

肝および脳の β -galactosidase と G_{M_1} -gangliosidosis について

祐川 和子

札幌医科大学小児科学講座 (主任 中尾 亨教授)

Liver and brain β -galactosidase in G_{M_1} -gangliosidosis

Kazuko SUKEGAWA

Department of pediatrics, Sapporo Medical College
(Chief: Prof. T. Nakao)

G_{M_1} -gangliosidosis is differentiated into type 1 and type 2 according to differences in clinicopathological features. In type 1 an early onset of the disease is seen and in type 2 a late onset disease is noted. However the biochemical basis of the differences in clinical manifestations remains obscure. The present study was conducted to isolate β -galactosidase isozymes in the liver and brain specimens using Sephadex G-150 gel filtration and electrofocusing, and to classify the different clinical phenotypes of these diseases from an enzymatic point of view.

4-methylumbelliferyl- β -galactosidase activity in control human liver specimens was separated into three components (Fractions I, II and III) by Sephadex G-150 gel filtration. These three components had their respective optimal activities at pH 4.0 (Fractions I and II) and pH 6.5 (Fraction III). Fractions I and II were stimulated by NaCl. The liver specimens from three patients with G_{M_1} -gangliosidosis were subjected to Sephadex G-150 gel filtration examination. A minute Fraction I was detected in Case 1. However, a minute Fraction I and Fraction III were found in Case 2 and only Fraction III was observed in Case 3. Furthermore, it was clearly observed that Fraction III obtained after gel filtration in both control and patients specimens has a similar isoelectric point of pH 4.5-4.6.

4-methylumbelliferyl- β -galactosidase activity in control human brain specimens was separated into two components (Fractions 1 and 2) by Sephadex G-150 gel filtration. The brain specimens from three patients with G_{M_1} -gangliosidosis were subjected to Sephadex G-150 gel filtration examination. Only Fraction I was observed in the three cases. However, it was noted that Fraction I observed in the above 3 cases was different from Fraction I obtained in control brain specimens in that the optimal pH and thermostability were different.

It has been suggested that patients with type 1 lack both acid and neutral β -galactosidase activity, while patients with type 2 lack only the acid β -galactosidase activity. However, this study showed that the low level of the acid β -galactosidase activity actually occurs in type 1 (Case 1), and type 2 (Case 2).

1. 緒 言

G_{M_1} -gangliosidosis は 1959 年, Norman らが内臓変化を伴った Tay-Sachs 病という黒内障性白痴の特殊型として報告した¹⁾.

その後 Hurler-variant, pseudo-Hurler 病などの名称で呼ばれていたが, 1964 年 Landing らが臨床および病理学的立場から, Tay-Sachs 病などとは異なる一つの独立疾患として familial neurovisceral lipidosis なる名称を与えた²⁾.

1965 年に O'Brien らは generalized gangliosidosis の題名で発表し, 脳および臓器に G_{M_1} -ganglioside が蓄積することを報告し³⁾, 1967 年 Suzuki および Chen により

G_{M_1} -gangliosidosis と名づけられ⁴⁾, その後この名称が広く用いられるようになった。

そして 1968 年, Okada および O'Brien により G_{M_1} -ganglioside- β -galactosidase の欠損が報告され⁵⁾, 以来本酵素の欠損が, この疾患の一次的病因と考えられるに至った。

本疾患は *p*-nitrophenol および 4-methylumbelliferone 誘導体の合成基質を用いて β -galactosidase 活性を測定しても, 脳⁶⁻⁸⁾, 肝^{7,9-12)}, 白血球¹³⁾, 線維芽細胞^{14,15)} などにおいて異常を呈することが報告されており, またシャム猫¹⁶⁾, 仔牛¹⁷⁾ などの動物モデル実験においてもその酵素異常が観察されている。

また全身各臓器には G_{M_1} -ganglioside のみにとどまらず glycosphingolipid¹⁸⁾, glycopeptide¹⁹⁾ もしくはケラト硫酸様物質^{20,21)} が蓄積するとの報告がなされ、本疾患における蓄積物質と β -galactosidase の欠損 isozyme の相互関係の解明が待たれている。

G_{M_1} -gangliosidosis は現在臨床所見より、早発型の 1 型と遅発型の 2 型とに分類されているが、これまでの報告では、酵素を主としての生化学分析結果と臨床所見との関係が各研究室において一様ではない。本研究は生化学的分析による本疾患の分類をより明確にしようという目的から、 G_{M_1} -gangliosidosis として経験した 3 症例について、肝および脳の β -galactosidase を 4-methylumbelliferyl- β -D-galactoside を基質としてゲル濾過および等電点分画法を用いて検索した。

2. 実験材料と実験方法

(1) 肝および脳剖検材料

肝および脳剖検材料は実験に用いるまで -80°C の超低温槽に保存した。

症例 1 (Type 1 大阪市大例): 男児。7 カ月時特異な顔貌と肝脾腫を指摘された。末梢リンパ球に空胞、骨髓に泡沫細胞を有し、cherry red spots を認め、胸腰椎に特有の骨変化を観察した。11 カ月時けいれんが発来し、次第に退行し 1 歳 2 カ月で死亡した。脳の G_{M_1} -ganglioside は総ガングリオシドの 63% と著明な増量を認めた。

症例 2 (Type 2A 札幌大例): 男児 (昭和 45 年 5 月 20 日生, 昭和 48 年 3 月 13 日死亡)。生後 5 カ月脊柱後彎の有無を求めて来院。両親に血族結婚はなく、同胞は 2 名で兄は 6~7 カ月頃脊柱後彎に気付かれ、pseudo-Hurler を疑われたが、精査出来ないまま 2 歳 9 カ月で嚥下性肺炎で死亡している。患児 (症例 2) は不活発ながら聴覚の過敏性がみられた。上眼瞼はやや浮腫状で前額部は膨隆しているが、gargoyle 様の顔貌ではない。肝は入院時右乳腺上では触知せず前腋窩腺上で辺縁を触知、脾は辺縁を触知した。6 カ月時肝は 1 横指触知された。1 歳 5 カ月では麻疹罹患後ではあるが肝 3 横指、脾は 2 横指触知、2 歳 0 カ月肝 2 横指、脾 2 横指触知、2 歳 7 カ月肝 2 横指、脾 1.5 横指と夫々触知した。眼科的には両角膜に小点状の混濁を認めたが、cherry red spots は観察されず、末梢リンパ球の原形質に多数の空胞がみられ、また骨髓標本で泡沫細胞が観察された。骨所見では胸腰椎移行部の後彎、第 1, 2 腰椎前上縁形成不全および髌臼の拡大を認めた。さらに *p*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside を基質とした尿および直腸粘膜中の β -galactosidase 活性は対照に比し非常に低値で β -galactosidase deficiency を認めたこと、尿中に

polysaccharide-protein complex の増量が確認されたこと、および腎糸球体上皮細胞の電顕所見から G_{M_1} -gangliosidosis と診断した。患児は 2 歳 9 カ月で死亡したが、脳の脂質分析の結果、 G_{M_1} -ganglioside は総ガングリオシドの 73.2% (対照 19.0%) と著増を認めた。

症例 3 (Type 2B 阪大例): 女児。1 歳 4 カ月頃から運動および精神運動機能の退行が出現し、2 歳 4 カ月頃から点頭けいれんを起こすようになってきた。臨床所見としては肝脾腫、骨変化、眼底の cherry red spots などは認めなかった。3 歳 9 カ月で死亡したが、脳に著明な G_{M_1} -ganglioside の増量を認めている。

(2) 酵素材料

肝および脳の剖検材料はテフロン—ガラス製の Potter-Eluehjem 型ホモジナイザーを用い、氷冷水にて 5~20% (w/v) ホモジネートとした。次に 1 分間超音波処理後 (久保田製作所 INSONATOR, Model 200M), 100,000×g 60 分間超遠心分離し、その上清を酵素試料として用いた⁸⁾。

(3) 酵素活性測定法

各酵素試料 0.1 ml と、50 mM NaCl を含む 0.1 M クエン酸—リン酸ナトリウム緩衝液に溶解した 0.8 mM 4-methylumbelliferyl- β -D-galactopyranoside (以後 4MUG とする) 0.5 ml を 37°C で 60 分間反応させ、後 0.25 M グリシン緩衝液 (pH 10.7) で反応を停止する。遊離した 4-methylumbelliferone は、日立螢光分光光度計 MPF-4 を用い、励起波長 365 m μ 、螢光波長 450 m μ で測定した¹¹⁾。基質の 4MUG は Koch Light Laboratories 製。蛋白量測定には Lowry 法²²⁾ を使用した。

(4) Sephadex G-150 によるゲル濾過

肝および脳から得た酵素試料は Sephadex G-150 カラム (1.8×93 cm) に添加し、0.05 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) で溶出した。流出速度: 10 ml/hr., 3 ml/fr. として分画した。

(5) 等電点分画法

等電点分画は LKB 810 column (110 ml) を用い、肝の酵素試料並びに Sephadex G-150 によるゲル濾過で得られた Fraction III 分画を泳動させた。キャリアアンホライト (pH 3.5~5) 濃度: 1%, sucrose 濃度勾配: 0~50%, 電圧は 300 V より徐々に上げて 600 V とし、24 時間泳動した。

3. 実験結果

(1) pH 曲線

肝における 4MU- β -galactosidase の pH 曲線は Fig. 1(a) のごとく、対照では pH 4.5 に最高活性を示したのに対し、症例 1 では pH 3.5, 症例 2 および 3 では pH 5.5~

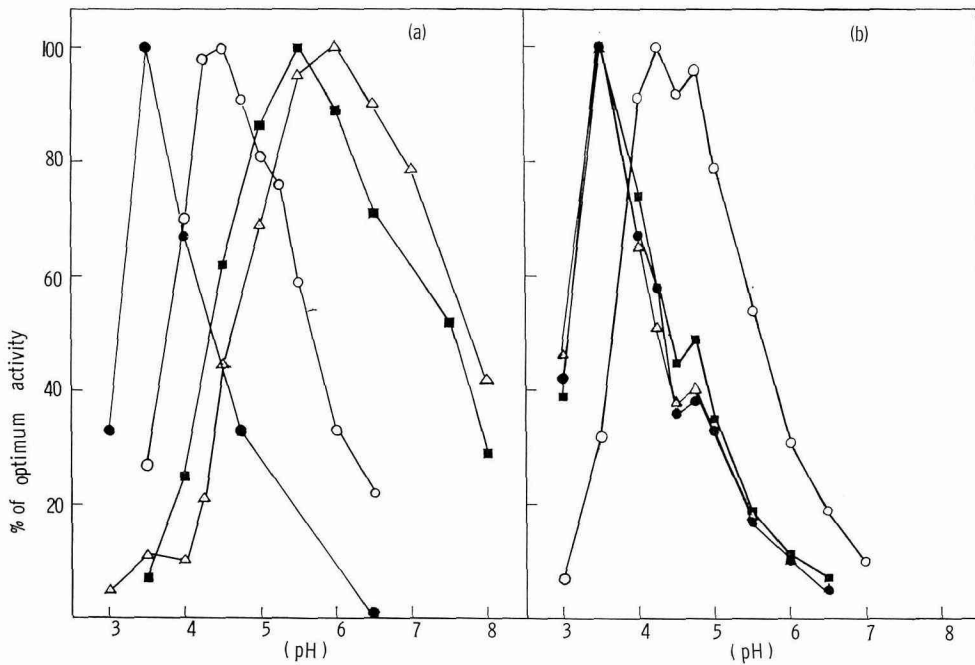


Fig. 1 Influence of pH on β -galactosidase activity.
 (a) Liver (b) Brain β -galactosidase
 ○—○ control ●—● Case 1 △—△ Case 2 ■—■ Case 3

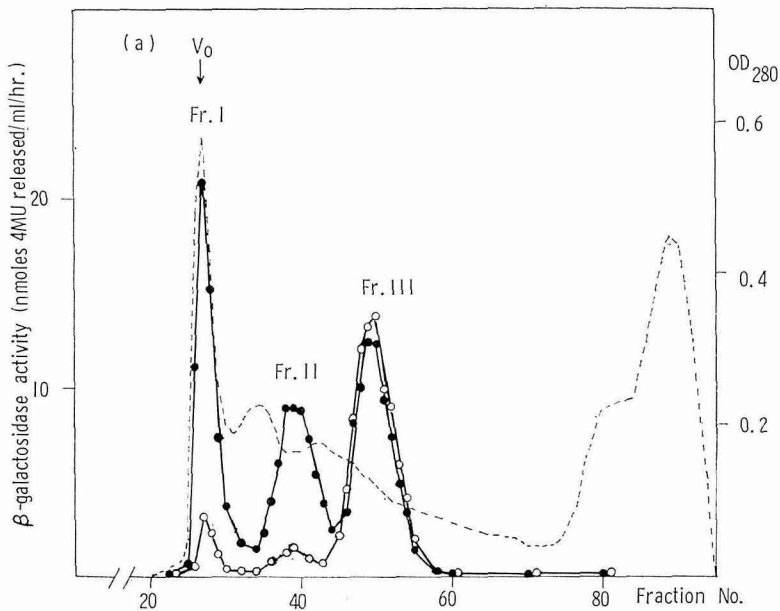
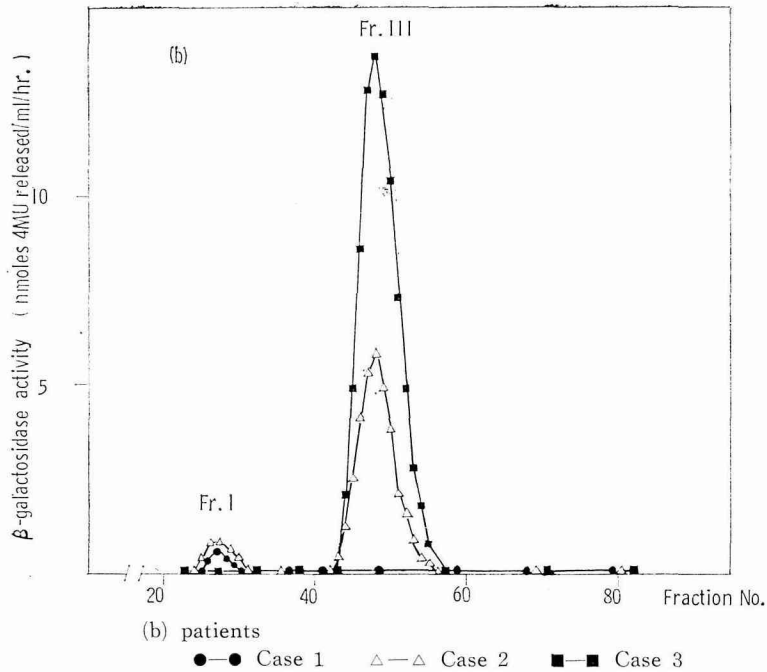


Fig. 2 Sephadex G-150 gel filtration of liver β -galactosidase.
 Activity was assayed at pH 5.0 in each fraction.
 (a) control
 ●—● incubated in presence of 50 mM NaCl
 ○—○ incubated in absence of NaCl
 - - - OD₂₈₀



6.0 に最高活性を示した。

脳における pH 曲線は、各々対照で pH 4.25, 症例 1, 2, 3 で pH 3.5 に最高活性を認め、脳においては症例間の差異は観られなかった (Fig. 1(b)).

(2) Sephadex G-150 によるゲル濾過

① 肝の 4MU-β-galactosidase

対照肝の 4MU-β-galactosidase 活性は、Sephadex G-150 カラムで 3 成分に分画された (Fig. 2(a)). 各々を Fraction I, II, III とすると Fr. I と Fr. II は至適 pH が pH 4.0 の acid-β-galactosidase, Fr. III は pH 6.5 に至適 pH を持つ neutral-β-galactosidase であった (Fig. 3). また Fr. I と Fr. II は反応液に NaCl を添加しないで酵素活性を測定すると活性が低下することから、塩素イオンによる影響を受けることが示された。

GM₁-gangliosidosis の肝では、症例 1 はきわめて低値の Fr. I のみ, 症例 2 は低値の Fr. I と Fr. III, 症例 3 は Fr. III のみの活性を認めた。すなわち症例 1 では neutral-β-galactosidase の完全欠損, 症例 2, 症例 3 では acid-β-galactosidase の低下および欠損が示された (Fig. 2(b)).

次に対照, 症例 2, 症例 3 で得られた Fr. III (neutral-β-galactosidase) についての性状を知るべく等電点分画を行ったところ、共に pH 4.5~4.6 に pI を持つ 1 本の活性ピークのみであった (Fig. 4).

② 脳の 4MU-β-galactosidase

脳における 4MU-β-galactosidase のゲル濾過分画も肝

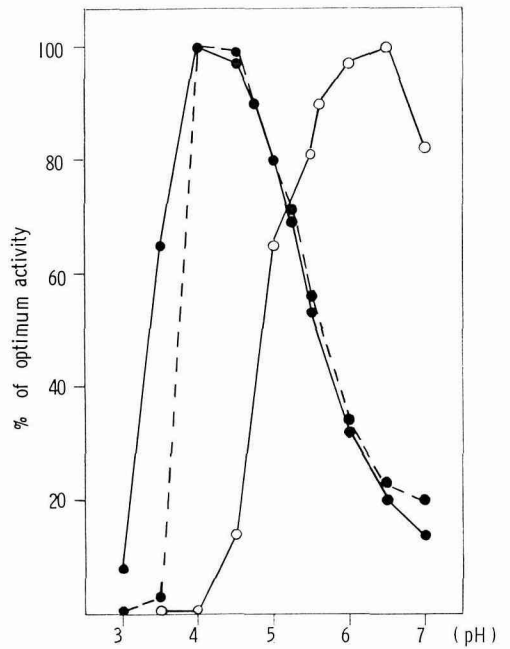


Fig. 3 pH activity curves of each fraction obtained after gel filtration in control liver.

- Fraction I
- Fraction II
- Fraction III

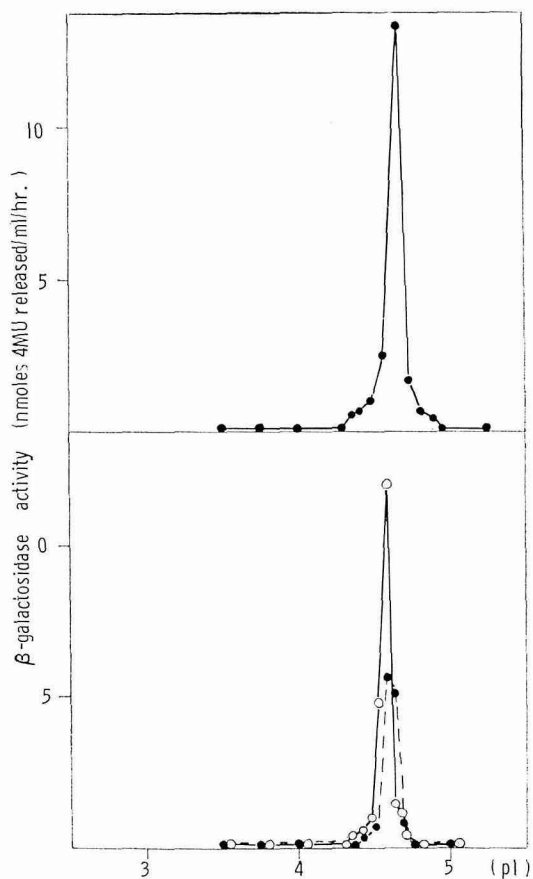


Fig. 4 Isoelectric focusing of the Fractions III. β -Galactosidase activity was assayed at pH 5.0

●—● control ●—● Case 2
○—○ Case 3

と同様の方法にて行ない、Fig. 5(a)のような結果を得た。すなわち、対照においては2成分に分画され、Fr. 1, Fr. 2 各々の成分の至適 pH は共に pH 4.25 であった (Fig. 6)。

GM₁-gangliosidosis の患児では、症例 1, 2, 3 共に Fr. 1 に活性を示したが (Fig. 5(b) (c) (d)), 対照の Fr. 1 とは異なる至適 pH を有した。さらに後述するように熱安定性においても、対照と症例間では異っていた。

(3) 等電点分画

肝の 4MU- β -galactosidase 活性の等電点分画は LKB-810 column を用いて行ない、pH 5.0 での活性測定で3成分に分画された (Fig. 7(a)). 各々のピークを P₁, P₂, P₃ とすると等電点は各々 pH 4.2, pH 4.3, pH 4.55~4.65 であった。活性測定時の pH を pH 4.0 にすると P₃ ピークが欠如し、pH 6.5 では P₁ と P₂ ピークが欠如した。つまり

P₁ と P₂ は acid- β -galactosidase, P₃ は neutral- β -galactosidase と考えられる。

GM₁-gangliosidosis の症例 2 と症例 3 の等電点分画では、pH 5.0 および pH 6.5 での活性測定で pH 4.55~4.65 に等電点を持つ 1 ピークのみであった (Fig. 7(b) (c)). Sephadex G-150 ゲル透過で確認された症例 2 の有する acid- β -galactosidase は低活性の為、泳動中に失活し検出されなかったものとする。

(4) 熱安定性

脳の Sephadex G-150 カラムにより得られた各成分を 42°C で 0-60 分間熱処理し、活性を pH 3.5 および pH 4.25 で測定した結果は (Fig. 8) の通りである。対照では 45 分間の熱処理で Fr. 1 は約 80% の活性を失なうが、GM₁-gangliosidosis においては 30~50% の失活にとどまっている。

4. 考 察

ヒト肝 β -galactosidase は 4MUG を基質としてデンブレン電気泳動, Sephadex G-150, G-200 によるゲル透過, 等電点分画法により 2~3 種の isozyme に分離され、かつ GM₁-gangliosidosis 患児の欠損 isozyme は 1 型, 2 型により異ると報告されている^{23,24,11,12}。

Ho および O'Brien²³, O'Brien²⁴ は、Sephadex G-150 で 3 ピーク (peak I, II, III) に、デンブレン電気泳動で 3 バンド (陽極へ泳動するものから A, B, C) に 4MU- β -galactosidase を分離し、両者の関係については、peak I は B, peak II は A と C, peak III は A と一致し、さらに peak I と II は熱に不安定で pH 4~4.3 の条件下で塩素イオンにより、安定性を保つ成分であるとしている。また GM₁-gangliosidosis の 1 型は、A, B および C 成分がすべて欠損しており、2 型では acid- β -galactosidase である B と C 成分が欠損していると報告している。

一方 Suzuki および Suzuki^{11,12} は、肝ホモジネートの 10,000×g, 10 分間超遠心分離の上清を酵素試料として、等電点分画で α (pI 4.1~4.2), β (pI 4.5~4.6), γ (pI 4.8~4.9) の 3 成分に分画し、それと Sephadex G-200 で分画された 3 ピークとの関係については、peak II は β と、peak III は γ と同等電点を持つが、peak III が galactosylceramide, lactosylceramide, asialo-GM₁-ganglioside を基質とした場合に活性を示さないにもかかわらず、 γ ではこれらの天然基質での活性を認めることから、ゲル透過成分と等電点分画成分との明確な関係は示されないと報告している。さらに GM₁-gangliosidosis については、肝の等電点分画で 2 型では 3 ピークとも欠損するが、1 型で pH 4.6~4.7 に等電点を持つ (abnormal isoelectric point) peak を

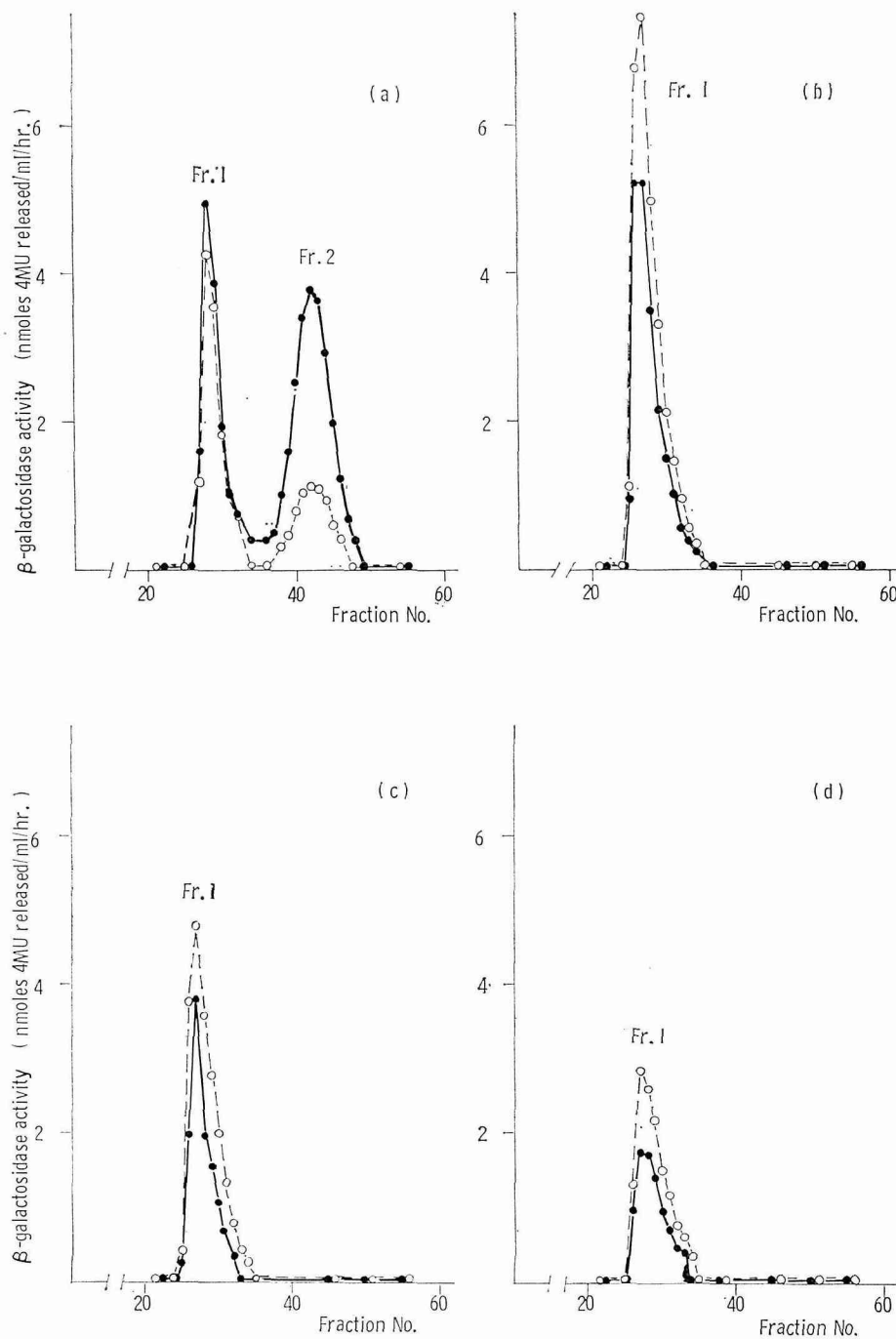


Fig. 5 Sephadex G-150 gel filtration of brain β -galactosidase. Activity was assayed at pH 3.5 ○··○ at pH 4.25 ●··●
 (a) control (b) Case 1 (c) Case 2 (d) Case 3

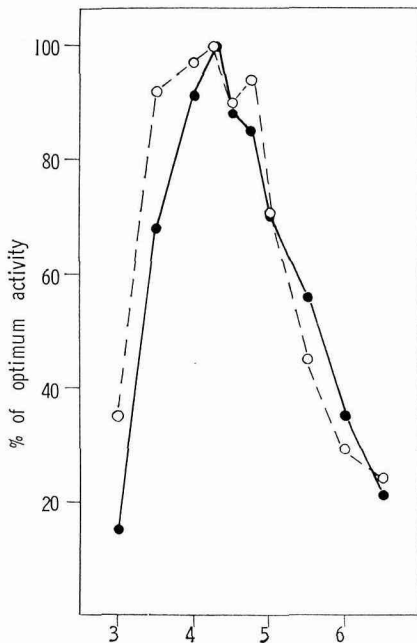


Fig. 6 pH activity curves of each fraction after gel filtration in control brain.
 ○··○ Fraction 1 ●—● Fraction 2

認めたと報告している。

本実験では、ヒト肝 4MU- β -galactosidase は Sephadex G-150 ゲル濾過で 3 成分に分画され、Fr. I と Fr. II は、pH 4.0 に至適 pH を持ち、塩素イオンにより activate される acid- β -galactosidase であり、Fr. III は至適 pH が pH 6.5、等電点が pH 4.5~4.6 である neutral- β -galactosidase という結果を得た。また G_{M_1} -gangliosidosis では、臨床的に 1 型である症例 1 は、Sephadex G-150 ゲル濾過できわめて低値の Fr. I に活性を示し、1 型と 2 型の中間の症状を示す症例 2 では低値の Fr. I と Fr. III、臨床的に 2 型に属する症例 3 では Fr. III 成分のみであった。脳の Sephadex G-150 ゲル濾過では、対照で Fr. I と Fr. II の 2 成分に分画されたが、 G_{M_1} -gangliosidosis では 3 症例共に Fr. I の 1 成分のみであり、症例間の差異は観られなかった。さらに患児の Fr. I と対照のそれとを比較すると、至適 pH、熱に対する安定性で異なる性状を示した。Chou ら⁸⁾ は G_{M_1} -gangliosidosis の脳の β -galactosidase について pH 曲線、熱安定性、デンプン電気泳動にて対照とは異なる性状の isozyme を認め、これは mutant enzyme であろうと述べているが、筆者らの結果はこれを支持すると考える。

以上の結果より、 G_{M_1} -gangliosidosis の臨床所見と欠損酵素の関係について次のような考察を加えた。すなわち、

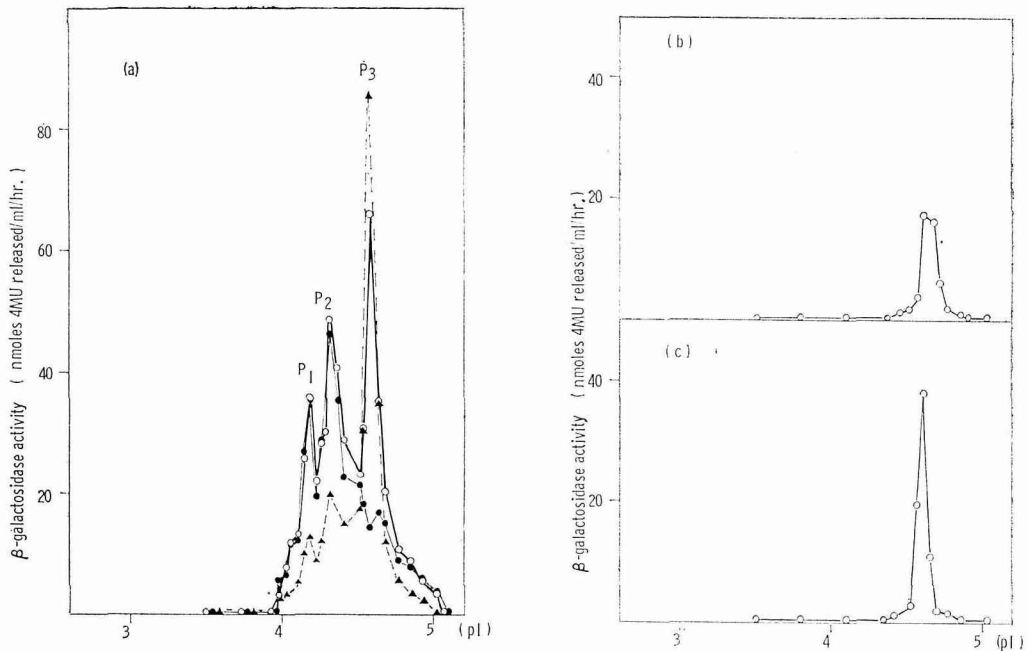


Fig. 7 Isoelectric focusing of liver β -galactosidase. Activity was assayed at pH 4.0 ●—● at pH 5.0 ○—○ at pH 6.5 ▲—▲.
 (a) control (b) Case 2 (c) Case 3

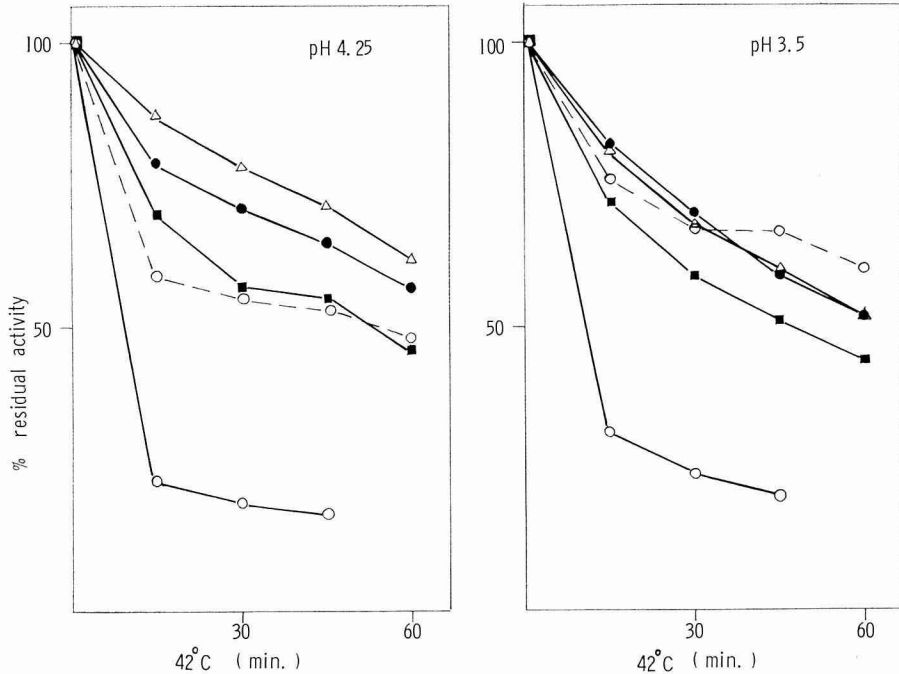


Fig. 8 Thermostability at 42°C of β -galactosidase in each Fraction after gel filtration in brain.

○—○ control Fr. 1 ○—● control Fr. 2
●—● Case 1 Fr. I △—△ Case 2 Fr. I ■—■ Case 3 Fr. I

1型は肝の β -galactosidase において neutral- β -galactosidase は欠損しているが、きわめて低値ではあるが acid- β -galactosidase 活性は残存している。2型では、臨床所見並びに欠損酵素が一定の様式を示さず、ある広がりをもっているが、neutral- β -galactosidase 活性は保持され、acid- β -galactosidase に部分欠損を含めた欠損がみられるものとする。したがって筆者らが経験した症例1は1型、臨床的に1型と2型の中間所見をみる症例2は、neutral- β -galactosidase を有するので便宜上2A型、症例3を2B型と分類した。

G_{M_1} -gangliosidosis の臓器には G_{M_1} -ganglioside 以外に末端に galactose を持つ lactosylceramide, asialo- G_{M_1} -ganglioside も蓄積するが、それらの基質に作用する β -galactosidase について、いくつかの報告がなされている。Tanaka ら²⁵⁾ は、肝の acid- β -galactosidase を250倍に精製し、それが lactosylceramide, asialo- G_{M_1} -ganglioside, G_{M_1} -ganglioside に作用すること、又 G_{M_1} -gangliosidosis ではこれらの天然基質の酵素活性が欠損していることから、確証はできないとしながらも、これらに作用する酵素は1つの酵素であり、それゆえに G_{M_1} -gangliosidosis は、 β -galactosidase の調節機構よりもむしろ構造

遺伝子に障害があるだろうと述べている。一方 Brady ら²⁶⁾ は、 G_{M_1} -gangliosidosis の lactosylceramide- β -galactosidase 活性は増加していると報告し、Norden ら²⁷⁾ は、肝の G_{M_1} -ganglioside- β -galactosidase を17,000倍に精製し、ポリアクリルアミド電気泳動で1つのバンドを得、その酵素には lactosylceramide- β -galactosidase 活性はないと報告している。

又 G_{M_1} -gangliosidosis の臓器には末端に galactose をもつ glycopeptide も蓄積するが、Wolfe ら²⁸⁾ は G_{M_1} -gangliosidosis 1型の肝に蓄積するオリゴ糖の構造解析を試み、erythrocyte glycopeptide 由来のものであろうと報告し、Tsay ら²¹⁾ はケラト硫酸様の物質であり、骨髄由来のものであろうと報告している。

このように G_{M_1} -gangliosidosis の成因の追求は、 β -galactosidase の基質特異性、又は生体内のオリゴ糖の代謝経路の解明にも展開されてゆくことであろう。

5. 結 語

G_{M_1} -gangliosidosis は β -galactosidase の異常を認める疾患で、現在臨床的に2型に分類されているが、その臨床所見と酵素欠損との関係が各研究室で様々ではない。本研

究はこの点についてより明確にしようという目的から、肝および脳の β -galactosidase 活性を Sephadex G-150 ゲル濾過と等電点分画にて検討し、次の結果を得た。

1) ヒト肝の 4MU- β -galactosidase は Sephadex G-150 ゲル濾過で 3 成分に分画され (Fr. I, Fr. II, Fr. III), 各々の至適 pH は pH 4.0 (Fr. I, II) pH 6.5 (Fr. III) であった。G_{M1}-gangliosidosis の患児については、臨床的に 1 型である症例 1 はきわめて低値の Fr. I (acid- β -galactosidase), 1 型と 2 型の中間の臨床所見を持つ症例 2 は低値の Fr. I と Fr. III (neutral- β -galactosidase), 2 型である症例 3 は Fr. III のみであった。また対照, 症例 2, 症例 3 の Fr. III の等電点は共に pH 4.5~4.6 であった。

2) ヒト肝の 4MU- β -galactosidase は, 等電点分画にて 3 成分に分離され (peak 1, 2, 3) 各々の等電点は pH 4.2, pH 4.3, pH 4.55~4.65 であった。患児肝の等電点分画は, 症例 2, 症例 3 について行なったところ, pH 4.5~4.6 に等電点をもつ 1 ピークのみが認められた。

3) ヒト脳の 4MU- β -galactosidase は, Sephadex G-150 ゲル濾過で 2 成分に分画され (Fr. 1, Fr. 2), 至適 pH は共に pH 4.25 であった。患児脳では, 症例 1, 症例 2, 症例 3 共に Fr. I のみであったが, 対照の Fr. I とは至適 pH, 熱安定性において異った性状を示した。

以上の結果より G_{M1}-gangliosidosis の 1 型は, きわめて低値ではあるが acid- β -galactosidase 活性が残存し, neutral- β -galactosidase は欠損しているもの, 2 型は neutral- β -galactosidase は欠損せず保有し, acid- β -galactosidase に異常を認めるものと考えらる。

終りに, 本研究にあたり貴重な材料を御提供下さいました, 大阪大学医学部小児科学教室藪内百治教授, 岡田伸太郎講師, 大阪市立大学医学部小児科学教室多田啓也教授に感謝いたします。

又御校閲を賜りました中尾亨教授, 実際に御指導下さいました折居忠夫助教授に感謝いたします。

なお, 研究の一部は昭和 49 年度文部省科学研究費補助金 (特定研究) による。

又本研究の要旨は第 17 回小児代謝研究会 (昭和 49 年 11 月 29~30 日・大阪), 第 18 回小児代謝研究会 (昭和 50 年 9 月 11~12 日・札幌) において発表した。

(昭和 51. 1. 7 受理)

参 考 文 献

- Norman, R. M., Urich, H., Tingey, A. H., and Goodbody, R. A.: Tay-Sachs disease with visceral involvement and its relationship to Niemann-Pick's disease. *J. Path. Bact.*, **78**, 409-421 (1959).
- Landing, B. H., Silverman, F. N., Craig, J. M., Jacoby, M. D., Lahey, M. E., and Chadwick, D. L.: Familial neurovisceral lipidosis. *Am. J. Dis. Child.*, **108**, 503-522 (1964).
- O'Brien, J. S., Stern, M. D., Landing, B. H., O'Brien, J. K., and Donnai, G. N.: Generalized gangliosidosis. *Am. J. Dis. Child.*, **109**, 338-346 (1965).
- Suzuki, K., and Chen, G. C.: Brain ceramide hexosides in Tay-Sachs disease and generalized gangliosidosis (G_{M1}-gangliosidosis). *J. Lipid. Res.*, **8**, 105-113 (1967).
- Okada, S., and O'Brien, J. S.: Generalized gangliosidosis: β -galactosidase deficiency. *Science*, **160**, 1002-1004 (1968).
- Brady, R. O., O'Brien, J. S., Bradley, R. M., and Gay, A. E.: Sphingolipid hydrolases in brain tissue of patients with generalized gangliosidosis. *Biochim. Biophys. Acta*, **210**, 193-195 (1970).
- Norden, A. G. W., and O'Brien, J. S.: Ganglioside G_{M1}- β -galactosidase: Studies in human liver and brain. *Arch. Biochem. Biophys.*, **159**, 383-392 (1973).
- Chou, L., Kaye, C. I., and Nadler, H. L.: Brain β -galactosidase and G_{M1}-gangliosidosis. *Pediat. Res.*, **8**, 120-125 (1974).
- Hultberg, B., Öckerman, P. A., and Dahlqvist, A.: Gargoylism: Hydrolysis of β -galactosides and tissue accumulation of galactosemannose-containing compounds. *J. Clin. Invest.*, **49**, 216-224 (1970).
- Ho, M. W., Cheetham, P., and Robinson, D.: Hydrolysis of G_{M1}-ganglioside by human liver β -galactosidase isozyme. *Biochem. J.*, **136**, 351-359 (1973).
- Suzuki, Y., and Suzuki, K.: Glycosphingolipid- β -galactosidases. I. Standard assay procedures and characterization and gel filtration of enzymes in normal human liver. *J. Biol. Chem.*, **249**, 2098-2104 (1974).
- Suzuki, Y., and Suzuki, K.: Glycosphingolipid- β -galactosidases. II. Electrofocusing characterization in G_{M1}-gangliosidosis. *J. Biol. Chem.*, **249**, 2113-2117 (1974).
- Hindman, J., and Cotlier, E.: Glycosidases in normal human leukocytes and abnormalities in G_{M1}-gangliosidosis. *Clin. Chem.*, **18**, 971-975 (1972).

- 14) Pinsky, L., and Powell, E.: G_{M1}-gangliosidosis types 1 and 2: Enzymatic differences in cultured fibroblasts. *Nature*, **228**, 1093-1095 (1970).
- 15) Pinsky, L., Miller, J., Shanfield, B., Watters, G., and Wolfe, L. S.: G_{M1}-gangliosidosis in skin fibroblast culture: Enzymatic differences between type 1 and 2 and observations on a third variant. *Am. J. Hum. Genet.* **26**, 563-577 (1974).
- 16) Baker, Jr. H. J., Lindsey, J. R., Mckhann, G. M., and Farrell, D. F.: Neuronal G_{M1}-gangliosidosis in a siamese cat with β -galactosidase deficiency. *Science*, **174**, 838-839 (1971).
- 17) Cheethan, P. S. J., Robinson, D., and Blakemore, W. F.: Animal models for G_{M1}-gangliosidosis. *Biochem. Soc. Transact.* **2**, 1121-1124 (1974).
- 18) Suzuki, K., Suzuki, K., and Kamoshita, S.: Chemical pathology of G_{M1}-gangliosidosis (Generalized gangliosidosis). *J. Neuropathol. Expth. Neurol.*, **28**, 25-73 (1969).
- 19) Brunngraber, E. G., Berra, B., and Zambotti, V.: Brain glycoproteins in G_{M1}-gangliosidosis: Isolation and carbohydrate composition of glycopeptides. *FEBS Letters*, **35**, 350-352 (1973).
- 20) Tsay, G. C., and Dawson, G.: Structure of keratosulfate-like material in liver from a patient with G_{M1}-gangliosidosis (β -D-galactosidase deficiency). *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **52**, 759-766 (1973).
- 21) Tsay, G. C., Dawson, G., and Li, Y. T.: Structure of the Glycopeptide storage material in G_{M1}-gangliosidosis. *Biochem. Biophys. Acta*, **385**, 305-311 (1975).
- 22) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J.: Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 263-275 (1951).
- 23) Ho, M. W., and O'Brien, J. S.: Differential effect of chloride assay. *Clin. Chim. Acta*, **32**, 443-450 (1971).
- 24) O'Brien, J. S.: Five gangliosidosis. *Lancet*, **ii**, 805 (1969).
- 25) Tanaka, H., Meisler, M., and Suzuki, K.: Activity of human hepatic β -galactosidase toward natural glycosphingolipid substrates. *Biochim. Biophys. Acta*, **398**, 452-463 (1975).
- 26) Brady, R. O., O'Brien, J. S., Bradley, R. M., and Gay, A. E.: Sphingolipid hydrolases in brain tissue of patients with generalized gangliosidosis. *Biochem. Biophys. Acta*, **210**, 193-195 (1970).
- 27) Norden, A. G. W., Tennant, L. L., and O'Brien, J. S.: G_{M1}-ganglioside β -galactosidase. *A. J. Biol. Chem.* **249**, 7969-7976 (1974).
- 28) Wolfe, L. S., Senior, R. G., and Ng Ying Kin, N. M. K.: The structures of oligosaccharides accumulating in the liver of G_{M1}-gangliosidosis type 1. *J. Biol. Chem.*, **249**, 1828-1838 (1974).