

ヒトのアリルスルファターゼ A の分子構成と癌性変化に関する研究

旭川医科大学産婦人科学教室

藤井 哲 哉

Molecular Constitution of Human Arylsulfatase A
and its Alteration in Cancer

Tetsuya FUJII

Department of Obstetrics and Gynecology, Asahikawa Medical College, Asahikawa

概要 ヒト胎盤、卵巣、および卵巣癌組織からアリルスルファターゼ A (ASA) を精製した。精製した ASA は、SDS 存在下でポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) で、分子量およそ 58kDa, 50kDa, 10kDa を示す異なるペプチドから成っていた。プロテインシーケンサーによる解析で、58kDa と 50kDa のペプチドの N 末端側配列は一致した。58kDa と 50kDa のペプチドマップのパターンはいくつかのピークを除いて極めて近似した。それらの異なるピークのペプチドを解析すると、50kDa のペプチドは、cDNA から推定されるアミノ酸配列上の 445 番目の Val から C 末端までの部分を欠いていた。10 kDa のバンドは異なる 4 個のペプチドからなり、それらは cDNA から推定される C 末端側近傍の配列を有していた。これらの結果より、50kDa と 10kDa のペプチドは、58kDa と同一のペプチドから proteolytic processing によつて生じたと考えられる。ヒト卵巣から精製した ASA は、SDS-PAGE 上でヒト胎盤 ASA と同様の泳動パターンを示した。卵巣癌由来の ASA は、主に 58kDa のバンドからなり、50kDa のバンドが減少していた。さらに卵巣癌由来の ASA では正常卵巣の ASA に比して、endo- β -N-acetylglucosaminidase H 抵抗性の糖鎖が増加していた。これらの結果より、卵巣癌において ASA の蛋白部分および糖鎖の両方に processing の変化を生じることが示唆された。

Synopsis Arylsulfatase A (ASA) was purified from human placenta, ovary, and ovarian cancer tissue. The purified ASA was composed of three non-identical peptides of 58kDa, 50kDa, and 10kDa on polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of SDS (SDS-PAGE).

The N-terminal sequence of the 58kDa peptide was found to be identical with that of the 50kDa on analysis with a protein sequencer. The peptide map of the 58kDa peptide was quite similar to that of the 50kDa except for some peaks. The 50kDa peptide lacked the peptide from the residue Val₄₄₅ to the C-terminus of the amino acid sequence deduced from the ASA cDNA. Four different peptides yielded by the 10kDa peptide on HPLC had sequences near the C-terminal side. These results suggest that the 50kDa peptide and the 10kDa peptide are yielded by the same peptide as the 58kDa peptide on proteolytic processing. Ovarian ASA showed the same pattern on SDS-PAGE as placental ASA. Ovarian cancer ASA was mainly composed of the 58kDa band, and in addition the 50kDa band decreased.

The carbohydrate chain of ovarian cancer ASA was more resistant to endo- β -N-acetylglucosaminidase H than that of normal ovary.

These findings suggest that the processing of both the oligosaccharide chains and the protein unit is modified in ovarian cancer.

Key words: Arylsulfatase A • Processing • Peptide map • Subunit

緒 言

アリルスルファターゼ A (以下 ASA と略す) は、リソゾームに局在する水解酵素の一つで、糖鎖の galactose-3-sulfate (糖脂質の一つ、cerebroside-3-sulfate の糖鎖などとして生体組織に存在) の脱硫酸を触媒する。先天代謝異常症の一つ異染性白質変性症は本酵素の欠損によつて

cerebroside-3-sulfate を蓄積する⁷⁾ことが知られている。他方、人癌においても本酵素の活性が白血病細胞¹⁵⁾²²⁾、膀胱癌¹³⁾で亢進することが知られている。しかしながら婦人科領域の癌について本酵素の性状は調べられていない。

本酵素は哺乳類において種々の組織について検討されてきたが、分子構成について、分子量約

55~63kDaの均一な subunit からなる 2 量体¹⁴⁾¹⁹⁾,あるいは55~63kDaと49~57kDaの不均一な subunit からなる³⁾⁶⁾¹⁰⁾,あるいは,より小さな subunit³⁾⁶⁾をも構成するともいわれ,統一の見解に乏しかった。

リソゾーム酵素はそれ自体が糖蛋白質であり,翻訳後,糖鎖が結合し,さらに蛋白部分と糖鎖部分が全く異なる機序の processing (成熟過程)を受けることが知られている¹⁸⁾。実際,癌細胞の ASA 酵素は荷電性に变化のあることが知られている。これは翻訳後 processing の変化と見なされており,変化の機序を探るには本酵素の cDNA の解析¹⁷⁾のみでは不可能であり,酵素蛋白自体についての追求が必要である。

本研究は,卵巣癌から精製した ASA 酵素について対照との比較において癌性変化を調べ,さらに量的精製が可能な胎盤酵素を用いて酵素蛋白自体の subunit 構成を検討したものである。

材料と方法

試薬: endo- β -N-acetylglucosaminidase H (Endo H), peptide: N-glycosidase F (PNGase F) は Genzyme Corporation より, lysyl endopeptidase は和光純薬より求めた。TPCK-trypsin は熊崎隆博士(北海道大学薬学部)より供与された。

ASA の精製: 正常分娩例のヒト胎盤組織,手術摘出によつて得られたヒト正常卵巣組織および卵巣癌(漿液性嚢胞腺癌)組織を用いて,中村らの方法¹⁴⁾に準じて精製した。

ASA の活性染色: 電気泳動ゲル上での活性染色は,泳動後のゲルを, 20mM p-ニトロカテコール硫酸を含む 0.25M 酢酸緩衝液中で 37°C, 10 時間反応させ, 1N 水酸化ナトリウムにゲルを浸すことにより発色させる。

電気泳動法: Laemmli の方法⁹⁾により,蛋白質をドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 存在下にポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) を行い,硝酸銀による蛋白染色を行つた。

ポリアクリルアミドゲルでの等電点電気泳動は, Stevens et al. の方法¹⁸⁾によつて行い,酵素活性染色で ASA を検出した。

ASA の Endo H および PNGase F 処理:

ASA を 0.5% SDS, 0.2M β -mercaptoethanol 存在下で, 3 時間煮沸して前処理を行つた。ついで 57mM クエン酸-リン酸緩衝液 (pH 5.4), 1.3% NP-40 中で 1mU の Endo H を加え, 37°C, 15 時間加温した。PNGase F 処理は, 200mM リン酸緩衝液 (pH 8.6), 1.3% NP-40 中で ASA に 0.25U の PNGase F を加え, 37°C, 15 時間加温した。処理した ASA を, SDS-PAGE で検討した。

高速液体クロマトグラフィー (HPLC): 蛋白およびペプチドの分離精製は, HPLC によつて行つた。装置は Waters 600 型, カラムは TOSO TSK (C1), Microbondaspher (C8 又は C18), 溶媒は 0.05% トリフルオール酢酸を用いアセトニトリルの 0 $\rightarrow$ 80% の直線濃度勾配で溶出し, 210nm の吸光度で検出した。トリプシン消化後のペプチドマップから得られたペプチドは, さらに 10mM ギ酸-アンモニア (pH 6.0) を溶媒として用い, アセトニトリルによる 0 $\rightarrow$ 80% 直線濃度勾配で精製した。

ペプチドの分離とシーケンシング: ヒト胎盤より精製した ASA を Cys 残基も同定可能とするためにピリジルエチル化した。その後, SDS-PAGE, 蛋白染色し, 各バンドごとにゲルを切りだし, 荷電抽出することで, 酵素 subunit を分離した。分離した subunit は, C8 の逆相カラムによる HPLC で精製し, 自動プロテインシーケンサー (Applied Biosystems, 447A) でアミノ酸配列を解析した。

ペプチドマップ: 前述の方法で分離したペプチドを, TPCK-trypsin 又は lysyl endo-peptidase を用いて消化断片化し, 逆相カラムを用いた HPLC によつて peptide mapping を行つた。すなわち, ASA に対して 1/50 (w/w) の TPCK-trypsin を用い, ASA の 8.4 倍 (w/w) の Lubrol-PX を加えた 50mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5) 溶液中で, 37°C, 15 時間消化した。lysyl endo-peptidase は ASA に対して 1/50 (mol/mol) 用い, ASA の 8.4 倍 (w/w) の Lubrol-PX を加えた 50mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) 溶液中で, 37°C, 10 時間消化した。HPLC で分離された各ピークのペプチドは, 自動プロテインシーケンサーでアミノ酸配列を解析した。

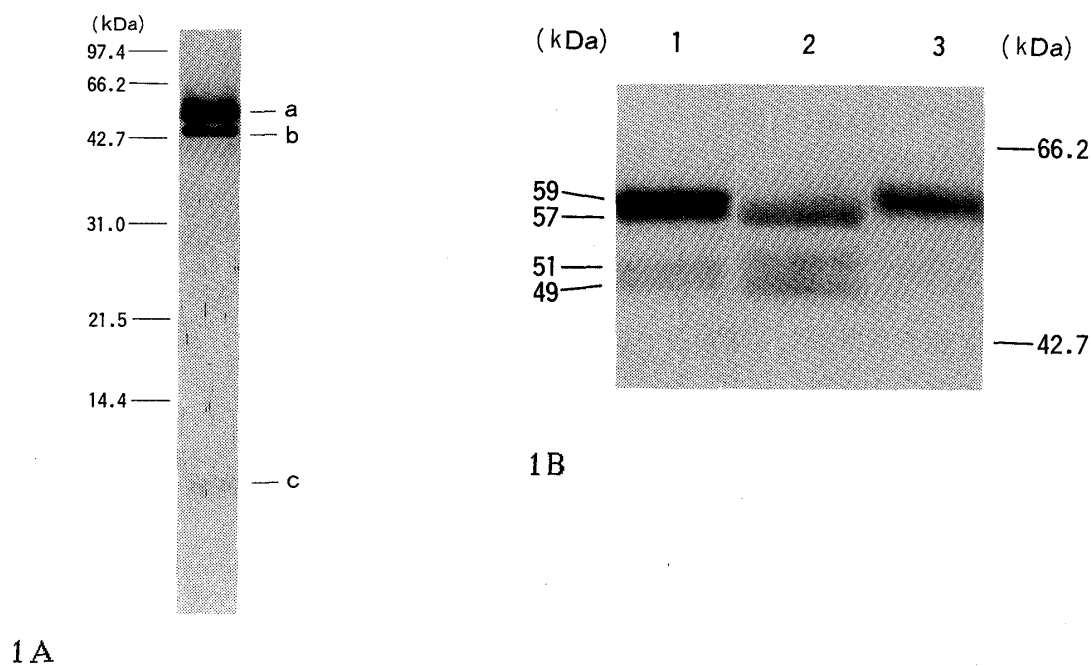


図1 アリルスルファターゼ A のポリアクリルアミドゲル電気泳動
1A: バンド a: 58kDa, バンド b: 50kDa, バンド c: 10kDa(15%T). 1B: Lane 1: 胎盤, Lane 2: 正常卵巣, Lane 3: 卵巣癌 (10%T)

結 果

1. ヒト正常組織と癌組織の ASA の性状

正常胎盤より均一にまで精製した ASA は, SDS-PAGE (15%T) で, a (約58kDa), b (約50kDa), c(約10kDa)のバンドに分離し, さらに10% Tゲルを用いた SDS-PAGE ではバンド a は59kDa と57kDa に, バンド b は51kDa と49kDa に分離していることが認められた (図 1A, 1B).

図 1B に示すように, SDS-PAGE では正常卵巣の ASA は a, b 2 本のバンドが検出され, それぞれ59kDa, 57kDa および51kDa, 49kDa に分離していた. これに対して卵巣癌組織由来の ASA では, 59kDa と51kDa を認めたが, 57kDa と49kDa を認めなかつた. バンド a とバンド b を比較すると, 正常組織に比してバンド a の増加とバンド b の減少がみられ, バンド a (subunit a) とバンド b (subunit b) の構成にも変化を生じたと考えられる.

等電点電気泳動では図 2 に示すように, ASA は 6 バンドに分離し, 正常胎盤の ASA は塩基性側の成分とくにバンド 1 と 2 が主成分であつた. 正常卵巣および卵巣癌の ASA では, バンド 2 ~ 5

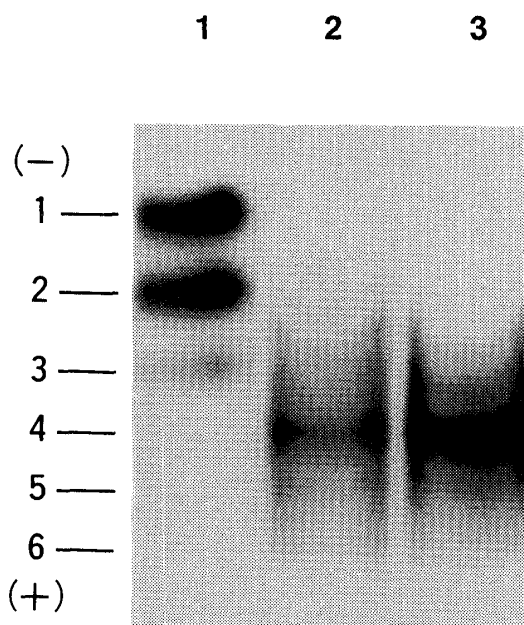


図2 アリルスルファターゼ A の等電点電気泳動 (活性染色)
Lane 1: 胎盤, Lane 2: 正常卵巣, Lane 3: 卵巣癌

がほぼ均等に分布し, 組織による差異を認めたが, 癌化による荷電性の明らかな違いはみられなかつた. 組織間の差は, Stevens et al.の報告した翻訳

後の修飾(リン酸化, 硫酸化, シアル酸化, Gln や Asn の脱アミド化)¹⁸⁾によると考えられ, 癌化によるこの修飾への影響はないと思われる。

2. ASA の糖鎖の解析

Endo H および PNGase F はともにアスパラギン結合型糖鎖に作用するが, 前者は高マンノース型糖鎖および混成型糖鎖を基質とするのに対し, 後者は, さらに複合型糖鎖をも基質とする広範な基質特異性をもつことが知られている。この基質特異性の違いを利用して, 正常および癌組織の ASA 糖鎖を比較した。

Endo H 処理によつて胎盤 ASA の59kDa, 57kDa のバンドの大部分が55kDa に転換し, 残りの一部は57kDa にとどまった。51kDa と49kDa のバンドは大部分が47kDa に変わり, 一部が49kDa にとどまった (図 3A)。

PNGase F 処理により59kDa, 57kDa および51kDa, 49kDa 成分はほとんど55kDa と47kDa に収束した (図 3A)。正常卵巢 (図 3B) のASA においてもほぼ同様の結果を得た。よつて正常組織では subunit a, b ともに大部分が高マンノース型糖鎖を有するが, 少量の複合型糖鎖も存在すると

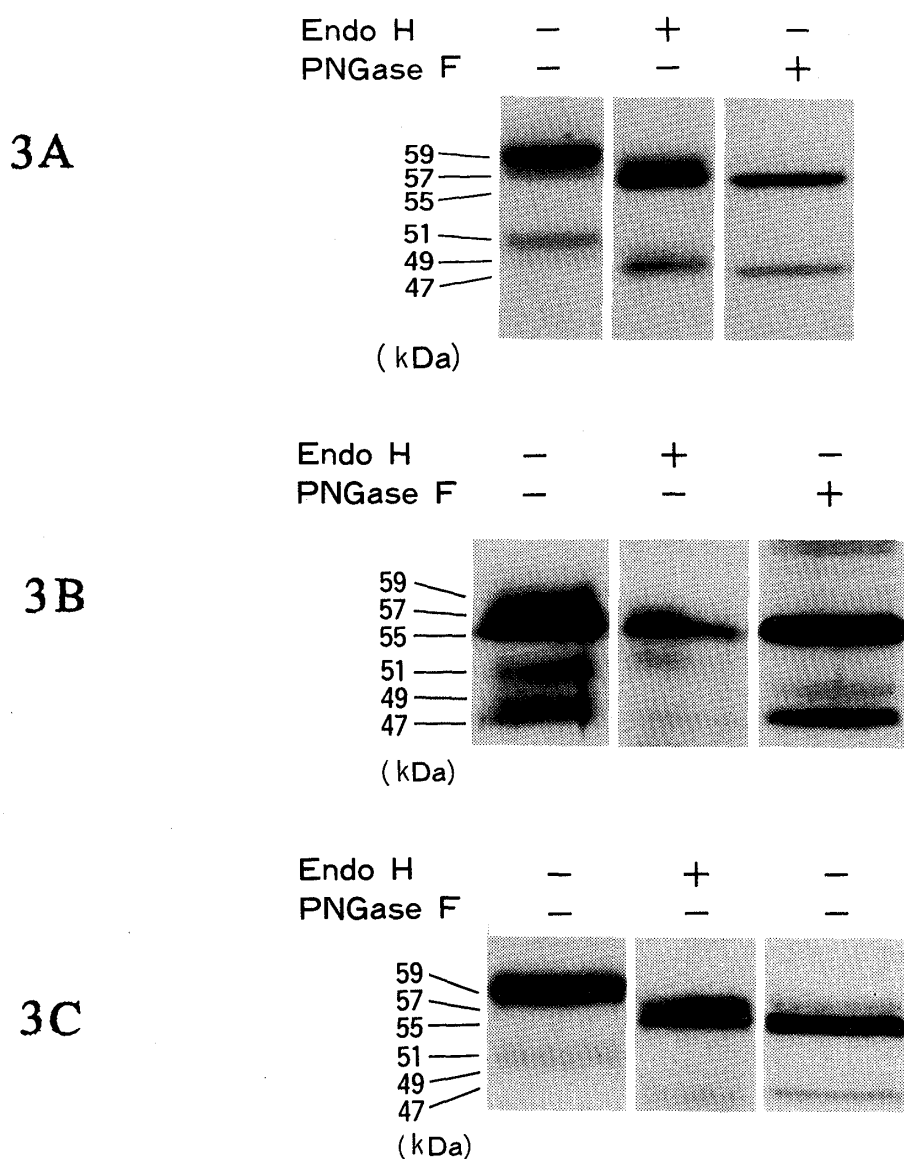


図3 アリルスルファターゼAのEndo HおよびPNGase F消化

3A: 胎盤, 3B: 正常卵巢, 3C: 卵巢癌

Endo H: endo- β -N-acetylglucosaminidase H, PNGase F: peptide: N-glycosidase F

思われる。

これに対して、卵巣癌(図 3C)由来の ASA では Endo H 処理で 57kDa バンドにとどまるものが正常組織よりも多くみられ、PNGase F 処理では正常組織と同様に 55kDa に収束した。したがって癌組織由来の ASA は複合型糖鎖が増加してい

ると考えられた。以上の結果より、癌組織の ASA は、蛋白部分と糖鎖部分の両方の processing に変化を来している可能性が高い。

ASA 蛋白の processing を検討するため、以下の実験を行った。

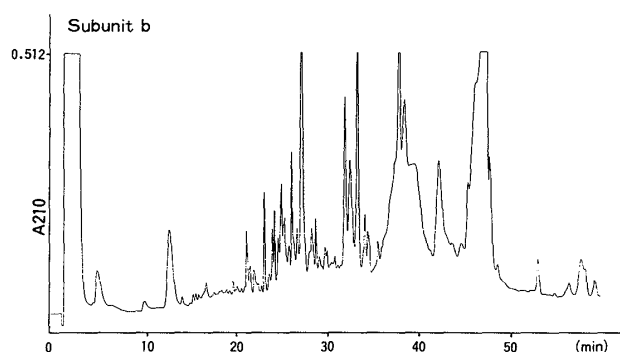
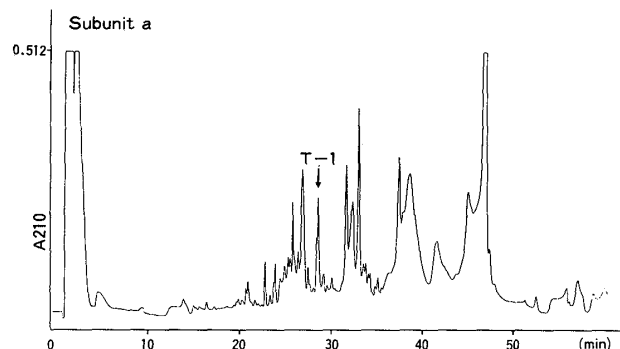


図 4 Subunit a と b の TPCK-trypsin 消化物
ペプチドマップ

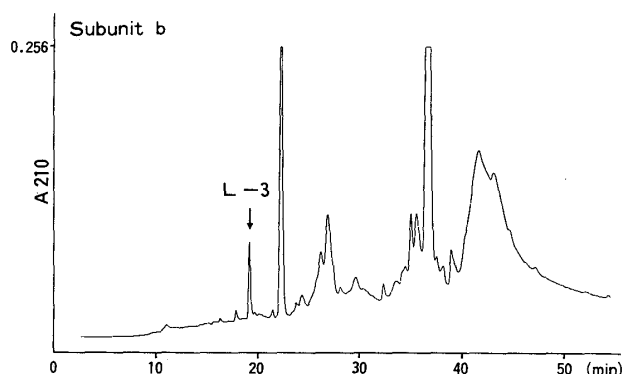
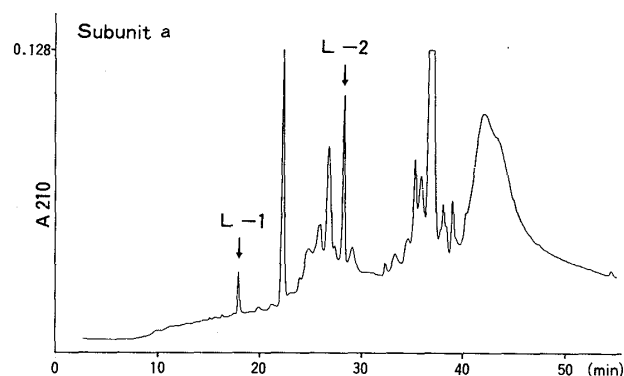


図 5 Subunit a と b の lysyl endopeptidase 消化物
ペプチドマップ

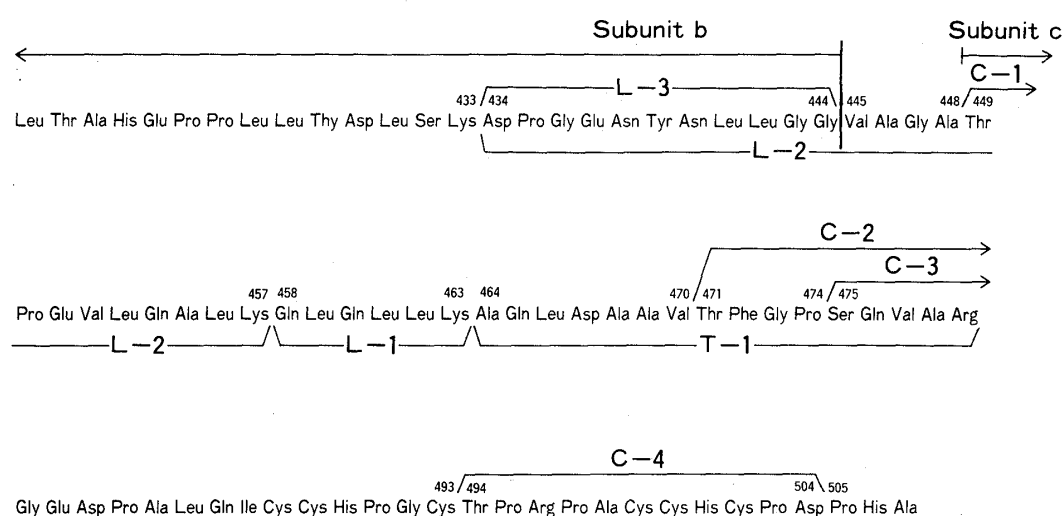


図 6 アリルスルファターゼ A の C 末端側部分アミノ酸配列上の subunit b, c, および
ペプチド T-1, L-1~3, C-1~4 の位置

3. subunit a と b の類似性の解析

PNGase F 処理でバンド a はバンド b に収束しなかつたので subunit a と b の分子量の差は糖鎖によるものではなく蛋白部分によるとみられた。

胎盤 ASA の subunit a と b の N 末端側のアミノ酸配列は、ともに Ser Pro Pro Asn Ile Val Leu Ile Phe Ala Asp Leu Gly Tyr と同一の配列であった。

subunit a と subunit b のトリプシン消化後のペプチドマップ(図4)を比較すると subunit a のみに存在するピーク T-1を得た。ピーク T-1のアミノ酸配列は、ASA の cDNA から推定されたアミノ酸 1 次配列の C 末端側のペプチド(464番目の Ala から479番目の Arg)に一致した(図6)。

他方, subunit a と subunit b の lysyl endopeptidase 消化後のペプチドマップ(図5)を比較すると, subunit a にのみに存在するピーク L-1, ピーク L-2, および subunit b のみに存在するピーク L-3を得た。ピーク L-1は458番目の Gln から463番目の Lys のペプチドに一致し, ピーク L-2は434番目の Asp から457番目の Lys のペプチドに一致した(図6)。これに対して, ピーク L-3はピーク L-2のペプチドの N 末端側(アミノ酸434番目の Asp から444番目の Gly)に一致した。

以上の結果より, subunit a と b はきわめて高い類似性を示し, subunit b は subunit a の N 末端から444番目の Gly までの配列を有するポリペプチドと考えられる。445番目の Val から C 末端の Ala までの分子量は約6.5kDa と算定され, SDS-PAGE 上での subunit a, b 間の分子量の差を説明しうる。

4. subunit c の N 末端側アミノ酸配列の解析
subunit c のペプチドをシーケンシングし, ASA の cDNA から推定されるアミノ酸配列と比較すると, C-1, C-2, C-3のペプチドを N 末端側とする3種類のペプチドと, C-4のペプチドの存在が推定され, いずれも ASA の C 末端側付近の配列に一致し(図6), それよりも N 末端側に類似の配列を認めなかつた。

考 案

細胞の癌化により複合糖質(糖蛋白質, 糖脂質)の糖鎖が変化することが知られており, この癌性変化のうちには, 腫瘍マーカーとして臨床応用されているものもある。本酵素についても肺癌組織の酵素は, より酸性の成分が増加しており, その原因としては, 酵素に結合する糖鎖のリン酸化およびシアル酸化の亢進によることが報告されている¹⁴⁾。その他のリソゾーム酵素についても, 肝癌のカテプシン D¹¹⁾, 肺癌の β -グルクロニダーゼ⁴⁾およびアリルスルファターゼ B⁵⁾における糖鎖のリン酸化による酸性化が知られている。本研究では, 正常卵巣と卵巣癌の ASA には荷電による明らかな違いは認められなかつた。しかしながら, 卵巣癌では複合型糖鎖を持つと考えられる ASA の増加があり, このような癌性変化は他の酵素²³⁾でも知られている。

ASA の subunit 構成については, ゲル濾過上での分子量が約120kDaであることを考え合わせると, 図7のような subunit 構成が推定される。C-1のペプチドを生じる場合を例にすると, まず subunit a が2量体となり, その後, 一方の C 末端付近の2カ所(444番目の Gly と445番目の Val の間および448番目の Ala と449番目の Thr の間)に切断を生じ, 445番目から448番目の Val-Ala-Gly-Ala の4アミノ酸が切り出され

C-2, C-3, C-4のペプチドを生じる場合も同様な機序が考えられる。リソゾーム酵素のカテプシン D は, その processing において, N 末端側の軽鎖と C 末端側の重鎖の間のアミノ酸が切り出され

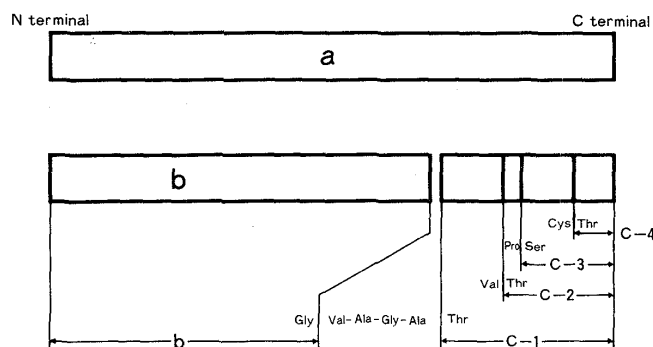


図7 アリルスルファターゼ A の subunit の推定構造

るという機構¹⁹⁾が知られている。ASA について, processing による subunit の構成機序は報告されていないが, 本研究の結果はこの機序を示すものである。

C-1~4のペプチドの解析から, 切断点の N 末端側のアミノ酸には一定の傾向は認められなかった。ペプチドの C 末端側のアミノ酸は Thr 又は Ser であるが, これらのアミノ酸配列を識別するプロテアーゼは知られていない。また C-1~4の長さの異なるペプチドを生じることから, これらが酵素活性に直接関与しているとは考えがたく, むしろ酵素の立体構造の形成, 維持に寄与している可能性が高い。

癌の ASA における subunit b の減少は, C 末端側で切断されたペプチドの減少を意味し, subunit b と c が不分離のもの (subunit a) が増加していた。これは蛋白部分の processing が癌で変化することを示唆している。同様の変化として, リソゾーム酵素の β -グルクロニダーゼ (慢性骨髄性白血病)²¹⁾やカテプシン D (肝癌)²²⁾で切断されていない前駆体の増加が報告されている。この原因としては, ASA 糖鎖の変化に伴う立体構造の変化によるプロテアーゼへの抵抗性増加, プロテアーゼの癌化による修飾, 発現量の変化などの可能性が考えられる。しかし ASA の processing に関わるプロテアーゼは, 既に他酵素で報告されているような塩基性アミノ酸残基¹⁶⁾や Asn-X 結合に作用する¹²⁾²⁰⁾²⁴⁾プロテアーゼである可能性はなく, プロテアーゼの早急な解明が待たれる。また血清中 ASA 濃度を測定すると, 健常人および良性卵巢腫瘍患者に比して卵巢癌患者で有意に血清中 ASA が増加しており (未発表), カテプシン D (肝癌)²²⁾でも同様の報告がされている。よつて血清中 ASA の増加にも processing の変化が関与している可能性も考えられる。

稿を終えるにあたり, 懇切なる御指導, 御校閲を賜った清水哲也教授に深く感謝いたします。また, 直接御指導をいただいた北海道大学医学部癌研究施設生化学部門牧田章教授, 賀佐伸省助教授, 本家孝一助手ならびに同大学薬学部熊崎 隆助手に感謝いたします。

文 献

1. 加藤敬太郎, 和田郁夫: リソゾーム酵素のプロセッシング. 代謝, 24: 99, 1987.
2. 間口四郎, 谷口直之, 大平基之, 牧田 章: ヒト血清カテプシン D の ELISA. 第 6 回腫瘍マーカー研究会記録集, 315, 1986.
3. Draper, R.K., Fiskum, G.M. and Edmond, J.: Purification, molecular weight, amino acid, and subunit composition of arylsulfatase A from human liver. Arch. Biochem. Biophys., 177: 525, 1976.
4. Fujita, M., Taniguchi, N., Makita, A. and Oikawa, K.: Cancer associated alteration of β -glucuronidase in human lung cancer: Elevated activity and increased phosphorylation. Gann, 75: 508, 1984.
5. Gasa, S. and Makita, A.: Phosphorylation on protein and carbohydrate moieties of a lysosomal arylsulfatase B variant in human lung cancer transplanted into athymic mice. J. Biol. Chem., 258: 5034, 1983.
6. James, G.T. and Austin, J.H.: Studies in metachromatic leukodystrophy. XIV. Purification and subunit structure of human liver arylsulfatase A. Clin. Chim. Acta, 98: 103, 1979.
7. Kolondny, E.H. and Moser, H.W.: The metabolic Basis of Inherited Diseases 5th ed. 881. (eds. J.B. Stanbury, J.B. Wyngaarden, D.S. Frederickson, J.L. Goldstein and M.S. Brown) McGraw Hill Book, Co., New York, 1982.
8. Kornfeld, R. and Kornfeld, S.: Assembly of asparagin-linked oligosaccharides. Ann. Rev. Biochem., 54: 631, 1985.
9. Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227: 680, 1970.
10. Laidler, P.M., Waheed, A. and Van Etten, R. L.: Structural and immunochemical characterization of human urin arylsulfatase A purified by affinity chromatography. Biochim. Biophys. Acta, 827: 73, 1985.
11. Maguchi, S., Taniguchi, N. and Makita, A.: Elevated activity and increased mannose-6-phosphate in the carbohydrate moiety of cathepsin D from human hepatoma. Cancer Res., 48: 362, 1988.
12. Mahuran, D.J., Neote, K., Klavins, M.H., Leung, A. and Gravel, R.A.: Proteolytic processing of pro- α and pro- β precursors from human β -hexosaminidase. J. Biol. Chem., 263: 4612, 1988.

13. Maru, A., Ishibashi, T., Imai, Y., Makita, A. and Tsuji, I.: Arylsulfatase A activity of urine in patients with various genitourinary tract disorders. *Clin. Chim. Acta*, 107: 155, 1980.
14. Nakamura, M., Gasa, S. and Makita, A.: Arylsulfatase A from normal human lung and lung tumors showed different patterns of microheterogeneity. *J. Biochem.*, 96: 207, 1984.
15. Posey, L.E., Rainey, J., Vial, R., Ryan, D., Brickers, J.H., Morgan, L.R. Jr., Samuels, M.S. and Hull, E.W.: A noninvasive technique for monitoring response to chemotherapy in human acute leukemia. *Cancer*, 44: 873, 1979.
16. Schwartz, T.W.: The processing of peptide precursors 'Proline-directed arginyl cleavage' and other monobasic processing mechanisms. *FEBS Lett.*, 200: 1, 1986.
17. Stein, C., Gieselann, V., Kreysing, J., Schmidt, B., Pohlmann, R., Waheed, A., Meyer, H.E., O'Brien, J.S. and Von Figura, K.: Cloning and expression of human arylsulfatase A. *J. Biol. Chem.*, 264: 1252, 1989.
18. Stevens, R.L., Fluharty, A.L., Killgrove, A.R. and Kihara, H.: Microheterogeneity of arylsulfatase A from human tissues. *Biochim. Biophys. Acta*, 4456: 661, 1976.
19. Stevens, R.L., Fluharty, A.L., Skokut, M.H. and Kihara, H.: Purification and properties of arylsulfatase A from human urine. *J. Biol. Chem.*, 250: 2495, 1975.
20. Takio, K., Towatari, T., Katunuma, N., Teller, D.C. and Titani, K.: Homology of amino acid sequences of rat liver cathepsin B and H with that of papain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 80: 3666, 1983.
21. Tanaka, J., Gasa, S., Sakurada, K., Miyazaki, T., Kasai, M. and Makita, A.: Characterization of the subunits and sugar moiety of human placental and leukemic β -glucuronidase. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 373: 1992. (in press)
22. Uehara, Y., Gasa, S., Makita, A., Sakurada, K. and Miyazaki, T.: Lysosomal arylsulfatases of human leukocytes: Increment of phosphorylated B variants in chronic myelogenous leukemia. *Cancer Res.*, 43: 5618, 1983.
23. Yamashita, K., Hitomi, A., Taniguchi, N., Yokosawa, N., Tsukada, Y. and Kobata, A.: Comparative study of the sugar chain of γ -glutamyltranspeptidase purified from rat liver and rat AH-66 hepatoma cells. *Cancer Res.*, 43: 5059, 1983.
24. Yonezawa, S., Takahashi, T., Wang, X., Wong, R.N.S., Hartsuck, J.A. and Tang, J.: Structures at the proteolytic processing region of cathepsin D. *J. Biol. Chem.*, 263: 16504, 1988.
(No. 7198 平4・3・13受付)