

# 網膜色素変性症患者リンパ球におけるシアリルトランスフェラーゼ 酵素活性およびガラクトシルトランスフェラーゼ酵素活性 (図4)

鷗木 一彦・上原 文行・村松 寿子\* ( 鹿児島大学医学部眼科学教室 )  
村松 喬\*・大庭 紀雄 ( \*鹿児島大学医学部第2生化学教室 )

## Sialyltransferase and Galactosyltransferase of Lymphocyte in Retinitis Pigmentosa

Kazuhiko Unoki, Fumiyuki Uehara, Hisako Muramatsu\*

Takashi Muramatsu\* and Norio Ohba

Departments of Ophthalmology and Biochemistry\*, Kagoshima University Faculty of Medicine

網膜色素変性症患者の末梢血リンパ球の Triton X-100抽出分画におけるシアリルトランスフェラーゼ活性およびガラクトシルトランスフェラーゼ活性を測定した。網膜色素変性症患者のシアリルトランスフェラーゼ活性は、健常者と比較して有意に低下していた。ガラクトシルトランスフェラーゼ活性は両者の間で差は認められなかった。常染色体劣性遺伝例と散发例との間には両酵素活性ともに差を認めなかった (日眼 91 : 1286—1290, 1987)

キーワード：シアリルトランスフェラーゼ，ガラクトシルトランスフェラーゼ，網膜色素変性症，リンパ球

### Abstract

Sialyltransferase and galactosyltransferase activities of the peripheral lymphocytes were measured in patients with retinitis pigmentosa, and were compared with those in age-matched normal subjects. Sialyltransferase activities were significantly reduced in autosomal recessive cases and sporadic cases of retinitis pigmentosa, while galactosyltransferase activities revealed no abnormality. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 91 : 1286—1290, 1987)

Key words: Sialyltransferase, Galactosyltransferase, Retinitis pigmentosa, Lymphocyte

## I 緒 言

細胞表面複合糖質は、細胞増殖、発生・分化、細胞接着、細胞間認識などさまざまな事象に関係し、網膜視細胞および色素上皮においても重要な機能をもつと考えられている。哺乳類網膜錐体視細胞には Galβ1→3GalNAc を認識するピーナツレクチン (peanut agglutinin, 以下 PNA) が選択的に結合し、杆体視細胞にはシアル酸および N-アセチルグルコサミンを認識する小麦胚芽レクチン (wheat germ agglutinin, 以下

WGA) が選択的に結合する<sup>1)~3)</sup>。視細胞表面および周囲に存在する複合糖質は、錐体では Galβ1→3GalNAc が露出しているのに対して、杆体ではシアル酸が結合して Galβ1→3GalNAc の PNA に対する結合性がマスクされているものと推定される<sup>4)5)</sup>。一方、RCS ラット変性網膜を組織学的に検索すると網膜下腔に蓄積した視細胞外節の表面にはシアル酸が減少していること<sup>6)~8)</sup>、視細胞変性マウス (C3H) 網膜において網膜複合糖質糖鎖非還元末端のシアル酸が減少し β-galactose が露出していることを示唆する報告があ

別刷請求先：890 鹿児島市宇宿町1208—1 鹿児島大学医学部眼科学教室 鷗木 一彦

Reprint requests to: Kazuhiko Unoki, M.D. Dept. of Ophthalmol., Kagoshima Univ. Faculty of Med., 1208-1 Usuki-cho, Kagoshima 890, Japan

(昭和62年7月22日受付) (Accepted July 22, 1987)

る<sup>9)</sup>。また、WGA を正常ラット網膜下腔に少量注入すると、視細胞層が脱落し変性網膜類似の変化が生じる<sup>10)</sup>。さらに、複合糖質最終過程において糖鎖非還元末端へのシアル酸添加機能をもつ糖転移酵素シアリルトランスフェラーゼの網膜内活性は、視細胞変性マウス(C3H)では正常マウスに比較して低下している<sup>11)</sup>。これらの知見から、網膜複合糖質糖鎖非還元末端に存在するシアル酸は正常網膜機能の維持に重要な役割を果たすとともに、網膜変性の病因に関係している可能性が考えられる。

遺伝性眼底疾患における体液生化学的異常として、脳回転状脈絡膜網膜萎縮症において、リンパ球のオルニチン・アミノトランスフェラーゼ活性に異常がみられる<sup>12)</sup>。また、錐体ジストロフィー患者白血球において $\alpha$ -L-フコシダーゼ活性低下が報告されている<sup>13)</sup>。網膜色素変性症患者リンパ球においても何らかの酵素活性異常が検出される可能性がある。一方、急性白血病や慢性Bリンパ球白血球においてはリンパ球のシアリルトランスフェラーゼ活性が上昇していることが報告されており<sup>14)</sup>、本酵素はリンパ球において活性が高いことが知られている。上記に示したシアル酸異常が網膜色素変性症の発症に関与するとともに、その異常がリンパ球に発現している可能性があることから、網膜色素変性症患者リンパ球におけるシアリルトランスフェラーゼ活性を測定した。一方、糖鎖内でシアル酸の内側に位置する糖であるガラクトースの添加機能をもつガラクトシルトランスフェラーゼ活性についても測定した。

## II 実験対象および方法

### 1. シアリルトランスフェラーゼ酵素活性 [E.C. 2.4.99.1.]

#### 1) 対象

定型的網膜色素変性症患者20例および健常者20例を対象とした。定型的網膜色素変性症患者は、男性11例、女性9例(年齢は29歳から77歳)、遺伝形式は常染色体劣性12例、散発例8例であった。健常者は、男性8例、女性12例(年齢は25歳から63歳)であった。

#### 2) リンパ球サンプル調製

末梢血10ml(ヘパリン1ml添加)を肘静脈から採取、モノボリ分離溶液(Ficoll-Hypaque, Flow, Lab.)に重層して遠沈(300g, 15分, 4℃)し、リンパ球分画を抽出した。PBSにて3回洗浄後、25mM トリス・塩酸緩衝液(pH 7.2, 1mM dithiothreitol, 0.1%

TritonX-100)を加えて $2 \times 10^7$ /mlに調整し、細胞浮遊液をホモジナイズ(Wheaton homogenizer)し可溶化させ、遠沈(12,000g, 15分, 4℃)して得られた上清を酵素活性測定試料とした。タンパク濃度はLowry法<sup>15)</sup>により測定した。

#### 3) 酵素活性測定法

シアリルトランスフェラーゼ活性をMiyagiらの方<sup>16)</sup>により測定した。リンパ球抽出分画50 $\mu$ lと基質0.1 $\mu$ Ci CMP-[<sup>14</sup>C]-シアル酸(シアル酸—4, 5, 6, 7, 8, 9, [<sup>14</sup>C]257.1mCi/mmol, New England Nuclear), 外因性アクセプターとして300 $\mu$ g アシアロフェツイン(Sigma, type II)を含む50mM トリス・塩酸緩衝液(pH 7.2, 5mM MgCl<sub>2</sub>)30 $\mu$ lを加えて、37℃, 30分間反応させた(これらの実験条件下では予備実験により酵素活性測定値に直線性が得られることを確認している)。1% 燐タングステン酸・0.5M 塩酸を加えて反応を停止し、遠沈して得られた沈渣を5%トリクロール酢酸・1% 燐タングステン酸液中に拡散させ、25mm グラスフィルター(Whatman GF/A)を通すことによりその表面に集めて、3回洗浄し、エーテル・エタノール(1:1 V/V)10mlで洗浄したあと、グラスフィルターを乾燥させた。乾燥したグラスフィルターに蒸留水1mlを加えて、4℃に一夜放置したのち、0.4% DPO・トルエン・TritonX-100(2:1 V/V)7mlを加えて液体シンチレーションカウンターにより放射活性を測定した。そして、外因性アクセプターを含む反応液と含まない反応液(内因性アクセプターのみ)におけるアクセプターに取り込まれた<sup>14</sup>C-シアル酸の放射活性値の差(外因性アクセプターにとりこまれた量)を求めて酵素活性値とした。なお、測定はduplicateで行った。

### 2. ガラクトシルトランスフェラーゼ酵素活性 [E.C. 2.4.1.22]

#### 1) 対象

定型的網膜色素変性症患者14例および健常者15例を対象とした。定型的網膜色素変性症患者は、男性7例、女性7例(年齢は32歳から73歳)であり、遺伝形式は常染色体劣性9例、散発例5例であった。健常者は、男性9例、女性6例(年齢は22歳から62歳)であった。

#### 2) 酵素活性測定法

基質にUDP-[<sup>14</sup>C]ガラクトース(ガラクトース-[<sup>14</sup>C]333.0mCi/mmol, New England Nuclear), アクセプターにオパルブミン(Sigma, grade V)を用いた。シアリルトランスフェラーゼ酵素活性測定と同様の方

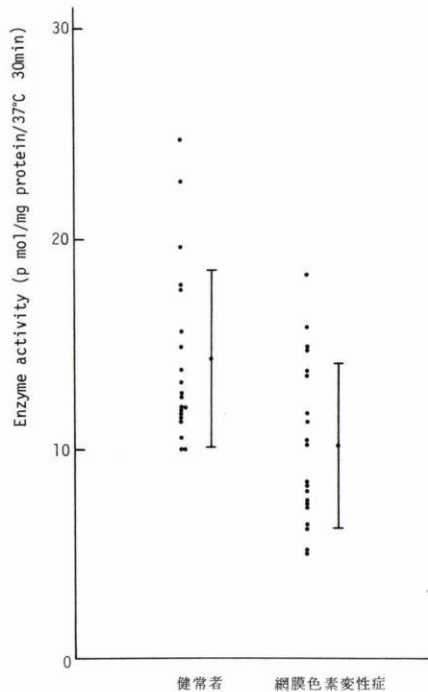


図1 健常者および網膜色素変性症患者リンパ球のシアリトランスフェラーゼ酵素活性

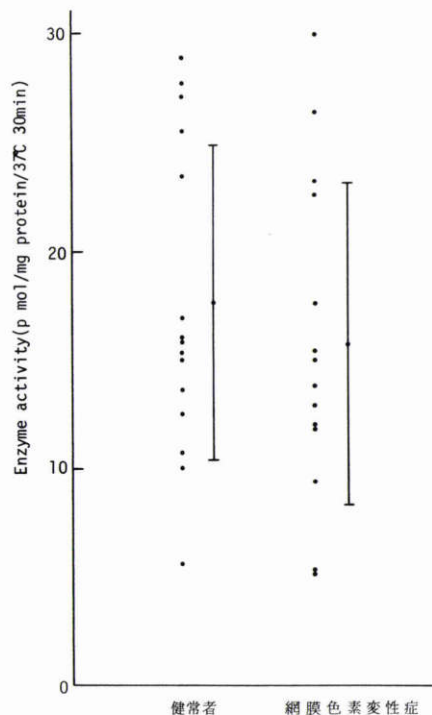


図3 健常者および網膜色素変性症患者リンパ球のガラクトシルトランスフェラーゼ酵素活性

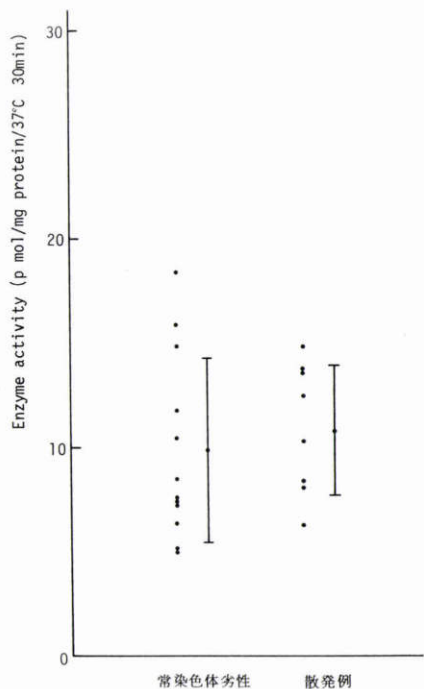


図2 網膜色素変性症常染色体劣性遺伝例および散発例のリンパ球のシアリトランスフェラーゼ酵素活性

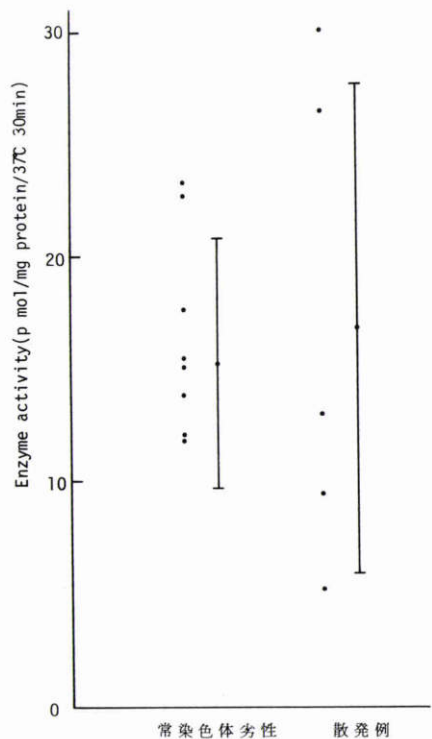


図4 網膜色素変性症常染色体劣性遺伝例および散発例のリンパ球のガラクトシルトランスフェラーゼ酵素活性

法を用いて酵素活性測定を行った。

### III 結 果

健常者におけるシアリルトランスフェラーゼ酵素活性は $14.3 \pm 4.2$  (p mol/mg protein/37°C 30min)で、最低10.0から最高24.7にわたっていた。一方、網膜色素変性症患者では $10.2 \pm 3.9$ で、5.0から18.3にわたっていた。これは、健常者に比べて危険率1%以下で有意に低いと判定された(図1)。遺伝形式で比較すると、常染色体劣性患者は $9.8 \pm 4.4$ 、散発例患者は $10.7 \pm 3.1$ で、両者の間に有意差を認めなかった(図2)。

健常者におけるリンパ球ガラクトシルトランスフェラーゼ酵素活性は $17.6 \pm 7.2$  (p mol/mg protein/37°C 30min)で、最低5.6から最高28.8に分布していた。一方、網膜色素変性症患者では $15.7 \pm 7.4$ であり、5.2から29.9であった(図3)。健常者との間に有意差を認めなかった。常染色体劣性患者は $15.2 \pm 5.5$ 、散発例患者は $16.7 \pm 10.8$ で、両者の間に有意差を認めなかった(図4)。

### IV 考 按

網膜色素変性症患者のリンパ球におけるシアリルトランスフェラーゼ酵素活性を測定すると、健常者に比較して有意に低下していた。酵素活性が常染色体劣性と散発例の間に差を認めなかったことは、散発例の多くは常染色体劣性遺伝によると考えられるので道理にかなっているであろう。一般に、常染色体劣性遺伝病の病因に直接関与する酵素は、罹患者(ホモ接合体)では欠損、極度の減少、あるいは不活性の現象がみられる。網膜色素変性症におけるシアリルトランスフェラーゼの減少は統計的にみて低下している所見が認められるものであり、欠損症例はなく、さらに症例によっては正常範囲に入るものもみられた。しかも、網膜色素変性症の同酵素活性低下群と正常範囲内の群との間で臨床的な差異は検出しえていない。シアリルトランスフェラーゼは多くの種類のものが存在し、一般に $\alpha 2-3$ 、 $\alpha 2-6$ 、 $\alpha 2-8$ 、 $\alpha 2-9$ 結合するものが知られており、今回は頻度の高い $\alpha 2-3$ 、 $\alpha 2-6$ 結合をするアシアロフェツインをアクセプターとして用いた。すなわち、今回活性測定を行ったシアリルトランスフェラーゼは少なくとも2種類以上の同酵素活性の総和をみていることになる。もし、単一のシアリルトランスフェラーゼの酵素活性のみを選択的に測定するならば、その結果に異常者と正常者の間で、all or noneの関係が成立

するかもしれない。一方、網膜変性動物の変性網膜を組織化学および電気泳動を用いて検索するとシアル酸が減少していると報告されており<sup>6)~9)</sup>、シアル酸の糖鎖非還元末端への添加機能をもつシアリルトランスフェラーゼ酵素活性が低値を示すことは道理にかなっているであろう。サル眼およびウシ眼各部位におけるシアリルトランスフェラーゼ酵素活性を検索すると、網膜および色素上皮が角膜やブドウ膜などに比べ高い活性を示すことから(未発表資料)、本酵素が正常網膜機能の維持に重要な役割をもっていることが考えられる。

複合糖質糖鎖のシアル酸はガラクトースやN-アセチルガラクトサミンに結合したものがほとんどであり<sup>17)</sup>、サルやラットの正常網膜においてシアル酸に結合するのはD-ガラクトースであるとみなされている。シアル酸の内側に存在するガラクトースが減少し、それに伴いシアル酸が低下している可能性も示唆されたため、網膜色素変性症患者リンパ球においてガラクトースを添加するガラクトシルトランスフェラーゼ酵素活性を測定したが、健常人に比較して差はみられなかった。このことから、糖鎖形成の最終段階において作用するシアリルトランスフェラーゼの異常が網膜変性の発症に関与している可能性が疑われる。赤血球の老化に際しそのシアル酸が減少することが知られている<sup>18)</sup>。本研究からシアル酸の減少は網膜の老化現象(変性)にも関与していることが強く示唆され、今後さらに、広く老化現象をシアル酸の減少という観点からとらえていくべきことを示していることは意義深いことと考える。また、網膜複合糖質をアクセプターとして用いることにより、網膜に特異性の高いシアリルトランスフェラーゼ活性異常の有無について研究を進めていく必要もあろう。

### 文 献

- 1) Uehara F, Sameshima M, Muramatsu T, Ohba N: Localization of fluorescence-labeled lectin binding sites on photoreceptor cells of the monkey retina. *Exp Eye Res* 36: 113—123, 1983.
- 2) Blanks JC, Johnson LV: Specific binding of peanut lectin to a class of retinal photoreceptor cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 25: 546—557, 1984.
- 3) Blanks JC, Johnson LV: Selective lectin binding of the developing mouse retina. *J Comp Neurol* 221: 31—41, 1983.
- 4) Uehara F, Muramatsu T, Sameshima M, Kawano K, Koide H, Ohba N: Effect of neur-

- aminidase on lectin binding sites in photoreceptor cells of monkey retina. *Jpn J Ophthalmol* 29: 54—62, 1985.
- 5) **Cohen D, Nir I**: Cytochemical characterization of sialoglycoconjugates on rat photoreceptor cell surface. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 28: 640—645, 1987.
  - 6) **La Vail MM, Pinto LH, Yasumura D**: Interphotoreceptor matrix in rats with inherited retinal dystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 21: 658—668, 1981.
  - 7) **Cohen D, Nir I**: Cytochemical evaluation of anionic sites on the surface of cultured pigment epithelium cells from normal and dystrophic RCS rats. *Exp Eye Res* 37: 575—582, 1983.
  - 8) **Cohen D, Nir I**: Sialic acid on the surface of photoreceptors and pigment epithelium in RCS rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 25: 1342—1345, 1984.
  - 9) **Uehara F, Muramatsu T, Takumi K, Ohba N**: Two-dimensional gel electrophoretic analysis of lectin receptors in the degenerative retina of C3H mouse. In Hollyfield J ed: *Degenerative Retinal Disorders, Clinical and Laboratory Investigations*. Alan R Liss, New York, 219—227, 1987.
  - 10) 内匠勝秀, 上原文行, 鮫島宗文, 大庭紀雄: 網膜下腔レクチン注入によりひき起こされる網膜変化. *あたらしい眼科* 3: 575—577, 1986.
  - 11) 上原文行, 鞆木一彦, 前里多佳美, 村松寿子, 村松喬, 大庭紀雄: 視細胞変性網膜のシアリルトラン  
スフェラーゼ活性. *あたらしい眼科* 3: 1349—1350, 1986.
  - 12) **Valle D, Valle LAD**: A specific enzyme defect in gyrate atrophy. *Am J Ophthalmol* 85: 200—204, 1978.
  - 13) **Hayasaka S, Nakazawa M, Okabe H, Masuda K, Mizuno K**: Progressive cone dystrophy associated with  $\alpha$ -L-fucosidase activity in serum and leukocytes. *Am J Ophthalmol* 99: 681—685, 1985.
  - 14) **Rossowski W, Srivastava SBI**: Glycosyltransferase activities in leukemic cells from patients and human leukemic cell lines. *Eur J Cancer Clin Oncol* 19: 1431—1437, 1983.
  - 15) **Lowry CH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ**: Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265—275, 1951.
  - 16) **Miyagi T, Tsuiki S**: Purification and characterization of  $\beta$ -galactoside ( $\alpha$ 2-6) sialyltransferase from rat liver and hepatomas. *Eur J Biochem* 126: 253—261, 1982.
  - 17) ローラント・シャウアー (田中徹三 訳): シアル酸の生化学. *生化学* 59: 133—146, 1987.
  - 18) **Aminoff D, Bruegge VWF, Bell WC, Sarpolis K, Williams R**: Role of sialic acid in survival of erythrocytes in the circulation: Interaction of neuraminidase-treated and untreated erythrocytes with spleen and liver at cellular level. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 1521—1524, 1977.
-