



β -ガラクトシドーシス：
遺伝子情報と疾病発現

大島 章弘

①

β -ガラクトシドーシス： 遺伝子情報と疾病発現

大島章弘

：スペースバイオテクノロジー
 医療産業と生命科学

目次

A 研究目的	2	保護タンパクの効果	15
B 研究の背景	2	D.5.1.1 酵素活性	15
B.1 β-ガラクトシドラーゼの臨床型	2	D.5.1.2 タンパク	16
B.2 ガングリオシドラーゼ発病のモデル	3	D.5.2 リン酸化障害	16
B.2.1 原形細胞	3	D.6 患者線維芽細胞の解析	18
B.2.2 発病の時期	4	D.6.1 細胞活性と前駆体活性	18
B.2.3 局所的障害	4	D.6.2 細胞内局在と複合体形成	18
B.3 酸性β-ガラクトシダーゼの基質特異性とプロセシング	5	D.6.3 患者線維芽細胞におけるE6-4プロテアーゼ阻害剤の活性回復効果	18
B.3.1 基質特異性	5	D.6.4 変異タンパクの半減期	20
B.3.2 プロセシング	5	E 考察	20
B.4 2次的β-ガラクトシダーゼ欠損症	7	E.1 正常β-ガラクトシドラーゼ遺伝子	20
B.4.1 細胞病	7	E.1.1 遺伝子構造	20
B.4.2 ガラクトシアリドラーゼ	7	E.1.2 発現実験と発現タンパク	20
C 研究方法	7	E.2 変異遺伝子	20
C.1 正常β-ガラクトシドラーゼ遺伝子のクローニング方法	7	E.2.1 遺伝子重複	20
C.1.1 cDNAライブラリのスクリーニング	7	E.2.2 イントロン変異に伴う異常	21
C.1.2 塩基配列の決定方法	7	E.2.3 エキソン内に起きた遺伝子変異	21
C.2 正常β-ガラクトシダーゼ遺伝子GPSの発現産物の解析	7	E.2.4 発現産物残存活性からみた変異遺伝子	21
C.2.1 β-ガラクトシダーゼ活性測定	7	E.3 表現型と遺伝子型の相関	22
C.2.1.1 過剰の発現	7	E.3.1 H本人の遺伝的背景	22
C.2.1.2 安定した発現	7	E.3.2 白人を中心とした表現型決定遺伝子	22
C.2.2 安定した発現	8	E.3.3 臨床型に影響を及ぼす変異遺伝子	23
C.2.3 免疫沈降法によるタンパクの検出	8	E.4 閾値理論と変異遺伝子	23
C.2.4 遺伝子発現産物添加によるGM1-ガンダリオンシドラーゼ細胞の活性回復効果	8	E.5 細胞病理からみたβ-ガラクトシドラーゼの多様性発現機構	24
C.3 変異遺伝子の解析	8	E.6 診断と治療に対して	26
C.3.1 RT-PCR法によるクローニング	8	F まとめ	26
C.3.2 PCR法によるゲノムの増幅と制限酵素解析による変異の同定	8	G 文献	27
C.4 変異遺伝子発現産物の解析	8		
C.4.1 ASVGM1-4細胞での発現方法	8		
C.4.2 活性発現に対するプロセアーゼ阻害剤と保護タンパクの効果	8		
C.4.3 リン酸化タンパクの検出	8		
C.5 患者細胞における変異タンパクの解析	8		
C.5.1 プロテアーゼ阻害剤の活性上昇効果	8		
C.5.2 バーコール密度勾配法による細胞内小器官の局在	8		
C.5.3 蔗糖密度勾配法による高分子複合体形成の確認	9		
C.5.4 半減期の測定	9		
D 結果	9		
D.1 β-ガラクトシダーゼcDNAの構造	9		
D.2 クローンGPSの発現タンパクの解析	13		
D.3 変異遺伝子	13		
D.4 変異遺伝子発現産物の残存活性	15		
D.5 残存活性を認める変異遺伝子発現産物のプロセシング障害	15		
D.5.1 活性発現に対するプロテアーゼ阻害剤と			

A 研究目的

β -ガラクトシダーゼ酵素欠損を伴う先天性代謝異常症は多い。それらは、 β -ガラクトシダーゼ酵素本体の異常によるものと2次的に活性低下を来したものに培養細胞の相補性テスト等から分類される(表1)。 $GM1$ -ガングリオシドシスとモルキオB病は、同じグループに属し、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子本体の異常によるものと考えられてきた。しかし、臨床症状は大いに異なる¹⁾。 $GM1$ -ガングリオシドシスは神経症状を主症状とするのに対して、モルキオB病は骨軟骨の異形成を伴い神経症状を示さない。 $GM1$ -ガングリオシドシスは更に、その発病の時期より乳児型、幼児型、成人型に分類される。(この論文では $GM1$ ガングリオシドシス乳児型を単に乳児型、 $GM1$ ガングリオシドシス幼児型を幼児型、 $GM1$ ガングリオシドシス慢性型/成人型を単に成人型と記載する。)これらは、発病の時期のみならず、臨床症状も質的違いがある。同じ酵素の異常でありながらなぜ多様な臨床症状を呈するのであろうか? 閾値の理論(B.2 ガングリオシドシス発病のモデル参照)は、病状の多くを説明する理論的根拠を与えるが、 $GM1$ -ガングリオシドシスとモルキオB病の質的違いを説明できない。筆者は、表現型の多様性の理由を明らかにするために、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子をクローニングし、種々の臨床型の遺伝子型を同定し、臨床型との相関を明らかにした。その結果は、特定の変異遺伝子が臨床型を決定することを示していた。そして、それらの変異遺伝子発現産物の分子病理の違いを明らかにした。

解析の途中で以下の事実を得た。
1) $GM1$ -ガングリオシドシスとモルキオB病は β -ガラクトシダーゼ遺伝子変異がも

表1 β -ガラクトシダーゼ欠損を認める疾患

欠損原因	疾患名	臨床型
		乳児型 幼児型 成人型
酵素自体の異常	$GM1$ -ガングリオシドシス	乳児型 幼児型 成人型
		モルキオB病
2次的酵素欠損	ガラクトシアリドシス	1 細胞病

培養細胞の相補性テスト等より、 $GM1$ ガングリオシドシスの3臨床型とモルキオB病は同じ遺伝子異常によることが分かっている。

たす典型的表現形態ではあるが、中間に属するような臨床症状を呈する例がある(解析予定)。

2) 同じ変異遺伝子を両疾患で認める。両疾患は別々の疾患と考えるより、統一的に考えることが病態の理解のために必要である。そこで、 β -ガラクトシドシスと両疾患を呼ぶことを筆者等は提案した(参考文献1)。 β -ガラクトシダーゼ遺伝子変異により引き起こされた疾患をここでは β -ガラクトシドシスと総称する。この論文は、 β -ガラクトシドシスにおける遺伝的背景と閾値の理論及び変異遺伝子の細胞病理を検討することで多様な表現型の発病機構解明を目的としている。

B 研究の背景

B.1 β -ガラクトシドシスの臨床型

β -ガラクトシドシスにおける臨床型分類の基準となるものは、神経症状の発病の時期(乳児/幼児/成人)、経過(急性/慢性)、障害臓器(全般/局在)などである。4臨床型のそれぞれの関係を示す(表2)。また、表3に具体的な臨床症状を示す。

乳児型は報告がもっとも多い。残存 β -ガラクトシダーゼ活性がほとんどなく、もっとも重篤で、多くの臓器で障害を受けることから、 β -ガラクトシドシスの基本的な病型であると考えられる。他の臨床型は残存 β -ガラクトシダーゼ活性がある程度見られることから、この軽症例とも考えられる。実際、幼児型は肝脾腫が見られないなどの違いはあるが、乳児型と神経症状は似ており、最終的に、筋緊張低下から除根硬直にいたる経過は同じであり剖検病理所見も同じである。乳児型幼児型ともに経過は急性であるが、幼児型の方がやや進行が遅やかであることが違っている。

表2 臨床型分類の参考とする基準

臨床型	$GM1$ ガングリオシドシス			モルキオB病
	乳児型	幼児型	成人型	
経過	急性	亜急性	慢性	
障害臓器	全般	特定臓器		
	中枢神経 内臓 骨軟骨 その他	中枢神経	大脳基底核	骨軟骨
残存活性	0-1%	2%	3-7%	2-4%

表3 β -ガラクトシドシスの4臨床型の臨床症状

	乳児型	幼児型	成人型	モルキオB病
発病時期	0-6カ月	6-20カ月	3才-成人	4-8才
死亡年齢	0-2才	3-20才	20才以上	20才以上
精神発達遅滞	+	+	+-	-
けいれん	+	+	-	-
錐体路障害	+	+	-	-
錐体外路障害	+	+	+	-
長管骨の変形	++	+-	-	++
脊椎の変形	++	+	+	++
ムコ多糖尿	+-	+-	-	+
角膜炎	-	-	-	+
肝脾腫	+	-	-	-
cherry-red spots	+-	-	-	-

成人型の神経症状は、乳幼児型と異なる。ほとんどの例で、構音障害と歩行障害で発病する。これらの障害は、大脳基底核の選択的障害として説明される。乳児型、幼児型、成人型と発病時期が遅くなるにつれ、主な障害部位は、多臓器、中枢神経系、大脳基底核と局在化している。

これとは、逆に、発病年齢を見るとこの順に、0-6カ月、6カ月-20カ月、3才-30才台と広域化している。モルキオB病は他の臨床型と違い神経症状を示さない。骨軟骨の異形成は、 $GM1$ -ガングリオシドシス乳幼児型と発病の年齢的な違いがあるので比較は難しいが、モルキオB病は質的にも長管骨の異形成や角膜炎を見るなど $GM1$ ガングリオシドシスと異なっていると思われる。

B.2 ガングリオシドシス発病のモデル

Conzelmann and Sandhoffらは、いくつかの仮定を行うことで、リソソーム病一般の発病モ

デルを提唱している¹⁾。このモデルは、患者細胞の残存活性と臨床型の相関から、純粋に酵素反応速度論をもちいて想定された理論である。このモデルを用いて、臨床型別の多様性をもたらす機構を検討する。

B.2.1 限界閾値

以下の順で発病すると仮定する。

- 1) 基質(ここではガングリオシド $GM1$)は、一定の量がいつもリソソームに流れ込んでいる。
- 2) 酵素はこれを分解するが通常10倍程度の余力を残している。
- 3) 酵素異常により活性が低下すると、残存活性が10%以上あれば基質の蓄積は起こらない。
- 4) これ以上低下すると基質の蓄積が始まる。この値が限界閾値となる。
- 5) 蓄積がある量になると発病する。残存活性があると、基質の蓄積がゆっくりになり、発病は遅くなる。

B.2 発病の時期

図1に理論的に考えられた発病年齢と残存活性の関係を示す。残存活性が限界閾値に近いほど gangliosid GM1 の蓄積は軽度になり発病は遅れる。このグラフでB曲線は8%を閾値に想定している。8%に近づくにつれ、基質の蓄積はゆっくりになり、発病年齢は急速に高齢化する。8%を越えるともはや発病しない。患者細胞が種々の残存活性をもつことが、発病年齢の広域化をもたらすことになる。

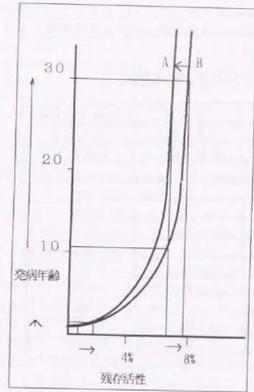


図1 残存活性と発病年齢の関係

本文B.2 発病の時期及びF.4 閾値理論と変異遺伝子参照

表4 培養患者細胞の残存活性と発病年齢

臨床型	残存活性	発病年齢
乳児型	0.65	3ヶ月
	0.69	5ヶ月
	1.58	3ヶ月
幼児型	3.05	2才
成人型	4.25	6才
	5.28	8才
	5.65	10才
	7.03	13才
	7.28	19才

酵素活性は4-methylumbelliferyl- β -galactosideを基質にして測定した(nmol/mg protein/h)。正常平均を100%とした。文献5より抜粋した。

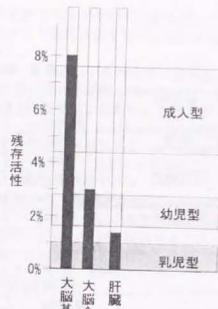


図2 GM1 ガングリオシドーシスにおける残存活性と障害組織

各組織の想定される限界閾値を黒の棒グラフで示した。乳児型、幼児型、成人型の残存活性は、0-1%、2-3%、4-7%である。ある組織の限界閾値が残存活性より高い場合障害が起きる。成人型では大脳基底核のみだが、幼児型では大脳全体、乳児型では肝臓基底まで障害を受けることになる。

患者培養リンパ球の残存 β -ガラクトシダーゼ活性を表4に示した。残存活性と発病年齢は逆相関している。このモデルから広域な発病年齢分布がある場合、0から7%までの残存活性を持つ多数の変異遺伝子発現産物があることが考えられる。

B.2.3 局所的障害

閾値が、臓器組織によって異なっていると仮定する。肝臓の閾値を1%、大脳皮質を3%、大脳基底核の8%とする。残存活性0%では、肝臓、大脳皮質、大脳基底核全てが障害を受ける。2%では、大脳皮質、大脳基底核。7%では、大脳基底核のみの障害となる。現実の患者リンパ球を用いた活性測定では、乳児型、幼児型、慢性型(成人型)で、それぞれ1%未満、2%、4-7%の残存活性を有していた(表4)。すなわち、残存活性が高いほど障害を受ける臓器組織の数が減り、部分的な障害が目立つことになる。慢性型での大脳基底核の選択的障害は、残存活性が高いこと由来と考えられる(図2)。

B.3 酸性 β -ガラクトシダーゼの基質特異性とプロセッシング

患者細胞の残存活性と閾値の理論は、GM1 ガングリオシドーシスの臨床症状をよく説明する。しかし、モルキオB病とGM1 ガングリオシドーシスの症状の違いを説明できない。今回の論文は、この違いを細胞病理に求めた。 β -ガラクトシドーシスの病態を理解するためには、正常 β -ガラクトシダーゼの酵素としての性質を理解する必要がある。その機能は、基質特異性とプロセッシングに分けて考えることができる。

B.3.1 基質特異性

酸性 β -ガラクトシダーゼは、生体内で多くの基質の加水分解を触媒する。そのなかで、gangliosid GM1 とケラタン硫酸が主要なものである。複数の基質が存在することが、 β -ガラクトシドーシスの臨床像の多様性をもたらす一つの原因と考えられる。

すなわち、「それぞれの臨床病型において、種々の基質に対する触媒能が異なって障害を受ける。それぞれの基質は、組織により局在が異なっているために、異なった組織が障害を受け、異なった臨床像を呈する。gangliosid GM1

1は、その名の示すように神経細胞に多い物質で、この蓄積は主に神経症状を引き起こす。ケラタン硫酸は、ムコ多糖の成分であり、この蓄積は骨軟骨の異形成を引き起こす(図3)。」とするモデルである。

逆に考えると、このモデルにしたがえば、神経障害を起こさないモルキオB病細胞は、gangliosid GM1 を分解できるはずである。この考え方は、生きた細胞レベルでの代謝において正しいと思われる。

実際、患者培養細胞へのGM1 ガングリオシドの負荷実験において、モルキオB病患者細胞は正常と同じ程度のGM1 ガングリオシドの分解を行う。しかし、in vitroにおいて、GM1 ガングリオシドに対する標準的な酵素活性測定法では、GM1 ガングリオシドーシス細胞とモルキオB病細胞の間では、残存活性に明かな差異をこれまでの研究では認めない。モルキオB病患者細胞のin vitroでのgangliosid GM1 分解活性は、幼児型程度しかない。そのため、他のタンパクとの関係やを含めた細胞内高次構造にその代謝障害の理由を求めねばならない。

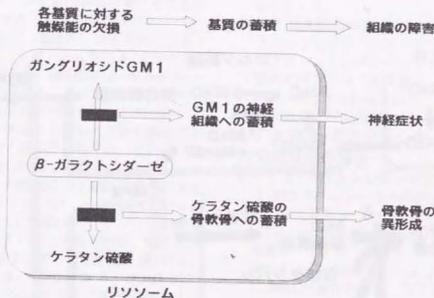


図3 β -ガラクトシダーゼ基質蓄積と臨床症状

黒の四角は、矢印の先の基質に対する酵素機能の欠損を示す。右矢印は、基質蓄積とそれにより引き起こされる組織障害の関係を示す。

B.3.2 プロセッシング

β -ガラクトシダーゼはリソソームの酵素であり、代謝機能を発現するためには、リソソームに輸送され、保護タンパクと高次構造をとる必要がある(図4) ¹⁸。 β -ガラクトシダーゼは、cDNAのアミノ酸配列によれば、シグナル配列を含め分子量72 kDのタンパクとして転写される。粗面小胞体でシグナルの切断と糖鎖の付加を受け、分子量84 kDの前駆体となる。ゴルジ装置に運ばれた後、更に糖鎖の修飾を受け、分子量88 kDの前駆体となる。この前駆体は、ゴルジ装置内で、トランスゴルジ内にあると考えられているフォスフォトランスフェラーゼによりリン酸化され、マンノース6リン酸糖鎖側鎖を獲得する(図4) ¹⁹。このマンノース6リン酸糖鎖側鎖をマンノース6リン酸レセプターは、中性の条件下で認識し結合する。これを含んだ小顆粒エンドソームはゴルジ装置を離れ、レセプターと β -ガラクトシダーゼ結合物をリソソームに輸送する。輸送の途中でエンドソームは酸性化する。この条件下で前駆体とレセプターは分離し、前駆体はリソソームにバックイジされる。マンノース6リン酸レセプターはゴルジ装置にもどり、次のリソソーム酵素の輸送

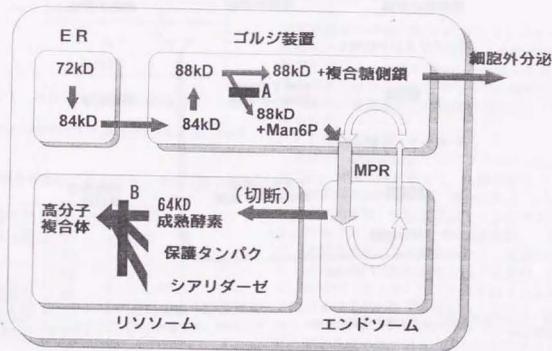


図4 β -ガラクトシダーゼの細胞内プロセッシング

ER: 粗面小胞体, Man6P: マンノース6リン酸糖鎖側鎖, MPR: マンノース6リン酸レセプター, A: I細胞病で傷害されるプロセッサ部位, B: ガラクトシダーゼでの障害部位。保護タンパク 多機能タンパクとして知られる(表5を参照されたい。)

を行う。細胞培養液に塩化アンモニウムなどのアルカリ剤を添加すると、このレセプターの輸送機能が障害され、リン酸化前駆体が分泌されてくる(図4細胞外分泌)。この現象を利用して細胞培養液より、前駆体タンパクの精製が可能となる。リソソームに輸送された分子量88 kDの前駆体は、ここでC末端側の切断を受け、分子量64 kDの成熟酵素に変換される。その後、保護タンパクとシアリダーゼとで高分子複合体を形成する。 β -ガラクトシダーゼ成熟酵素は、そのままではリソソーム内で不安定であり、プロテアーゼの分解を受け易い。保護タンパクは、 β -ガラクトシダーゼを安定化する因子として、ガラクトシアリドシスの研究から発見された。その名は、 β -ガラクトシダーゼを分解から保護することに由来する。1988年にこの酵素のcDNAの配列が決定されたが、その配列は酵母のカルボキシペプチダーゼYと強い相同性をもっていた¹⁹。これを契機に保護タンパクの機能について研究が進み、プロセッサ分解からの保護とは全く異なる機能であるペプチダーゼ作用等の多機能タンパクとして注目を受けるようになった。表5に保護タンパクの現在までの明らかになった機能を示す¹⁴。

表5 保護タンパクの機能

- 1) β -ガラクトシダーゼの安定化
- 2) シアリダーゼの活性化
- 3) 酸性カルボキシペプチダーゼ (至適pH5.6)
- 4) 中性エステラーゼ(至適pH7.0)
- 5) 生理活性ペプチドC末端デアミダーゼ (至適pH7.0)

B.4 2次の β -ガラクトシダーゼ欠損症

プロセッシングでのべたように β -ガラクトシダーゼがリソソームに運ばれて安定化するためには、多くの酵素が関与する。そのうちフォスフォトランスフェラーゼ欠損はI細胞病を、保護タンパク欠損はガラクトシアリドシスを引き起こす。それぞれの患者培養細胞内の β -ガラクトシダーゼの動態を次に示す。これらの動態は、 β -ガラクトシダーゼにおける β -ガラクトシダーゼの動態を考える上で有用である。

B.4.1 I細胞病

I細胞病においては、フォスフォトランスフェラーゼの欠損により β -ガラクトシダーゼにマンノース6リン酸糖鎖側鎖を付加することができず、 β -ガラクトシダーゼは分泌タンパクと同じ経路を通り、細胞外に分泌されてしまう(図4A) ¹²。リソソーム内の β -ガラクトシダーゼは欠損するが、細胞外の β -ガラクトシダーゼは欠損するが、患者血清の β -ガラクトシダーゼ活性は異常高値を示し診断の助けとなる。マンノース6リン酸レセプター輸送系が主要な役割をなす線維芽細胞では、他の多くのリソソーム酵素も同様に欠損する。しかし、これらのリソソーム酵素は、I細胞病患者の多くの組織では欠損していない。この輸送系以外の系が多くの組織では機能して、リソソーム酵素を正しく輸送していると考えられる。唯一の例外が、 β -ガラクトシダーゼである。調べられた組織全部で、 β -ガラクトシダーゼの低下が見られている。他のリソソーム酵素と違い、 β -ガラクトシダーゼはマンノース6リン酸レセプター輸送系に強く依存していると考えられる。

B.4.2 ガラクトシアリドシス

ガラクトシアリドシス患者細胞では、保護タンパクの欠損のために β -ガラクトシダーゼが、高次構造をとることができない(図4B)。このため、 β -ガラクトシダーゼはプロテアーゼ的作用を受け、異常分解してしまう。正常線維芽細胞内では、 β -ガラクトシダーゼの半減期は10日以上あるが、ガラクトシアリドシ

ス患者細胞内では、1日程度である。培養細胞で欠損を回復する方法は、2つ知られている。1つは、培地に保護タンパクの前駆体を加える方法である。とりこまれた保護タンパクは、 β -ガラクトシダーゼと高分子複合体をつくり安定化する。もう一つの方法は、培地にプロテアーゼ阻害剤を加える方法である。数日で正常の40%程度の活性回復を見る。

C 研究方法

C.1 正常 β -ガラクトシダーゼ遺伝子のクローニング方法

C.1.1 cDNAライブラリのスクリーニング

ヒト胎盤Ag111ライブラリは、J. Evan Sandler 博士(Howard Hughes Medical Institute, Washington University School of Medicine, St. Louis, USA)より供与された。ライブラリを抗-高分子複合体ウサギ血清でスクリーニングした。高分子複合体は、 β -ガラクトシダーゼ、保護タンパク及びシアリダーゼで構成される。得られた陽性クローンを更に抗 β -ガラクトシダーゼモノマー抗体で2次スクリーニングした。1クローンがこれら2種の抗体で陽性になり、GP8とした。

C.1.2 塩基配列の決定方法

クローンGP8をパケテリオフィージM13にサブクローンし、デレイションライブラリを複製またはプライマーを複製し、Dideoxynucleotide chain termination 法にて全塩基配列を決定した。

C.2 正常 β -ガラクトシダーゼ遺伝子 GP8 の発現産物の解析

C.2.1 β -ガラクトシダーゼ活性測定

β -ガラクトシダーゼ活性の測定方法は、人工蛍光基質 4-methylumbellifery β -galactoside を用いた。30 μ l 試薬(クエン酸緩衝液 0.2 M pH 4.5 + 0.1 M NaCl + 2mM 4-methylumbellifery β -galactoside) に30 μ l の検体を加え、37°C 1時間 でできる 4-methylumbelliferyferon の量を蛍光測定した。

C.2.2 COS細胞での発現

C.2.2.1 一過性の発現

クローンGP8をpSVL(ファーマシア)にサブクローンし、DEAE-Dextran 法につづき chloroquine 処理にて、COS1細胞にトランスフェクションを行った¹³。トランスフェクション後は、65°Cで2時間加熱し β -ガラクトシダーゼ活性を失活させた培地で数日培養した。

C.2.2.2 安定した発現

クローン GP8 を pKTH539 (Anu Jalanko 博士, Orion Genetic Engineering Laboratory, University of Helsinki) にサブクローンし、エレクトロポレーションにて、COS 細胞に導入した。Hygromycin B 抵抗性のクローンを分離した。高い β -ガラクトシダーゼ活性を発現するクローンを分離、COS-pKTH539 (GP8) とした。

C.2.3 免疫沈降法によるタンパクの検出

細胞内タンパクの解析には、変異遺伝子のトランスフェクション後、細胞をロイシンフリー MEM+L-[4,5-³H]ロイシン添加培地で 2 日間培養した細胞を用いた。細胞は、0.6 ml 溶解液 (0.1M Tris-HCl pH7.5, 1% Triton X-100, 0.4M KCl, 0.6M EDTA, 0.025M leupeptin) に溶解した。分泌タンパクの解析には、上記の培養液を 60% 硫酸で塩析濃縮し、20mM リン酸緩衝液 pH6.0 で透析したのを用いた。検体に 5 μ l の抗体を加え 16 時間反応後、50 μ l の protein A crude cell suspension と 1 時間反応した。この後、免疫沈降物を遠心に集め、3 回洗浄液 (0.1M Tris-HCl pH 7.5 + 0.15M NaCl + 0.5% Triton X-100, 0.1% SDS + 1mM EDTA) で洗浄した。沈降物は、SDS ポリアクリルゲル電気泳動で展開解析した。

C.2.4 遺伝子発現産物添加による GM1- α グリコシドラーゼ細胞の活性回復効果

COS-pKTH539 (GP8) 細胞から分泌される β -ガラクトシダーゼ前駆体の GM1- α グリコシドラーゼ細胞への取り込みを検討した。COS-pKTH539 (GP8) 細胞と線維芽細胞より、前駆体と成熟酵素を D'Azzo らの方法¹⁴ で部分精製した。それぞれの酵素 10 ユニットの GM1- α グリコシドラーゼ細胞の培地に添加し、24 時間後の酵素活性の回復を測定した。

C.3 変異遺伝子の解析

C.3.1 RT-PCR 法によるクローニング

株化した患者リンパ球ないし線維芽細胞から、guanidine isothiocyanate / cesium chloride 法で mRNA を精製した。ランダムエキサマーまたは、オリゴ dT をプライマーに cDNA Synthesis System Plus Kit (アマージャム) により cDNA を作製し、PCR 法にて、重なり合う断片にわけて増幅し、塩基配列の決定方法に述べた方法で塩基配列を決定した。

C.3.2 PCR 法によるゲノムの増幅と制限酵素解析による変異の同定

RT-PCR 法にて cDNA 上に発見された遺伝子の多くは、必要に応じてゲノム DNA で遺伝子変

異の確認を行った。2-3 μ g 患者及び正常コントロール DNA をテンプレートに遺伝子変異近辺のエキソン配列を PCR 法にて増幅した。遺伝子変異により新たに制限酵素部位が出現または消失といった変化が見られない場合は、増幅プライマーに塩基置換をいれることで、新たな制限酵素部位の出現を図った。増幅 DNA を適当な制限酵素で消化後、アガロースゲルで解析した。

C.4 変異遺伝子発現産物の解析

C.4.1 ASVGM1-4 細胞での発現分析

GM1 ガングリオシドラーゼ乳児型線維芽細胞 (遺伝子型 Dup1103/dup1103) をアデノシ V 4.0 組換えウイルスを用いて形質転換し、ホストにした¹⁵。pCAGGS (宮崎純一博士, 東京大学医学部) をベクターにして、標準的なカルシウムリオン法でトランスフェクションすることで遺伝子の導入を行った。

C.4.2 活性発現に対するプロセアーゼ阻害剤と保護タンパクの効果

正常 β -ガラクトシダーゼ遺伝子 (GP8) と変異遺伝子のトランスフェクション後、5 日目で活性を追跡した。この際、プロセアーゼ阻害剤の効果は、培地に E64 (10 μ g/ml) を加えることで、また保護効果はトランスフェクション時に保護タンパクとトランスフェクションすることで検討した。

C.4.3 リン酸化タンパクの検出

トランスフェクション後、³²P で細胞タンパクを標識し、10mM NH₄Cl を培地に付加して分泌されてくる前駆体タンパクを免疫沈降法によるタンパクの検出と同様の方法で解析した。

C.5 患者細胞における変異タンパクの解析

C.5.1 プロテアーゼ阻害剤の活性上昇効果

保護タンパクと高分子複合体形成が行われず、異常分解が起きていれば、ガラクトシアリドラーゼと同様に、E 6.4 の培地付加で培地へ活性の回復が見られるはずである。患者細胞をサブコンフルエントのまで培養し、培地交換後プロテアーゼ阻害剤 E64 (10 μ g/ml) を加えた。更に 5 日間培養し、加えなかった場合に対するの活性の上昇を検討した。

C.5.2 パーコール密度勾配法による細胞内小器官の局在

パーコールを用いた密度勾配法により、リソソームとエンドソームを分離し、活性タンパクがリソソームに正しく輸送されたかを検討した。細胞をトリプシン処理で培養プレートよりはがし、沈澱を 0.25M ショ糖液に 400 μ l に懸濁し、250psi で 10 分間加圧後、急速に

減圧することで細胞を破砕した。装置は、Yeda press (Linca Lamon Instrumentation, Tel Aviv, Israel) を用いた。その後、5ml の 40% パーコール + 0.25M ショ糖液に重層し、Beckman VTI-80 ローターで、22000rpm 25 分遠心、分離した。

C.5.3 蔗糖密度勾配法による高分子複合体形成の確認

ショ糖密度勾配法 (20% から 40%) により、分子量で変異タンパクを分離し、 β -ガラクトシダーゼが保護タンパクと高分子複合体を形成しているか検討した。細胞を 100 μ l の溶解液 (20mM リン酸ナトリウム PH 6.0 + 100mM 塩化ナトリウム + 0.2% トライト N100) に溶かし、5ml の 20%-40% のショ糖勾配液 (20mM リン酸ナトリウム PH 6.0 + 100mM 塩化ナトリウム + 0.2% トライト N100) に溶かし、5ml の 20%-40% のショ糖勾配液につけられた溶液に重層し、Beckman SW-50 ローターで 40000rpm 15 時間遠心後、分離した。

C.5.4 半減期の測定

β -D-galactopyranosyl methyl-p-nitrophenyl triazene 処理により細胞内の β -ガラクトシダーゼ活性を完全に不活性化させることができる。この処理後、活性消失前の活性にもどるまでの時間を測定することで回復することで生成酵素の半減期を推定した¹⁶。

D 結果

D.1 β -ガラクトシダーゼ cDNA の構造

ライブラリを抗高分子複合体ウサギ血清でスクリーニングした結果 11 個の陽性クローンが

得られた。更に抗 β -ガラクトシダーゼモノマー抗体で 2 次スクリーニングした。1 クローンは陽性としての残り GP8 とした。クローン GP8 は、2379 塩基からなり、タンパクコード領域に 203 1 塩基 677 アミノ酸をコードしていた。非転写領域は、5' に 34 塩基、3' に 314 塩基認められた。3' 切所シグナル (AATAAA) は、ポリ A 配列がこの後続く 3' 終端から 16 塩基上流に見られた。タンパクコード領域には、シグナル配列とみられる 23 アミノ酸疎水性アミノ酸配列と 7 個の糖鎖結合部位の候補 (アミノ酸配列 (NX (T or S)) を認めた。図 5-6 に β -ガラクトシダーゼの構造と全塩基配列と推定されるアミノ酸配列を示す (参考文献 2¹⁷ 発表分)。図 6 には、難波らが報告したマウス β -ガラクトシダーゼの配列¹⁸ とゲノム構造解析の結果との比較のために記した。マウス遺伝子との相同性の検討において、同じアミノ酸が保たれているものは下線を引いた。シグナル配列 (1-23) と成熟酵素切断部位の付近 (520-540) 以外は全般に相同性がよく保たれている。マウスでは、ヒトの C 末端 33 アミノ酸の配列がない。Morreau の報告した 16 のエキソンの境界部は、1 で印をつけた¹⁹。 β -ガラクトシダーゼ患者遺伝子解析から判明した患者における 1 塩基置換を正常配列の上に、アミノ酸置換を下の記した。括弧内は認められた患者の臨床型をしめす。この結果についての詳細は、変異遺伝子を参考にされたい。

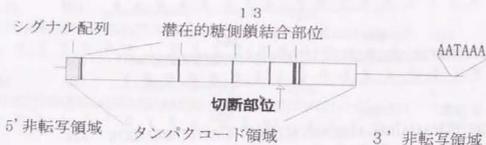


図 5 β -ガラクトシダーゼ cDNA GP8 の構造

ヒト胎盤ライブラリより分離した完全長 β -ガラクトシダーゼ遺伝子の構造を示す。23 アミノ酸のシグナル配列と 7 つの潜在的糖鎖結合部位を認めた。矢印の部位は前駆体成熟酵素にプロセアされる時に切断されると考えられる。

40 60 T 80 34
 GCGCGACTGCAGAGCCGGGAGGCTGGTGTCT
 ATGCCGGGGTCTCGGTTCCGACTCCCTCCCTGTTGGTGGTTCGCTGCTTCTGGGCCCT 94
M P G F L V R I L P L L L V L L L L L G P 20
 L (Polymorphism)
 100 1 | 2 120 140
 ACGCGCGGCTTGGCG|AATGCCACCCAGAGGATGTTTGAATGACTATAGCCGGGACTCC 154
T R G L R N A T Q R M F E I D Y S R D S 40
 160 T C 200
 TTCCCTCAAGGATGGCCAGCCATTTCGCTACATCTCAGGAAGCATTACTACTCCCGTGTG 214
F L K D G Q P F R Y I S G S I H Y S R V 60 R49C
 C T (Adult) 151T
 (Infantile)
 220 240 260
 CCGCGTCTACTGGAAGGACGGCTGCTGAAGATGAAGATGGCTGGGCTGAACGCCATC 274
P R F Y W K D R L L K M K M A G L N A I 80
 2 T | C 3 300 320
 CAGAC|GTATGTGCCCTGGAACCTTCATGAGCCCTGGCCAGGACAGTACCAGTTTCTGAG 334
Q T Y V P W N F H E P W P G Q Y Q F S E 100 T82M
 M H (Adult) (Morquio B) Y83H
 340 360 380
 GACCATGATGTGGAATATTTCTTCGGCTGGCTCATGAGCTGGGACTGCTGGTTATCCTG 394
D H D V E Y F L R L A H E L G L L V I L 120
 A 420 3 | 4 440
 AGCCCGGGCCCTACATCTGTGCAGAGTGGAAATG|GGAGGATTACCTGCTTGGCTGCTA 454
R P G P Y I C A E W E M G G L P A W L L 140 G123R
 R (infantile)
 460 480 4 | 5 500
 GAGAAGAGTCTATTCTCTCCGCTCCTCCGACCCAG|ATTACCTGGCAGCTGTGGACAAG 514
E K E S I L L R S S D P D Y L A A V D K 160
 520 540 560
 TGGTTGGGAGTCTCTGCCCCAAGATGAAGCCTCTCCTCATCAGAATGGAGGCCAGTT 574
W L G V L L P K M K P L L Y Q N G G P V 180
 580 5 | 6 600 620
 ATAACAGTGCAG|GTTGAAAATGAATAGCCAGCTACTTGGCCTGTGATTTGACTACCTG 634
I T V Q V E N E Y G S Y F A C D F D Y L 200
 TA 640 660 680
 CGTCTCTGCAGAAAGGCTTTCGCCACCATCTGGGGGATGATGGTTCGTTTACCAC 694 R201C
R F L Q K R F R H H L G D D V V L F T T 220 R201H
 CH (Juvenile) C (Infantile) R208C

710 720 740
 GATGGAGCACATAAAACATTCTGAAATGTGGGCGCTCGAGGCGCTCTACACCCAGGTG 754
D G A H K T F L K C G A L Q G L Y T T V 240
 760 6 | 7 780 800
 GACTTTGGAACAG|GCAGCAACATCACAGATGCTTCTTAAGCCAGAGGAAGTGTGAGCC 814
D F G T G S N I T D A F L S Q R K C E P 260
 820T 7 | 8 840 (CT)* 860
 AAAGGACCCTTG|ATCAATTCTGAATTCATACTGGCTGCTAGATCACTGGGCCAACT 874
K G P L I N S E F Y T G W L D H W G Q P 280 P263S
 S (Adult) L (Morquio B) W273L
 880 900 920
 CACTCCACAATCAAGCCGAAGCAGTGGCTTCCTCCCTATGATATACTTCCCGTGGG 934
H S T I K T E A V A S S L Y D I L A R G 300
 940 8 | 9 960 G 9 | 10
 GCGAGTGTGAAC|GTACATGTTTATAGGTGGGACCAATTTGCTATTGGAATG|GGGCC 994
A S V N L Y M F I G G T N F A Y W N G A 320 Y316C
 C (Infantile)
 1000 1020 1040
 AACTCACCTATGCAGCACAGCCACCAGCTACGACTATGATGCCCACTGAGTGGGCT 1054
N S P Y A A Q P T S Y D Y D A P L S E A 340
 1060 1080 10 | 11
 GGGGACCTCACTGAGAAGTATTTGCTCTGCGAAACATCATCCAGAAG|TTTAAAAAGTA 1114
G D L T E K Y F A L R N I Q K F E K V 360
 1120 1140 1160
 CCAGAAGGCTCTATCCCTCCATCTACACCAAAGTTGCAATGGAAGGCTCACTTTGGAA 1174
P E G P I P P S T P K F A Y G K V T L E 380
 11 | 12 1200
 AAG|TTAAAGACAGTGGGAGCAGCTCTGGACATTCTGTCCCTCTGGGCCCATCAAAGC 1234
K L K T V G A A L D I L C P S G P I K S 400
 1240 1260 12 | 13 1280
 CTTTATCCCTTGACATTTATCCAGGTGAACAG|CATTATGGTTGTGCTGTACGGGACA 1294
L Y P L T F I Q V K Q H Y G F V L Y R T 420
 1300 1320 1340
 ACACCTCCTCAAGATTGCAGAACCCAGCACCTCTCTCTGACCCCTCAATGGAGTCCAC 1354
T L P Q D C S N P A P L S S P L N G V H 440
 1360 13 | 14 1400 TA
 GATCGACATATGTTGCTGTGGATGGGA|TCCCCAGGGAGTCTCTGAGCGAAACAATGTG 1414 R457Ter
D R A Y V A V D G I P Q G V L E R N N V 460 R457O
 O (Infantile) (Adult)

1420 1440 1460 1474
ATCACTCTGAACATAACAGGGAAGCTGGAGCCACTCTGGACCTCTCTGGTAGAGAACATG 480
I T L N I T G K A G A T L D L L V E N M

TA 1500 14 | T 15
GGACGTGTGAACATATGGTGCATATATCAACGATTTAAAG | GGTTGGTTTCTAACCTGACT 1534 R482C
G R V N Y G A Y I N D F K G L V S N L T 500 R482H
CH (Morquio B & Infantile) (Morquio B) C (Infantile) 6494C

1540 T 1580
CTCAGTTCCAATATCCTCCAGGACTGGACGATCTTTCCACTGGACACTGGAGGTGCAGTG 1594
L S S N I L T D W T I F P L D T E D A V 520 W509C
C (Morquio B)

1600 1620 1640
CGCAGCCACCTGGGGGCTGGGGACCCGTGACAGTGGCCACCATGATGAAGCTGGGCC 1654
R S H L G G W G H R D S G H H D E A W A 540

1660 1680 1700
CACAACTCATCCAACACTACAGCTCCCGGCCCTTTATATGGGAACTCTCCATCCCAGT 1714
H N S S N Y T L P A F Y M G N F S I P S 560

1720 1740 1760 15 G | 16
GGATCCGAGACTTGCACCAGGACACCTTTATCCAGTTTCTGGATGGACCAAG | GGCCAG 1774
G I P D L P Q D T F I Q F P G W T K G Q 580 K577R
R (Infantile)

1780 1800 A 1820
GTCTGGATTAATGGCTTAACTTGGCCGCTATTGGCCAGCCGGGGCCCTCAGTTGACC 1834
V W I N G F N L G R Y W P A R G P Q L T 600 R590H
H (Juvenile)

1840 1860 1880
TTGTTGTGCCCCAGCACATCCTGTGACCTCGGGCCCAACACCATCACCGTGGTCAA 1894
L F V P Q H I L M T S A P N T I T V L E 620

1900 G 1940
CTGGAGTGGCCACCTCGACGAGTATGATCCAGAAGTATGTGCTGTGACGTTCTGGAC 1954
L E W A P C S S D D P E L C A Y T F V D 640 E632G
G (Juvenile)

1960 1980 2000
AGGCCAGTTATTGGCTCATCTGTGACCTACGATCATCCCTCCAAACCTGTTGAAAAAGA 2014
R P V I G S S V T Y D H P S K P V E K R 660

2020 2040 2060
CTGATCCGCCCCACCCCGCAAAAACAAAGATTCATGGCTGGACCATGTATGATGATGA 2074
L M P P P P Q K N K D S W L D H V Ter 677

AAGCCTGTGTCTTTGAGGGATTGTACCCTGAACTAACCTGCACAGATCCCTCGTGTACGC 2134
CACATTTCACTGATTGGAATGTGGAATGGAAGAAGAAITTAGGATGTGCATTTTCACCT 2294
GAGTTTCCGTGCATCCCTGCAGTGCCTGCAAGCCACCTTCAGGGACCCAGCTGGAATGTG 2354
TGAGGGCTGACAGCACAGTACCTGCATACATATCTCGAGGGCTGGAATGGAAGCTTTA 2414
AAGTGGTAGTGATTTTATTTTGGGAAGATCATGTACCTTTTTGTAATAAAATTTG 2474
TACTC 2479

図6 ヒトβ-ガラクトシダーゼcDNAの塩基配列とアミノ酸配列

G P Bの塩基配列と対応するアミノ酸配列を示す。下線を引いた部位はマウスでも同じアミノ酸に保たれていることをしめす。潜在的糖鎖結合部位は、ボックスで囲った。β-ガラクトシダーゼ患者で認められた塩基置換を塩基配列の上に、アミノ酸置換を下に示す。括弧内は患者の臨床症状を、左には遺伝子変異の名を記した。詳細は、遺伝子変異の章を参照されたい。*引き続く2塩基が変異したものを示す。

D.2 クローン GP8 の発現タンパクの解析

COS細胞をホストにした一過性の発現実験では、コントロールと比較して細胞内の活性では、3倍程度の酵素活性の上昇を認めた。培地への分泌では、7倍程度認められた。また、免疫沈降法では、84と88kbの前駆体と思われるバンドと60kbの成熟酵素と思われるバンドを認めた。これらの分子量は、ヒト正常で見られる分子量とはほぼ同じであった。(参考文献2発表分)

COS細胞のβ-ガラクトシダーゼより10倍程度安定に酵素活性を発現するクローンを

pKH539(GP8)の遺伝子導入にて得た。この細胞より分泌される前駆体の乳児型細胞への取り込みをヒト線維芽細胞由来の前駆体と成熟酵素と比較した(表6)。ヒト正常β-ガラクトシダーゼ前駆体と同様の患者細胞への前駆体の取り込みがGP8発現産物に認められた。この取り込みは、mannose 6-phosphateにより阻害された。また、とりこまれた前駆体は、88kbから64kbの成熟酵素に細胞内でプロセスされた。(参考文献3発表分)

精製材料	酵素形態	培養時間		
		24時間	24時間 +チエイイス	24時間 +Man-6P
pKH539(GP8)形質転換細胞	前駆体	18.2	12.3	0.6
ヒト線維芽細胞	前駆体	23.4	14.5	0.5
ヒト線維芽細胞	成熟酵素	1.0	0.7	0.6
	なし	0.6	0.8	0.7

表6 GP8発現産物の培地添加時のGM1-ガングリオシド-シス細胞の活性上昇効果

精製材料で示された部分精製酵素10ユニットをGM1-ガングリオシド-シス細胞の培地5mlに添加し、細胞のβ-ガラクトシダーゼ活性の回復を測定した。24時間：24時間培養後の活性上昇をみた。24時間+チエイイス：培地交換+更に24時間チエイイスしたときの活性を示す。24時間+Man-6P：酵素添加と同時に5mM mannose 6-phosphateを加えて24時間培養したときの活性を示す。

D.3 変異遺伝子

筆者らは、遺伝子解析を2回にわたって計画した。初回は、4臨床型それぞれについて数人づつの患者細胞を集め解析を行った。この結果、日本人を中心としたβ-ガラクトシダーゼの遺伝的背景が明らかになった。この結果から、さらに臨床症状を決定する因子を解明するために優性型とモルキオB病患者を中心に患者細胞を集め、2回目の解析を行った。Dup288, Y316C, W273L, R482H, 及びW509C遺伝子変異が、

添付した参考文献4及び5により報告した変異である。表7に現在までに筆者らが同定した変異を示す。吉田と筆者らの初回の研究の発表後、同様の研究方法を用いてGM1ガングリオシド-シスの遺伝子解析の研究が発表されている。表は以後の考察の参考にするために他の研究グループの発表した変異を含んでいる(第一報告者及び文献参照)。それらの表現型と遺伝子型との相関を表8と表9にまとめて示した。

表7 β-ガラクトシドーシス患者で見られた遺伝子変異

遺伝子名	ゲノムの変異	mRNAの異常	第一報告者	文献
遺伝子重複				
Dup288	塩基配列288-310塩基の重複	mRNAの減少	大島、吉田、 et al.	20
Dup1103	エキソン11、12の重複	分子量の増加	吉田、大島、 et al.	5
イントロン内の変異				
Sp11	イントロン1ドナー側接合部位の1塩基挿入	スプライス変異による20塩基の挿入	Morrone A, Morreau H, et al.	21
Sp12	イントロン2アクセプター側接合部位の1塩基置換	スプライス変異による32塩基の挿入	石井、大島、 et al.	22
Sp16	イントロン6アクセプター側接合部位の1塩基置換	スプライス変異による9塩基の挿入	福島、塚本、 et al.	23

エキソン内の変異	cDNA上の変異位置	残存活性	第一報告者	文献
R49C	179	-	西本、難波、et al.	24
151T	186	+	吉田、大島、et al.	5 24
T82M	279	+	Chakraborty S, Rafi MA, et al.	25
Y83H	281	+	石井、大島、et al.	22
G123R	401	-	吉田、大島、et al.	5
R201C	635	+	吉田、大島、et al.	5
R201H	636	+	石井、大島、et al.	22
R208C	656	-	Boustany RM, Qian WH, et al.	26
P263S	821	-	石井、大島、et al.	14
W273L	851	+	大島、吉田、et al.	27
Y316C	981	-	大島、吉田、et al.	20
R457Ter	1402	-	西本、難波、et al.	24
R457Q	1403	-	吉田、大島、et al.	5
R482C	1478	-	石井、大島、et al.	22
R482H	1479	-	大島、吉田、et al.	27, 28
G494C	1513	-	石井、大島、et al.	22
W509C	1561	-	大島、吉田、et al.	27
K577R	1566	-	Boustany RM, Qian WH, et al.	26
R590H	1802	-	Boustany RM, Qian WH, et al.	26
E632G	1928	-	Boustany RM, Qian WH, et al.	26

残存活性：変異遺伝子を乳児型GM1-ガングリオシドーシス患者細胞に導入し残存活性を検討した。残存活性を認められるものを+、認められないものを-とした。

表8 日本人の臨床型と遺伝子型の相関

臨床型	遺伝子型	患者数
乳児型	Dup1103/Dup1103	1
	Dp-1103/?	1
	Y316C/G494C	1
	G123R/Dup288	1
	R49C/?	1
	R497Ter/T497Ter	2
幼児型	R201C/R201C	2
	R201C/?	4
	Sp16/Sp16	1
成人型	151T/?	1
	151T/R457Q	1
	151T/151T	18
モルキオB病	Y83H/R482C	1

変異遺伝子発現産物に残存活性がある変異は太字と下線で示した。

表9 白人の臨床型と遺伝子型の相関

臨床型	遺伝子型	患者数
乳児型	R482H/R482H	6
	R482H/?	1
	R208C/R208C	2
	R208C/K577R	2
	R208C/?	2
幼児型	R590H/R208C	1
	E632G/R208C	1
	R201H/P263S	1
成人型	T82M/T82M	1
	T82M/Sp11	2
モルキオB病	Sp12/Sp12	1
	W273L/W273L	2
	W273L/R482H	2
	W273L/W509C	1
	W273L/?	3

D.4 変異遺伝子発現産物の残存活性

表7の残存活性の項に、C.4.1 ASVGM1-4細胞での発現方法で述べた方法で変異遺伝子を発現したときの酵素活性を示す。正常と比べ低い残存活性を認められるものを+、認められないものを-とした。

D.5 残存活性を認める変異遺伝子発現産物のプロセッシング障害

変異遺伝子151T、R201C、W273Lに関する結果は、参考文献6²⁹⁾に発表しており、本論文は、更にY83H、T82M、Sp12に関する結果を追加報告する。

D.5.1 活性発現に対するプロテアーゼ阻害剤と保護タンパクの効果

D.5.1.1 酵素活性

図7に変異遺伝子の活性発現に対するプロテアーゼ阻害剤と保護タンパクの活性上昇効果の検討結果を示す。正常遺伝子でのみの発現においては、トランスフェクション後、3-4日目で活性の上昇があるが、5日目では低下する。保護タンパクの共発現やプロテアーゼ阻害剤E64の培地への付加で活性の数倍の上昇と5日目までの活性上昇が見られた(図7正常)。

日本人モルキオB病患者に認められたY83H遺伝子変異と白人モルキオB病患者で複数の患者に認められたW273L変異遺伝子の発現では、正

常と同様に保護タンパクの共発現とE64の培地への付加で、活性上昇効果を認めた(図7 W273LとY83H)。

白人幼児型患者で認められたR201H変異と日本人幼児型患者に共通に認められたR201C変異遺伝子では、E64の培地への付加で活性の上昇が認められたが、保護タンパクの共発現では、活性の上昇は認められなかった(図7 R201CとR201H)。

白人で認められたT82M変異遺伝子と日本人成人型患者に共通に認められた151T変異遺伝子は、E64付加も保護タンパクの共発現でも活性上昇を認めなかった。しかし、活性は5日まで上昇した。(図7 T82Mと151T)

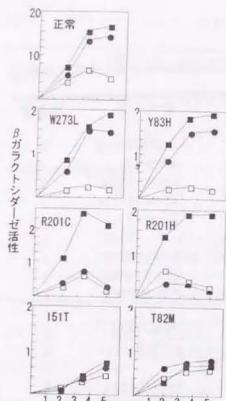


図7 変異遺伝子の発現に於ける E 6 4 と保護タンパクの効果

正常及び変異遺伝子をpCAGGSベクターに挿入し、AdノSV40 相同組換えウイルスにより、形質転換した乳児型線維芽細胞にトランスフェクションした。その後のβ-ガラクトシダーゼ活性を経時的に測定した。□: 正常及び変異遺伝子のみ発現。■: E 6 4 を培地に付加した場合。●: 保護タンパクと共発現させた場合。

D. 5. 1. 2 タンパク

同様に変異タンパクを SDS アクリルアミドゲルで解析した(図 8)。正常遺伝子のみ発現ではトランスフェクション後 2 日から 20 時間標識した場合、88kD と 84kD の前駆体と少量の成熟酵素ができる。これに E64 を培地に加えた場合は、前駆体と成熟酵素ともに量的な増加をみた。保護タンパクとトランスフェクションした場合、成熟酵素が前駆体と比べて多くなった。

白人モルキオ B 病変異 W273L 変異蛋白は、E64 を加えた場合でも保護タンパクのトランスフェクションでも正常とおなじパターンを示した(図 8-F と N)。

日本人幼児型変異 R201H は、E64 を加えた場合に前駆体の増加がみられたが、保護タンパクとのトランスフェクションでは影響は見られなかった(図 8-B)。

日本人成人型変異 I51T は、ともに影響が見られなかった。88kD の前駆体現れず 84kD にバンドが認められた(図 8-A)。

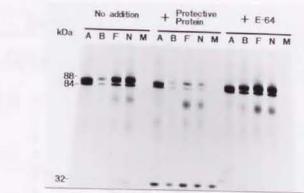


図 8 変異遺伝子発現における E64 と保護タンパクの効果

No addition: GFS または変異遺伝子のみ発現。
+ Protective Protein: 保護タンパク遺伝子とのコトランスフェクション。
+ E64: 培地にプロセアゼ阻害剤 E64 (10μg/ml) 添加 A, B, F, N のレーンは、それぞれ以下の遺伝子の発現である (M はモックのコントロール)、I51T, R201C, W273L, 正常 GFS。

D. 5. 2 リン酸化障害

遺伝子の発現後細胞をリンで標識し、塩化アンモニウムで培地に分泌されてきた前駆体を SDS アクリルアミドゲルで解析した。正常 GFS 遺伝子と日本人乳児型変異 R201C 変異と白人モルキオ B 病変異 W273L は、前駆体のリン酸化が確認されたが、日本人成人型変異 I51T では、認められなかった(図 9 A)。

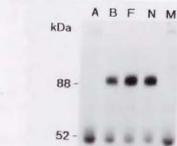


図 9 変異遺伝子発現タンパクのリン酸化

A, B, F, N のレーンは、それぞれ以下の遺伝子の発現である (M はモックのコントロール)、I51T, R201C, W273L, 正常 GFS。細胞をリンで標識し、塩化アンモニウムで分泌されてくる前駆体を抗高分子複合体で免疫沈降した。β-ガラクトシダーゼと保護タンパクの分子量は 88kD と 52kD である。

D. 6 患者線維芽細胞の解析

D. 6. 1 細胞活性と前駆体活性

表 10 に β-ガラクトシダーゼ患者細胞とその分泌タンパクの β-ガラクトシダーゼ活性を示す。正常細胞では、細胞内と塩化アンモニウムを添加した場合の培地に、高い β-ガラクトシダーゼ活性を認める (B. 3. 2 プロセッシング参照)。モルキオ B 病細胞では、共に低い活性

を認めた。成人型では細胞内は比較的高い活性を認めたが、培地には、活性上昇を認めなかった。これと反対に幼児型では、細胞内の活性は低い、培地に高い活性を認めた。これは、ガラクトシダーゼ患者でも認められる。しかし、幼児型細胞ではガラクトシダーゼ細胞と異なり、シアリダーゼの活性は正常であった。

表 10 β-ガラクトシダーゼ患者細胞と分泌タンパクの β-ガラクトシダーゼ活性

表現型	遺伝子型	細胞内活性		分泌活性	
		β-ガラクトシダーゼ	シアリダーゼ	β-ガラクトシダーゼ	
		150.0	60.5	14.6	63.7
				[NH4C]+	[NH4C]-
正常				60.5	14.6
モルキオ B 病	W273L/W273L	7.3	66.9	2.6	4.3
成人型	I51T/I51T	18.1	63.9	1.4	1.6
幼児型	R201C/R201C	4.6	91.3	2.1	12.2
ガラクトシダーゼ	SpDEX7/SpDEX7 ³⁰	21.2	2.2	9.1	84.2

D. 6. 2 細胞内局在と複合体形成

患者線維芽細胞の β-ガラクトシダーゼ活性のリソソームへの局在と保護タンパクとの高分子複合体形成をパーコル密度勾配法(図 10左 a)とシロ糖密度勾配法(図 10右 b)で検討した。R482H と R482C と P263S 変異遺伝子の発現実験では活性を全く認めなかったため、線維芽細胞での活性は、図で下線を引いた変異遺伝子に由来すると考えられる。

正常では、90%程度の活性がリソソームにあり、10%程度がエンドソーム・ゴルジ装置にある。これらは、パーコル密度勾配法分画のリソソーム分画(図 10 a1 分画 4-8)とエンドソーム・ゴルジ分画(分画 10-18)の活性として示される。これに対応して、シロ糖密度勾配法で 90%程度が高分子複合体分画(分画 10 b1 分画 5-10)と 10%がダイマー分画(分画 18-25)に認められる。

Y83H 変異遺伝子をもつモルキオ B 病患者細胞では W273L 変異遺伝子を持つ細胞と同じく、正常分布を示した(図 10 2 と 3)。Sp12/Sp12 の遺伝子型のモルキオ B 病患者細胞では、活性はリソソームに多かった。シロ糖密度勾配法では、高分子複合体とダイマー分画で同程度認められた(図 10 4)。

R201H 変異遺伝子をもつ幼児型患者細胞では、R201C 変異遺伝子をもつ細胞と同じく、活性はエンドソーム分画とダイマー分画にあった(図 10 6 と 7)。これは、ガラクトシダーゼ患者細胞と同じ分布だった(図 10 8)。

D. 6. 3 患者線維芽細胞における E 6 4 プロセアゼ阻害剤の活性回復効果

患者線維芽細胞の培地に E 6 4 を加えた場合と加えなかった場合との活性比を表 11 に示した。201 番のアミノ酸に変異のおきた遺伝子をもつ幼児型患者細胞のみにガラクトシダーゼと同様に活性の 4 倍から 5 倍の上昇を認めた。

表 11 患者線維芽細胞における E 6 4 プロセアゼ阻害剤の活性回復効果

	正常	モルキオ B 病		幼児型	成人型	ガラクトシダーゼ
遺伝子型		W273L/R482H	Y83H/P263S	Sp12/Sp12	R201C/R201H	I51T/R482C
活性上昇率	1.2	1.2	1.3	1.6	4.2	5.5
						151T/SpEX7
						1.3
						4.0

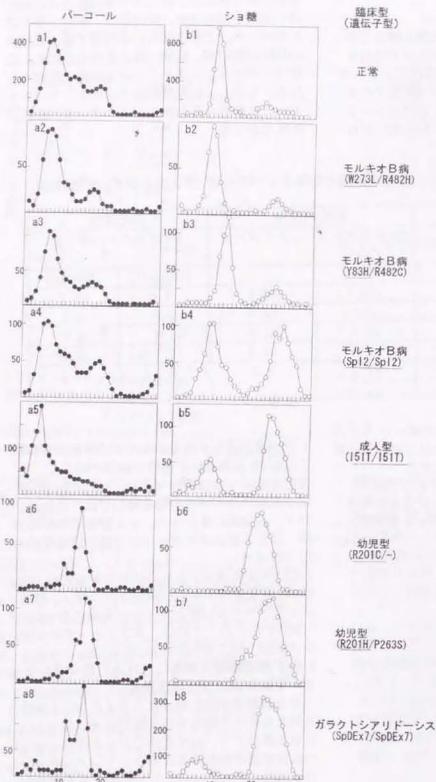


図 10 患者線維芽細胞におけるβ-ガラクトシダーゼの細胞内局在と高分子複合体形成

D.6.4 変異タンパクの半減期

β-D-galactopyranosyl methyl-p-nitrophenyltriazene にβ-ガラクトシドーシスを不活化後 5 日目で、正常と白人モルキオ B 病と日本人成人型細胞は、不活化前の 30% 程度にしか活性がもどらなかった。一方、ガラクトシアリドーシス細胞と日本人幼児型細胞は、2 日以内の不活化前のレベルまで活性が回復した。このことは、β-ガラクトシドーシス酵素の半減期は、正常と白人モルキオ B 病と日本人成人型細胞では 10 日以上、日本人幼児型とガラクトシアリドーシス細胞では 1 日以内であることを示す。

E 考察

E.1 正常β-ガラクトシドーシス遺伝子

E.1.1 遺伝子構造

筆者の報告後、2 つのβ-ガラクトシドーシス遺伝子構造の報告があった。それらにおいて 10 番のアミノ酸はプロリンではなくロイシンであった。以後の変異遺伝子解析において、両者の配列が見られることからポリモルフィズムであると考えられる。日本人では、プロリンの配列は認められていない。ゲノム上の位置も GPS cDNA をプローブにして 3p21.23 に決定された¹³ Morreau らは、エクソン 3、4、6 のスキップした cDNA を報告している¹²。これにより翻訳されるタンパクの機能は不明だが、エクソンスキッピングにより異なるタンパクができる現象は、同じリソソームの酵素であるβ-グルクロニダーゼで報告されている¹⁴。

E.1.2 発現実験と発現タンパク

COS 細胞に遺伝子導入し精製した発現前駆体を乳児型細胞培養液に加えることで、細胞の活性回復が可能であった。この回復は、ヒト線維芽細胞から精製した前駆体とほぼ同様であった。更に成熟酵素への正常プロセシングとエンドサイトーシスが mannose 6-phosphate 輸送系を介していることを認めた。これは、GPS が正常のβ-ガラクトシドーシス遺伝子をコードしていることをしめすとともにこの発現タンパクを用いた酵素補充療法の可能性を示す。

COS 細胞への一過性の発現では、多量の前駆体がみられた際には、成熟酵素の量が少なく細胞内活性の上昇が細胞外への分泌に比べて少ないことが認められる(参考文型 2 発表分)。これは、β-ガラクトシダーゼタンパクがあまりに

多量に少数の細胞に発現したために、安定化因子である保護タンパクが相対的に不足するため、β-ガラクトシダーゼが異常分解していると考えられた。これと同じことは、保護タンパクが欠損するガラクトシアリドーシス細胞内で起きている。そのために、D.5.1 正常遺伝子の発現結果のように、乳児型線維芽細胞での一過性の発現ではプロセアーゼ阻害剤を培地に加えることで異常分解を控え、発現活性を上昇させることができた。また、保護タンパク遺伝子のコトランスフェクションにより安定化因子を補充することでも、同様の効果があらわれた。この現象を、「D.5 残存活性を認める変異遺伝子発現産物のプロセシング障害」の章のように、細胞病理に解析に応用した。

変異遺伝子発現産物の解析では、COS 細胞から残存活性のない患者細胞 (ASVGM1-4) に発現実験のホストを切り替えているが、このことにより微量の発現酵素活性を検出できるようになり、変異遺伝子発現産物の微量な残存活性が測定できるようになった。

E.2 変異遺伝子

変異遺伝子は、その変異の起こり方から、3 グループに分類した。

E.2.1 遺伝子重複

この変化は 2 つ同定された。Dup1103 はエクソン 1 と 12 に相当する部分が mRNA 上で増幅していることから、ゲノム上でエクソン 1 の手前からエクソン 12 の後までの DNA が順方向に重複したと考えられる。たまたま重複塩基数 (165) が 3 の倍数だったため、部位がフレームを壊さない起り方だったため、アミノ酸配列 (357-411) が重複した変異タンパクができることになった。このため、他のナンセンス変異を起こす変異

(Dup288, Sp11, Sp12, Sp13, R457Ter) と違い、mRNA は安定で正常と同程度認められた。変異タンパクも分子量のやや大きい前駆体が線維芽細胞で認められた。しかし、このタンパクはβ-ガラクトシダーゼ活性を有せず、リン酸化されずに細胞外に分泌されてしまう異常タンパクであった(未発表データ)。

Dup288 は、遺伝子の前後の配列に異なる配列があり不平等な乗り換え現象 (unequal crossover) が起きたと考えられる(図 11)。

る(図14)¹⁵⁾。同様に変異遺伝子R208Cは、解析の行われた南北アメリカで主要な乳児型変異遺伝子で、この乳児型細胞には残存活性がほとんど見られず、幼児型にも認められる(表9 図15)¹⁶⁾。これらの幼児型細胞には残存活性があるため、もう一方のアレルに残存活性がある変異が予想される。

W273L白人モルキオB病共通変異遺伝子は、R201C日本人幼児型共通変異遺伝子と同様、残存活性のない乳児型の変異遺伝子と複合した場合と血族結婚の場合、モルキオB病と表現されると考えられる。遺伝情報の流れを図14に示す。

遺伝子変異 ⇨ 複合化 ⇨ 発病

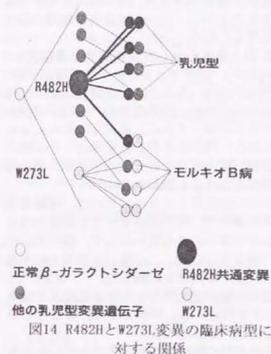


図14 R482HとW273L変異の臨床病型に対する関係

遺伝子変異 ⇨ 複合化 ⇨ 発病

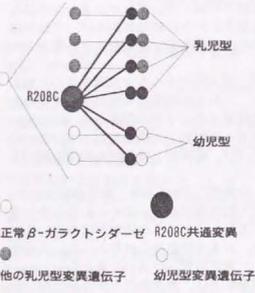


図15 R208C変異と臨床病型の関係

E.3.3 臨床型に影響を及ぼす変異遺伝子

表13の変異遺伝子は、その残存活性のために臨床型を、幼児型・成人型・モルキオB病に臨床型をかえらると思われる変異遺伝子をリストしたものである。R590H E632G SpI2以外の変異遺伝子は、残存活性のない乳児型ヒト線維芽細胞への遺伝子導入で残存活性を確認した。

SpI2遺伝子変異は、DNA解析で正常mRNAもできていることと、このホモ接合体患者線維芽細胞に残存活性があることから、残存活性のある変異遺伝子としてこの表に加えた。R590HとE632Gは、対立遺伝子が残存活性のない乳児型の変異遺伝子であることから、この変異遺伝子の残存活性が臨床型を幼児型にかえていと考えられる。

表13 臨床型を決定する遺伝子変異

臨床型	変異遺伝子
幼児型	R201C
	R201H
	R590H
	E632G
	151T
成人型	T82M
	151T
モルキオ病	SpI2
	Y83H
	W273L
	W273L

E.4 閾値理論と変異遺伝子

成人型患者細胞の残存β-ガラクトシドース活性(3~7%)と広範な発症年齢分布は、成人型の遺伝的背景が多様であることを予想させた。しかし、ほとんどの患者は、151T遺伝子変異のホモ接合体であった(図16)²⁾。この説明として以下のように考えられる。

- 1) β-ガラクトシダーゼ活性は、他の遺伝的要因等により1%程度影響をうけると仮定する。同じ遺伝子を持った正常人のβ-ガラクトシダーゼ活性でも2から3倍程度のばらつきがあることから、細胞内外の環境によって1%程度の活性変化は有り得るであろう。
- 2) 乳児型(1%未満)の活性では、1%の活性上昇(図1下左矢印)があっても発症年齢では数カ月の差としかならないのに、成人型(6%前後)では、この1%(図1下右)は、発症年齢を2.0年近く遅らせる効果があることがこのグラフから分かる。

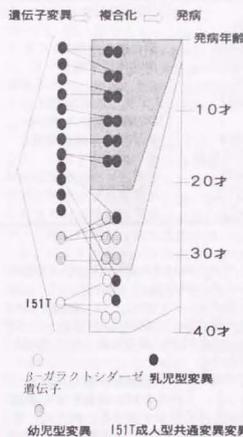


図16 遺伝子変異と発症年齢の関係

- 3) 更に、個人によってGM1 ガングリオシドの合成量が異なれば、当然閾値そのものも変化するはずである。1%の閾値減少(BからA曲線)も同様に発症年齢を2.0年遅らせる効果が慢性型において存在する。閾値閾値に近い活性を有する変異は、これらのことより、広範な発症年齢分布をとることになる。このことは、更に151T変異のホモ接合体であっても、発病に至らない症例の存在を予想するが、必ずしも100%発病に至らない可能性がある。遺伝子診断では、乳幼児型の発症年齢は予測できるが、慢性(成人)型の発症年齢は理論的にも予測できないこととなる。多くのβ-ガラクトシドースを引き起こす変異遺伝子発現産物は、ほとんど完全に活性を消失している。151Tのような活性を残しながらかつ閾値閾値より少し低い活性を残す変異は、まれにしか起きないと考えられる。しかし、患者は乳児型と比べ長く生存するために、症例報告されることが多くなる。これらのために、乳児型変異は多様だが、成人型では151Tが共通変異として認識されると考えられる。

E.5 細胞病理からみたβ-ガラクトシドースの多様性発現機構

今回の解析の結果は、GM1 ガングリオシドース変異遺伝子発現産物に、リソソームへの輸送が保護タンパクとの高分子複合体形成障害を示した。これと反対に、モルキオB病変異遺伝子発現産物は、全例で保護タンパクと高分子複合体を形成していた。W273LとY83H変異遺伝子発現産物は今回の実験結果からリソソームに成熟酵素が充分量あると考えられる。この結果は、患者線維芽細胞の抗β-ガラクトシダーゼ抗体を用いた解析でも確認している(未発表データ)。そのため、分子当たりの活性低下が欠損の原因と考えられる。遺伝子解析結果は、SpI2変異遺伝子においては10%程の正常mRNAができることを示した。それゆえ、正常タンパクが少量しか産生されないことが活性低下の原因と考えられる。しかし、ショ糖密度勾配法での結果は、変異タンパク活性はリソソームにはあるが、正常とは異なり、ダイマー配分に50%ほどの活性を示した。保護タンパクとの高次構造形成にβ-ガラクトシダーゼ酵素との配比が問題となるのかも知れない。今後の検討を要する。

151TとT82M変異遺伝子の発現実験では、E64の培地付加と保護タンパクの共発現での活性上昇効果が見られなかった。正常と同じ様にリソソームに輸送されれば、E64の培地付加で活性上昇が見られるはずであるから、リソソーム輸送に問題があると考えられる。発現実験で5日目まで活性の上昇があることは、リソソームで安定であることを示す。151T変異遺伝子産物のタンパクの解析では、前駆体の分子数が異常でありリン酸化がおきないことから、リソソームへの輸送障害はゴルジ装置でのプロセッシング異常が原因であった。しかしながら、151T変異遺伝子をもつ患者細胞のショ糖密度勾配法による検討では、高分子複合体配分に少量ながら活性を認めた5)。その輸送機構は不明であるが、少量の変異タンパクはリソソームに選ばれ安定に存在する(半減期は10日以上)。この事が、151T変異遺伝子により引き起こされる成人型において、臨床症状を軽くし大脳基底核に病変を局在させているのかも知れない。T82M変異遺伝子を持った細胞が現在人手でできていないため、この変異遺伝子発現産物の線維芽細胞レベルでの検討は現在できていない。

R201CとR201H(幼児型)変異遺伝子発現タンパクはE64により活性上昇効果があることからリソソームに輸送されると考えられる。実際、R201C変異遺伝子の前駆体は、リン酸化される。しかし、保護タンパクによる活性上昇効果を示

さないことは、保護タンパクとの複合体形成障害を示唆する。そのためリソソームでの異常分解がおき、活性低下が起きると考えられる。このことは、線維芽細胞での以下の実験で確認した。1) 線維芽細胞内の活性は分解の起きていないエンドソームにあり、高分子複合体を形成していない。2) ガラクトシアリドラーシスと同様に、プロテアーゼ阻害剤で分解が抑えられ活性が回復した。3) R201C変異タンパクでは、酵素活性の半減期は1日以下であった。ガラクトシアリドラーシス細胞では保護タンパクの異常があり、高分子複合体形成ができず、活性低下が起きるが、幼児型細胞ではβ-ガラクトシダーゼに異常があり、同様な機構で活性の低下が起きる。しかし、ガラクトシアリドラーシスでは、β-ガラクトシダーゼ以外にも表5で示された機能の欠損があり、幼児型とは異なる表現型となると考えられる。

変異遺伝子発現産物のプロセッシングの障害部位のまとめを表14に示す。

活性低下の理由は異なるが、多くの細胞内β-ガラクトシダーゼ活性がリソソーム内高分子複合体にあることは、全てのモルキオB病決定遺伝子で共通している。分子病理においてGM1ガングリオシドーシスとモルキオB病は、質的に異なる。図17に変異遺伝子情報がGM1ガングリオシドーシスとモルキオB病に取れんする機構を示した。

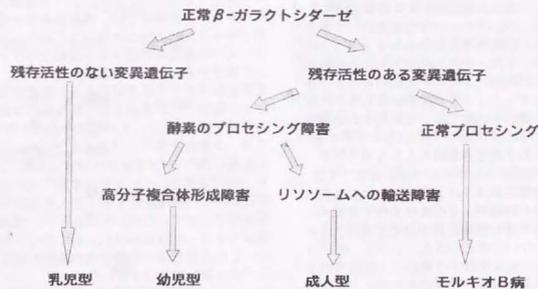


図17 変異遺伝子発現産物の病理と臨床型の間係

表14 変異タンパクの細胞病理

臨床型	活性変異酵素のプロセス障害
幼児型	
R201C	複合体形成障害
R201H	複合体形成障害
成人型	
I51T	リソソーム輸送障害 (ゴルジ装置でのプロセッシング障害)
T82M	リソソーム輸送障害
モルキオB病	
Y83H	正常プロセッシング
W273L	正常プロセッシング
Sp12	正常プロセッシング?

ガングリオシドGM1の蓄積が少ないと考えられるモルキオB病全例で、変異タンパクが高分子複合体形成をしていることは、保護タンパクとの高分子複合体が、脂溶性のGM1ガングリオシドーシスの代謝に重要であることを示していると思われる。

幼児型では酵素の異常分解が主要な活性低下の原因であった。このことは、変異により組織の活性が異なる可能性を示唆する。例えば、中枢神経系では幼児型変異遺伝子発現産物はプロテアーゼの分解を受けやすく、活性低下をモルキオB病変異遺伝子発現産物より多く起こす可能性はあると思われる。

限界閾値の理論を応用して考えることもできる。高分子複合体分画のβ-ガラクトシダーゼ活性は、成人型でも1-2%としかなく、モルキオB病細胞では、3-4%以上ある。GM1-ガングリオシドーシス発病のモデルでは、閾値を8%に想定したが、この分画に3%あれば、GM1ガングリオシドーシスの代謝には十分なのかも知れない。

また、モルキオB病ではGM1-ガングリオシドーシスと異なり、複合体形成をしない分画の活性が少ないとも考えられることから、この分画がケラタン硫酸等の代謝に意味があることも考えられる。今後、高分子複合体分画とダイマー分画を精製し、天然基質を用いた検討を行うなどにより、モルキオB病でのケラタン硫酸代謝障害の原因を明らかにする必要がある。しかし、これらの仮説を確認するためには、研究目的の章で述べた幼児型とモルキオB病の中間型を呈する症例などの解析や高分子複合体機能の解析が必要であるとともに、組織臓器レベルでの研究が必要である。現在、β-ガラクトシダーゼ遺伝子を標的破壊したβ-ガラクトシドーシスモデルマウスを作成し、β-ガラクトシドーシスモデルとして有用な検討中である(平成7年2月現在)。このモデルマウスを用いた解析が、組織のレベルでの発病機構の解明に役立つと思われる。

E.6 診断と治療に対して

R201C(幼児型)とR201H(成人型)変異タンパクは、リソソームにおける酵素の異常分解が活性低下の原因である。そのため、培養細胞レベルではE64等のプロテアーゼ阻害剤で活性の回復を見た(表11)。ガラクトシアリドラーシスでは、β-ガラクトシダーゼ活性は回復してもシアリダーゼとカルボキシペプチダーゼ活性は回復せず、病気の本質的治療とはならない。GM1ガングリオシドーシスでは、β-ガラクトシダーゼ活性の回復は、臨床症状の改善を期待できる。今後、有効なプロテアーゼ阻害剤が開発されれば、この変異遺伝子をもつ患者の治療の可能性がある。しかし、今回のモルキオB病の研究結果は、高分子複合体分画の活性がGM1-ガングリオシドーシスの代謝に重要であることを示した。プロテアーゼ阻害剤投与では、ダイマー分画の活性は上昇するが、高分子複合体分画の活性は上昇しない。細胞レベルでのガングリオシドGM1の代謝能に対するプロテアーゼ阻害剤の効果を検討する必要があると思われる。

R201CまたはR201H変異遺伝子を持つことの診断は、遺伝子解析以外に、血清の活性をはかることで可能である。血清の活性は細胞外に分泌された活性を反映するのでR201C変異発現産物の

ような酵素分子として活性のある変異を持つ患者では、血清β-ガラクトシダーゼ活性は正常近く認められる。遺伝子診断や血清の酵素学的診断で、変異タンパクが、この異常分解によることを診断しておくことは意味があると考えられる。

F まとめ

正常な人類のβ-ガラクトシダーゼ遺伝子には、常に変異が蓄積されている。変異の起き方は、少なくとも遺伝子重複・スプライス異常・点突然変異があり、遺伝子情報は少なくとも数十に多様化している。しかし、病気として表現される変異は、2群に分けられた。

1群は、ほとんど全く活性を失う変異遺伝子群で、あらゆる種類の変異で起こり、頻度的にも多い。多くの変異遺伝子はこの群に属し、乳児型に集約される。乳児型は多臓器で障害が起き、急性の経過をとる。

もう1群は、限界閾値以下の残存活性を発現する変異遺伝子群である。この変異群は一般に頻度が低いと考えられ、全く活性のない群とたまたま複合ヘテロ接合体になったとき、血族結婚でホモ接合体になったときに軽症型として表現されると考えられる。これらの残存活性のある変異タンパクの多くは、プロセッシングに障害があり、GM1ガングリオシドーシスの代謝を充分に行えない。この群に属する変異遺伝子は、その代謝障害のためにGM1ガングリオシドーシスとして表現される。遺伝子変異は異なっても、保護タンパクとの高分子複合体形成障害をきたす変異は幼児型に、リソソームへの輸送障害をきたす変異は成人型に集約された。

細胞内プロセッシングが正常に行われる変異遺伝子を持つ患者の臨床型は、神経症状を呈さないモルキオB病であった。遺伝子変異は異なっても、GM1ガングリオシドーシスとモルキオB病ではそれぞれに共通した分子病理を示すことから、この分子病理の違いが臨床症状の違いに関係することが示唆された。

G 文献

- transformed Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* 268:1180-1186
- 1 O'Brien JS (1989) β -galactosidase deficiency (GM1-gangliosidosis, galactosialidosis, and Morquio syndrome type B): ganglioside sialidase deficiency (mucopolidosis IV). In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, and Valle D (eds) *The metabolic basis of inherited disease*, 6th edn. McGraw-Hill, New York, pp 1797-1806
 - 2 Suzuki Y, Sakuraba H, and Oshima A (1995) β -Galactosidase deficiency (β -galactosidosis): GM1-gangliosidosis and Morquio B disease. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, and Valle D (eds) *The metabolic basis of inherited disease*, 7th edn. McGraw-Hill, New York, in press
 - 3 Suzuki Y, Oshima A (1993) A β -galactosidase gene mutation identified in both Morquio B and infantile GM1-gangliosidosis. *Human Genet.* 91:407
 - 4 Leinenkugel P, Michel S, Conzelmann E, Sandhoff K (1992) Quantitative correlation between the residual activity of β -hexosaminidase A and arylsulfatase A and the severity of the resulting lysosomal storage disease. *Hum. Genet.* 88: 513-523
 - 5 Yoshida K, Oshima A, Shimoto M, Fukuhara Y, Sakuraba H, Yanagisawa N, and Suzuki Y (1991) Human β -galactosidase gene mutations in GM1-gangliosidosis: a common mutation among Japanese adult/chronic cases. *Am. J. Hum. Genet.* 49: 435-442
 - 6 Kobayashi T, Shinoh N, Kuroiwa Y (1986) Incorporation and degradation of GM1-ganglioside and asialo GM1-ganglioside in culture fibroblasts from normal individuals and patients with β -galactosidase deficiency. *Biochem. Biophys. Acta* 875:115-121
 - 7 Oshima A, Itoh K, Nagao Y, Sakuraba H, Suzuki Y (1990) β -Galactosidase-deficient human fibroblasts: uptake and processing of the exogenous precursor enzyme expressed by stable transformant COS cells. *Hum Genet.* 85:505-508
 - 8 Itoh K, Takiyama N, Kase R, Kondoh K, Sano A, Sakuraba H, Suzuki Y (1993) Purification and characterization of human lysosomal protective protein expressed in stably transformed Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* 268:1180-1186
 - 9 Oshima A, Nolan CM, Kyle JW, Grubb JH, Sly WS (1987) The human cation-independent mannose 6-phosphate receptor: cloning and sequence of the full-length cDNA and expression of functional receptor in COS cells. *J. Biol. Chem.* 263:2553-2562
 - 10 Galjart NJ, Gillemans N, Harris A, van der Horst GTJ, Verheijen FJ, Galjaard H, d'Azzo A (1988) Expression of cDNA encoding the human "protective protein" associated with lysosomal β -galactosidase and neuraminidase: homology to yeast proteases. *Cell* 54:755-764
 - 11 Kase R, Itoh K, Takiyama N, Oshima A, Sakuraba H, Suzuki Y (1990) Galactosialidosis: simultaneous deficiency of esterase, carboxy-terminal deamidase and acid carboxypeptidase activities. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 172:1175-1179
 - 12 Nolan K, Sly WS (1989) I-Cell disease and pseudo-Hurler polydystrophy: disorders of lysosomal enzyme phosphorylation and localization. In: *The metabolic basis of inherited disease*. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, and Valle D (eds) *The metabolic basis of inherited disease*, 6th edn. McGraw-Hill, New York, pp 1589-1601
 - 13 Oshima A, Kyle JW, Miller RD, Hoffmann JW, Powell PP, Grubb JH, Sly WS, Tropak M, Guise KS, Gravel KA (1987) Cloning, sequencing, and expression of cDNA for human β -glucuronidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:685-689
 - 14 D'Azzo A, Hoogveen A, Reuser AJJ, Robinson D, Galjaard H (1982) Molecular defect in combined β -galactosidase and neuraminidase deficiency in man. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:4335-4339
 - 15 van Doren K, Gluzman Y (1984) Efficient transformation of human fibroblasts by adenovirus-simian virus 40 recombinants. *Mol. Cell Biol.* 4:1653-1656
 - 16 Van Diggelen OT, Schram AW, Sinnott ML, Smith PJ, Robinson D, Galjaard H (1981) Turnover of β -galactosidase in fibroblasts from patients with genetically different type of β -galactosidase deficiency. *J. Biol Chem* 256:143-151
 - 17 Oshima A, Tsuji A, Nagao Y, Sakuraba H, Suzuki Y (1988) Cloning, sequencing, and expression of cDNA for human β -galactosidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 157:238-244
 - 18 Namba E, Suzuki K (1990) Molecular cloning of mouse acid β -galactosidase cDNA: sequence, expression of catalytic activity and comparison with the human enzyme. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 173:141-148
 - 19 Morreau H, Bonten E, Zhou XY, d'Azzo A (1991) Organization of the gene encoding human lysosomal β -galactosidase. *DNA Cell Biol.* 10:495-504
 - 20 Oshima A, Yoshida K, Ishizaki A, Shimoto M, Fukuhara Y, Sakuraba H, Suzuki Y (1992) GM1-gangliosidosis: tandem-duplication within exon 3 of β -galactosidase gene in an infantile patient. *Clin. Genet.* 41(5): 235-238
 - 21 Morrone A, Morreau H, Zhou XY, Zammarchi E, Kleijer WJ, Galjaard H, d'Azzo A (1994) Insertion of a T next to the donor splice site of intron 1 causes aberrantly spliced mRNA in a case of infantile GM1-gangliosidosis. *Hum. Mutat.* 3:112-120
 - 22 Ishii N, Oshima A, Shimoto M, Sakuraba H, Fukuyama Y, Suzuki Y (1994) Phenotype-genotype correlation in hereditary β -galactosidase deficiency: a comparison among different ethnic group. VI international congress inborn errors of metabolism abstract pp220
 - 23 福島久雄, 塚本浩子, 西木潤史, 乾幸治, 岡田伸太郎, 南良二, 石川幸辰 (1993) 若年型GM1ガングリオシドーシスの新しい遺伝子変異. 日本先天代謝異常学会雑誌, 9-2:112
 - 24 Nishimoto J., Namba E, Inui K., Okada S, Suzuki K (1991) GM1-gangliosidosis (genetic β -galactosidase deficiency): identification of four mutations in different clinical phenotypes among Japanese patients. *Am. J. Hum. Genet.* 49: 566-574
 - 25 Chakraborty S, Rafi MA, Wenger DA (1994) Mutation in the lysosomal β -galactosidase gene that cause the adult form of GM1 gangliosidosis. *Am. J. Hum. Genet.* 54:1004-1013
 - 26 Boustany RM, Qian WH, Suzuki K (1994) Mutations in acid β -galactosidase cause GM1-gangliosidosis in American patients. *Am. J. Hum. Genet.* 53:881-888
 - 27 Oshima A, Yoshida K, Shimoto M, Fukuhara Y, Sakuraba H, Suzuki Y (1991) Human β -galactosidase gene mutations in Morquio B disease. *Am. J. Hum. Genet.* 49:1091-1093
 - 28 Mosna G, Fattore S, Tubiello G, Brocca S, Trubia M, Gianazza E, Gatti R, Danesino C, Minelli A, Piantanida M (1992) A homozygous missense arginine to histidine substitution at position 482 of the β -galactosidase in an Italian infantile GM1-gangliosidosis patient. *Hum. Genet.* 90:247-250
 - 29 Oshima A, Yoshida K, Itoh K, Kase R, Sakuraba H, Suzuki Y (1994) Intracellular processing and maturation of mutant gene products in hereditary β -galactosidase deficiency (β -galactosidosis). *Human Genet.* 93:109-114
 - 30 Shimoto M, Takano T, Fukuhara Y, Oshima A, Sakuraba H, Suzuki Y (1991) Japanese-type adult galactosialidosis. A unique and common splice junction mutation causing exon skipping in the protective protein/carboxypeptidase gene. *Proc Jpn Acad* 66B:217-222
 - 31 Takano T, Yamanouchi Y (1993) Assignment of human β -galactosidase-A gene to 3p21.33 by fluorescence in situ hybridization. *Human Genet.* 92:403-404
 - 32 Morreau H, Galjart NJ, Gillemans N, Willemsen R, van der Horst GTJ, d'Azzo A (1989) Alternative splicing of β -galactosidase mRNA generates the classic lysosomal enzyme and a β -galactosidase-related protein. *J. Biol. Chem.* 264:20665-20663
 - 33 Yoshida K, Oshima A, Sakuraba H, Nakano T, Yanagisawa N, Inui K, Okada S, Iiyama E, Namba R, Kondo K, Isasaki S, Takiyama K, Suzuki Y (1992) GM1-gangliosidosis in adults: clinical and molecular analysis of sixteen Japanese patients. *Ann. Neurol.* 31:328-332
 - 34 Ishii N, Oshima A, Sakuraba H, Fukuyama Y, Suzuki Y (1994) Normal serum β -galactosidase in juvenile GM1-gangliosidosis. *Pediatric Neurol.* 10:317-

Letter to the editors

A β -galactosidase gene mutation identified in both Morquio B disease and infantile G_{M1} gangliosidosis

Y. Suzuki, A. Oshima

Department of Clinical Genetics,
The Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science,
3-18-22 Honkomagome, Bunkyo-ku, Tokyo, 113 Japan

Received: 4 February 1993

In a recent paper, a mutation of the lysosomal β -galactosidase gene, ⁴⁸²Arg \rightarrow His (CGT \rightarrow CAT; R482H), was reported in Italian patients with infantile G_{M1} -gangliosidosis (Mosna et al. 1992). It was concluded that this mutation, the first to be reported in Caucasians, was likely to be the cause of the severe β -galactosidase deficiency. The authors did not express this mutant gene to evaluate the mutant enzyme protein.

They may have overlooked our previous paper on Morquio B disease mutations, including the R482H mutation in Caucasians, confirming defective catalytic activity in the expressed mutant enzyme (Oshima et al. 1991; mutation G or R482H). R482H is not a neutral polymorphism, as suggested by Mosna et al. (1992). An interesting point is that, in our study, this mutation was found in two siblings with Morquio B disease. We anticipated that this mutation causes a severe functional defect of the enzyme and that a second mutation in another allele is responsible for the pathogenesis of the Morquio phenotype.

These two reports indicate that the R482H mutation causes a dramatic change in enzyme protein expression,

Correspondence to: Y. Suzuki

resulting clinically in a phenotype depending on the second mutant allele in patients with β -galactosidase deficiency. It may also occur in patients with clinically defined diseases, such as juvenile or chronic G_{M1} -gangliosidosis, or neurological diseases with a more protracted clinical course, when the second allele has a mutation giving a mutant enzyme with high residual catalytic activity, as in one of the mutations reported by Yoshida et al. (1991). Further cell biological analysis of the gene product is necessary to solve the questions raised by these observations. It now seems meaningless to argue for or against the diagnosis of conventionally defined G_{M1} -gangliosidosis or Morquio B disease, simply on the basis of clinical manifestations. Indeed, case are known with intermediate phenotypic expressions. We therefore propose a more comprehensive term " β -galactosidosis" for the group of diseases with mutations of the β -galactosidase gene.

References

- Mosna G, Fattore S, Tubiello G, Brocca S, Trubia M, Gianazza E, Gatti R, Danesino C, Minelli A, Piantanida M (1992) A homozygous missense arginine to histidine substitution at position 482 of the β -galactosidase in an Italian infantile G_{M1} -gangliosidosis patient. *Hum Genet* 90:247-250
- Oshima A, Yoshida K, Shimamoto M, Fukuhara Y, Sakuraba H, Suzuki Y (1991) β -Galactosidase gene mutations in Morquio B disease. *Am J Hum Genet* 49:1091-1093
- Yoshida K, Oshima A, Shimamoto M, Fukuhara Y, Sakuraba H, Suzuki Y (1991) β -Galactosidase gene mutations in G_{M1} -gangliosidosis: a common mutation among Japanese adult/chronic cases. *Am J Hum Genet* 49:435-442

CLONING, SEQUENCING, AND EXPRESSION OF cDNA
FOR HUMAN β -GALACTOSIDASE

Akihiro Oshima*, Akihiko Tsuji**, Yoshiro Nagao*, Hitoshi Sakuraba*, Yoshiyuki Suzuki**

*Department of Clinical Genetics, The Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, Honkomagome, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan

**Division of Inherited Metabolic Disease, National Institute of Neuroscience, N.C.N.P., Ogawa-Higashimachi, Kodaira, Tokyo 187, Japan

Received October 4, 1988

Summary: We cloned and sequenced the full-length cDNA for human placental β -galactosidase. The 2379-nucleotide sequence contains 2031 nucleotides which encode a protein of 677 amino acids. The amino acid sequence includes a putative signal sequence of 23 amino acids and 7 potential asparagine-linked glycosylation sites. The cDNA in the expression vector pSVL was used to transfect COS cells. Expression of the cDNA in transfected COS cells produced immunoprecipitable proteins and led to an increase in β -galactosidase activity. © 1988 Academic Press, Inc.

β -Galactosidase (EC 3.2.1.23) catalyzes the hydrolysis of terminal β -galactoside linkage in ganglioside G_{M1} and other carbohydrate-containing compounds. In human fibroblasts, an 84 kDa precursor is processed to an 88 kDa intermediate form, and then to a 64 kDa mature enzyme (1-3). This enzyme protein aggregates with a 32 kDa "protective protein" to form a high molecular weight complex in lysosomes, also involving lysosomal sialidase (4,5). A complete or partial deficiency of β -galactosidase has been observed in diseases of various molecular pathology; G_{M1} -gangliosidosis and Morquio B disease caused by gene defects for the enzyme (6-8), mucopolipidosis II and III caused by defect in transport of the precursor enzyme (9,10), and galactosialidosis caused by abnormal degradation of the enzyme molecule due to a defect of the protective protein (11,12). In this communication, we report the nucleotide sequence of a full-length cDNA clone for human placental β -galactosidase and its expression in transfected COS cells.

Materials and Methods

Materials

β -galactosidase was highly purified from human placenta, and two types of specific antisera were raised as described previously (13). Restriction enzymes, T4 DNA ligase, exonuclease III, and mung bean nuclease were purchased from

Nippon Gene (Toyama, Japan), DNA polymerase I (Klenow fragment) from Boehringer Mannheim Biochemicals (Mannheim, West Germany), the eukaryotic expression vector pSVL, M13 universal primer (17-mer), dextran sulfate, deoxy- and dideoxy-nucleotide triphosphates, and DEAE-dextran from Pharmacia (Uppsala, Sweden), horseradish peroxidase-conjugated second antibody from Bio-Rad Laboratories (Richmond, U.S.A.) and [32 P]-dATP from Amersham (Buckinghamshire, England). All other reagents used in this study were purchased from Wako Pure Chemicals (Osaka, Japan), unless indicated otherwise.

cDNA library screening

A λ -gt11 cDNA library prepared from human placenta (14) was generously provided by Dr. J. Evan Sadler (Howard Hughes Medical Institute, Washington University School of Medicine, St. Louis, U.S.A.). The cDNA library was screened, using two different rabbit antisera (13); one preparation against the β -galactosidase/protective protein complex, and the other against the β -galactosidase monomer. A positive clone GP8 recognized by both antisera was subcloned into pGEM2 (Promega Biotec; Madison, U.S.A.).

cDNA sequencing

cDNA was subcloned into Sall site of the bacteriophage M13mp19 (15) in both directions, and deletions were generated. Each clone was digested first with SacI and XbaI, and then with exonuclease III (16). Aliquots were taken every 30 seconds, and treated with mung bean nuclease. Subsequently, each DNA sample was treated with T4 DNA ligase, and used to transform JM103 to generate a library of human β -galactosidase cDNA deletions. These deletion clones were sequenced by the dideoxynucleotide chain termination method (17). When necessary, 7-deazo-dGTP was used for sequencing through GC-rich regions (18). The entire sequence was determined from the overlapping clones on both strands.

Culture and transfection of COS cells

COS-1 cells (kindly supplied by Dr. Y. Nabeshima, National Institute of Neuroscience, N.C.N.P., Tokyo, Japan) were cultured in Ham's F-10 medium (F-10) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) and antibiotics, and trypsinized frequently. The cDNA was isolated after Sall digestion, and was ligated into the Sall-compatible XhoI site of pSVL. The DEAE-dextran procedure followed by treatment of cells with chloroquine (19) was used to transfect COS cells (20). Subconfluent COS cells, which had been plated 12 h prior to transfection, were washed twice with F-10, and then incubated with transfection buffer (200 μ g/ml DEAE-dextran, and 50 mM Tris, pH 7.4, in F-10) containing the plasmid at the concentration of 10 μ g/ml for 8 h. At the end of transfection, the cells were washed with F-10 containing 10% FCS, incubated for 2 h with 100 μ M chloroquine in this medium, and then incubated in the medium without chloroquine which had been heated at 65°C for 2 h to inactivate serum β -galactosidase. β -Galactosidase activity was assayed with a fluorogenic substrate (4-methylumbelliferyl β -galactoside; Nakarai Chemicals, Kyoto, Japan) as described previously (21) 60 and 80 h after transfection. Protein concentration was determined by the method of Lowry et al (22).

Labeling and immunoprecipitation of human β -galactosidase from transfected COS cells

COS cells were washed 48 h after transfection, incubated for 1 h in leucine-free Eagle's Minimum Essential Medium (MEM), and labeled for 20 h with L-[4,5- 3 H]-leucine (0.1 mCi per dish, 70 Ci/mmol; Amersham) in leucine-free MEM containing 5% dialyzed FCS (23,24). The cells were harvested, pelleted, and solubilized in 0.4 ml of detergent solution (0.1 M Tris-HCl, pH 7.5, 1% Triton X-100, 0.4 M KCl, 0.6 mM EDTA, and 0.025 mg/ml leupeptin). The samples were precleared by addition of anti-human fibronectin goat serum (5 μ l; Cooper, Malvern, U.S.A.), and protein A crude cell suspension (50 μ l; Sigma Chemical Co., St. Louis, U.S.A.) was added. The mixture was then incubated at 4°C for 1 h, and centrifugated. Rabbit anti-human β -galactosidase antiserum (5 μ l) (13) was added to each supernatant, and the samples were incubated overnight at 4°C. The immunoprecipitates were collected after addition of 50 μ l of the crude protein A suspension. The pellets were washed three times with 0.1 M Tris-HCl, pH 7.5, containing 0.15 M NaCl, 0.5% Triton X-100, 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS) and 1 mM EDTA, and then washed once with 10 mM Tris-HCl, pH 7.5.

Finally, the proteins were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (25), and visualized by fluorography.

Results

Isolation of cDNA encoding human β -galactosidase

The anti-human β -galactosidase/protective protein complex antiserum was used to screen a λ gt11 library prepared from human placental mRNA (14). Several positive clones were found. One of them, the clone GP8, expressed a fusion protein in *Escherichia coli* which cross-reacted with the anti-human β -galactosidase monomer antiserum.

Characterization of cDNA

The clone GP8 consisted of a 2379 nucleotide sequence, including a 34-nucleotide 5'-untranslated region, a 2031-nucleotide coding region, and a 314-nucleotide 3'-untranslated region (Fig. 1). The first ATG begins at nucleotide 35. The 3'-untranslated region contains a 3'-cleavage signal, AATAAA, which is followed 16 nucleotide later by a 21-nucleotide stretch of poly(A) sequence. The predicted molecular weight of a protein of 677-amino acid residues is 75 kDa.

```

5' GAG GGC GAG TGC AGA GCC GGG AGG CTG CCG GTC ATC CGG GGG TTC CTG GTT GGC ATC CTC CTT CTG TG CCG GTC CTT CTG GGC CTT ACG CGC GGG TTG GCG GAT GCC ACC 119
Met Pro Gly Phe Leu Val Arg Ile Leu Pro Leu Leu Val Val Leu Leu Leu Gly Pro Thr Arg Gly Leu Arg Ala Asp Thr 120
CAC AAG ATA TTT GAA ATT GAT TAC TAC ACC CGG GAC TCC TTC CTC AAG GAT GCG GAG CTC TTT GGC TAC ATC TCA GGA AAC ATT CAC TAC TCC GGT GTC GCG TTC TAC TGG AAG GAC GGG 226
Gln Arg Met Phe Glu Ile Asp Tyr Ser Arg Asp Ser Phe Leu Leu Asp Gly Gln Pro Phe Arg Tyr Ile Ser Gly Ser Ile His Tyr Ser Arg Val Val Pro Arg Phe Tyr Trp Leu Asp Arg 227
CTC CTG AAG ATA AAG ATG ATG GTC 356
Leu Leu Leu Met Leu Met Ala Ile Glu Thr Thr Val Pro Asp Phe Met His Glu Thr Ser Gly Tyr Gln Phe Ser Gly Asp His Asp Val Glu Tyr Phe Leu 357
GCG CTC GGT CAT GAG CTG GGA CTG CCG GTT ATC CTC AAG GCC GGG CCG TAC ATC TGT GGG CTA GAG AAG GAG TCT ATT CTT CTC CCG 476
Arg Leu Ala His Glu Leu Gly Leu Glu Val Ile Leu Arg Pro Gly Pro Tyr Ile Cys Ala Val Glu Thr Met Gly Leu Pro Ala Trp Leu Leu Glu Leu His Glu Ser Ile Leu Leu Arg 478
TCC TCC GAG GCA GAT TAC CTG GCA GCT GTC GAC AAG TGG TTS GGA CTC CTT CTG CCG AAG ATA AAG CTC CTC TAT CAG AAT GAA GGG CGA GGT ATA ACA GTC CAG GTT GAA AAT GAA 586
Ser Ser Asp Pro Asp Tyr Leu Ala Ala Val Asp Leu Trp Leu Gly Val Leu Leu Leu Trp Met Leu Leu Leu Trp Gln Aun Gly Gly Pro Val Ile Val His Glu Leu Asp Val 588
TAT GGG ACG TAC TTT GGC GAT TTT GAT TCC TAC CTC GCG TCC CTC CAG AAG GGC TTT GGC CAG CAT CTG GGG GAT GAT GTC GTT CTT GTC ACC ACT GAT GAA GCA CAT AAA ACA TTC CTC 716
Tyr Gln Ser Tyr Phe Ala Cys Asp Phe Asp Tyr Leu Ala Phe Leu Glu Lys Arg Phe Arg His His Leu Gly Asp Asp Val Val Leu Ser Thr Thr Asp Gly Ala His Lys Thr Phe Leu 728
AAA TGT GGG GGC CTG CAG GGC CTC TAC ACC GCG GAC TTT GGA ACA GGC AAC GAC ATC ACG GAT GCT TTC CTA ACG CAG AAG TST GAG CCG AAA GGA CCG TTG ATC AAT TCT GAA 836
Lys Cys Gly Ala Leu Glu Gln Gly Leu Tyr Thr Val Asp Phe Thr Thr Val Asp Ala Phe Leu Leu Leu Ser Gly Arg Lys Cys Glu Phe Lys Gly Pro Lys Thr Asp Ser Val 838
TTC TAT ACC GGG TGG CTA GAT CAC TGG GGC CAA CCT CAC TCC ACA ATC AAG ACC GAA GGA GGT GCT TCC TCC CTC TAT GAT ATA CTT GCG TGT GGG GCG AAT GTC ACA TTG TAC ATG 956
Phe Tyr Gly Trp Leu Asp His Trp Gly Gln Pro His Ser Thr Ile Lys Thr Glu Ala Val Ala Ser Ser Leu Tyr Asp Ile Leu Ala Arg Gly Ala Ser Val Aun Leu Tyr Met Phe 958
ATA GAT GGC AAC AAT TTT GGC TAT TGG AAT GGG GCG AAG TCA CCC TAT GGA GGA CAG CCC ACC ACC TAC GAC TAT GAT GGC CCA CTC AAT GAG GAG CAG CTC ACT GAG AAG TAT TTT 1076
Ile Thr Gly Thr Aun Phe Ala Tyr Arg Thr 1078
GCT CCG GAG AAT ATC ATC CAG AAG TTT GAA AAA GTA CAA GAG GGT GCT ATC CTT CCA TCA ACA TCA AAG TTT GAA ACC ACG CTC ACT TCG GAA AAG TTA GAG ACA GTC GGA GCA GCT 1196
Glu Cys Arg Aun Thr Cys Arg Thr 1198
CTG GAT ATT CTG TGT GCT TGG CCG ACC AAG CCG CTT TAT CCG TTG ACA TTT ATC CAG CAG AAA CAG CAT TAT GGG TTT GTC CTG TAC GCG ACA CTT CTT CCA TAC TGG AAG ACA 1318
Leu Asp Ile Leu Cys Pro Ser Tyr Gly Gln Thr 1320
CGA GAG CTC CTC TCA CCC CTC AAT GGA CTC CAG GAT GGA GCA TAT GGT GCT GTC GAT GGG ATC CCG GAA CTC CTT GAG GAG AAC AAT GTC ATC ACT CTG ACA ATA ACG GGG AAA 1436
Pro Ala Pro Leu Ser Pro Leu Leu Val Val His Asp Arg Ala Tyr Val Ala Val Asp Gly Ile Pro Gln Gly Val Val Leu Glu Arg Aun Aun Val Ile Thr Leu Ala Thr Thr Lys Lys 1438
TGG TCC GAT GCT GTC GAC CTT CTG GGA GAG AAG GTA GGA GAT GTC GTC AAT GAT GCA TAT GTC GCA TAT ATC AAG GAT TTT AAG GGT TGT GTT TGT TAC CTG ACT CTC AG 1556
Ala Gly Ala Thr Leu Asp Leu Val Glu Aun Met Gly Val Aun Thr 1558
TGG ACC ATC TTT CTA CTC GAC ACT GAG GAT GAG TGC GGC AAG CAG CTC GCG GCG TGG TGG GCG CAG COT GAT CAG ACT GGC CAG CAT GAT GAA GCG TGG GCG CAA CTA TCA TCA ACT 1676
Tyr Thr Ile Phe Leu Asp Thr Glu Asp Ala Val Arg Ser His Leu Gly Tyr Gly Trp Ile Arg Asp Ser Gly His Asp Arg Ser Gly His Asp Glu Ala Trp Ala His Aun Ser Ser Aun Tyr Thr 1678
CGG GCG TTT TAT ATA GGG AAC TTC TCC ATT CCC AAT GGG ATC CCA GAC TCC CCG CAG GAC ACC TTT ATC CAG TTT CCG GAA TGG ACG AAG GCG CAG CTC TGG ATT AAT GGC TTT AAC CTT 1796
Pro Ala Phe Tyr Met Gly Thr 1798
GAG GCG CTT TGG CCA GCG GGG GCG CCG CAC TTC ACC TTG TTT GTC CCG CAG CAC ATC CTG ATC ACC TCG GCG CCA AAC ACC ACC ACC GTC GGA GTC GAG TGG GGA GCG TGG AAC AOT 1916
Gly Arg Tyr Trp Pro Ala Arg Gly Pro Gln Thr Leu Thr Val Pro Gln His Ile Leu Met Thr Ser Ala Pro Aun Thr Ile Thr Val Glu Leu Glu Thr Ala Pro Leu Thr Thr Thr Thr Thr Thr 1918
GAT GAT CCA GAA CTA TGT GCT GTC GAG AAG CCA GTT ATT GGC TCA TCT GTC ACC TAC GAT CAT CCG TCC AAA CCA GCT GGT GAA AAA ACA CTC ATC CCG CCA CCC CCG CCA AAA 2036
Asp Arg Pro Glu Leu Cys Ala Val Thr Phe Val Asp Arg Pro Val Ile Cys Ser Met Thr Tyr Asp His Pro Ser Lys Pro Val Glu Leu Arg Lys Met Pro Pro Pro Pro Gly Lys 2038
AAC AAA GAT TCA TGG CTC GAG CAT GTA TGA TGA TGA AAC CTT GCT TTT TGA GAT TCT CCA 2156
Asp Aun Arg Ser Leu Asp His Val 2157
TTCCATCGAGTGTTCGGCTCGAGTCCGAGCCGACCCCTCGAGGACCCCTCGAGTGTGAGGGGGTCCACAGCAGCAATAGCTGCATACATCTCTCGAGGGTGGAGTGAAGGACTTAAAGGTGTGATGATTTTATTATGAGAACAT 2346
ATGTTACTCTTTTGTTCATTAATTTGATCTC 2379

```

Fig. 1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of human β -galactosidase. The methionine encoded by the first ATG is designated amino acid 1. The putative signal sequence cleavage site is indicated by an arrow. The potential asparagine-linked glycosylation sites are boxed. The amino acid sequence that is homologous to monkey testis β -galactosidase and the AATAAA sequence in the 3'-untranslated region are underlined.

Table 1 Expression of human β -galactosidase in transfected COS cells

Plasmid	Cell extract		Medium	
	60 h	80 h	60 h	80 h
	unit/mg protein		total unit/dish	
pSVL	92	100	0.5	0.7
pSVL(GP8)	234	298	1.7	4.9

COS cells were transfected with pSVL or pSVL(GP8) as described in the text. β -Galactosidase activity in the cells and the culture medium was assayed 60 h and 80 h after transfection. One unit of the enzyme activity was defined as the activity releasing 1 nmol of 4-methylumbelliferone per h.

The amino acid sequence contains a 23-amino acid putative signal sequence at the NH₂ terminus. This signal sequence includes a long hydrophobic stretch of amino acids, helix-breaking residues (glycine and proline) at positions -5 and -4 from a probable cleavage site marked by an arrow in Fig. 1, a small neutral residue (threonine) at position -3, a large polar residue (arginine) at position -2, and glycine at position -1. This sequence agrees with the consensus sequence for a signal sequence cleavage site (26,27). Seven potential N-linked glycosylation sites are located at positions 26, 247, 464, 498, 542, 545, and 555. The sequence of this protein was compared with the sequences in the protein database of the National Biochemical Research Foundation (release 15, 1988). No significant protein homology was detected.

Expression and immunoprecipitation

The insert of GP8 was subcloned into the SV40 expression vector pSVL and designated pSVL(GP8). The results of experiments after transfection of COS cells with pSVL(GP8) or pSVL are summarized in Table 1. Transfection with pSVL(GP8) led to a 3-fold increase in β -galactosidase activity in the cells and the medium 60 h after transfection as compared with the enzyme activity in the cells transfected with the vector alone. β -Galactosidase activity was increased 7-fold in the medium after 80 h. Also a large increase of the immunoprecipitable protein was found in the cells transfected with pSVL(GP8) (Fig 2). Protein bands of 88, 84 and 60 kDa were detected by immunoprecipitation from the extract of the cells transfected with pSVL(GP8).

Discussion

We reported here the results of isolation and sequencing of the full-length cDNA for human placental β -galactosidase. This cDNA was expressed in COS cells with an increase of the enzyme activity and synthesis of immunoprecipitable proteins. The deduced amino acid sequence revealed some characteristic features of a lysosomal enzyme, β -galactosidase. There are a signal sequence

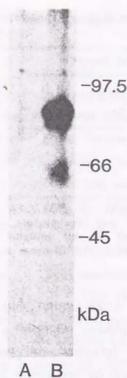


Fig. 2 Immunoprecipitation of human β -galactosidase from transfected COS cells. COS cells were transfected with pSVL (lane A) or with pSVL(GP8) (lane B), and metabolically labeled with L-[4,5- 3 H]-leucine as described in the text. The proteins precipitated from the cell extracts with rabbit anti- β -galactosidase antiserum were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and visualized by fluorography.

and seven potential N-linked glycosylation sites. The carbohydrate content of β -galactosidase precursor was estimated at 21-28% on the basis of the molecular mass of this molecule (28). This estimation agrees with the number of potential N-linked glycosylation sites, and accounts for an apparent discrepancy between the molecular weight of the immunoprecipitable protein (88 kDa) and that of the protein calculated from the amino acid sequence after cleavage of the signal sequence (73.5 kDa). The deduced amino acid sequence at positions 235-254 is 75% homologous with an amino acid sequence of monkey testis β -galactosidase (Try-Glu-Pro-Arg-Gly-Pro-Leu-Ile-Asn-Ser-Glu-Phe-Tyr-Tyr-Gly-Trp-Leu-Asp-Phe-Tyr) determined by Edman degradation (29).

Expression of the cloned cDNA for human β -galactosidase, GP8, led to biosynthesis of a large amount of 88 kDa and 84 kDa and a relatively small amount of 60 kDa immunoprecipitable proteins. The former two were visualized as sharp and narrow bands, but the latter always appeared as a broad band. Mature human β -galactosidase may not have been processed properly, or may be unstable and partially degraded in COS cells which are derived from monkey kidney.

Studies on patients with a human inherited metabolic disease, galactosialidosis, demonstrated the presence of a specific protein ("protective protein") for stabilization of β -galactosidase (12,13). The expression product (newly synthesized

β -galactosidase) may therefore have been degraded excessively in COS cells, due to oversaturation of the stabilizing system involving the protective protein, as the enzyme protein is expected to increase at least 100-fold in the transfected cells according to the calculation based on the theoretical efficiency of transfection. Galactosialidosis is a disease with defect in protective protein resulting in accelerated degradation of β -galactosidase molecule (30). Further experiments are necessary to elucidate this problem, including those on expression of the cloned cDNA in human cell lines.

The full-length cDNA reported here will be useful for the study of transport, processing, and stabilization of β -galactosidase, and will make it possible to clarify the pathogenesis of the disorders with β -galactosidase deficiency.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the Ministry of Education, Science and Culture, and from the Ministry of Health and Welfare of Japan.

References

- Hoozevee, A.T., Graham-Kawashima, H., d'Azzo, A., and Galjaard, H. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 1974-1977.
- Hoozevee, A.T., Reuser, A.J.J., Kroos, M., and Galjaard, H. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 5702-5704.
- Namba, E., Tsuji, A., Omura, K., and Suzuki, Y. (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 152, 794-800.
- Hoozevee, A.T., Verheijen, F.W., and Galjaard, H. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 12143-12146.
- Verheijen, F.W., Palmeri, S., Hoozevee, A.T., and Galjaard, H. (1985) *Eur. J. Biochem.* 149, 315-321.
- Okada, S., and O'Brien, J.S. (1968) *Science* 160, 1002-1004.
- O'Brien, J.S., Gugler, E., Giedion, A., Wiesmann, U., Herschkowitz, N., Meier, C., and Leroy, J. (1976) *Clin. Genet.* 9, 495-504.
- Furusawa, T., and Suzuki, Y. (1984) *J. Inher. Metab. Dis.* 7, 145-146.
- Kornfeld, S. (1986) *J. Clin. Invest.* 77, 1-6.
- von Figura, K., and Hasilik, A. (1986) *Annu. Rev. Biochem.* 55, 167-193.
- Suzuki, Y., Sakuraba, H., Yamanka, T., Ko, Y.-M., Iimori, Y., Okamura, Y., and Hoozevee, A.T. (1985) *The Developing Brain and Its Disorders* (Arima, M., Suzuki, Y., and Yabuuchi, H., ed.) pp. 161-175, Karger, Basel.
- D'Azzo, A., Hoozevee, A., Reuser, A.J.J., Robinson, D., and Galjaard, H. (1982) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 79, 4535-4539.
- Namba, E., Tsuji, A., Omura, K., and Suzuki, Y. (1987) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 144, 138-142.
- Ye, R.D., Wun, T.-C., and Sandler, J.E. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 3718-3725.
- Norrander, J., Kempe, T., and Messing, J. (1983) *Gene* 26, 101-106.
- Henikoff, S. (1984) *Gene* 28, 351-359.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 74, 5463-5467.
- Mizusawa, S., Nishimura, S., and Seela, F. (1986) *Nucleic Acids Res.* 14, 1319-1324.
- Oshima, A., Kyle, J.W., Miller, R.D., Hoffmann, J.W., Powell, P.P., Grubb, J.H., Sly, W.S., Tropak, M., Guise, K.S., and Gravel R.A. (1987) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 685-689.
- Gluzman, Y. (1981) *Cell* 23, 175-182.
- Sakuraba, H., Aoyagi, T., and Suzuki, Y. (1982) *Clin. Chim. Acta* 125, 275-282.

β -Galactosidase-deficient human fibroblasts: uptake and processing of the exogenous precursor enzyme expressed by stable transformant COS cells

Akihiro Oshima, Kohji Itoh, Yoshiro Nagao, Hitoshi Sakuraba, and Yoshiyuki Suzuki

Department of Clinical Genetics, The Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, 3-18-22 Honkomagome, Bunkyo-ku, Tokyo, 113 Japan

Received January 8, 1990 / Revised March 28, 1990

Summary. COS-1 cells were transfected by electroporation with a cDNA for human acid β -galactosidase cloned in our laboratory and stable transformants expressing the enzyme activity were selected. The precursor form of the enzyme was secreted in large quantities into the culture medium. The fibroblasts from patients with G_{M1} -gangliosidosis or Morquio B disease showed a remarkable increase of enzyme activity, up to the normal level, after culture in this medium for 2 days; the amount of uptake was essentially the same as that for the precursor form in human fibroblasts. After endocytosis, the precursor molecules were processed normally to the mature form and remained as stable as those produced by human fibroblasts. On the other hand, cells from galactosialidosis patients did not show any increase of enzyme activity in a similar experiment. It was concluded that the transformants are useful as the source of precursor proteins for the study of intracellular turnover of enzyme molecules in mutant cells.

Introduction

A complete or partial deficiency of β -galactosidase has been observed in diseases of various molecular pathology: G_{M1} -gangliosidosis and Morquio B disease caused by gene defects for this enzyme (O'Brien 1989; Okada and O'Brien 1968), mucopolipidosis II and III caused by a defect in transport of the precursor enzyme (Nolan and Sly 1989), and galactosialidosis caused by abnormal degradation of the enzyme molecules due to a defect of a specific protein protecting the enzyme molecule against proteolytic degradation (protective protein) (D'Azzo et al. 1982; Nanba et al. 1987). In normal fibroblasts, a 84 kDa β -galactosidase precursor is processed to an 88 kDa intermediate precursor form, and then to a 64 kDa mature enzyme (Nanba et al. 1988a). Active β -galactosidase is mainly present as a 64 kDa form aggregated with a 30 kDa protective protein to form a high molecular complex in

Offprint requests to: A. Oshima

lysosomes (Hoogveen et al. 1983, 1984 1986; Nanba et al. 1988b).

We have reported the nucleotide sequence of a full-length cDNA clone for human β -galactosidase and its expression in transfected COS cells to study disorders involving β -galactosidase deficiency (Oshima et al. 1988). Morreau et al. (1989) also independently cloned the human β -galactosidase and a β -galactosidase-related protein cDNA. The transient expression of the β -galactosidase cDNA isolated in both laboratories resulted in the production mainly of an 88 kDa precursor. The precursor enzyme was found to be taken up by G_{M1} -gangliosidosis fibroblasts (Morreau et al. 1989). The nucleotide sequence and expression of the human protective protein have also been described (Galjart et al. 1988). In this communication, we report the endocytosis, processing, and stability of the exogenous 88 kDa precursor in fibroblasts from patients with hereditary β -galactosidase deficiency. The precursor form enzyme was secreted into the culture medium in large quantities by stably transformed COS cells.

Materials and methods

Materials

The human precursor and mature β -galactosidases were purified from human fibroblast secretions and cell extracts (D'Azzo et al. 1982; van Diggelen et al. 1981). Restriction enzymes and T4 DNA ligase were purchased from Nippon Gene (Toyama, Japan), and the dye reagent concentrate for protein assay from Bio-Rad (Richmond, USA). All other reagents used in this study were purchased from Wako Pure Chemicals (Osaka, Japan), unless indicated otherwise.

Cell culture

Skin fibroblast strains were obtained from patients with G_{M1} -gangliosidosis and galactosialidosis. The diagnosis of these diseases was established by clinical manifestations and enzyme assays (Moteji et al. 1987; Nanba et al. 1987, 1988b). Morquio B disease fibroblasts (GM3251 and GM2455) were obtained from Human Genetic Mutant Cell Repository (Camden, USA). COS-1 cells were supplied by Dr. Y. Nabeshima (National Institute of Neuro-

ence, N.C.N.P., Tokyo, Japan). The cells were cultured in Ham's F-10 medium supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) and antibiotics.

Enzyme assay and protein determination

The β -galactosidase assay was assayed with a fluorogenic substrate (4-methylumbelliferyl β -galactoside; Nakari Chemicals, Kyoto, Japan) as described previously (Sakuraba et al. 1982). Protein concentration was determined by the method of Bradford (1976).

Construction of expression vector

The Epstein-Barr virus-based mammalian cell expression vector pKTH539 was obtained from Dr. Anu Jalanko (Orion Genetic Engineering Laboratory, University of Helsinki, Helsinki, Finland) (Jalanko et al. 1988). The cDNA for human acid β -galactosidase (Oshima et al. 1988) was subcloned into the *SalI* site of pKTH539 and designated pKTH539(GP8).

Transfection of COS cells

Centrifuge Model 1950-S (Waken-yaku Co., Kyoto, Japan) was used for electroporation (Harlander 1981). Subconfluent COS-1 cells, which had been plated in 100-mm Petri dishes prior to transfection, were harvested by trypsinization, washed once with phosphate-buffered saline (PBS), and suspended in 0.3 ml of PBS containing 10 μ g of pKTH539 or pKTH539(GP8) in the electroporation chamber. The chamber was chilled on ice for 5 min, centrifuged for 3 min at 3500 rpm, subjected to five 50- μ s-pulses of 400 V, centrifuged again at 5000 rpm for 10 s, and allowed to sit on ice for 5 min. The cells were plated in a 100-mm Petri dish, and cultured for 24 h. The culture was then continued in a medium containing 100 μ g/ml of hygromycin B (Boehringer Mannheim, Mannheim, FRG) for 21 days. Finally, hygromycin B-resistant colonies were isolated, and analyzed for human β -galactosidase expression.

Labeling and immunoprecipitation of β -galactosidase

The stable transformant COS-1 cells were incubated for 1 h in leucine-free Eagle's Minimum Essential Medium (MEM), and labelled for 24 h with L-[4,5-³H]-leucine (0.2 mCi per dish, 70 Ci/mmol; Amersham, Buckinghamshire, UK, in leucine-free MEM containing 5% dialyzed FCS (Hasilik and Neufeld 1980; Proia et al. 1984). The medium was concentrated by ammonium sulfate precipitation at 60% saturation, and dialyzed against 20 mM sodium phosphate, pH 6.0. Human fibroblasts were incubated for 2 days in a culture medium containing the labelled enzyme. The immunoprecipitation was performed as described previously (Oshima et al. 1988).

Enzyme uptake and processing in human cells

The COS-1 cells stably transformed by pKTH539(GP8) (vector + β -galactosidase cDNA) or pKTH539 (vector alone) were cultured for 2 days in F-10 with 10% FCS, which had been heated at 65°C for 2 h to inactivate serum β -galactosidase. Fibroblasts from patients with β -galactosidase deficiency were incubated for 2 days in this medium, and β -galactosidase activity was assayed in the cells as described above.

In a subsequent experiment, fibroblasts from a patient with G_{M1} -gangliosidosis was cultured for 3 days in regular F-10, and the culture medium was replaced with the medium in which the pKTH539 transformant had been cultured for 2 days. Ten units of human β -galactosidase (one unit: nmol of substrate cleaved/h) obtained from one of the following sources were added to the culture medium: (1) the precursor secreted from the pKTH539(GP8) transformant, (2) the β -galactosidase precursor purified from human fibroblasts, or (3) the mature enzyme purified from human

fibroblasts. After 24 h incubation in the presence of the exogenous enzyme, the cells were cultured in regular F-10 for 2 days prior to analysis (D'Azzo et al. 1982). Mannose 6-phosphate was added at a final concentration of 5 mM in some experiments.

Results

Expression of β -galactosidase in transfected COS-1 cells

β -Galactosidase activity was assayed in individual hygromycin B-resistant cell lines after the initial transfection with pKTH539(GP8). Three cell lines with high β -galactosidase activity secreted an immunoprecipitable 88 kDa protein (Fig. 1, lanes B–D). In contrast, no or very little immunoprecipitable protein was detected in the cells stably transformed by the vector pKTH539 alone (Fig. 1, lane A). The cell lines presented in Fig. 1, lanes C and A, were designated COS-1-pKTH539(GP8) (vector + β -galactosidase cDNA) and COS-1-pKTH539 (vector alone), respectively, and used for the following experiments.

Enzyme supplementation in β -galactosidase-deficient human fibroblasts

The fibroblasts derived from patients with β -galactosidase deficiency were cultured for 2 days in the medium of COS-1-pKTH539(GP8) cells (β -galactosidase activity: 144 units/ml). The enzyme activity became normal in G_{M1} -gangliosidosis and Morquio B disease fibroblasts (normal range: 209–384) (Table 1). However, only a little increase of activity was observed in the galactosialidosis cells. Incubation with the culture medium of the COS-1-pKTH539 cells did not change the enzyme activity in the cells tested.

Then, the uptake of β -galactosidase from various sources was compared in a G_{M1} -gangliosidosis cell strain

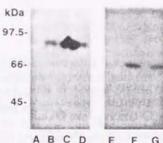


Fig. 1. Processing of the COS-1 cell expression product in fibroblasts from patients with β -galactosidase deficiency. COS-1 cells were transfected with pKTH539 vector alone (lane A) or with pKTH539(GP8) (lanes B–D), and selected for resistance to hygromycin B. Individual colonies were metabolically labelled. The secreted products were immunoprecipitated with rabbit anti- β -galactosidase serum, separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, and visualized by fluorography. Fibroblasts derived from patients with galactosialidosis (lane E), G_{M1} -gangliosidosis (lane F), or Morquio B disease (lane G) were cultured for 2 days in the medium containing the labelled secreted product from COS-1 cells stably transformed by pKTH539(GP8) (lane C). The cell extracts were treated as described above for the secreted products.

sulfate, and clinical manifestations of central nervous system abnormalities are absent (O'Brien 1989). Recent genetic and biochemical studies, including cell hybridization and immunoprecipitation analysis, have indicated that these two diseases, G_{M1} -gangliosidosis and Morquio B disease, are caused by allelic mutations of the β -galactosidase gene (van der Horst et al. 1983). On the other hand, galactosialidosis has been reported to be caused by abnormal degradation of the enzyme molecule due to a defect of the protective protein (D'Azzo et al. 1982). The data in our present study support these previous reports; supplementation of the β -galactosidase precursor resulted in restoration of the enzyme activity in G_{M1} -gangliosidosis and Morquio B disease cells, but did not do so in galactosialidosis cells.

In one of the experiments using the β -galactosidase precursor from the transformant COS cells, supplementation with 100 units of the enzyme was found to be sufficient to restore the enzyme activity in G_{M1} -gangliosidosis fibroblasts to nearly the normal level. In our previous study, 5000 units of the human liver mature enzyme were necessary to increase the activity in G_{M1} -gangliosidosis cells, although the mature enzyme was stable after being taken up by the cells (Ko and Suzuki 1985). The finding that the addition of mannose 6-phosphate completely inhibited the uptake of the precursor enzyme indicates that the difference in the rate of uptake is related to the amount of mannose 6-phosphate residues on the enzyme (Creek and Sly 1984; Kornfeld 1986). It is expected that the COS-1 cells with human acid β -galactosidase gene transfer will provide and excellent source of the enzyme for further supplementation cell studies and possible replacement therapy of the patients with G_{M1} -gangliosidosis and Morquio B disease.

Acknowledgments. This work was supported by grants from the Ministry of Education, Science, and Culture, and the Ministry of Health and Welfare of Japan.

References

- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254
- Creek KE, Sly WS (1984) The role of the phosphomannosyl receptor in the transport of acid hydrolases to lysosomes. In: Dingle JT, Dean RT, Sly WS (eds) *Lysosomes in biology and pathology*, vol 7. Elsevier, Amsterdam, pp 63–82
- D'Azzo A, Hoogeveen A, Reuser AJJ, Robinson D, Galjaard H (1982) Molecular defect in combined β -galactosidase and neuraminidase deficiency in man. *Proc Natl Acad Sci USA* 79:4335–4339
- Diggelov OP van, Schram AW, Sinnott ML, Smith PJ, Robinson D, Galjaard H (1981) Turnover of β -galactosidase in fibroblasts from patients with genetically different types of β -galactosidase deficiency. *Biochem J* 200:143–151
- Galjarr NJ, Gillemans N, Harris A, Horst GTJ van der, Verheijen FW, Galjaard H, D'Azzo A (1988) Expression of cDNA encoding the human "protective protein" associated with lysosomal β -galactosidase and neuraminidase: homology to yeast proteases. *Cell* 54:755–764
- Harlander SK (1981) Transfection of *Streptococcus* cells by electroporation. In: Ferretti JJ, Curtis R (eds) *Streptococcus* gen-

- netics. American Society for Microbiology, Washington, DC, pp 229–233
- Hasilik A, Neufeld EF (1980) Biosynthesis of lysosomal enzymes in fibroblasts. *J Biol Chem* 255:497–495
- Hoogeveen AT, Verheijen FW, Galjaard H (1983) The relation between human lysosomal β -galactosidase and its protective protein. *J Biol Chem* 258:12143–12146
- Hoogeveen AT, Graham-Kawashima H, D'Azzo A, Galjaard H (1984) Processing human β -galactosidase in G_{M1} -gangliosidosis and Morquio B disease. *J Biol Chem* 259:1974–1977
- Hoogeveen AT, Reuser AJJ, Kroos M, Galjaard H (1986) G_{M1} -Gangliosidosis: defective recognition site on β -galactosidase precursor. *J Biol Chem* 261:5702–5707
- Horst GTJ van der, Kleijer WJ, Hoogeveen AT, Huiman JGM, Blom W, Diggelov OP van (1983) Morquio B syndrome: a primary defect in β -galactosidase. *Am J Med Genet* 16:261–275
- Jalanko A, Kallio A, Ruohonen-Lehto M, Soderlund H, Ulmanen I (1988) An EBV-based mammalian cell expression vector for efficient expression of cloned coding sequences. *Biochim Biophys Acta* 949:206–212
- Ko Y, Suzuki Y (1985) Experimental studies on enzyme replacement therapy of genetic β -galactosidase deficiency. II. Studies on β -galactosidase human tissues. *Nippon Shonka Gakkai Zasshi* 89:553–559
- Kornfeld S (1986) Trafficking of lysosomal enzymes in normal and disease states. *J Clin Invest* 77:1–6
- Morreau H, Galjarr NJ, Gillemans N, Willemens R, Horst GTJ van der, D'Azzo A (1989) Alternative splicing of β -galactosidase mRNA generates the classic lysosomal enzyme and a β -galactosidase-related protein. *J Biol Chem* 264:20655–20663
- Motegi Y, Fujinaga T, Tamura H, Kuroume T, Omura K, Namba E, Suzuki Y (1987) Severe infantile galactosialidosis: a case report. *Nippon Shonka Gakkai Zasshi* 91:1459–1464
- Namba E, Tsuji A, Omura K, Suzuki Y (1987) Galactosialidosis: direct evidence that a 46-kilodalton protein resides deficient enzyme activities in fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 144:138–142
- Namba E, Tsuji A, Omura K, Suzuki Y (1988a) G_{M1} -gangliosidosis: abnormalities in biosynthesis and early processing of β -galactosidase in fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 152:794–800
- Namba E, Tsuji A, Omura K, Suzuki Y (1988b) Galactosialidosis: molecular heterogeneity in biosynthesis and processing of protective protein for β -galactosidase. *Hum Genet* 88:329–332
- Nolan CM, Sly WS (1989) I-cell disease and pseudo-Hurler polydystrophy: disorder of lysosomal enzyme phosphorylation and localization. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds) *The metabolic basis of inherited disease*, 6th edn. McGraw-Hill, New York, pp 1589–1601
- O'Brien JS (1989) β -Galactosidase deficiency (G_{M1} -gangliosidosis, galactosialidosis, and Morquio syndrome type B): ganglioside sialidase deficiency (mucopolysaccharidosis). In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds) *The metabolic basis of inherited disease*, 6th edn. McGraw-Hill, New York, pp 1797–1806
- Okada S, O'Brien JS (1968) Generalized gangliosidosis: β -galactosidase deficiency. *Science* 160:1002–1004
- Oshima A, Kyle JW, Miller RD, Hoffmann JW, Powell PB, Clubb JH, Sly WS, Tropak KS, Guse KS, Gravel RA (1987) Cloning, sequencing, and expression of cDNA for human β -galactosidase. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:685–689
- Oshima A, Tsuji A, Nagao Y, Sakuraba H, Suzuki Y (1988) Cloning, sequencing, and expression of cDNA for human β -galactosidase. *Biochem Biophys Res Commun* 157:238–244
- Proia RL, D'Azzo A, Neufeld EF (1984) Association of α - and β -subunits during the biosynthesis of β -hexosaminidase in cultured human fibroblasts. *J Biol Chem* 259:3350–3354
- Sakuraba H, Aoyagi T, Suzuki Y (1982) Galactosialidosis (β -galactosidase-neuraminidase deficiency): a possible role of sennethiol proteases in the degradation of β -galactosidase molecules. *Clin Chim Acta* 125:275–282

Table 1. Supplementation of exogenous β -galactosidase to mutant fibroblasts. The COS-1 cells stably transformed by pKTH539 (vector alone) or pKTH539(GP8) were cultured for 2 days in F-10 with 10% FCS heated at 65°C for 2 h. Then, the mutant fibroblasts with β -galactosidase deficiency were incubated for 2 days in this medium, and the β -galactosidase activity of the cells was assayed. The enzyme activity is expressed as unit/mg protein (one unit: nmol of 4-methylumbelliferone released per h)

Fibroblast strain	Enzyme source		Cell source
	pKTH539	pKTH539(GP8)	
GM1-Gangliosidosis 1	4	214	Nanba et al. 1988a (case 2)
	2	0	New case (L-91)
Morquio B disease 1	5	183	Human Genetic Mutant Cell Repository, Camden, USA (GM3251)
	2	8	Human Genetic Mutant Cell Repository, Camden, USA (GM2455)
Galactosialidosis 1	12	30	Nanba et al. 1988b (case 2)
	2	32	Nanba et al. 1988b (case 11)

Table 2. Uptake of exogenous β -galactosidase into GM1-gangliosidosis fibroblasts. Fibroblasts derived from a patient with GM1-gangliosidosis (Nanba et al. 1988a, case 2) were cultured in a medium containing 10 units of human β -galactosidase from various sources under three different conditions: (1) 24 h incubation only (24h); (2) 24 h incubation followed by 48 h chase without the enzyme in the medium (24h + chase); and (3) 24 h incubation in the presence of 5 mM mannose 6-phosphate (24h + M6P). Precursor and mature β -galactosidases were purified according to the method described by D'Azzo et al. (1982) and van Diggelen et al. (1981), respectively. The intracellular β -galactosidase activity was assayed after each experiment. The enzyme activity is expressed as unit/mg protein (one unit: nmol of 4-methylumbelliferone released per h)

Enzyme source	Enzyme form	Incubation		
		24 h	24 h + chase	24 h + M6P
COS-pKTH539(GP8)	Precursor	18.0	12.3	0.6
Human fibroblast	Precursor	23.4	14.5	0.5
Human fibroblast	Mature	1.0	0.7	0.6
No addition		0.6	0.8	0.7

(Table 2). The β -galactosidase precursors, prepared from human fibroblasts and COS-1-pKTH539(GP8) cells, were taken up efficiently during the 24 h incubation and retained significantly high activities after the subsequent 48 h incubation without the enzyme. The enzyme activity was not changed after incubation with the mature enzyme purified from human fibroblasts. Endocytosis was completely inhibited by the addition of 5 mM mannose 6-phosphate to the culture medium during incubation.

Processing of the β -galactosidase precursor

The molecular weight of the β -galactosidase precursor secreted from COS-1-pKTH539(GP8) was 88 kDa (Fig. 1, lane B). The endocytosed precursor was processed to an immunoprecipitable 64 kDa protein in the GM1-gangliosidosis cells (Fig. 1, lane F) and the Morquio B disease cells (Fig. 1, lane G). On the other hand, only a small amount of immunoprecipitable 64 kDa protein was detected in a galactosialidosis strain (Fig. 1, lane E).

Discussion

In this report, we have established stable transformant COS-1 cells, expressing human β -galactosidase, by transfection of an expression vector pKTH539(GP8). This vector consists of the human cytomegalovirus immediate early gene enhancer, the SV40 virus early promoter, the entire coding region for human β -galactosidase, the intron and polyadenylation signals from SV40 virus DNA, the Epstein-Barr virus EBNA-1 nuclear antigen gene, the ori-P sequence, and the hygromycin B resistance gene, hph, from *E. coli* (Jalanko et al. 1988). β -Galactosidase was successfully expressed in these cells, and the intracellular turnover of the enzyme molecule was studied in normal and mutant human fibroblasts.

The results of this study can be summarized as follows: (1) a large amount of β -galactosidase precursor was secreted from the transformed COS-1 cells into the medium without addition of any alkalinizing agent (Creek and Sly 1984; Kornfeld 1986); (2) the secreted precursor was endocytosed into the human fibroblasts via the mannose 6-phosphate receptor transport pathway, and was processed to the stable mature enzyme; (3) supplementation of the precursor increased the β -galactosidase activity in fibroblasts derived from GM1-gangliosidosis and Morquio B disease, but not from galactosialidosis; and (4) the efficiency of endocytosis and the intracellular stability were almost the same as those of the precursor from human fibroblasts.

The reason why the high uptake form of this enzyme was secreted from the transformed COS-1 cells is unknown. Under regular culture conditions, parent COS-1 cells, cells transfected with the vector alone, or human fibroblasts, did not secrete β -galactosidase in significant quantities. Overproduction of the human enzyme may have saturated the β -galactosidase transport pathway to the lysosomes. In the case of transient expression of human β -glucuronidase in COS-7 cells, a half of the newly synthesized enzyme was also secreted into the medium (Oshima et al. 1987).

GM1-gangliosidosis is a disease in which ganglioside GM1 accumulates in many organs (especially in brain), and central nervous system abnormalities are manifest clinically (O'Brien 1989). Morquio B disease is one of the mucopolysaccharidoses involving storage of keratan

参考文献 4

G_{M1}-gangliosidosis: tandem duplication within exon 3 of β -galactosidase gene in an infantile patient

Oshima A, Yoshida K, Ishizaki A, Shimamoto M, Fukuhara Y, Sakuraba H, Suzuki Y. G_{M1}-gangliosidosis: tandem duplication within exon 3 of β -galactosidase gene in an infantile patient. Clin Genet 1992; 41: 235-238.

A 23-nucleotide tandem duplication (GGACCTTGAAAGTACTC-GGGACC) was found within exon 3 of the β -galactosidase gene in a patient with infantile-form G_{M1}-gangliosidosis, which generated a premature stop codon after translation of 36 amino acids. Homologous sequences at the area of duplication suggested that the mutation resulted from an unequal crossover. A single base substitution ³⁶⁸Trp→Cys was found in the other allele. Family study showed that the duplication was transmitted from his father and the base substitution from his mother.

G_{M1}-gangliosidosis and Morquio B disease are the lysosomal storage diseases caused by allelic mutations of β -galactosidase gene (O'Brien 1989). Thirteen gene mutations have been found in them (Oshima et al. 1991). Mutations of infantile-form G_{M1}-gangliosidosis are heterogeneous and their expression products are almost completely deficient in enzyme activity (Yoshida et al. 1991). On the other hand, common gene mutations have been found in the other types of β -galactosidase deficiency: late infantile/juvenile and adult/chronic G_{M1}-gangliosidosis (Nishimoto et al. 1991, Yoshida et al. 1991), and Morquio B disease (Oshima et al. 1991). Their expression products have detectable residual enzyme activities.

In our previous study on G_{M1}-gangliosidosis (Yoshida et al. 1991), only single mutations were found in two infantile cases by sequence analysis of reverse-transcribed cDNA, but subsequent genomic restriction site analysis suggested the presence of second mutations, and we concluded that direct genomic analysis would be necessary for the final determination of the genotype. We report here a 23-nucleotide (nt) duplication within the β -galactosidase gene exon 3 in one of them.

Akihiro Oshima¹, Kunihira Yoshida¹, Asayo Ishizaki², Michie Shimamoto¹, Yukiko Fukuhara¹, Hitoshi Sakuraba¹ and Yoshiyuki Suzuki¹

¹Department of Clinical Genetics, The Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, Bunkyo-Ku, Tokyo, and ²Metropolitan Medical Center of the Severely Handicapped, Fuchu, Tokyo, Japan

Key words: β -galactosidase - gene mutation - G_{M1}-gangliosidosis - tandem duplication

Dr. Akihiro Oshima, Dept. of Clinical Genetics, The Tokyo Metropolitan Inst., 3-18-22 Honkomagome, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan

Received 6 September, accepted for publication 6 November 1991

Case report

The patient, a 5-year-old boy (Yoshida et al. 1991; case 1), was born to non-consanguineous parents. His 7-year-old brother was affected with Down syndrome. Otherwise, the family history was non-contributory. The course of pregnancy and delivery was uneventful. No dysmorphism has been observed since early infancy. Hepatomegaly and liver dysfunction were detected at 6 months of age. He was hospitalized at 1 year for evaluation of progressive psychomotor deterioration. He was hypotonic, but deep tendon reflexes were hyperactive. Cherry-red spots were found bilaterally. β -Galactosidase activity in mixed leukocytes was almost completely deficient, with 4-methylumbelliferyl- β -galactoside as substrate.

Generalized convulsive seizures occurred subsequently and progressive rigospasticity developed. He was kept hospitalized because of recurrent bronchopneumonia. Respiration has been assisted with a mechanical ventilator since 4 years of age. At present, he is in a state of decerebrate rigidity. A single base substitution ⁹⁸¹A→G(¹⁶Tyr→Cys) was found in one of his alleles in a previous study (mutation J; Yoshida et al. 1991).

Material and methods**Preparation and amplification of genomic DNA and cDNA**

Genomic DNA was prepared from lymphoblasts or mixed leukocytes as described by Sakuraba et al. (1990), and cDNA as described by Yoshida et al. (1991). Exon 3 (Nanba & Suzuki, personal communication) or a cDNA fragment corresponding to nucleotide #280-430 (Oshima et al. 1988) was amplified by polymerase chain reaction (PCR) with an upstream primer 5'-GTATGTGCCCTGGAACCTTCATGAGCC-3' and a downstream primer 5'-CAATTCCCACTGCTGCACAGATGTAGGG-3' under the following conditions: denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 65°C for 2 min and extension at 72°C for 1 min. Exon 9 with normal sequence (Nanba & Suzuki, personal communication) was amplified with an upstream primer 5'-GTACATGTTATAGGTGG-3' and a downstream primer 5'-ACTTACCATTCCAAT-3', and exon 9 with mutation J (Yoshida et al. 1991) with the same upstream primer and another downstream primer 5'-ACTTACCATTCCAAC-3' under the following conditions: denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 40°C for 2 min, and extension at 72°C for 1 min.

Cloning and sequencing of PCR products

The amplified fragments were subcloned into bacteriophage M13mp19 and sequenced with the 7-DEAZA sequencing kit (Takara Biochemicals, Tokyo, Japan).

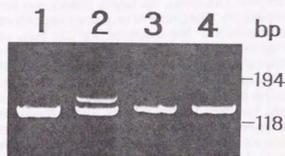


Fig. 1. PCR amplification of genomic DNA and cDNA of β -galactosidase. Exon 3 in genomic DNA or a cDNA fragment corresponding to exon 3 was amplified by PCR and electrophoresed in 4% agarose gel. Lane 1: normal genomic exon 3, lane 2: mutant genomic exon 3 from the patient, lane 3: normal cDNA fragment, lane 4: mutant cDNA fragment from the patient.

Results**Mutation**

An additional upper band was found in this case, together with a normal band, by genomic DNA amplification (Fig. 1, lane 2). Subsequent sequence analysis revealed that the upper band contained an internal tandem duplication of 23 nt within exon 3 (Fig. 2) and the lower band contained mutation J, as described previously (Yoshida et al. 1991). The mutation newly found in this study produced a premature stop codon after the translation of 36 amino acids. The normal gene had two homologous 11-nt sequences in this region, the first sequence overriding the 5' end of the duplication and the second being located at the 3' end of the duplication (Fig. 3). In addition, a palindrome se-

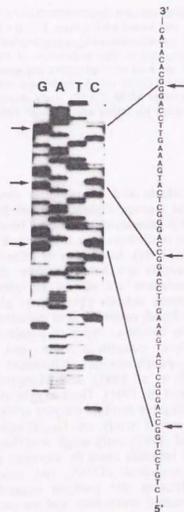


Fig. 2. Nucleotide sequence of a part of exon 3 in the mutant β -galactosidase gene, showing the presence of a 23-nt duplication. Arrows mark duplication junctions.

quence overriding the 3' end of the duplication was observed.

Only a trace amount of this abnormally large fragment was observed by amplification of reverse-transcribed cDNA in the patient (Fig. 1, lane 4).

Family study

The genomic DNA amplification of exon 3 showed the upper band in the father of the patient, but not in the mother (Fig. 4-II). A 47-nt fragment comprising the exon 9 sequence with mutation J was amplified only in the patient and his mother, but not in his father, and the fragment without mutation J was amplified in all subjects examined (Fig. 4-III). These data indicated that the patient was a compound heterozygote of the duplication within exon 3 and the 981A→G substitution in exon 9. The former was transmitted from the father and the latter from the mother.

Discussion

A tandem duplication is a rare type of gene mutation in human genetic disease. A case of spondyloepiphyseal dysplasia was reported with a 30-nt tandem duplication within a type II collagen gene exon (Tiller et al. 1990), and an unequal crossover was suggested between the related homologous sequences. In our present study, two homologous sequences in normal exon 3 were found to be associated with a palindrome sequence in the region of duplication. The duplication started from the middle of the upstream homologous sequence to the end of the downstream sequence. It is highly probable that an unequal crossover had occurred at this location which was transmitted from the father of the patient.

Recently specific and common mutations have been identified within the β -galactosidase gene in late infantile/juvenile and adult/chronic G_{M1} -gangliosidosis (Nishimoto et al. 1991, Yoshida et al. 1991) and Morquio B disease (Oshima et al. 1991). On the other hand, the mutations were heterogen-

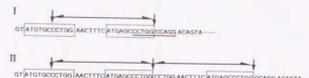


Fig. 3. Comparison of the exon 3 sequences between normal and mutant β -galactosidase genes. I: normal exon 3 sequence at the region of duplication, II: mutant sequence with 23-nt duplication. The homologous sequences are boxed and the palindrome sequence is underlined. The duplication sequence in the mutant is pointed with arrows.

eous in infantile G_{M1} -gangliosidosis. The following mutations have been found in this clinical form (Nishimoto et al. 1991, Oshima et al. 1991, Yoshida et al. 1991): four single-base substitutions with normal mRNA in size and amount, one single-base substitution with a reduction of mRNA, tandem duplication of exon 11-12 with large mRNA, and tandem duplication within exon 3 with a reduction of mRNA (this case).

Only single mutations were identified in some patients by sequence analysis of reverse-transcribed cDNA in our previous study, but, in fact, the presence of other mutations was suggested by genomic DNA analysis in two of them (Yoshida et al. 1991; cases I and 5). For gene mutation analysis using cDNA from the proband, the possibility should always be considered of a second mutation, which

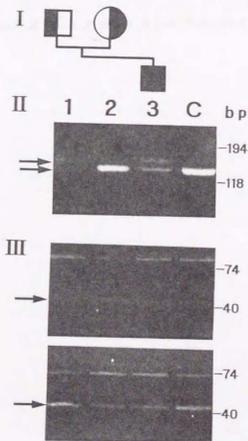


Fig. 4. Family study on two different mutations of the patient. I: the pedigree. II: PCR amplification of β -galactosidase gene exon 3. III: PCR amplification of β -galactosidase gene exon 9. A 47-nt fragment comprising the exon, with mutation J (upper gel) or without the mutation (lower gel), was amplified by PCR and electrophoresed in 8% agarose gel. Lane 1: father, lane 2: mother, lane 3: patient, lane C: normal control.

might be overlooked because of a reduction of the amount of mRNA. Genomic analysis of family members is useful to determine the genotype of the proband, as shown in this study.

PCR amplification of genomic DNA is rapid and easy to carry out, for the analysis of mutant sequences in any laboratory. The method described here can be used for diagnostic screening of carriers of infantile G_{M1} -gangliosidosis by multiple PCR amplification with mixed primers for the various mutations which have been identified so far.

Acknowledgements

Information about the intron-exon organization of the human β -galactosidase gene was kindly provided by Drs. E. Nanba and K. Suzuki (University of North Carolina, Chapel Hill, NC, USA). This work was supported by grants from the Ministry of Education, Science and Culture, and from the Ministry of Health and Welfare of Japan.

References

Nishimoto J, Nanba E, Inui K, Okada S, Suzuki K. G_{M1} -

gangliosidosis (genetic β -galactosidase deficiency): identification of four mutations in different clinical phenotypes among Japanese patients. *Am J Hum Genet* 1991; in press.

O'Brien JS. β -Galactosidase deficiency (G_{M1} gangliosidosis, galactosialidosis, and Morquio syndrome type B), ganglioside sialidase deficiency (mucopolidosis IV). In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D eds. *The metabolic basis of inherited disease*, 6th ed. New York: McGraw-Hill, 1989: 1797-1806.

Oshima A, Tsuji A, Nagao Y, Sakuraba H, Suzuki Y. Cloning, sequencing, and expression of cDNA for human β -galactosidase. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; 157: 238-244.

Oshima A, Yoshida K, Shimamoto M, Fukuhara Y, Sakuraba H, Suzuki Y. Human β -galactosidase gene mutations in Morquio B disease. *Am J Hum Genet* 1991; in press.

Sakuraba H, Oshima A, Fukuhara Y, Shimamoto M, Nagao Y, Bishop DF, Desnick RJ, Suzuki Y. Identification of point mutations in the α -galactosidase A gene in clinical and atypical hemizygotes with Fabry disease. *Am J Hum Genet* 1990; 47: 784-789.

Tiller GE, Rimoin DL, Murray LW, Daniel HC. Tandem duplication of a type II collagen gene (COL2A1) exon in an individual with spondyloepiphyseal dysplasia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 3889-3893.

Yoshida K, Oshima A, Shimamoto M, Fukuhara Y, Sakuraba H, Suzuki Y. Human β -galactosidase gene mutations in G_{M1} -gangliosidosis: a common mutation among Japanese adult/chronic cases. *Am J Hum Genet* 1991; in press.

Human β -Galactosidase Gene Mutations in Morquio B Disease

参考文献 5

Abstracts and references section on the right page, including the title 'Human β -Galactosidase Gene Mutations in Morquio B Disease' and various numbered entries.

Human β -Galactosidase Gene Mutations in Morquio B Disease

Akihiro Oshima, Kunihiro Yoshida, Michie Shimmoto, Yukiko Fukuhara, Hitoshi Sakuraba, and Yoshiyuki Suzuki

Department of Clinical Genetics, Tokyo Metropolitan Institute of Medicine Science, Tokyo

Summary

Three different β -galactosidase gene mutations—a $^{273}\text{Trp}\rightarrow\text{Leu}$ (mutation F) in both families, $^{482}\text{Arg}\rightarrow\text{His}$ (mutation G) in one family, and $^{589}\text{Trp}\rightarrow\text{Cys}$ (mutation H) in the other family—were identified in three patients with Morquio B disease who were from two unrelated families. Restriction-site analysis using *SnaI*, *NspI*(7524) or *RsaI* confirmed these mutations. In human fibroblasts, mutation F expressed as much as 8% of the normal allele's enzyme activity, but the other mutations expressed no detectable enzyme activity. We conclude that the unique clinical manifestations are specifically associated with mutation F, a common two-base substitution, in this disease.

Introduction

Genetic deficiency of human acid β -galactosidase (E.C.3.2.1.23) causes G_{MI} gangliosidosis and Morquio B disease. The latter has been classified as one type of genetic mucopolysaccharidosis, with progressive and generalized skeletal dysplasia and without neurological involvement—in contrast to G_{M1} gangliosidosis, which is a severe neurosomatic disease (O'Brien 1989). We cloned recently a full-length cDNA for human β -galactosidase (Oshima et al. 1988) and reported gene mutations in G_{M1} gangliosidosis (Yoshida et al. 1991). Further molecular analysis revealed three different mutations in three Morquio B patients.

Material and Methods

The fibroblast strains from three Morquio B disease patients—case 1 (family 1 proband; GM01602), case 2 (family 1 affected sister; GM02455), and case 3 (family 2 proband; GM03251)—were purchased

from NIGMS Human Genetic Mutant Cell Repository (Camden, NJ).

Details of the procedures of the mutation analysis and of the transient-expression experiment have been described in previous reports (Sakuraba et al. 1990; Yoshida et al. 1991). Three DNA constructs for gene expression—pCAGGS(GPF), pCAGGS(GPG), and pCAGGS(GPH)—were prepared from mutant cDNAs F, G, and H, respectively.

Results and Discussion

Northern blotting showed a single band of apparently normal size (3.0 kb) and of either normal or high intensity in all patients (data not shown). Direct sequence analysis of amplified cDNA from the patients revealed three different mutations— $^{851-852}\text{TG}\rightarrow\text{CT}$ ($^{273}\text{Trp}\rightarrow\text{Leu}$; mutation F) in all three cases, $^{1479}\text{G}\rightarrow\text{A}$ ($^{482}\text{Arg}\rightarrow\text{His}$; mutation G) in cases 1 and 2, and $^{1561}\text{G}\rightarrow\text{T}$ ($^{589}\text{Trp}\rightarrow\text{Cys}$; mutation H) in case 3. It is noteworthy that mutation F contained a two-base substitution. It may have been produced either by a coincidental combination of two single-base substitutions or by a single-base substitution associated with a pre-existing neutral polymorphism.

The three mutation alleles of Morquio B disease were detected also by restriction-site analysis using specific restriction enzymes (fig. 1). Mutation F did not

Received April 15, 1991; revision received June 27, 1991.
Address for correspondence and reprints: Akihiro Oshima, M.D., Department of Clinical Genetics, Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, 3-18-22 Honkomagome, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan.
© 1991 by The American Society of Human Genetics. All rights reserved. 0002-9297/91/4905-0020\$02.00

Table 1

 β -Galactosidase Gene Mutation in G_{M1} -Gangliosidosis and Morquio B Disease

A. MUTANT ALLELES		
Nomenclature*	Mutation	
A.....	¹¹ Ile→Thr	
B (1).....	²⁰¹ Arg→Cys	
C.....	⁴³⁷ Arg→Gln	
D.....	Duplication (nucleotides 1103-1267 ^b)	
E.....	¹⁹¹ Leu→Pro	
F.....	²⁷³ Trp→Leu	
G.....	⁴⁸² Arg→His	
H.....	³⁸⁹ Trp→Cys	
I.....	¹²¹ Gly→Arg	
J.....	³¹⁶ Tyr→Cys	
K.....	⁴⁹⁸ Gly→Cys	
L.....	Duplication (nucleotides 288-310 ^b)	
P (I-1).....	⁴⁹ Arg→Cys	
Q (I-2).....	⁴⁵⁷ Arg→Ter	
B. GENOTYPES		
Phenotype and Genotype ^c	No. of Cases	Source(s)
G_{M1}-gangliosidosis:		
Infantile:		
D/D?	1	Yoshida et al. 1991 (case 4)
I/K	1	Yoshida et al. 1991 (case 2)
I/L	1	Yoshida et al. 1991 (case 3)
P/?	1	Yoshida et al. 1991 (case 1)
Q/Q	1	Nishimoto et al. 1991 (case 1)
Q/Q	1	Nishimoto et al. 1991 (case 2)
Late infantile/juvenile:		
B/B	1	Nishimoto et al. 1991 (case 5)
B/?	4	Nishimoto et al. 1991 (cases 3, 4, and 6); and Yoshida et al. 1991 (case 5)
Adult/chronic:		
A/A	11	Nishimoto et al. 1991 (cases 7-12); and Yoshida et al. 1991 (cases 8-11)
A/C	1	Yoshida et al. 1991 (case 7)
Morquio B disease:		
F/G	2	Oshima et al. (cases 1 and 2)
F/H	1	Oshima et al. (case 3)

* Nomenclature of Nishimoto et al. (1991) is given in parentheses.

^b Source: Oshima et al. (1988).

^c The common mutation for each phenotype is underlined.

create any new restriction site, but the introduction of an additional substitution ⁴⁸⁷T→A induced by an appropriate upstream primer created an *Stu*I site; the 147-bp PCR product was digested to produce a 121-bp fragment. Mutation G created an *Nsp*(7524)I site, and the 101-bp PCR product was digested to a 61-bp and 40-bp fragments. Mutation H created an *Rsa*I site, and the 103-bp PCR product was digested to 57-bp and 46-bp fragments. A partial digestion was observed for cases 1 and 2 in *Stu*I- and *Nsp*(7524)I-site

analyses and for case 3 in *Stu*I- and *Rsa*I-site analyses. The PCR products from the cDNA without these mutations were not digested by any of the enzymes used in the present study. We concluded that all cases were compound heterozygotes—either genotype F/G (cases 1 and 2) or genotype F/H (case 3).

We have not found any polymorphism in the β -galactosidase cDNA in the Japanese population, but the base sequence designated as polymorphism E [¹⁹¹Leu→Pro] was found in two cases from family 1.

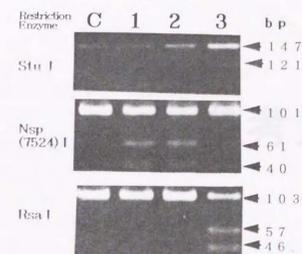
 β -Galactosidase Gene Mutations in Morquio B

Figure 1 Restriction-site analysis of PCR-amplified β -galactosidase cDNA. Three amplified cDNA fragments—nucleotides 824-960, 1421-1521, and 1505-1607—were amplified and subjected to restriction-site analysis using *Stu*I (top gel), *Nsp*(7524)I (middle gel) and *Rsa*I (bottom gel), respectively. The first fragment contained an additional base substitution, ⁴⁸⁷T→A, which created an *Stu*I site in the presence of mutation F (nucleotides 851-852) (see text). The fragments with mutation G (nucleotide 1479) or mutation H (nucleotide 1561) were digested by *Nsp*(7524)I or *Rsa*I, respectively; normal cDNA fragments without these mutations were not digested by any of the three enzymes. Electrophoresis was performed in 3% agarose gel. Lane C, Control fibroblasts. Lanes 1-3, Cases 1-3.

In retrospect it was seen that this substitution was in fact observed also in the λ gt11 cDNA library from human placenta of non-Japanese origin (Oshima et al. 1988) and is considered to be a neutral polymorphism.

The pathogenesis of different phenotypic expressions is not clear in human β -galactosidase deficiency. Including those in the present report (table 1), 14 different β -galactosidase gene mutations have been observed, and some correlations with clinical phenotypes are suggested. Our previous gene-expression study detected no enzyme activity toward a fluorogenic substrate (4-methylumbelliferyl β -galactoside) in mutant β -galactosidase genes in G_{M1} -gangliosidosis, except for two mutant alleles—mutations A (¹¹Ile→Thr) and B (²⁰¹Arg→Cys), for adult and juvenile forms, respectively (Yoshida et al. 1991).

In the present study, the common mutant F allele in Morquio B disease was found to express a low but

measurable enzyme activity (8% of control value), whereas the other two mutations expressed no detectable enzyme activity. We tentatively conclude that the three mutant β -galactosidase genes expressing detectable enzyme activity may be closely related to the pathogenesis of late-onset G_{M1} -gangliosidosis (mutations A and B) or Morquio B disease (mutation F). Further characterization of mutant gene products—e.g., in terms substrate specificity, enzyme kinetic studies, and intracellular turnover of the enzyme protein—is expected to reveal further the phenotype-genotype relationship in human β -galactosidase deficiency.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the Ministry of Education, Science and Culture and by grants from the Ministry of Health and Welfare of Japan.

References

- Nishimoto J, Nanba E, Inui K, Okada S, Suzuki K (1991) G_{M1} -gangliosidosis (genetic β -galactosidase deficiency): Identification of four mutations in different clinical phenotypes among Japanese patients. *Am J Hum Genet* 49:000-000
- O'Brien JS (1989) β -galactosidase deficiency (G_{M1} gangliosidosis, galactosialidosis, and Morquio syndrome type B): ganglioside sialidase deficiency (mucopolidosis IV). In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds) *The metabolic basis of inherited disease*, 6th ed. McGraw-Hill, New York, pp 1797-1806
- Oshima A, Tsuji A, Nagao Y, Sakuraba H, Suzuki Y (1988) Cloning, sequencing, and expression of cDNA for human β -galactosidase. *Biochem Biophys Res Commun* 157: 238-244
- Sakuraba H, Oshima A, Fukuhara Y, Shimamoto M, Nagao Y, Bishop DF, Desnick RJ, et al (1990) Identification of point mutations in the α -galactosidase A gene in classical and atypical hemizygotes with Fabry disease. *Am J Hum Genet* 47:784-789
- Yoshida K, Oshima A, Shimamoto M, Fukuhara Y, Sakuraba H, Yanagisawa N, Suzuki Y (1991) Human β -galactosidase gene mutations in G_{M1} -gangliosidosis: a common mutation among Japanese adult/chronic cases. *Am J Hum Genet* 49:435-442

Table 1

Genetic control of the inheritance of the ability to synthesize... (text continues)

Table 2

Table with 5 columns (1-5) and 3 rows of data. The first row contains numbers 1, 2, 3, 4, 5. The second and third rows contain various symbols and numbers.

Genetic control of the inheritance of the ability to synthesize... (text continues)

Genetic control of the inheritance of the ability to synthesize... (text continues)

Genetic control of the inheritance of the ability to synthesize... (text continues)

Genetic control of the inheritance of the ability to synthesize... (text continues)

Genetic control of the inheritance of the ability to synthesize... (text continues)

Genetic control of the inheritance of the ability to synthesize... (text continues)

Genetic control of the inheritance of the ability to synthesize... (text continues)

Genetic control of the inheritance of the ability to synthesize... (text continues)

Genetic control of the inheritance of the ability to synthesize... (text continues)

Genetic control of the inheritance of the ability to synthesize... (text continues)

Genetic control of the inheritance of the ability to synthesize... (text continues)

Intracellular processing of... (text continues)

参考文献 6

Genetic control of the inheritance of the ability to synthesize... (text continues)

Abstract: This paper reports on the results of... (text continues)

This paper has been found to contain... (text continues)

Genetic control of the inheritance of the ability to synthesize... (text continues)

Introduction

Genetic control of the inheritance of the ability to synthesize... (text continues)

Materials and Methods

Genetic control of the inheritance of the ability to synthesize... (text continues)

Intracellular processing and maturation of mutant gene products in hereditary β -galactosidase deficiency (β -galactosidosis)

Akihiro Oshima¹, Kunihiro Yoshida², Kohji Itoh¹, Ryoichi Kase¹, Hitoshi Sakuraba¹, Yoshiyuki Suzuki¹

¹Department of Clinical Genetics, The Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, 3-18-22 Honkomagome, Bunkyo-ku, Tokyo, 113 Japan

²Department of Internal Medicine (Neurology), Shinshu University School of Medicine, Asahi, Matsumoto, Japan

Received: 17 March 1993 / Revised: 7 July 1993

Abstract. Heterogeneous patterns of biosynthesis, post-translational processing, and degradation were demonstrated for mutant enzymes in three clinical forms of β -galactosidase deficiency (β -galactosidosis): juvenile G_{M1} -gangliosidosis, adult G_{M1} -gangliosidosis, and Morquio B disease. The precursor of the mutant enzyme in adult G_{M1} -gangliosidosis was not phosphorylated, and only a small portion of the gene product reached the lysosomes. The enzyme in Morquio B disease was normally processed and transported to lysosomes, but its catalytic activity was low. A common gene mutation in juvenile G_{M1} -gangliosidosis (R201C) produced an enzyme protein that did not aggregate with protective protein in the lysosome, and was rapidly degraded by thiol proteases. This abnormal turnover was similar to that for the normal but dissociated β -galactosidase in galactosialidosis. Protease inhibitors restored the enzyme activity in fibroblasts of this clinical form. A possible therapeutic approach is discussed for this specific type of enzyme deficiency.

Introduction

Allelic mutations of the human lysosomal β -galactosidase gene result in heterogeneous phenotypic expression. They are classified mainly into four major clinical groups, based on the age of onset and distribution of pathological lesions: three clinical forms of G_{M1} -gangliosidosis (infantile, late infantile/juvenile and adult/chronic) with central nervous system lesions, and Morquio B disease with no central nervous system lesions (O'Brien 1989). We recently proposed a term " β -galactosidosis" for this clinical group (Suzuki and Oshima 1993). There is another clinically related disease (galactosialidosis) characterized by accelerated breakdown of the β -galactosidase molecule caused by mutations in a gene coding for another multifunctional protein (protective protein/carboxypeptidase) (Shimamoto et al. 1993; Suzuki et al. 1985; Takano et

al. 1991). This protein has been found to protect the β -galactosidase molecule against proteolytic degradation (D'Azzo et al. 1982).

Gene mutations are heterogeneous in infantile G_{M1} -gangliosidosis, and result in an almost complete deficiency of β -galactosidase (Yoshida et al. 1991). On the other hand, common mutations have been found in the other types of β -galactosidase deficiency (Nishimoto et al. 1991; Oshima et al. 1991; Yoshida et al. 1991; 1992); E51T for adult G_{M1} -gangliosidosis, R201C for juvenile G_{M1} -gangliosidosis, and W273L for Morquio B disease. The residual enzyme activity in each of these clinically mild or atypical forms is significantly higher than that in early onset G_{M1} -gangliosidosis. In this study, we have analyzed intracellular turnover of mutant proteins transiently expressed in human fibroblasts. Among them, a gene product of a common mutation for Japanese patients with juvenile G_{M1} -gangliosidosis (R201C) has been found to be abnormally degraded because of a defect of the molecular interaction with protective protein/carboxypeptidase.

Materials and methods

Materials

Fibroblasts with mutations causing the following diseases were used: infantile G_{M1} -gangliosidosis (transformed cell line ASV G_{M1} -4) (Yoshida et al. 1991); normal (GM05381) and Morquio B disease (Morquio B disease (GM03251) (Oshima et al. 1991), purchased from NIGMS Human Genetic Mutant Cell Repository (Camden, NJ, USA); juvenile G_{M1} -gangliosidosis (Yoshida et al. 1991); adult G_{M1} -gangliosidosis (Suzuki et al. 1977); and galactosialidosis (Takano et al. 1991). Clinical and genetic data of the patients are summarized in Table 1. Juvenile G_{M1} -gangliosidosis and Morquio B disease patients in this study were genotypically compound heterozygotes, a second mutation (not identified in the former) was present in each cell strain, together with the common mutation described above. The residual enzyme activity was expressed almost exclusively by the common mutation in them. The second mutation (allele "c" or R482H in Table 1) did not express any detectable mRNA or enzyme activity (Oshima et al. 1991).

Correspondence to: A. Oshima

Table 1. Clinical and genetic data for the fibroblasts from patients with β -galactosidase deficiency

Case (phenotype)	Ethnic origin	Sex	Age at diagnosis	Mutant enzyme	Genotype ^a	Reference (case no.)
Normal	Black	M	5 years		N/N	5 (GM05381)
Juvenile G_{M1}	Japanese	M	2 years	β -Galactosidase	R201C/-	3 (no. 5; FB394)
Adult G_{M1}	Japanese	M	29 years	β -Galactosidase	I51T/I51T	7 (no. 5)
Morquio B	Caucasian	F	4 years	β -Galactosidase	W273L/R482H	5 (GM03251)
Galactosialidosis	Japanese	M	28 years	Protective protein/carboxypeptidase	SpDEx7/SpDEx7	8 (no. 11)

^a G_{M1} , G_{M1} -gangliosidosis; N, normal; R201C, common mutation for juvenile G_{M1} -gangliosidosis (²⁰¹Arg \rightarrow Cys) (3, 4); I51T, common mutation for adult G_{M1} -gangliosidosis (⁵¹Le \rightarrow Thr) (3); W273L, common mutation for Morquio B disease (²⁷³Tyr \rightarrow Leu) (5); R482H, a mutation found in Morquio B disease (⁴⁸²Arg \rightarrow His) (5, 6); SpDEx7, common mutation among Japanese patients with adult galactosialidosis (6, 10); -, mutant allele with no detectable expression of mRNA or enzyme activity (mutation site not identified).

Antipain, chymostatin, leupeptin, and pepstatin were purchased from Peptide Institute (Osaka, Japan). E-64 was provided by Dr. E. Hanada (Central Research Institute, Taisho Pharmaceutical, Omiya, Japan). A suicide substrate β -D-galactopyranosyl methyl-p-nitrophenyltriazene (β -Gal-MNT) was supplied by Dr. K. Inui (Department of Pediatrics, Osaka University, Osaka, Japan).

Cell culture and enzyme assay

The cells were cultured in F-10 medium with 10% fetal calf serum (FCS), unless otherwise indicated. β -Galactosidase and neuraminidase were assayed as described previously (Sakuraba et al. 1982). Intracellular enzyme activity was assayed up to 5 days after inactivation with β -Gal-MNT as described by Van Diggelen et al. (1981). Protein concentration was determined by the method of Bradford (1976).

Transient expression of β -galactosidase

The ASV G_{M1} -4 cells were transfected by means of the calcium phosphate method followed by glycerol treatment, as described previously (Yoshida et al. 1991). Normal β -galactosidase cDNA, mutant β -galactosidase cDNAs for three mild or atypical clinical phenotypes (I51T, R201C and W273L), and normal protective protein cDNA were expressed, using an expression vector pCAGGS (Oshima et al. 1991; Shimoto et al. 1990; Yoshida et al. 1991).

Labeling and immunoprecipitation of β -galactosidase expressed from mutant genes

For the detection of the intracellular enzyme, the cells were incubated for 48 h after transfection, and then labeled for 20 h with L-[4,5-³H]leucine (0.1 mCi per dish, 70 Ci/mmol; Amersham, Buckinghamshire, UK) in leucine-free Eagle's MEM with 5% dialyzed FCS. For the detection of phosphorylated precursor, the cells were labeled for 20 h with [³²P]phosphate (0.1 mCi per dish, 8500 Ci/mmol; New England Nuclear Research Product, Boston, MA, USA) in phosphate-free MEM, containing 10 mM NH₄Cl, 10 μ g E-64, and 5% dialyzed FCS. The cell extract was concentrated by 60% ammonium sulfate precipitation (Hooeveen et al. 1984). The enzyme protein was immunoprecipitated with rabbit antiserum against β -galactosidase/protective protein complex (Oshima et al. 1988). The precipitate was subjected to sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), and proteins were visualized by fluorography.

Percoll density gradient centrifugation of β -galactosidase

Confluent cells on a 100-mm dish were harvested by trypsinization and suspended in 400 μ l 0.25 M sucrose. They were kept at 250 psi for 10 min in a cell cylinder of a yeda press (Linca Lamou Instru-

mentation, Tel Aviv, Israel), and then the pressure was abruptly released to disrupt cells. The postnuclear fraction was loaded on 5 ml 40% Percoll in 0.25 M sucrose. β -Galactosidase activity was assayed for each fraction, after centrifugation at 22000 rpm for 25 min (Beckman VTI-80 rotor) and fractionation.

Sucrose density gradient centrifugation of β -galactosidase

Sucrose density gradient centrifugation was performed as described by Martin and Ames (1961). Confluent fibroblasts on a

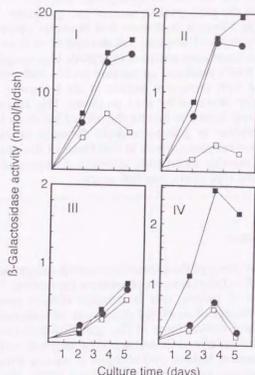


Fig. 1. Effects of protective protein or E-64 on mutant β -galactosidase. ASV G_{M1} -4 cells on a 60-mm plate were transfected with β -galactosidase cDNA in pCAGGS. **I** Normal; **II** mutation W273L in the Morquio B patient; **III** mutation I51T in the adult G_{M1} -gangliosidosis patient; **IV** mutation R201C in the juvenile G_{M1} -gangliosidosis patient. β -Galactosidase was assayed at 2, 3, 5 and 5 days posttransfection days. \square Transfection with β -galactosidase cDNA; \blacksquare E-64 (10 μ l) added to the culture medium after transfection; \bullet co-transfection with 20 μ g protective protein cDNA in pCAGGS. Note that the ordinate for panel I is different from those in the others.

100-mm dish were harvested and lysed by suspension in 100 μ l 20 mM sodium phosphate pH 6.0, containing 100 mM NaCl and 0.2% Triton X-100. The lysate was loaded on 5 ml of a linear gradient of 20%–40% sucrose in the same buffer, and centrifuged at 40000 rpm for 15 h at 4°C with a Beckman SW-50 rotor.

Results

Transient expression of normal and mutant genes

Transient expression of the normal β -galactosidase gene resulted in an increase of the enzyme activity for 3 days after transfection, and then the activity started decreasing

(Fig. 1–I); addition of E-64 or co-transfection with protective protein cDNA enhanced the increase 2- to 3-fold, and there was no decrease for 5 days. The almost identical pattern was observed for the juvenile G_{M1} -gangliosidosis or Morquio B gene mutation (Fig. 1–IV, 1–II), but the enzyme activity was not affected by co-transfection with protective protein cDNA in juvenile G_{M1} -gangliosidosis. In the case of adult G_{M1} -gangliosidosis, the gene expression increased gradually for 5 days; neither the addition of E-64 nor co-transfection with protective protein cDNA changed the activity (Fig. 1–III). The mutation R482H did not express any detectable enzyme activity (data not shown).

Immunoprecipitation of mutant proteins

Normal β -galactosidase cDNA expressed 84-kDa and 88-kDa precursors with a trace of 64-kDa mature enzyme (Fig. 2). The amount of the mature enzyme increased by co-transfection with protective protein cDNA, or by addition of E-64 in the culture medium. The same pattern was also observed for the Morquio B gene. This increase correlated with a decreased in the amount of precursor in the normal and Morquio B cells with the protective protein co-expression. The adult G_{M1} -gangliosidosis gene expressed both precursors, but the mature enzyme was barely visualized; this was also seen in the presence of expressed protective protein or E-64. The juvenile G_{M1} -gangliosidosis gene expressed only small amounts of precursors. Additional expression of protective protein did not modify the pattern, but E-64 increased the precursors remarkably and the mature enzymes to some extent. β -Galactosidase precursors were phosphorylated and secreted into the culture medium in the presence of NH₄Cl in all gene products, except for the product in adult G_{M1} -gangliosidosis (data not shown).

β -Galactosidase and neuraminidase activities in fibroblasts

β -Galactosidase activity was low in all fibroblast strains used in this study (Table 2). Neuraminidase activity was almost completely deficient only in galactosialidosis cells. Secretion of β -galactosidase activity increased in the presence of NH₄Cl for juvenile G_{M1} -gangliosidosis and galactosialidosis cells and for normal cells, but not for Morquio B or adult G_{M1} -gangliosidosis cells.

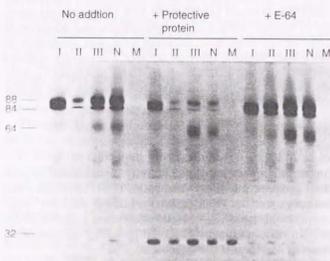


Fig. 2. Immunoprecipitation of gene product expressed in ASV G_{M1} -4 cells after transfection with 20 μ g cDNA in pCAGGS. Two days after transfection, the cells were labeled with [³H]leucine for 20 h. β -Galactosidase was immunoprecipitated with rabbit antiserum against β -galactosidase/protective protein complex, and SDS-PAGE was performed. The cells were transfected with β -galactosidase cDNA, with or without co-transfection with protective protein cDNA, or addition of E-64 (10 μ g/ml) in the culture medium. **Lane I**, Mutation I51T in the adult G_{M1} -gangliosidosis patient; **Lane II**, mutation R201C in the juvenile G_{M1} -gangliosidosis patient; **Lane III**, mutation W273L in the Morquio B patient; **Lane M**, normal; **Lane M**, mock transfection (expression vector only). β -Galactosidase precursors appeared as 88- and 84-kDa bands and the mature enzyme as a 64-kDa band. Protective protein was detected at 32 kDa when its cDNA was transfected with β -galactosidase cDNA.

Table 2. Enzyme activities in cultured fibroblasts and culture medium. The enzyme activity in the culture medium was assayed after 20-h incubation with or without addition of 20 mM NH₄Cl. The enzyme unit is given as nmol/300 μ l per 20 h (culture medium)

Phenotype	Fibroblasts		Culture medium	
	β -Galactosidase	Neuraminidase	β -Galactosidase [-NH ₄ Cl]	β -Galactosidase [+NH ₄ Cl]
Normal	150.0	60.5	14.6	63.7
Morquio B	7.3	66.9	2.6	4.3
Adult G_{M1}	18.1	63.9	1.4	1.6
Juvenile G_{M1}	4.6	91.3	2.1	12.2
Galactosialidosis	2.2	2.2	9.1	84.2
G_{M1} - G_{M1} -gangliosidosis				

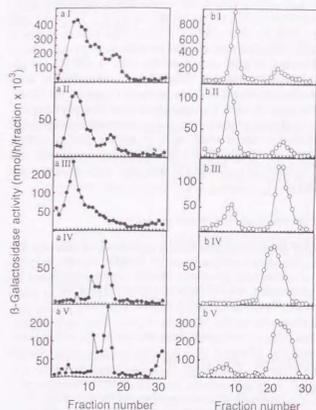


Fig. 3. Percoll density-gradient centrifugation (a: left panel) and sucrose density-gradient centrifugation (b: right panel) in normal and mutant fibroblasts. The initial 30 fractions (180 μ l each) were collected for β -galactosidase assays (30 μ l). I, Normal; II, Morquio B disease (genotype: W273L/R482H); III, adult G_{M1} -gangliosidosis (genotype: I51T/I51T); IV, juvenile G_{M1} -gangliosidosis (R201C/T); V, galactosialidosis (genotype: SpDEX7/SpDEX7).

Subcellular distribution and intracellular aggregation of β -galactosidase

In normal fibroblasts, the enzyme activity was distributed mainly in the heavy lysosomal fraction and partly in the light lysosomal fraction (Fig. 3a). They corresponded to the peaks of the high molecular weight multimer and the low molecular weight monomer, respectively (b). On the other hand, the enzyme activity was present mainly in the light lysosomal fraction as a low molecular weight monomer in galactosialidosis fibroblasts (aV, bV).

Table 3. Effect of protease inhibitors on β -galactosidase activity in fibroblasts. Fibroblasts were cultured for 3 days in the medium with the protease inhibitor: 10 μ g/ml leupeptin, 10 μ g/ml E-64, 10 μ g/ml chymostatin, 50 μ g/ml antipain, or 10 μ g/ml pepstatin. Relative β -galactosidase activities over those in the cells without inhibitors are shown

Phenotype	None	Leupeptin	E-64	Chymostatin	Antipain	Pepstatin
Normal	1.0	1.3	1.2	1.0	0.7	0.6
Morquio B	1.0	1.7	1.6	1.3	1.6	0.7
Adult G_{M1}	1.0	1.3	1.2	1.0	1.1	1.2
Juvenile G_{M1}	1.0	3.8	3.3	3.3	3.8	0.9
Galactosialidosis	1.0	3.9	3.7	3.4	4.2	1.1
G_{M1} , G_{M2} -gangliosidosis						

Morquio B fibroblasts expressing the common mutation W273L showed the same pattern as normal fibroblasts (aII, bII), and juvenile G_{M1} -gangliosidosis cells showed the pattern for galactosialidosis cells (aV, bV). Almost all enzyme activity was in the heavy lysosomal fraction in adult G_{M1} -gangliosidosis (aIII), but 80% of the activity was present as the low molecular weight monomer (bII).

Restoration of β -galactosidase activity after inactivation with β -Gal-MNT

The recovery of intracellular β -galactosidase activity occurred up to 5 days following inactivation with β -Gal-MNT for normal and mutant fibroblasts. The enzyme activity was restored gradually to 30% of its original activity in normal, adult G_{M1} -gangliosidosis, and Morquio B cells before treatment; turnover time was estimated as more than 10 days. Enzyme activity was rapidly restored within 2 days in galactosialidosis and juvenile G_{M1} -gangliosidosis cells, with an estimated turnover time of less than 1 day (data not shown).

Restoration of β -galactosidase activity by protease inhibitors

Intracellular β -galactosidase activity was restored by four thiol protease inhibitors (leupeptin, E-64, chymostatin and antipain) but not by a carboxypeptidase inhibitor (pepstatin) in juvenile G_{M1} -gangliosidosis and galactosialidosis. No restoration was observed in adult G_{M1} -gangliosidosis or Morquio B cells (Table 3).

Discussion

The pathogenesis of heterogeneous clinical manifestations in hereditary β -galactosidosis is not known at present. The severity, clinical course, and tissue distribution of pathological lesions are determined by a common mutation for each clinical phenotype in this study. We have therefore examined the molecular basis of variable phenotypic expressions in patients with these β -galactosidase deficiency subtypes.

Among the mutant gene products in this study, the enzyme expressed by one of the common mutations showed an abnormal molecular turnover in fibroblasts. As shown by transient expression study, monomeric β -galactosidase, which was mainly localized in the light lysosomal fraction, was rapidly degraded in juvenile G_{M1} -ganglio-

sis and galactosialidosis patients. The enzyme did not survive to reach heavy lysosomes as an aggregated form with other proteins (protective protein and neuraminidase). From the data in this study, we conclude that the enzyme became unstable because of an aggregation defect caused by the β -galactosidase gene mutation R201C in the clinical phenotype of juvenile G_{M1} -gangliosidosis; this unstable enzyme, like the normal enzyme, is not associated with a mutant protective protein/carboxypeptidase expressed by the mutation SpDEX7 (Suzuki et al. 1977, 1985; Takano et al. 1991).

β -Galactosidase activity was restored by thiol protease in cells showing galactosialidosis and juvenile G_{M1} -gangliosidosis. The correction is limited only to β -galactosidase activity for galactosialidosis, and neuraminidase activity is not restored (Suzuki et al. 1981). A full metabolic correction is not expected by thiol protease inhibitors in galactosialidosis, but restoration of β -galactosidase will correct the metabolic defect in juvenile G_{M1} -gangliosidosis patients with the specific mutation R201C. Enzyme therapy of this nature (enzyme activation) with any of the protease inhibitors, if technically possible, may be considered for this type of the disease.

The adult G_{M1} -gangliosidosis gene 115T did not produce an active or phosphorylated precursor that was secreted into the culture medium. Processing of this gene product was probably disturbed at the Golgi apparatus, and only a small portion of the enzyme reached the lysosomes. Our results in this study of a homozygote of this mutation (Suzuki et al. 1977) are in accord with those reported previously from other laboratories (Hoogveen et al. 1986; Kobayashi et al. 1986; Van Diggelen et al. 1981; Willemssen et al. 1986). A small portion of catalytically active gene product was transported, probably by the cation-independent mannose 6-phosphate receptor system (Nolan and Sly 1989), and expressed detectable enzyme activity.

The Morquio B gene product was normally processed to the mature enzyme and was stabilized by protective protein/carboxypeptidase. The mature enzyme of apparently normal molecular mass was found in cell strains from Morquio B patients (Paschke and Kresse 1982). Enzyme activity per molecule was low in the catalytic site of the enzyme seems to have been modified by this mutation. A high K_m has been reported in a few cases (Groche et al. 1980; van Gemund et al. 1983).

In this study, we have analyzed mutant gene products only in fibroblasts that are easily available from patients. However, future analysis should be extended to neural, skeletal, and other visceral tissues, for the basic understanding of the pathological expressions in each clinical phenotype, with or without central nervous system involvement. Alterations in substrate specificity should also be considered in order to explain the different patterns of storage materials in human β -galactosidase deficiency. Further research in this direction, together with a full consideration of ontogeny, should reveal the pathogenesis of various hereditary β -galactosidase disorders.

Acknowledgements. This work was supported by grants from the Ministry of Education, Science and Culture (Japan), the Ministry of Health and Welfare (Japan), the Yamamochi Foundation for Research on Metabolic Disorders, and the Uehara Memorial Foundation.

References

- Braford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254
- D'Azco A, Hoogveen A, Reuser AJJ, Robinson D, Galjaard H (1982) Molecular defect in combined β -galactosidase and neuraminidase deficiency in man. *Proc Natl Acad Sci USA* 79:4535-4539
- Gemund J van, Giesberts MA, Erdmans RF, Blom W, Kleijer WJ (1983) Morquio B disease: spondylo-epiphyseal dysplasia associated with acid β -galactosidase deficiency. Report of three cases in one family. *Hum Genet* 64:50-54
- Groche H, Krins M, Schmidberger H, Figura K von, Harzer K, Kresse H, Paschke E, Sewell A, Ullrich K (1980) Morquio syndrome (mucopolysaccharidosis IVB) associated with β -galactosidase deficiency. Report of two cases. *Am J Hum Genet* 32:258-272
- Hoogveen AT, Graham-Kawashima H, D'Azco A, Galjaard H (1984) The relation between human lysosomal β -galactosidase and its protective protein. *J Biol Chem* 259:1974-1977
- Hoogveen AT, Reuser AJJ, Kross M, Galjaard H (1986) G_{M1} -gangliosidosis. Defective recognition site on β -galactosidase precursor. *J Biol Chem* 261:5702-5704
- Kobayashi T, Shimono N, Kurowa Y (1986) Incorporation and degradation of G_{M1} -ganglioside and asialo G_{M1} ganglioside in cultured fibroblasts from normal individuals and patients with β -galactosidase deficiency. *Biochim Biophys Acta* 875:115-121
- Martin RG, Ames BM (1961) A method for determining the sedimentation behavior of enzymes: application to protein mixtures. *J Biol Chem* 236:1372-1379
- Nishimoto J, Namba E, Inui K, Okada S, Suzuki K (1991) G_{M1} -gangliosidosis (genetic β -galactosidase deficiency): identification of four mutations in different clinical phenotypes among Japanese patients. *Am J Hum Genet* 49:566-574
- Nolan K, Sly WS (1989) I-cell disease and pseudo-Hurler dystrophy: disorders of lysosomal enzyme phosphorylation and localization. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds) *The metabolic basis of inherited disease*, 6th edn. McGraw-Hill, New York, pp 1580-1601
- O'Brien IS (1989) β -Galactosidase deficiency (G_{M1} -gangliosidosis, galactosialidosis, and Morquio syndrome type B): gangliosidase sialidase deficiency (mucopolidosis IV). In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds) *The metabolic basis of inherited disease*, 6th edn. McGraw-Hill, New York, pp 1797-1806
- Oshima A, Tsuji A, Nagao Y, Sakuraba H, Suzuki Y (1988) Cloning, sequencing, and expression of cDNA for human β -galactosidase. *Biochem Biophys Res Commun* 157:238-244
- Oshima A, Yoshida K, Shimamoto M, Fukuhara Y, Sakuraba H, Suzuki Y (1991) Human β -galactosidase gene mutations in Morquio B disease. *Am J Hum Genet* 49:1091-1093
- Paschke E, Kresse H (1982) Morquio disease type B: activation of G_{M1} - β -galactosidase by G_{M1} -activator protein. *Biochem Biophys Res Commun* 30:568-575
- Sakuraba H, Aoyagi T, Suzuki Y (1982) Galactosialidosis (β -galactosidase-neuraminidase deficiency): a possible role of serine-thiol protease in the degradation of β -galactosidase molecules. *Clin Chim Acta* 125:275-282
- Shimamoto M, Takano T, Fukuhara Y, Oshima A, Sakuraba H, Suzuki Y (1990) Japanese-type adult galactosialidosis. A unique and common splice junction mutation causing exon skipping in the protective protein/carboxypeptidase gene. *Proc Jpn Acad* 66B:217-222
- Shimamoto M, Fukuhara Y, Itoh K, Oshima A, Sakuraba H, Suzuki Y (1993) Protective protein gene mutations in galactosialidosis. *J Clin Invest* (in press)
- Suzuki Y, Oshima A (1993) A β -galactosidase gene mutation identified in both Morquio B disease and infantile G_{M1} -gangliosidosis. *Hum Genet* 91:407

- Suzuki Y, Nakamura N, Fukuoka K, Shimada Y, Uono M (1977) β -Galactosidase deficiency in juvenile and adult patients. Report of six Japanese cases and review of literature. *Hum Genet* 53:241-247
- Suzuki Y, Sakuraba H, Hayashi K, Suzuki K, Imahori K (1981) β -Galactosidase-neuraminidase deficiency: restoration of β -galactosidase activity by protease inhibitors. *J Biochem* 90: 271-273
- Suzuki Y, Sakuraba H, Yamanaka T, Ko Y-M, Imori Y, Okamura Y, Hoogveen AT (1985) Galactosialidosis: a comparative study of clinical and biochemical data on 22 patients. In: Arima M, Suzuki Y, Yabuuchi JH (eds) *The developing brain and its disorders*. Karger, Basel, pp 161-175
- Takano T, Shimamoto M, Fukuhara Y, Itoh K, Kase R, Takiyama N, Kobayashi T, Oshima A, Sakuraba H, Suzuki Y (1991) Galactosialidosis: clinical and molecular analysis of 19 Japanese patients. *Brain Dysfunct* 4:271-280
- Van Diggelen OT, Schram AW, Sinnott ML, Smith PJ, Robinson D, Galjaard H (1981) Turnover of β -galactosidase in fibroblasts from patients with genetically different types of β -galactosidase deficiency. *J Biol Chem* 256:143-151
- Willemsen R, Hoogveen AT, Sips HJ, Dongen JM van, Galjaard H (1986) Immunoelectron microscopic localization of lysosomal β -galactosidase and its precursor forms in normal and mutant human fibroblasts. *Eur J Cell Biol* 40:9-15
- Yoshida K, Oshima A, Shimamoto M, Fukuhara Y, Sakuraba H, Yanagisawa N, Suzuki Y (1991) Human β -galactosidase gene mutations in G_{M1} -gangliosidosis: a common mutation among Japanese adult/chronic cases. *Am J Hum Genet* 49:435-442
- Yoshida K, Oshima A, Sakuraba H, Nakano T, Yanagisawa N, Inui K, Okada S, Uyama E, Namba R, Kondo K, Iwasaki S, Takamiya K, Suzuki Y (1992) G_{M1} -gangliosidosis in adults: clinical and molecular analysis of sixteen Japanese patients. *Ann Neurol* 31:328-332

