The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	異型異染性白質ジストロフィー症におけるサルファタイドサルファターゼ賦活蛋白欠損の免疫学的証明
Author(s)	乾, 幸治
Citation	大阪大学, 1984, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/34878
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【32】

氏名・（本籍）	乾（いぬい）　幸（こう）　治（じ）
学位の種類	医　学　博　士
学位記番号	第　6576　号
学位授与の日付	昭和59年8月6日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位論文題目	**異型異染性白質ジストロフィー症におけるサルファタイドサルファターゼ賦活蛋白欠損の免疫学的証明**
論文審査委員	（主査） 教授　藪内　百治 （副査） 教授　山野　俊雄　教授　和田　博

論文内容の要旨

（目　的）

MLDはリソゾーム酵素であるSulfatide Sulfataseの欠損により生じる，神経線維の脱髄変性を主とする遺伝的疾患である。しかし最近，臨床的，病理学的，尿中への異常Sulfatideの排泄より，MLDと疑われるが，in vitroでの酵素活性がほぼ正常な症例が異型MLDとして報告された。一方近年低分子蛋白が，GM_1 ganglioside，GM_2 ganglioside，Sulfatideなどの Sphingolipidのリソゾームでの酵素分解に必須であることが知られ，Sphingolipid Activator Protein（SAP）と呼ばれている。しかしその各々のSAPの脂質特異性や，GM_1 gangiosideとSulfatideのSAPが同一のものかに関して不明である。今回異型MLDの病因を証明するため，又GM_1 ganglioside SAPとSulfatide SPAの同一性を証明するため，GM_1 ganglioside SAP（GM_1 SPA）を精製し，異型MLD皮フ線維芽細胞（SF）での，この蛋白添加によるSulfatideの代謝の正常化，並びにこの蛋白に対する抗体により，免疫反応物質（CRM）を検討した。

（実験方法と成績）

GM_1 SPAは，GM_1 gangliosidosisの肝よりLiらの方法を用いて精製した。この精製蛋白はSephadex G75ゲル沪過法では分子量約28,000であり，SDS PAGEで約10,000と推定され，3量体と考えられた。この蛋白は，GM_1 ganglioside，Sulfatideの各々の酵素による分解を促進した。又各々の基質とも結合することが確められた。

この精製蛋白に対する抗体は，ウサギにて作製した。その特異性は二重免疫拡散法と，2次元免疫電気泳動法により検討した。

^{14}C-Stearic acidラベルのSulfatide（^{14}C-CS）はDuboisらの方法により作製した。

① 皮フ線維芽細胞（SF）での ^{14}C–CS代謝の検討

正常，MLD，異型MLDのSFは10％胎児ウシ血清，Eaglés MEMにて培養した。in vitroでの ^{14}C–CS Sulfatase活性はMLDでは正常の0％であり，異型MLDでは20～40％に低下していた。in vivo での^{14}C–CS代謝を検討するため，正常，MLD，異型MLDのSFを25㎠フラスコにて60nmolの^{14}C–CSを含む4㎖の培地にて3日間培養した。3日後SFより脂質をクロロフオルム：メタノール（2：1）にて抽出した。下層の脂質層を薄層クロマトグラフィーにより展開後，オートラジオグラムにて検討した。正常細胞では3日後取り込まれた^{14}C–CSの約80％はgalactosyl ceramide，ceramideと分解され，一方MLDでは取り込まれた^{14}C–CSの98％，又異型MLDでも80％が分解されずに蓄積した。しかし異型MLDのSFに精製したGM_1 SAP 50 μgを4㎖の培地に加え，3日間^{14}C–CSとともに培養すると，取り込まれた^{14}C–CSの65％が分解され，150 μg以上添加することにより完全な正常パターンとなった。しかしMLDではGM_1 SAPの効果は認められなかった。それゆえに異型MLDでは，Sulfatide Sulfataseの酵素欠損によりSulfatideの蓄積を来たしたのではなく，GM_1 SAPの欠損によりSulfatideの分解が障害されたと，考えられる。

② 抗体を利用したSFでのCRMの検討

正常，MLD，異型MLDのSFをホモゲナイズし，11,000 × 9　15分間の遠心後上清を抽出蛋白とした。これらの抽出蛋白を用い二重免疫拡散法を行なった。正常，MLDでは沈降線が認められたが，異型MLDでは沈降線は認められなかった。又Emmettらの方法にてロケット免疫電気泳動を行ないCRM量を検討した。正常SFにては0.76 ±36（平均±ISD）μg／㎎蛋白のCRMが認められたが，異型MLDでは沈降線は形成されず，標準曲線より5％以下であると推定し得た。

（総　　括）

① GM_1 SAPは，各々の酵素によりGM_1 ganglioside，Sulfatideの分解を促進する。

② GM_1 SAPは，GM_1 ganglioside，Sulfatideに結合する。

③ 精製GM_1 SAPを添加することにより，異型MLDのSFにて^{14}C–CS代謝の正常化が認められたので異型MLDの欠損因子と考えられる。

④ GM_1 SAPに対する抗体で，異型MLDのSFにはCRMが認められなかった。この事実もまたGM_1 SAPが欠損因子である事を示唆している。

⑤ 上記の事実よりGM_1 SAPとSulfatide SAPは同一のものである。

論文の審査結果の要旨

本論文は，異型異染性白質ジストロフィー症の病態が，通常考えられるサルファタイドサルファターゼの酵素欠損ではなく，サルファタイドと結合し酵素を働かせる活性化蛋白の異常であることを解明した。これはスフィレゴリピッドゥ代謝にこのような賦活化蛋白が関与していることを示し，意義ある研究と認められる。