unique 52-base Synthetic Oligonucleotide Probe Deduced from the Amino Acid Sequence of Bovine Factor IX., *Nucl. Acids Res.*, **11**: 2325~2335, 1983.
- 25) **Crantham, R., Gautier, C., Gouy, M., Jacobzone, M. and Mercier, R.:** Codon Catalog Using Is A Genomic Strategy Modulated for Gene Expressivity., *Nucl. Acids Res.*, **9**: r43~r74, 1981.
- 26) **Chen, C. and Okayama, H.:** High-Efficiency Transformation of Mammalian Cells by Plasmid DNA., *Mol. Cell Biol.*, **7**: 2745~2752, 1987.
- 27) **Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R.:** DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **74**: 5463~5467, 1977.
- 28) **Chen, E.Y. and Seeburg, P.H.:** Supercoil Sequencing: A Fast and Simple Method for Sequencing Plasmid DNA., *DNA*, **4**: 165~170, 1985.
- 29) **Biggin, M.D., Gibson, T.J., and Hong, G.F.:** Buffer Gradient Gels and 35S Label as An Aid to Rapid DNA Sequence Determination., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **80**: 3963~3965, 1983.
- 30) **Dean, K.J. and Sweely, C.C.:** Studies on

- Human Liver  $\alpha$ -Galactosidases. I. Purification of  $\alpha$ -Galactosidase A and Its Enzymatic Properties with Glycolipid and Oligosaccharide Substrates., *J. Biol. Chem.*, **254**: 9994~10000, 1979.
- 31) **Graham, E.L. and van der Eb, A.J.:** A New Technique for the Assay of Infectivity of Human Adenovirus 5 DNA., *Virology*, **52**: 456~467, 1973.
- 32) **Schram, A.W., Hamers, M.N. and Tager, J.M.:** The Identity of  $\alpha$ -Galactosidase B form Human Liver., *Biochem. Biophys. Acta.*, **482**: 138~144, 1977.
- 33) **Israel, M., Bach, G., Miyatake, T., Naiki, M. and Suzuki, K.:** Forssman Hapten N-Acetyl- $\alpha$ -D-Galactosaminidase in Rat Brain and Kidney., *J. Neurochem.*, **23**: 803~809, 1974.
- 34) **Reissing, J.L., Strominger, J.L. and Leloir, L.F.:** A Modified Colorimetric Method for the Estimation of N-Acetylamino Sugars. *J. Biol. Chem.* **217**: 959~966, 1955.
- 35) **Kusiak, J.W., Quirk, J.M. and Brady, R.O.:** Purification and Properties of the Two Major Isoenzymes of  $\alpha$ -Galactosidase from Human Placenta., *J. Biol. Chem.*, **253**: 184~190, 1978.
- 36) **Kobayashi, H., Sakimura, K., Kuwano, R., Sato, S., Ikuta, F., Takahashi, Y., Miyatake, T. and Tsuji, S.:** Stability of Messenger RNA in Postmortem Human Brains and Construction of Human Brain cDNA Libraries., *J. Mol. Neurosci.*, **2**: 29~34, 1990.
- 37) **Saiki, R., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. and Arnheim, N.:** Enzymatic Amplification of  $\beta$ -Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia., *Science*, **230**: 1350~1354, 1985.
- 38) **Chelly, J., Kapln, J.C., Marie, P., Gautron, S. and Kahn, A.:** Transcription of The Dystrophin Gene in Human Muscle and Non-Muscle Tissues., *Nature*, **333**: 858~860, 1988.
- 39) **Bishop, D.F., Calhoun, D.H., Bernstein, H.S., Hantzopoulos, P., Quinn, M. and Desnick, R.J.:** Human  $\alpha$ -Galactosidase A: Nucleotide Sequence of A cDNA Clone Encoding The Mature Enzyme., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **82**: 4859~4863, 1986.
- 40) **Tsuji, S., Martin, B.M., Kaslow, D.C., Migeon, B.R., Choudary, P.V., Stubblefield, B.K., Mayor, J.A., Murray, G.J., Barranger, J.A. and Ginns, E.I.:** Signal Sequence and DNA-Mediated Expression of Human Lysosomal  $\alpha$ -Galactosidase A., *Eur. J. Biochem.*, **165**: 275~280, 1987.
- 41) **Liljestrom, P.L. and Liljestrom, P.:** Nucleotide Sequence of the melA Gene, Coding for  $\alpha$ -Galactosidase in Escherichia coli K-12., *Nucl. Acids Res.*, **15**: 2213~2221, 1987.
- 42) **Wood, W.I., Capon, D.J., Simonsen, C.C., Eaton, D.L., Gitschier, J., Keyt, B., Seeburg, P.H., Smith, D. H., Hollingshead, P., Wion, K.L., Delwart, E., Tuddenham, E.G.D., Vehar, G.A. and Lawn, R.M.:** Expression of Active Human Factor VIII from Recombinant DNA Clones., *Nature* **312**: 330~337, 1984.
- 43) **Desnick, R.J. and Bishop, D.F.:** Fabry Disease:  $\alpha$ -Galactosidase Deficiency; Schindler Disease:  $\alpha$ -N-Acetylgalactosaminidase Deficiency., In *The Metabolic Basis of Inherited Disease.* (Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S. and Valle, D.) 6th ed. pp 1751~1796, 1989, McGraw-Hill, New York, NY.
- 44) **Dean, K.J. and Sweely, C.C.:** Studies on Human Liver  $\alpha$ -Galactosidases. III. Partial Characterization of Carbohydrate-Binding Specificities, *J. Biol. Chem.*, **254**: 10006~10010, 1979.
- 45) **Beutler, E. and Kuhl, W.:** Relationship between Human  $\alpha$ -Galactosidase Isoenzymes., *Nature New Biol.*, **239**: 207~208, 1972.
- 46) **Shram, A.W., Hamers, M.N., Brouwer-Kelder, B., Donker-Koopman, W.E. and Tager, J.M.:** Enzymological Properties and Immunological Characterization of  $\alpha$ -Galactosidase Isoenzymes from Normal and Fabry Human Liver., *Biochem. Biophys. Acta*, **482**: 125~137, 1977.
- 47) **Bishop, D.F., Kornreich, R. and Desnick, R.J.:** Structural Organization of The Human  $\alpha$ -Galactosidase A Gene: Further Evidence for The Absence of A 3' Untranslated Region., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **82**: 4859~4863, 1986.



Sci. U.S.A., **85**: 3903~3907, 1988.

- 48) **Lux, S.E., John, K.M. and Bennet, V.:**  
Analysis of cDNA for Human Erythrocyte Ankyrin  
Indicates A Repeated Structure with Homology  
to Tissue-Differentiation and Cell-Cycle Control

proteins., Nature, **344**: 36~42, 1990.

- 49) **Maury, C.P.J.:** Urinary Sialic Acid Levels in  
Aspartylglycosaminuria., Clin. Chim. Acta, **109**:  
219~223, 1981.

(平成3年3月2日受付)

---