

α -ガラクトシダーゼの構造と機能 I

小林 秀 行*

α -ガラクトシダーゼは古くからその存在が報告され、その性質について研究されてきた。また、工業的にも精糖工程に於て砂糖の収率向上のために利用されてきた。最近になって、 α -ガラクトシダーゼの立体構造の解明が進み、 α -ガラクトシダーゼの構造と機能の相関についての情報が得られるようになった。そこで、現在までに明かにされている事柄についてまとめてみたい。

1. α -ガラクトシダーゼとは

α -ガラクトシダーゼ [α -galactosidase (E.C. 3.2.1.22)] は図1の反応を触媒する酵素である。

水酸基を持った受容体分子 (R'OH) は通常は水であるが、R と R' は脂肪族または芳香族グループを表しており、 α -ガラクトシダーゼはオリゴ糖や多糖などの複雑な分子と同様に種々の α -D-ガラクトシドを加水分解することができる。加えて、種々のアルコール誘導体への α -D-ガラクトース残基の O- 転移を触媒する転移活性を有する。

α -ガラクトシダーゼは微生物、植物、動物に広く分布している¹⁾。植物では種子に、動物では脳、小腸、腎臓、甲状腺、副甲状腺、血球や骨髄細胞にも活性が認められている。ブタ腎臓中の α -ガラクトシダーゼはトリプシンによって可溶化されるが、多くの生物の細胞中では可溶性画分に α -ガラクトシダーゼ活性が認められている。

(1) α -ガラクトシダーゼの活性測定法, 検出法

α -ガラクトシダーゼの活性測定にメリビオース、ラフィノースを基質として用いる場合、酵素反応後の加水分解の度合は還元力の上昇または酵素的な方法で測定する。生成したガラクトースをガラ

クトースデヒドロゲナーゼで測定する方法、メリビオースを基質とした場合には、生成したグルコースをグルコースオキシダーゼで測定する方法などがある。p-ニトロフェニル α -D-ガラクトシドを基質として用いる時は、ガラクトースの遊離を還元力の上昇で測定するか、またはアグリコン (ニトロフェノール) の生成量を 400 ~ 420 nm における吸光度を測定する事により行う。ニトロフェノールの生成量を測定する方法が容易で、かつ高感度である。

一般に α -ガラクトシダーゼは補酵素を必要としないが、酵素活性の発現に補酵素が必須の場合がある。例えば、*E. coli* の α -ガラクトシダーゼ (Mel A) は活性発現に Mn^{2+} と NAD (ニコチンアミドジヌクレオチド) を必要とし、 Mn^{2+} と還元剤 (グルタチオン) は酵素を安定化させる。また、ソラマメ (*Vicia faba*) の種子の α -ガラクトシダーゼのように K^+ によって活性化されるものもある²⁾。

細胞や組織における α -ガラクトシダーゼ活性の局在は 6-ブロモ-2-ナフチル α -D-ガラクトシドを基質として検出できる。これらの化合物の加水分解によって生ずるアグリコンは水不溶性で、Fast blue BB と反応し呈色する。ポリアクリルアミドゲル上での活性染色は 4-メチルウンベリフェリル α -D-ガラクトシドを用い、生成した不溶性アグリコンを紫外線をあてて蛍光で検出する³⁾。

(2) α -ガラクトシダーゼの精製法

一般的に α -ガラクトシダーゼは他のグリコシダーゼと共存しており、分離することが難しい。精製には通常の硫酸塩析、イオン交換クロマト、ゲルろ過、等電点分離等が用いられるが、また、特異性の高い精製法であるアフィニティークロマトグラフィーのリガンドとしてメリビオースや N- ϵ -アミノカプロイル α -D-ガラクトシルアミンを用いアガラスに結合させたものが報告されている⁴⁾。

* 鯉淵学園農業栄養専門学校 教授・農学博士

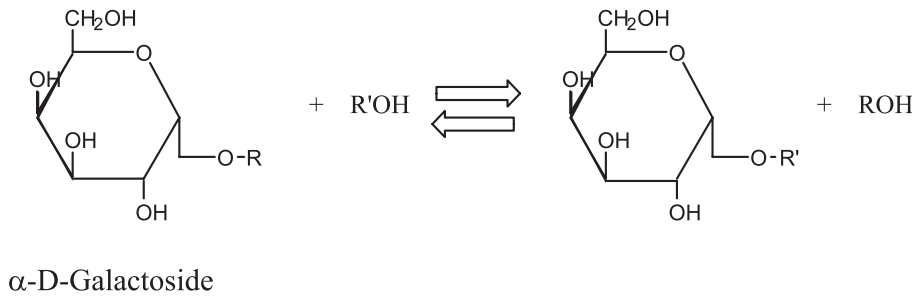


図1. α -ガラクトシダーゼの反応

α -ガラクトシダーゼに関する研究の多くは粗酵素で行われてきたが、ソラマメ及び *Mortierella vinacea* の酵素は精製されている。初めて結晶化された α -ガラクトシダーゼは *M. vinacea* から得られた⁵⁾ものである。

(3) α -ガラクトシダーゼの分子量, 存在形態

α -ガラクトシダーゼの分子量は、ほとんどのものがゲルろ過によって決定されたものである。休眠中の種子には2種の α -ガラクトシダーゼが含まれており、高分子型は低分子型の2~6倍の大きさである。 α -ガラクトシダーゼはサブユニット構造をとっており、ソラマメの α -ガラクトシダーゼI (高分子型) の場合6M尿素有存在下でのゲルろ過によって、6つの不活性なタンパク質に解離する。また、他の植物起源の高分子型酵素は4量体構造をとっていると考えられており、大腸菌 (Mel A) やヒトの α -ガラクトシダーゼは2量体構造をとっている。

また、*M. vinacea* の α -ガラクトシダーゼIは糖タンパク質であり、3%のグルコサミン、11%のヘキソースを含んでいる。ソラマメの α -ガラクトシダーゼIも糖タンパク質である。植物由来の α -ガラクトシダーゼは糖タンパクであることが多く、その糖鎖の不均一性のために分子量の決定は難しい。

2. α -ガラクトシダーゼの特性

(1) α -ガラクトシダーゼの基質特異性

一般にグリコシド基質において一つの水酸基の配置の違いは相当する加水分解酵素の加水分解反応に大きく影響する。 α -ガラクトシダーゼにおける基質の加水分解速度に影響する2つの因子としては、ピラノースであることと、1,2,3,4の炭素原子の水酸基の配置が α -D-ガラクトースと似ていることである。他のグリコシダーゼ (β -ガラクトシダーゼ, α -グルコシダーゼ, α -マンノシダーゼ) と同様に基質のグリコン部分のC-6における変化は α -ガラクトシダーゼでは認識が甘い。それ故 β -L-アラビノシドや α -D-フコシドは数種の α -ガラクトシダーゼによって加水分解される。しかし、*Streptococcus bovis* や *Diplococcus pneumoniae* の α -ガラクトシダーゼのようにアラビノシドが基質とならないものもある。(図2)

α -ガラクトシダーゼのグリコン特異性に関してはアーモンドとソラマメの酵素を用いた結果を表1に比較した。加水分解力 (Vmax) はものによってまちまちであるが、親和性 (Km) はグリコン部分の構造的変化に依存している。つまり、 α -D-ガラクトシド > α -D-フコシド > β -L-アラビノシドの順

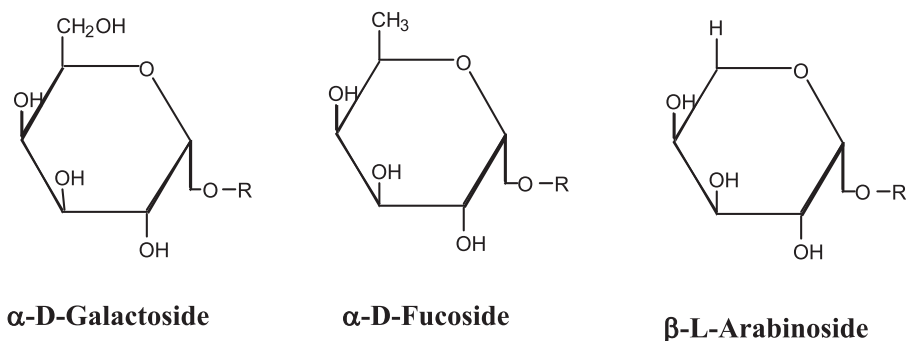


図2. α -D-ガラクトシドと関連する糖

表 1. α-ガラクトシダーゼの基質特異性

	α-Galactosidases from								
	ソラマメ pH4.0						アーモンド		
	I			II			pH5.5		
	Vmax	Km	Vmax/ Km*	Vmax	Km	Vmax/ Km*	Vmax	Km	Vmax/ Km*
Glycon and stereospecificity									
<i>p</i> -Nitrophenyl α-D-galactoside	25.53	0.38	67.18	2.39	0.45	5.311	27.00	0.53	50.94
<i>p</i> -Nitrophenyl α-D-fucoside	24.10	4.76	5.063	6.96	5.88	1.184	ND	ND	-
<i>p</i> -Nitrophenyl β-L-arabinoside	16.4	14.3	1.147	2.39	12.50	0.191	5.00	33.30	0.150
Aglycon specificity									
Methyl α-D-galactoside	1.66	7.13	0.233	0.29	14.3	0.020	0.59	10.90	0.023
Ethyl α-D-galactoside	1.66	8.93	0.186	0.28	8.00	0.035	0.62	6.20	0.100
<i>n</i> -Propyl α-D-galactoside	2.20	6.13	0.359	0.27	5.88	0.046	1.08	6.25	0.173
Phenyl α-D-galactoside	20.30	1.11	18.29	4.36	1.25	3.488	22.70	5.00	4.540
<i>p</i> -Aminophenyl α-D-galactoside	26.60	0.95	28.00	2.72	0.87	3.126	ND	ND	-
<i>m</i> -Chlorophenyl α-D-galactoside	20.60	0.83	24.82	3.30	1.17	2.821	32.70	8.33	3.926
<i>o</i> -Nitrophenyl α-D-galactoside	42.10	1.14	36.93	2.80	0.69	4.058	43.00	0.33	130.3
<i>m</i> -Nitrophenyl α-D-galactoside	5.86	10.00	0.586	0.31	2.50	0.124	23.60	1.57	15.03
<i>p</i> -Nitrophenyl α-D-galactoside	25.53	0.38	67.18	2.39	0.45	5.311	27.00	0.53	50.94
Melibiose	2.54	0.96	2.646	0.41	0.77	0.532	1.61	2.24	0.719
Raffinose	28.40	4.00	7.100	4.18	5.00	0.836	11.8	12.50	0.944
Stachyose	9.00	7.50	1.200	1.36	5.26	0.259	ND	ND	-

に加水分解され易い。ガラクトースを非還元末端に含むオリゴ糖であるメリピオース、ラフィノース、スタキオース、ウンベリフェロースなど種々のα-D-ガラクトシドは、α-ガラクトシダーゼによって加水分解されるが、これらを加水分解できない酵素もある。

種子に含まれるガラクトマンナンはβ-1,4-結合したD-マンノース残基の骨格にα-1,6-結合でD-ガラクトース残基が結合したもので、植物の起源によってガラクトース含量が異なる。全てのα-ガラクトシダーゼがガラクトマンナンのガラクトースを加水分解できるというわけではなく、分解できるものも末端のガラクトース残基のみを除去することができる。

表1に示したように、ソラマメとアーモンドのα-ガラクトシダーゼにとって*p*-ニトロフェニルα-D-ガラクトシドなどのアリルα-D-ガラクトシドは一般にメチルα-D-ガラクトシドなどのアルキル誘導体や2糖よりもよい基質である。Kmと

Vmaxへの影響はアグリコンによって異なっており、ソラマメのα-ガラクトシダーゼの場合、芳香族ガラクトシドのフェノール環の置換はVmaxに大きく影響しないが、求電子性置換基が存在する場合、親和性は増大する(Kmは小さくなる)傾向にある。親和性に影響する因子は複雑で、芳香族置換基の位置と大きさ、求電子効果等に依存している。

ソラマメのα-ガラクトシダーゼIとIIは、それぞれの基質に対するKmにあまり差はないが、Vmaxにはかなり差があり、高分子型のα-ガラクトシダーゼIの方が活性は高い。IとIIは共に*m*-ニトロフェニルα-D-ガラクトシドを基質とした場合、Vmax, Kmとも大きく影響を受ける。

アーモンドのα-ガラクトシダーゼは全般的にソラマメのα-ガラクトシダーゼIとVmax/Km*は似ているが、*p*-ニトロフェニルβ-L-アラビノシドに対する親和性がかなり低い。また、ソラマメのα-ガラクトシダーゼと比べてメリピオース、ラフィノースに対する親和性が低いといえる。

*Vmax/Km: 酵素に対する基質の良さを判断する基準。Vmaxは大きいほど活性は高く、Kmは小さいほど親和性が高い。Vmax/Kmの比が大きいほどよい基質であることを示している。

メリビオースやマンニトリオースのようなガラクトースを含むオリゴ糖に関しては、メリビトールやマンニトリティールを生じる末端還元基の還元によって酵素活性は減少するが、メリビオースからメリビオン酸を生じるような還元基の酸化によって加水分解速度は影響を受けない。末端のガラクトース残基の加水分解以外に、アーモンド α -ガラクトシダーゼはスタキオースの内部のガラクトシド結合を水解し、ガラクトピオースとスクロースを生成する。一方、コーヒー α -ガラクトシダーゼはスタキオースの非還元末端からガラクトースを遊離する。

金子らは、ガラクトマンノオリゴ糖に対する *Aspergillus niger* 5-16 株と *Mortierella vinacea* の α -ガラクトシダーゼ I の基質特異性について検討した⁶⁾ 結果、表 2 に示すように *M. vinacea* の α -ガラクトシダーゼ I は他の起源の α -ガラクトシダーゼと同様にメリビオースやマンニトリオースから効率的にガラクトースを遊離し、ガラクトオリゴ糖の場合はマンノオリゴ糖の非還元末端に位置するガ

ラクトース (末端ガラクトース) を効率的に加水分解した。一方、*A. niger* 5-16 の α -ガラクトシダーゼはメリビオースやマンニトリオースを加水分解せず、ガラクトマンノオリゴ糖に関しては非還元末端のガラクトースには作用できずに非還元末端から 2 番目または 3 番目のマンノースに結合しているガラクトース (側鎖ガラクトース) を遊離することが明らかになった。このことから、*A. niger* 5-16 の α -ガラクトシダーゼは今まで報告されている α -ガラクトシダーゼとは全く異なる基質特異性を持っていることが明らかとなっている。

(2) 転移活性

ガラクトース転移活性は酵母 α -ガラクトシダーゼの系で観察され、メリビオースからマンニトリオースを生成することが発見された。転移活性については、供与体と受容体の特異性、受容体濃度、pH、温度、酵素の種類等について検討されている。ヘキソースは受容体として機能するが、ペントー

表 2. *Aspergillus niger* α -ガラクトシダーゼと *Mortierella vinacea* α -ガラクトシダーゼ I の基質特異性

Substrate	<i>A. niger</i> 5-16	<i>M. vinacea</i>
<i>p</i> -Nitrophenyl α -D-galactoside	Gal-PNP ↑	Gal-PNP ↑
Milibiose	Gal-Glc* ↓	Gal-Glc* ↑
Manninotriose	Gal-Gal-Glc* ↓ ↓	Gal-Gal-Glc* ↑ ↑
Gal ¹ Man ₂ ^a	Gal M-M* →	Gal M-M* ↔
Gal ³ Man ₃ ^a	Gal-M-M-M* ↓	Gal-M-M-M* ↑
Gal ² Man ₄ ^a	Gal M-M-M-M* →	Gal M-M-M-M* ↔
Gal ^{1,3} Man ₄ ^a	Gal Gal M-M-M-M* → ↔	Gal Gal M-M-M-M* ↔ ↔
Gal ^{3,4} Man ₄ ^a	Gal Gal-M-M-M-M* ↓	Gal Gal-M-M-M-M* ↑
Gal ^{3,4} Man ₅ ^a	Gal Gal M-M-M-M-M* → →	Gal Gal M-M-M-M-M* ↔ ↔

a 下付きの数字は、マンノオリゴ糖の重合度を表し、上付の数字はオリゴ糖の還元末端から何番目のマンノースに結合しているかを表している。M: β -1,4-結合のマンノピラノース残基, Gal-: α -1,6-結合のガラクトピラノース残基 (末端ガラクトース), Gal: α -1,6-結合のガラクトピラノース残基 (側鎖ガラクトース), *: 還元末端,
 →: 素早く加水分解される結合, ↔: 殆どまたは全く分解されない結合。

スはそのような性質を示さない。多くの場合、反応混合物を長期間保温すると転移生成物は消失するが、このことはα-D-ガラクトースの配置(α-アノマー)が転移生成物中にも保たれていることを示しており、これは化学分析によっても確かめられている。

(3) 阻害剤

高濃度の p-ニトロフェニル α-D-ガラクトシドはソラマメの α-ガラクトシダーゼ I と II の両方に対し阻害的に作用する。それに対してメリビオースやラフィノースなどのオリゴ糖はそのような阻害効果を示さない。

D-ガラクトースはパワフルな拮抗阻害剤であり、その構造アナログである L-アラビノースと D-フコースも α-ガラクトシダーゼを阻害する。しかし、2-デオキシ-D-ガラクトース、D-グルコース、D-キシロース、D-リボースは α-ガラクトシダーゼを阻害しない。α-ガラクトシダーゼと、基質である糖の結合の為には C-1, C-2, C-4, C-6 の水酸基の配置が重要であるといえる。

(4) α-ガラクトシダーゼの安定性

α-ガラクトシダーゼはその起源により、またその状態により安定性に差がある。A. niger の α-ガラクトシダーゼは 55°C, 1 時間の処理で 30% の活性を失うのみであるが、Streptomyces oleracea の α-ガラクトシダーゼは不安定で 55°C, 15 分の処理で 90% の活性を失う。また、ソラマメの α-ガラクトシダーゼは非常に安定で、75°C, 40 分の処理でさえも活性のロスも僅かに 16% である。また、E. coli の粗酵素は非常に不安定であるが、精製酵素は 4°C で 2 ヶ月間活性の損失なしで保存可能である。同様に、A. niger, S. oleracea, Prunus amygdalus, Canavalia ensiformis, 牛肝臓の α-ガラクトシダーゼは低温で貯蔵可能である。

M. vinacea の α-ガラクトシダーゼ I は pH5.5 の酢酸緩衝液中で 8°C で 5 年間以上、ほぼ 100% 活性を維持している。

(5) α-ガラクトシダーゼに対する化合物の影響

Vmax と Km への pH の影響はアーモンドとソラ

マメの α-ガラクトシダーゼについて検討されている。ソラマメの α-ガラクトシダーゼ I で得られた結果から、カルボキシル基が基質の加水分解に関与していることが示唆されている。また、アーモンド α-ガラクトシダーゼでもメリビオースと p-ニトロフェニル α-D-ガラクトシドを基質とした同様の研究によっても、カルボキシル基が酵素の活性部位に存在することが示唆されている。

Aerobacter aerogenes の α-ガラクトシダーゼは p-chloromercuribenzoate, N-ethyl maleimide, iodoacetamide のような SH 化合物により阻害される。これらの SH 化合物は Diplococcus pneumoniae と Streptomyces olivaceus の α-ガラクトシダーゼも阻害するが、ホウレン草、アーモンド、ソラマメの α-ガラクトシダーゼは阻害しない。この事はすべての α-ガラクトシダーゼにおいてシステイン残基が活性に関与、または活性部位近傍に存在するのではないという事を示している。

また、α-ガラクトシダーゼは種々の金属イオンによって様々な影響を受ける。Ag⁺ で不活性化されたソラマメの α-ガラクトシダーゼ I は、システインの存在下で pH4.0 の緩衝液に対して透析することにより賦活化される。Ag⁺ の阻害効果は、低濃度の D-ガラクトースが存在する場合には減少する。この事は Ag⁺ が活性部位に反応していることを示唆している。

α-ガラクトシダーゼの作用様式について、アリアル α-D-ガラクトシドを用いたアーモンド α-ガラクトシダーゼの特異性の研究によりアグリコン**の静電的性質が加水分解速度に影響していることが示されている。また、活性発現には脱プロトン化したカルボキシル基とプロトン化したカルボキシル基が必要であると考えられている。アグリコン**は 2 つのカルボキシル基の共同の作用で切断され、水又は脂肪族アルコールである (R'OH) の受容体分子存在下での加水分解または転移反応が起こると考えられる。

3. 植物の α-ガラクトシダーゼ

植物にはガラクトースを含む糖と脂質は多量に存在しており、組織中でそれらは α-ガラクトシダー

**アグリコン：配糖体の糖以外の部分

ゼと共存している。成熟種子においてはガラクトシルスクロース誘導体（ラフィノース、スタキオース等）の合成に伴って、 α -ガラクトシダーゼの活性も増加する。発芽時にはオリゴ糖の分解に α -ガラクトシダーゼが関与しており、分解生成物は可溶性で、すぐに代謝されうるエネルギー源として機能している。種子成熟中にガラクトシルスクロース誘導体が蓄積するための酵素と基質の接触を妨げる何等かのメカニズム（区画化または内在性インヒビター）が存在するはずである。ソラマメについては種子の生理的状態が α -ガラクトシダーゼの分子型のパターンを変化させることが知られている。未成熟な種子は α -ガラクトシダーゼ II に相当する活性を示すのみであるが、発達段階に伴って高分子型である α -ガラクトシダーゼ I が生成する。*In vitro* の実験によっても α -ガラクトシダーゼ I は α -ガラクトシダーゼ II から生じることが示されている。

インゲンマメの α -ガラクトシダーゼの役割は、D-ガラクトースを含むオリゴ糖を移動させる事である。コロハ（マメ科）の種子中では発芽初期には低レベルの α -ガラクトシダーゼしか存在しないが、後期には内胚乳でのガラクトマンナンの分解と一致して α -ガラクトシダーゼのレベルが上昇する。胚では比較的ハイレベルの α -ガラクトシダーゼが存在し、それは発芽の間一定に保たれ、この器官でのラフィノース等の加水分解に寄与している。

また、 α -ガラクトシダーゼは糖脂質の代謝にも関与している。例えばベニバナインゲンの葉には、糖脂質を脂肪酸、グリセリン、ガラクトースにまで完全に分解するための α -ガラクトシダーゼを含む全ての酵素が存在しており、クロロプラスト膜の糖脂質も α -ガラクトシダーゼにより分解される。ソラマメとカボチャの葉でも同様に糖脂質の分解に関与している。

インゲンマメの α -ガラクトシダーゼは四量体（テトラマー）の場合、B型赤血球凝集能をもつが、単量体（モノマー）には1つの結合部位しかないためにその能力はない。大豆の α -ガラクトシダーゼの場合も同様で、テトラマーは血球凝集に十分なサイト数を持っている。

これらの α -ガラクトシダーゼは赤血球を凝集さ

せるが、レクチンとは異なり、長時間の反応により凝集物を再溶解する。溶解の度合は温度、酵素濃度、pHにより変化する。一度溶解したものは更に α -ガラクトシダーゼを加えても凝集しない。これは血球表面のガラクトース残基が除かれ、血液型がB型からO型に変化した為であると考えられている。赤血球凝集活性を示す部位と α -ガラクトシダーゼの活性部位は、両活性が共にD-ガラクトースで阻害されることから同一であると考えられている。

4. α -ガラクトシダーゼとファブリー病

動物の α -ガラクトシダーゼは、リソゾームに局在する加水分解酵素で、生体内では糖脂質や糖タンパク質中の非還元末端に α -1,4または α -1,3結合しているガラクトースを水解する。ヒトにおけるスフィンゴ糖脂質代謝異常症として知られているファブリー病は、先天的なヒト α -ガラクトシダーゼ（ α -ガラクトシダーゼ A）活性の欠損により発症する遺伝病である。遺伝的欠陥により α -ガラクトシダーゼ A の働きが失われると基質であるグロボトリアオシルセラミド（galactosyl-(α 1 \rightarrow 4)-galactosyl-(β 1 \rightarrow 4)-glucosyl-(β 1 \rightarrow 1')-ceramide）やガラビオシルセラミド（galactosyl-(α 1 \rightarrow 4)-galactosyl-(β 1 \rightarrow 1')-ceramide）が分解を受けることができずに体液中や臓器のリソゾーム中に蓄積する。蓄積は特に血管内皮細胞や平滑筋細胞、心筋、腎、汗腺、角膜、自律神経系の神経節細胞において顕著に見られる。

ファブリー病はX染色体性劣性遺伝型式をとり、ヘミ接合体***の男性に強い症状が出現する。日本人におけるファブリー病の発症頻度は1/40,000程度である。多くは学童期から、発作的な手足の先の痛みがしばしば発熱と共に現れる。皮膚や粘膜には、暗赤色の被角血管腫が認められることが多く、角膜の放射状混濁が見られ、白内障を伴う。更に進行すると、全身の血管病変のために腎臓の機能障害がおこり、腎不全、心不全、心弁膜症、心筋梗塞、脳血管障害を伴い、これらが死因となる。

また、これら古典型の外に50歳を過ぎて発症し、心筋障害を唯一の症状とする軽症の患者が日本の中

***性染色体がXY型であったり、何らかの理由で相同染色体の全部もしくは1部を欠いたりして、ある遺伝子が対立遺伝子なしに単独で存在する状態にある個体のこと

表 3. ファブリー病における α-ガラクトシダーゼ遺伝子の変異

症例	1	2	3	4	5	6
変異	Trp ₄₄ (TGG) ↓ Stop codon (TAG)	Glu ₆₆ (GAG) ↓ Gln (CAG) Arg ₁₁₂ (CGG) ↓ Cys (TGC)	Gly ₃₂₈ (GGG) ↓ Arg (AGG)	Pro ₄₀ (CCT) ↓ Ser (TCT)	Gln ₂₇₉ (CAG) ↓ Glu (GAG)	Arg ₃₀₁ (CGA) ↓ Gln (CAA)
活性	欠損	欠損	欠損	欠損	僅かに残存	僅かに残存
臨床型	古典型	古典型	古典型	古典型	心筋型	心筋型

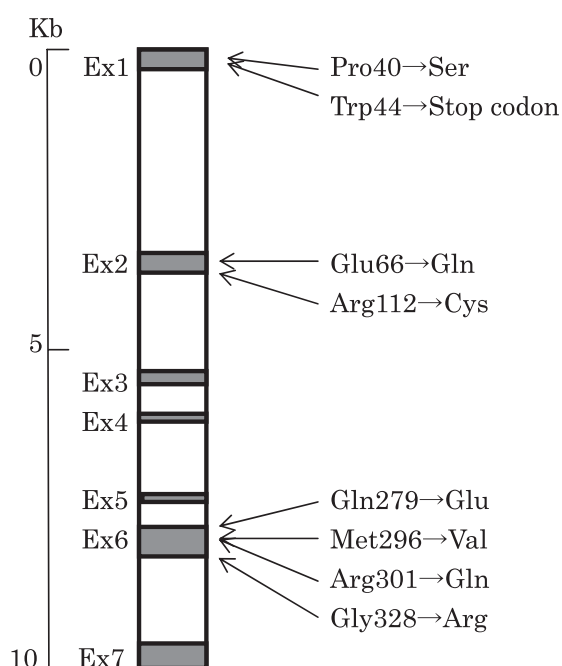


図 3. ファブリー病で見られる α-ガラクトシダーゼ遺伝子の変異
Ex: Exon

心に発見されている。これらの患者のリンパ芽球の α-ガラクトシダーゼ A の活性は正常者の 3 ~ 5% であり、古典型患者の酵素活性がほぼ完全に欠損しているのとは対照的である。

α-ガラクトシダーゼ A の遺伝子座は X 染色体の長腕 Xq21.33 → Xq22 の領域に存在している⁷⁾。また、α-ガラクトシダーゼ A の遺伝子は約 12kbp の大きさを持ち、7 個のエキソンと (長さ 92 ~ 291bp) と 6 個のイントロン (長さ 200bp ~ 3.7kbp) を含む。α-ガラクトシダーゼ A の cDNA は 31 個のアミノ酸からなるシグナルペプチドと 398 個のアミノ酸からなる酵素タンパク質をコードする⁸⁾。α-ガラクトシダーゼ A は糖タンパク質であり、N-型糖鎖結合部位は 4 箇所存在する。この遺伝子か

らの発現産物はヒト線維芽細胞では分子量 50,000 の前駆体として合成され、ゴルジ体からリソゾームへ輸送される過程で糖鎖の修飾やシグナルペプチドの切り離しなどのプロセッシングを受け、リソゾームでは分子量約 46,000 のサブユニットからなるホモ 2 量体の形で存在する。

ファブリー病をおこす α-ガラクトシダーゼ A 遺伝子の変異の位置と種類は表 3 に示すようなものが知られている。その他 Met296 (ATG) → Val (GTG) の変異も報告されており、心筋型の変異はいずれもエキソン 6 の 5' 側から中央部までに集中している (図 3)。なぜ特異的に心筋のみに病変が発現するのかは不明である。

5. α-ガラクトシダーゼの精製と一次構造

前述のようなガラクトマンノオリゴ糖に対する *M. vinacea* と *A. niger* 5-16 の α-ガラクトシダーゼの特異性の差が何に由来するのかを明かにするために、まず *M. vinacea* の α-ガラクトシダーゼの精製を行った。*M. vinacea* を培養し、菌体を pH5 で一晚 50°C で自己消化させ、口過し、口液に硫酸アンモニウムを加え、塩析した。pH8.5 の緩衝液に対して透析し、同緩衝液で平衡化した QAE-TOYOPEARL 550C カラムにアプライし、食塩の直線濃度勾配で溶出した。活性画分を集め、Sephadex G-100 カラムでゲル口過を行い、精製酵素とした。精製ステップを表 4 にまとめた。粗酵素液から 66% の収率で、約 40mg の酵素が得られた。SDS-PAGE (SDS-ポリアクリルアミド電気泳動) の結果、単一のタンパク質バンドを示し、分子量は 52,000 であった。また、糖鎖を切断する酵素であるエンドグリコシダーゼ F で処理したのち SDS-PAGE を行ったところ、43,000 にバンドが移動し (図 4)、約 10,000 の分子量の糖

表 4. *M. vinacea* α-ガラクトシダーゼの精製

Step	Total activity (unit)	Total protein (mg)	Specific activity (unit/mg)	Yield (%)
Crude extract	6310	1100	5.7	100
QAE-TOYOPEARL 550C	4820	73.2	65.8	76.4
Sephadex G-100	4140	39.0	106	65.6

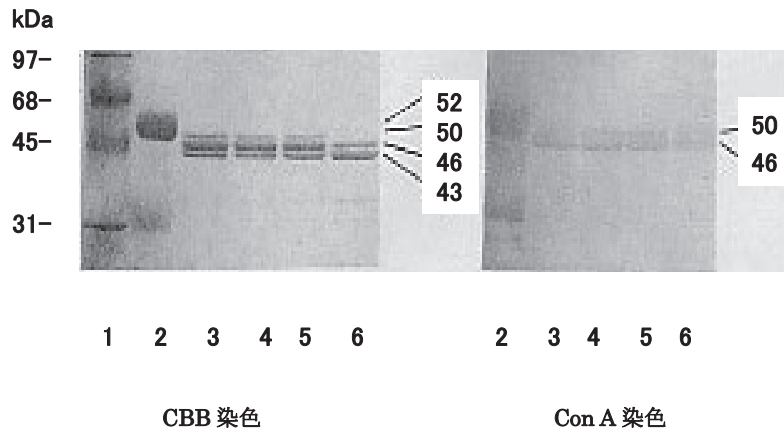


図 4. *M. vinacea* α-galactosidase I の SDS-PAGE

精製 α-galactosidase I をエンド β グリコシダーゼ F で処理し、SDS-PAGE で泳動し、タンパク質染色 (Coomassie Brilliant Blue) と糖鎖染色 (Concanavalin A) を行った。

1, M.W. marker; 2, α-galactosidase; 3-6, α-ガラクトシダーゼを 0.05 unit, 0.1 unit, 0.2 unit, 0.4 unit のエンド β グリコシダーゼ F で、pH 6.0, 37°C, 16 時間処理したもの。

鎖を持っていることが明らかになった⁹⁾。

精製酵素を SDS-PAGE を行った後に、PVDF 膜にブロッティングし、気相ペプチドシーケンサーで N-末端配列を検討した。その結果、S-N-N-G-L-A-I-T-P-Q-M-G-W-N-T-W-N-K-Y-G-X-N-I-D-E-Q-L-I-L-X-A-A-K-X-I-V- の配列が同定された (1 文字表記アミノ酸, X は未同定)。一次構造の明かな種々の α-ガラクトシダーゼの N-末端アミノ酸配列と、*M. vinacea* の α-ガラクトシダーゼの N-末端配列との相同性を比較したところ、*M. vinacea* の α-ガラクトシダーゼは、ヒト、酵母、グアー、*A. niger* それぞれの α-ガラクトシダーゼとよく似た N-末端配列をしめした。ヒトの α-ガラクトシダーゼ A には他の α-ガラクトシダーゼと比べて 10 残基の挿入が見られた。また、*M. vinacea* の α-ガラクトシダーゼに対するそれぞれの α-ガラクトシダーゼの相同性はヒトが 35%、酵母が 32%、グアーが 38%、*A. niger* が 24% であった。N-末端配列の中から、Q-M-G-W-N-T-W を基にオリ

ゴヌクレオチドを合成し、常法に従って調製した λgt10 cDNA ライブラリーからオリゴヌクレオチドをプローブとしてスクリーニングした。その結果、60,000 プラークの中から 3 個のポジティブクローンがえられた。塩基配列を検討したところ、*M. vinacea* α-ガラクトシダーゼの N-末端アミノ酸配列に相当する塩基配列が確認された。この塩基配列から推定されるアミノ酸配列より、本酵素は 397 残基のアミノ酸からなり、分子量は 44,350 であると推定された (図 5. MvI)。他の起源の α-ガラクトシダーゼのアミノ酸配列と比較すると酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) の酵素とは 47%、グアー (*Cyamopsis tetragonoloba*) の酵素とは 43%、そして人の酵素とは 34% の同一性を示した。

6. α-ガラクトシダーゼとファブリー病

Fabry 病におけるヒトの α-ガラクトシダーゼ A のアミノ酸置換の結果は次のような事を示唆してい

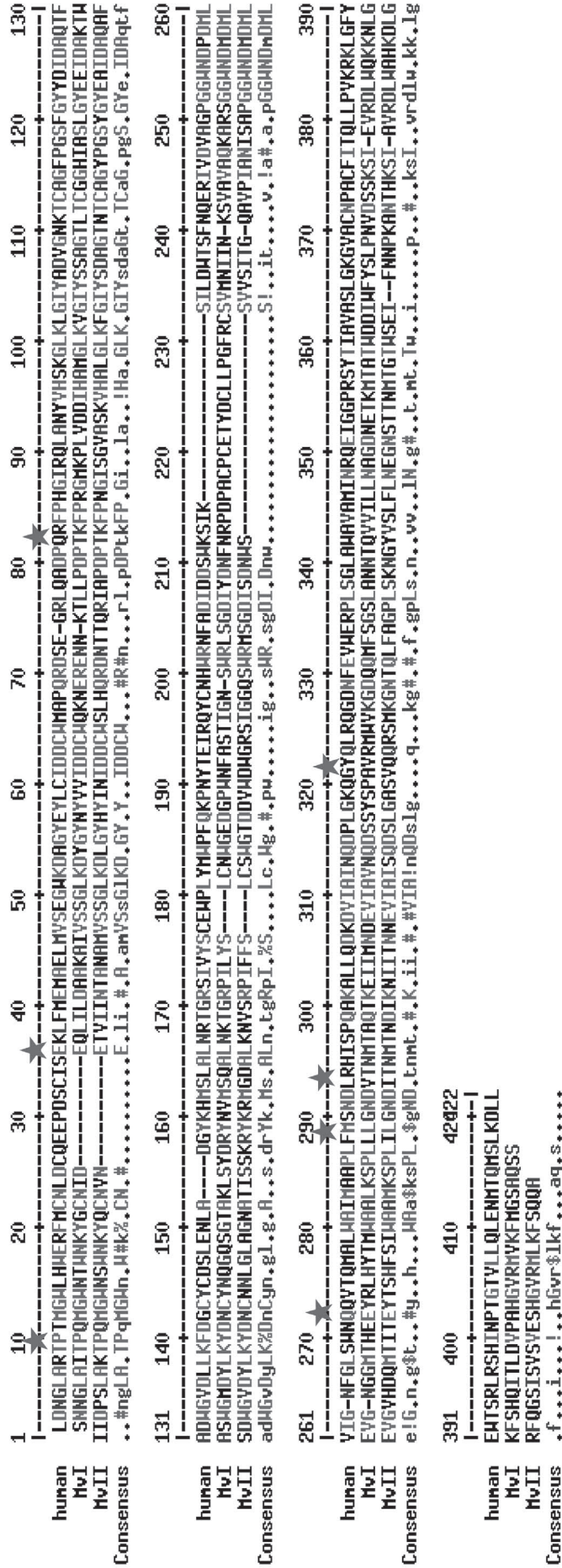


図5. 種々のα-ガラクトシダーゼの一次構造の比較（一文字表記）
 Human: ヒト α-galactosidase, MvI: *Mortierella vinacea* α-galactosidase I, MvII: *M. vinacea* α-galactosidase II, Consensus: the common amino acid in the sequences.

る。つまり、図5に示した一次構造に於て★印のついたアミノ酸が変異しているために活性が殆ど失われている。

図中の通し番号で、10番目のプロリンがセリンに、289番目のメチオニンがバリンに、272番目のグルタミンがグルタミン酸に、294番目のアルギニンがグルタミンに、321番目のグリシンがアルギニンに変異したもの、そして36番目（グルタミン酸がグルタミンに変異）と83番目（アルギニンがシステインに変異）の2箇所が変異したものには活性が殆どなく、これらのアミノ酸残基が立体構造の維持等に重要な役割を果たしていることが考えられる。 α -ガラクトシダーゼの10番目のこの部分にはプロリン独自の構造が必要であり、294番目のアルギニンのグルタミンへの+電荷の減少や、321番目のグリシンのアルギニンへの+電荷の増加は α -ガラクトシダーゼの構造への影響があると考えられる。また、36番目と83番目の変化は電荷の変化とシステインというS-S結合を作る事ができるアミノ酸残基の導入という大きな変化である。しかし272番目のグルタミンのグルタミン酸への変化は電荷の変化は伴うが、比較的小さな変化であり、酵母やグアーの α -ガラクトシダーゼではこの残基はグルタミン酸であるため、何故この変化が大きな影響を活性に与えるかについては検討する価値があると思われる。同様に、289番目のメチオニンのバリンへの変異はグアーではバリンであり、活性に与える影響は小さいように思えるが、実際は殆ど活性が失われ

ているのでこの点についても検討する必要がある。

参考文献

- 1) P.M. Dey and J.B. Pridham, *Adv. in Enzymol.*, 36, 91 (1972)
- 2) P.M. Dey, A. Khaleque, J.B. Pridham, *Biochem. J.*, 124, 27P (1971)
- 3) C. Ganter, A. Bockel, R. Mattes, *J. Biotech.*, 8, 301-310 (1988)
- 4) J.S. Mayes, E.L. Cray, J.A. Dell, B. Scheerer, R.N. Sifers, *Am.J. Hum. Genet.*, 34, 602-610 (1982)
- 5) Z. Fujimoto, S. Kaneko, M. Momma, K. Murakami, H. Mizuno, *J. Biol. Chem.*, 278, 20313-20318 (2003)
- 6) R. Kaneko, I. Kusakabe, E. Ida, K. Murakami, *Agric. Biol. Chem.*, 55, 109 (1991)
- 7) S. Tsuji, B. Martin, D.C. Kaslow, B.R. Migeon, P.V. Choudary, B.K. Stubblefield, J.A. Mayer, G.J. Murray, J.A. Baranger and E.I. Ginns, *Eur. J. Biochem.*, 165, 275 (1987)
- 8) D.F. Bichop, D.H. Calhoun, H.S. Berstein, P. Hantzopoulos, M. Quinn and R.J. Desnick, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 4859 (1986)
- 9) H. Shibuya, H. Kobayashi, K. Kasamo and I. Kusakabe, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 59, 1345-1348 (1995)