

臨床遺伝学公開シンポジウム 2013

「リソソーム病解明への新たな前進」

日時： 2013年3月5日(火) 13:00～16:15

場所： 明治薬科大学
総合教育研究棟 フロネシス 8111 講義室

2013年3月5日

明治薬科大学 臨床遺伝学講座

目次

臨床遺伝学公開シンポジウム 2013 開催に際して	1
プログラム	2
演題 1: ファブリー病の診断システムをご紹介します 月村 考宏	3
演題 2: リゾ糖脂質はリソソーム病の良いバイオマーカーです 兔川 忠靖	4
演題 3: 高感度同時多項目 (MUSTag) 法をファブリー病診断に応用しました 東京都医学総合研究所 芝崎 太、他	5
演題 4: 血中 α - ガラクトシダーゼ A タンパク質を高感度に測定することができました 小野 悠香里、他	6
演題 5: 抗 GLA 抗体測定用簡易イムノクロマト法を開発しました 中野 早知栄、他	7
演題 6: 抗 GLA モノクローナル抗体のキャラクタライズを行いました 神倉 亜耶、他	8
演題 7: 酵素製剤中のマンノース-6-リン酸残基を定量しました 相澤 良明、他	9
演題 8: リソソーム酵素へ糖鎖を転移する酵素を開発しています 臨床遺伝学客員教授 産業技術総合研究所 千葉 靖典	10
演題 9: ファブリー病に対する酵素補充療法へのサポシン B の有用性について検討しています 臨床遺伝学客員教授 東京都医学総合研究所 川島 育夫	11
演題 10: リソソーム酵素の精製と機能評価の方法を開発しました 徳島大学大学院 薬科学教育部 創薬生命工学分野 北風 圭介	12
演題 11: ザンドホッフ病モデルマウス由来 iPS 細胞はニューロンに分化しにくいことを見つけました 明治薬科大学 薬理学教室 高田 昂、他	13
演題 12: α -L-イズロニダーゼの立体構造を明らかにしました 徳島大学 疾患酵素学研究センター 真板 宣夫	14
演題 13: 構造学的視点からファブリー病研究を進めています 櫻庭 均、他	15

臨床遺伝学公開シンポジウム 2013 開催に際して

明治薬科大学 分析化学教室・臨床遺伝学講座
教授 櫻庭 均

大日本住友製薬株式会社様およびジェンザイム・ジャパン株式会社様の研究助成により、本学に臨床遺伝学講座が設立され、2009年4月より活動を開始して4年が過ぎました。私共は、遺伝性難病、特にリソソーム病の病態解明と診断・治療法の開発を目指して研究を行い、ささやかではありますが、毎年、公開シンポジウムでその成果を発表させて頂いております。次年度は、私が臨床遺伝学講座専任となり、新たな体制で研究に取り組む予定です。その転換期にあたる今回のシンポジウムは、「リソソーム病解明への新たな前進」というタイトルで、研究の新たな担い手として期待される大学院生や学生にも、その成果を発表してもらうことに致しました。もちろん、我々スタッフも頑張りますので、どうぞ皆様の御指導、御鞭撻を宜しくお願い致します。

臨床遺伝学講座研究スタッフ

臨床遺伝学	分析化学	生体機能分析学
教授 櫻庭 均	教授 櫻庭 均	教授 兎川 忠靖
客員教授 伊藤 孝司	講師 鈴木 俊宏	助教 月村 考宏
千葉 靖典	大学院生 水戸部さゆり	
田島 陽一	秘書 田中聖恵子	
川島 育夫	経理 池田 範子	
川村眞智子		
研究技術員 森山 厚子		
大塚 智子		
田中 利絵		

臨床遺伝学シンポジウム 2013 プログラム

「リソソーム病解明への新たな前進」

- 13:00-13:10 開会の辞
挨拶（大学） 石井啓太郎（明治薬科大学 学長）
挨拶（法人） 久保 陽徳（明治薬科大学 理事長）
進行説明 櫻庭 均
- 13:10-13:20 ファブリー病の診断システムをご紹介します
明治薬科大学 生体機能分析学教室 月村 考宏
- 13:20-13:30 リゾ糖脂質はリソソーム病の良いバイオマーカーです
明治薬科大学 生体機能分析学教室 兎川 忠靖
- 13:30-13:50 高感度同時多項目（MUSTag）法をファブリー病診断に応用しました
東京都医学総合研究所 芝崎 太, 他
- 13:50-14:00 血中 α -ガラクトシダーゼ A タンパク質を高感度に測定することができました
明治薬科大学 分析化学教室 小野 悠香里, 他
- 14:00-14:10 抗 GLA 抗体測定用簡易イムノクロマト法を開発しました
シンセラ・テクノロジーズ株式会社 中野 早知栄, 他
- 14:10-14:20 抗 GLA モノクローナル抗体のキャラクタライズを行いました
明治薬科大学 分析化学教室 神倉 亜耶, 他
- 14:20-14:30 酵素製剤中のマンノース-6-リン酸残基を定量しました
明治薬科大学 分析化学教室 相澤 良明, 他
- 14:30-14:40 リソソーム酵素へ糖鎖を転移する酵素を開発しています
明治薬科大学 臨床遺伝学客員教授、産業技術総合研究所 千葉 靖典
- 14:40-14:50 休憩
- 14:50-15:00 ファブリー病に対する酵素補充療法へのサポシン B の有用性について検討しています
明治薬科大学 臨床遺伝学客員教授、東京都医学総合研究所 川島 育夫
- 15:00-15:20 リソソーム酵素の精製と機能評価の方法を開発しました
徳島大学大学院 薬科学教育部 創薬生命工学分野 北風 圭介
- 15:20-15:30 ゼンドホッフ病モデルマウス由来 iPS 細胞はニューロンに分化しにくいことを見つけました
明治薬科大学 薬理学教室 高田 昂, 他
- 15:30-15:50 α -L-イズロニダーゼの立体構造を明らかにしました
徳島大学 疾患酵素学研究センター 真板 宣夫
- 15:50-16:10 構造学的視点からファブリー病研究を進めています
明治薬科大学 分析化学教室・臨床遺伝学講座 櫻庭 均, 他
- 16:10-16:15 閉会の辞
明治薬科大学 分析化学教室・臨床遺伝学講座 櫻庭 均
- 16:30-18:00 懇親会 （厚生棟 1F 食堂）

ファブリー病の診断システムをご紹介します

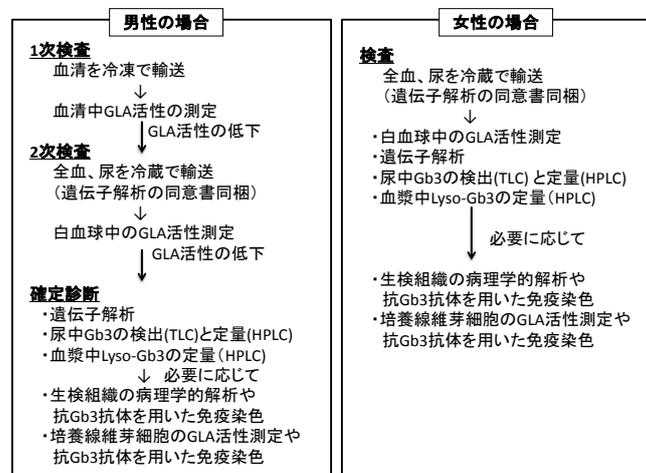
明治薬科大学 生体機能分析学教室

月村 考宏

ファブリー病は、 α -ガラクトシダーゼ A (GLA) の活性が低下することで、基質であるグロボトリアオシルセラミド (Gb3) やグロボトリアオシルスフィンゴシン(Lyso-Gb3)が細胞内のリソソームに蓄積してしまう X 染色体性の遺伝病です。ファブリー病では、酵素補充療法が導入されているため、早期診断・早期治療が非常に重要となっています。しかし、心障害、腎障害、脳血管障害等の症状を示す患者さんのなかに、ファブリー病であるにも拘わらず、適切な診断をされず治療を受けられていない患者さんがいると考えられます。そこで我々のグループでは、これらの症状を示す患者さんを対象として男性と女性とを別にして、次の様な方法でファブリー病患者さんの診断を行っています。

ファブリー病は、X 染色体性の遺伝病のため、男性は GLA 活性を測定することで診断することができます。GLA 活性の測定は容易で多検体を処理することができるため、男性の診断では、まず 1 次検査で血清中の、そして 2 次検査で白血球中の GLA 活性を測定するハイリスク・スクリーニングを実施しています。現在までに、約 4000 人の患者さんを検査して、20 人以上のファブリー病患者さんが診断されました。

一方女性の場合は、GLA 活性測定だけで診断することが難しいため、遺伝子解析、Gb3 や Lyso-Gb3 の定量などの検査を行い、それらの結果を基に、総合的に診断しています。これらの検査は、GLA 活性測定に比べ複雑で多検体を処理することが難しいため、臨床情報から解析対象を絞り、ファブリー病の可能性が特に高い患者さんを検査しています。現在までに、約 50 人を検査し、25 人のファブリー病患者さんが診断されました。今後も、この診断システムを用いて、ファブリー病患者さんの早期診断・早期治療に貢献していきたいと思っております。



ファブリー病の診断

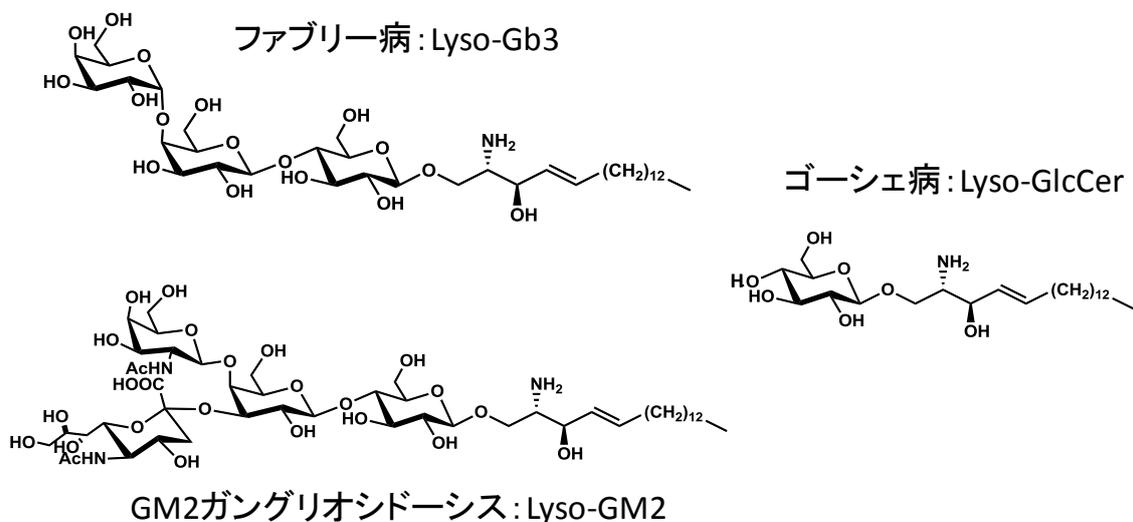
リゾ糖脂質はリソソーム病の良いバイオマーカーです

明治薬科大学 生体機能分析学教室

兎川忠靖

近年、リソソーム病のいくつかの疾患に対して、酵素の補充療法が開始され、治療効果が得られています。そこで、診断に役立ち、治療の効果を反映するバイオマーカーの測定が重要になります。診断においては、高い特異性を持ち、病状の程度を反映し、健常人との差が大きいほど良いマーカーと言えます。また、治療の効果を見る際には、測定法が簡便であること、必要な試料量が少なく、一般検査の検体の一部で測定可能であることがあげられます。リソソーム病における蓄積物質は糖脂質であることから、当然、当該糖脂質がバイオマーカーとされてきました。しかし、スフィンゴ糖脂質代謝異常を来たすリソソーム病で主に蓄積するセラミド化合物は、健常人にも相当量存在することから、病的状態との判別が難しい場合があります。そこで、新たにリゾ糖脂質に着目しました。我々がバイオマーカー候補として検討したリゾ糖脂質は、ファブリー病の Lyso-Gb3、ゴーシェ病の Lyso-GlcCer、GM2-ガングリオシドーシスの Lyso-GM2 です。これらのリゾ糖脂質は、患者血漿中濃度が増加していることはもちろん、健常人血漿中では検出限界以下であり、複雑なアイソマーが存在しません。さらに、我々は、疾患モデルマウスでの血漿および組織あるいは患者血漿で高値を示したリゾ糖脂質濃度が、酵素補充により低下することを示しました。今回は、これまでに臨床遺伝学教室で解析したリゾ糖脂質のデータを発表させていただくとともに、診断で注意しなければならない、特異な例についてもご報告いたします。

図 リソソーム病のバイオマーカーとなるリゾ糖脂質の構造



高感度同時多項目 (MUSTag) 法をファブリー病診断に応用しました

芝崎 太¹、中野早知栄^{1,2}、森實芳仁^{1,2}、櫻庭 均^{3,4}

¹ (公財) 東京都医学総合研究所・分子医療 PT、² シンセラ・テクノロジーズ (株)、

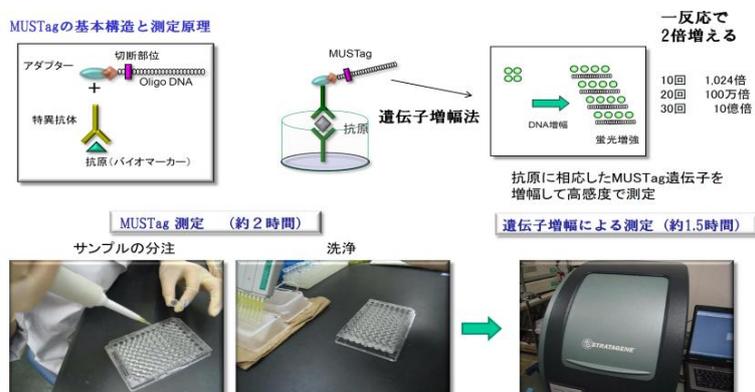
³ 明治薬科大学・分析化学、⁴ 明治薬科大学・臨床遺伝学

疾患を早期に診断し、的確な薬効予測に基づく投薬で早期の治療を目指す予防的治療を確立するためには、(1)少量のサンプルから、(2)疾患の診断標的となるバイオマーカーを複数同時に、(3)超高感度に、(4)しかも短時間で測定できるような新規の検出法の開発が不可欠です。

私たちがイムノ PCR 法をベースに新たな診断基盤技術として開発してきた MUSTag (Multiple Simultaneous Tag) 法は、最大数十種類の蛋白質バイオマーカーを、数 10 fg/ml の超高感度で、同時に測定できる特長を持ちます。MUSTag 法により、従来法では検出不可能であった極低濃度の標的蛋白質の定量が可能となり、臨床研究分野においても新たな知見が得られています。

これまでに、私たちは、血液濾紙を試料とした MUSTag 法による酵素蛋白質測定で、ファブリー病、ポンペ病およびゴーシェ病の同時解析が可能であることを示しました。そして、最近の改良により、血清や血漿を試料とする α -ガラクトシダーゼ A (GLA) 蛋白質測定法を確立し、ファブリー病の診断や分子病態解明に役立つことを示しました。

MUSTag 法の臨床診断への応用を進める上で課題点の一つとなっていたアッセイ時間の長さについても、民間企業と共同開発した次世代超高速リアルタイム PCR 機器の利用で、検出時間を大幅に短縮することが可能となり、アッセイの高速化への展望が開けました。さらに測定者の操作による誤差を極力避けるため、大量の試料を処理できる洗浄自動機を作製しています。これらの機器を用いた解析システムが完成すれば、試料採取から測定結果が得られるまでの処理時間を 1 時間程度に短縮できることが予想されます。



血中 α -ガラクトシダーゼ A タンパク質を高感度に測定することができました

明治薬科大学 分析化学教室

小野 悠香里、神倉 亜耶、深野 颯人、鈴木 俊宏

ファブリー病は、 α -ガラクトシダーゼ A (GLA) の活性低下により、その基質となるグロボトリアオシルセラミド (Gb3) などの糖脂質が体内に蓄積し、四肢疼痛、腎不全、心不全などを来す X 染色体性の遺伝病です。本症は、早期発見で重症の「古典型」と晩期発症で比較的軽症の「亜型（遅発型）」とに臨床分類されます。また、本症患者の他に GLA 活性低下を認める遺伝的多型である E66Q を持つ例が日本人や韓国人に多数確認されています。現在、ファブリー病に対する治療として、組換えヒト GLA (rhGLA) を用いた酵素補充療法 (ERT) が行われておりますが、多くのファブリー男性患者は GLA タンパク質を持たないため、GLA タンパク質に対する抗体が産生されてしまい、アレルギー性有害副反応が起こる場合があると報告されています。しかし、ファブリー病ヘテロ接合体である女性では、GLA 発現細胞が存在するため、抗 GLA 抗体産生が起こりにくいことが知られています。このことから、少量であれ GLA タンパク質を持っていれば、治療に対する有害副反応が起こる危険性が低くなると予想されます。そのため、酵素補充療法による抗体産生の可能性を予想し、副反応に適切に対処するために、ERT 開始前に患者血中の GLA タンパク質量を高感度に測定する方法の開発が求められています。

私たちは、MUSTag ビーズ法 (シンセラテクノロジーズ株式会社) を用いて、血中 GLA タンパク質の測定を行いました。その結果、古典型ファブリー病男性患者では血中 GLA タンパク質がほぼ欠損していたのに対し、亜型ファブリー病男性患者と機能性多型である E66Q を持つ男性では僅かながら残存 GLA タンパク質が存在することが明らかになりました (図)。

本法は、簡便かつ高感度に血中 GLA タンパク質を測定することが可能であるため、ファブリー病の病態解明だけでなく、ERT に伴うアレルギー性有害副反応の予想に役立つと期待されます。

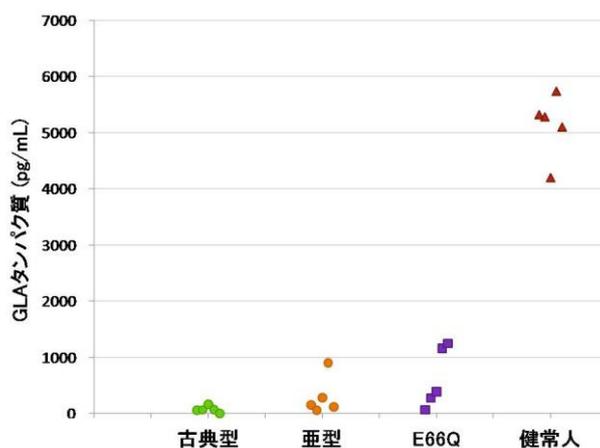


図 ヒト血漿中のGLA濃度

抗 GLA 抗体測定用簡易イムノクロマト法を開発しました

中野 早知栄^{1,2}、芝崎 太¹、櫻庭 均^{3,4}

¹ (公財) 東京都医学総合研究所・分子医療 PT、² シンセラ・テクノロジーズ (株)、

³ 明治薬科大学・分析化学、⁴ 明治薬科大学・臨床遺伝学

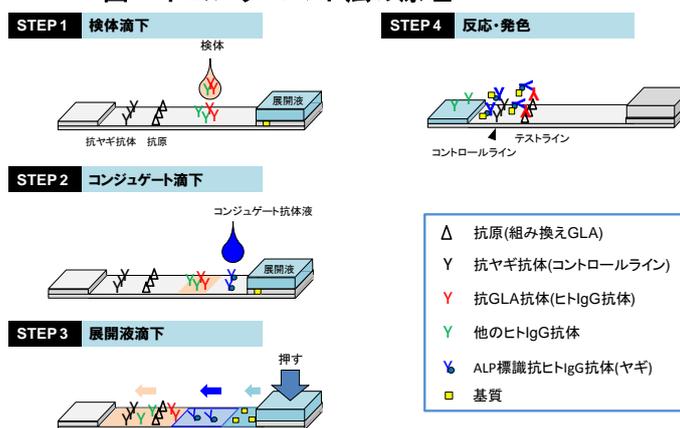
ファブリー病に対する治療として、酵素補充療法が行われていますが、組換え GLA の繰り返し投与によって血中に抗 GLA 抗体が産生されることがあり、治療効果の減弱やアレルギー反応を起こす場合があることが報告されています。その為、抗 GLA 抗体検査を簡便に行なうための方法の開発が臨床サイドから強く望まれています。そこで、我々は、簡便且つ短時間で血中の抗 GLA 抗体を測定できるイムノクロマト法を利用した測定方法を検討しました。

イムノクロマト法とは、毛細管現象により検体がメンブレン上を移動する際、検体中の抗体と標識抗体（酵素や金属コロイド等で標識された抗体）及び抗原の 3 者により免疫複合体が形成される現象を利用し、その標識物の集積を目視（または読み取り装置）で確認する測定方法です。抗 GLA 抗体測定用のイムノクロマト法では、組換え GLA（抗原）をテストラインに固相化し、標識抗体に ALP（Alkaline phosphatase）を標識した抗ヒト IgG 抗体（ヤギ）を使用し、コントロールラインには、抗ヤギ抗体を固相化しました。（下図）

このイムノクロマト法を用いて、組換え GLA を投与された患者さんの血清または血漿検体中の抗 GLA 抗体の測定を行ったところ、抗体価の高い検体ではテストラインに強い発色が認められました。さらに同一検体を用いて、交差反応を調べたところ、GLA 以外のタンパク質を使用した場合には陰性を示しました。また、健常人由来の 40 検体（血清 20 検体、血漿 20 検体）を、抗 GLA 抗体測定用イムノクロマト法で測定した場合、全ての検体で陰性でした。以上のことから、抗 GLA 抗体測定用イムノクロマト法のテストラインの発色は、組換え GLA を投与された患者さんの血清または血漿中の抗 GLA 抗体に特異的に反応していることが示されました。

今回開発したイムノクロマトにより、抗 GLA 抗体が簡便にかつ短時間で測定可能であり、酵素補充療法時のコンパニオン診断として非常に有用であると思われます。

図 イムノクロマト法の原理



抗 GLA モノクローナル抗体のキャラクタライズを行いました

明治薬科大学 分析化学教室

神倉 亜耶、小野 悠香里、深野 颯人、鈴木 俊宏

α -ガラクトシダーゼ A (GLA) は、ファブリー病の患者において、その活性が顕著に低下しており、患者の GLA の発現量を検討することで、ファブリー病の臨床像の理解に役立つと考えられます。その為、抗 GLA 抗体を用いて GLA タンパク質に関するデータを得ることは、臨床研究のみならず基礎研究としても重要になります。

今回、抗 GLA モノクローナル抗体の作製を試み、49 種の抗体産生細胞の培養上清を得ました。それらの培養上清について、ウェスタンブロッティング、ELISA、SPR 法を用いて、GLA に対する免疫反応性を評価し、感度・特異性の優れた抗体を選出し、クローン化を行いました。その結果、GLA 特異的で感度の良いモノクローナル抗体を得ることが出来ました。

現在、我々は、MUSTag 法による微量 GLA の定量を行っていますが、その際、抗 GLA モノクローナル抗体を、同法の捕捉抗体として用いています。そこで、今回得られた高感度抗 GLA モノクローナル抗体を MUSTag 法に利用することで、MUSTag 法による GLA タンパク質測定感度を高めることや、他の免疫測定法への応用が出来るかと期待されます。

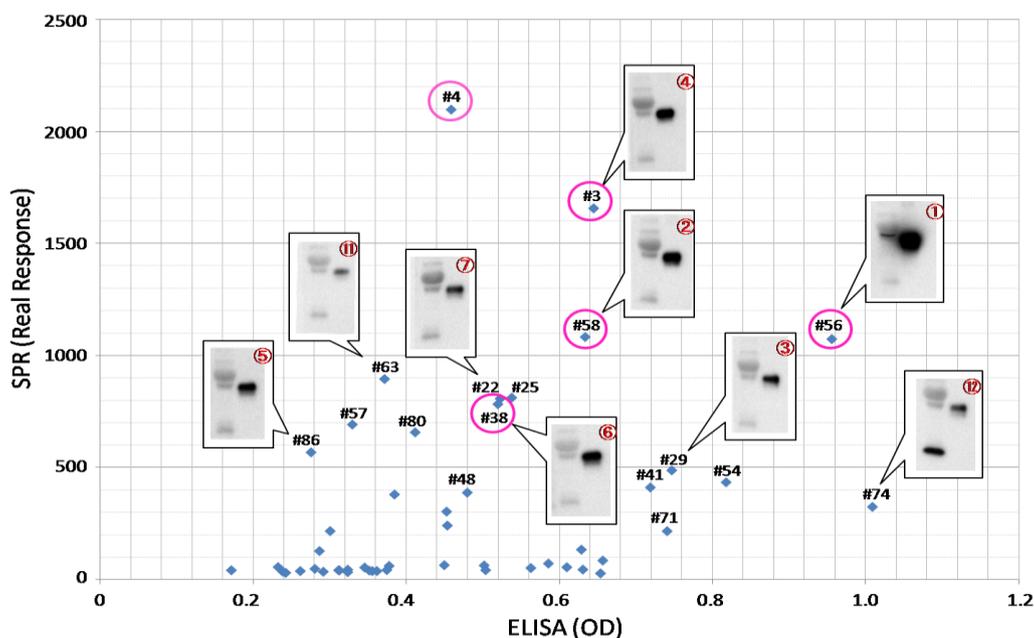


図 ELISA・SPR相関性とWestern Blottingの結果

酵素製剤中のマンノース-6-リン酸残基を定量しました

明治薬科大学 分析化学教室

相澤 良明、高田 大、兎川 忠靖

リソソーム病は、リソソームの酸性加水分解酵素またはその調節因子の遺伝的異常により、細胞内に基質が蓄積し、障害を引き起こす一群の遺伝病です。それらの疾患に対する根本的治療法の中で最も汎用されているものが酵素補充療法であり、現在臨床の場で用いられています。多くの酵素補充療法において、血管内に投与された組換え酵素は、主に細胞膜に存在するマンノース-6-リン酸 (M6P) 受容体を介して細胞内に取り込まれ、リソソームに運ばれると考えられています (図)。従って、酵素タンパク質に結合した糖鎖の非還元末端にある M6P 残基数が多い程、細胞内取り込みに有利と考えられ、酵素の取り込み機構や新たな酵素製剤の検討において、M6P の定量は重要です。そこで我々は、HPLC を用いて酵素製剤中の M6P 残基数を定量する、特異的で高感度な方法を開発しました。

今回開発した方法を用いて、ポンペ病の治療で用いられる酸性 α -グルコシダーゼ (GAA)、ファブリー病の治療で用いられる α -ガラクトシダーゼ A (GLA)、そして新たに開発された改変型 α -N-アセチルガラクトサミニダーゼ (NAGA; α -ガラクトシダーゼ B) の M6P 残基数を定量しました。酵素製剤中の糖鎖をトリフルオロ酢酸により加水分解し、さらに 2-アミノピリジン (PA) により蛍光標識化しました。PA 化された M6P を含む反応液を固相抽出により精製し、HPLC を用いて M6P 残基数を定量したところ、M6P 量は、酵素 1 分子中に GAA で 1.0 残基、2 種類の GLA で 2.4 および 3.6 残基、そして改変型 NAGA で 6.4 残基でした。

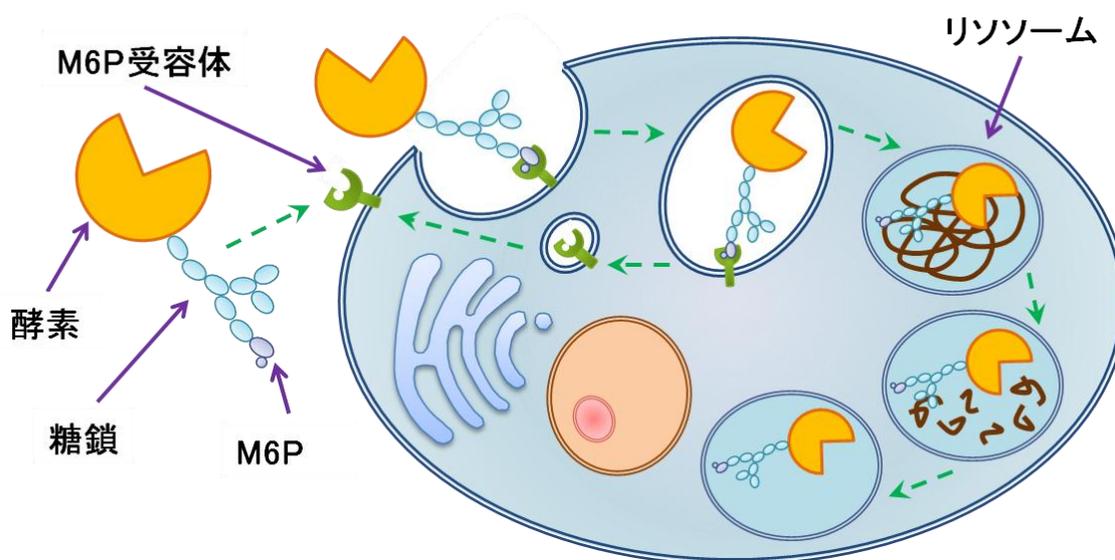


図 M6P 受容体を介した細胞へのリソソーム酵素の取り込み機構

リソソーム酵素へ糖鎖を転移する酵素を開発しています

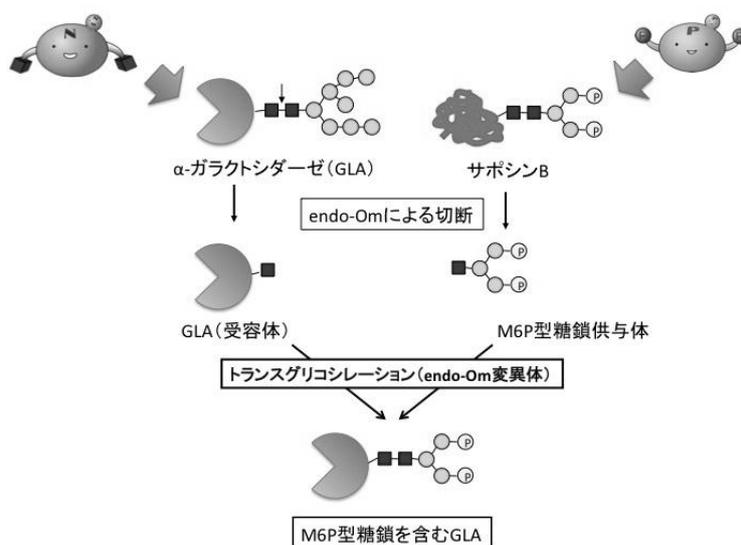
明治薬科大学 臨床遺伝学講座

産業技術総合研究所 生物プロセス研究部門

千葉 靖典

我々はこれまでに酵母を利用して、様々なリソソーム酵素や関連タンパク質(サポシン B)を発現し、その糖鎖をマンノース-6-リン酸 (M6P) 型に変換するべく開発を行ってきました。その結果、サポシン B では95%以上の糖鎖を M6P 型として発現させることに成功しています。しかし、残念ながら他のリソソーム酵素では 40~60%程度ですので、より効率のよい取り込みのために、M6P 型糖鎖を増加させることが必要です。

そこで、タンパク質に付加するアスパラギン型糖鎖を切断する加水分解酵素 (Endo- β -N-acetylglucosaminidase) を利用し、この逆反応を利用して M6P 型糖鎖を増やすことを考えました。そのために必要な酵素として、我々はメタノール資化性酵母株 *Ogataea minuta* にその活性を見だし、当該遺伝子を単離することができました。我々は、この酵素を endo-Om と命名しました。この酵素は、ヒトに見られる2分岐複合型糖鎖を切断する活性を有しており、酵母の仲間ではこれまで報告がない酵素のタイプでした。実際に、*Saccharomyces cerevisiae* や *Pichia pastoris* などの他の酵母では、該当する酵素活性は検出できませんでした。endo-Om の遺伝子をクローニングし、大腸菌と酵母で過剰発現系を構築して、Ni アフィニティーカラムで精製を行いました。諸性質を調べたところ、2分岐複合型糖鎖をドナー、pNP-グルコースをアクセプターとしてトランスグリコシレーション反応が起きることが確認できました。現在、サポシン B から糖鎖を切断してドナー基質を調製する一方、酵母で発現した α -ガラクトシダーゼをアクセプター基質として転移反応が進むか確認を進めています。



ファブリー病に対する酵素補充療法へのサポシン B の有用性について検討しています

明治薬科大学 臨床遺伝学講座、東京都医学総合研究所・分子医療プロジェクト

川島育夫

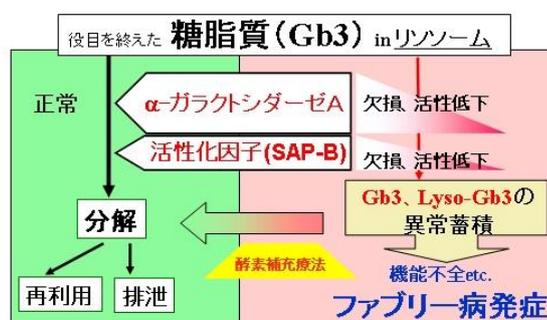
生体内で役目を終えたスフィンゴ糖脂質（糖鎖を有するセラミド）は、細胞内のリソソームに運ばれ、そこで種々の糖鎖分解酵素による逐次分解を受けて、再利用又は排泄されます。この糖鎖分解過程には、特異的な糖鎖分解酵素と、それに対応する活性化タンパク質の存在が必須であることが知られています。特異的な糖鎖分解酵素の活性や対応する活性化タンパク質の欠損により生じる疾病は、総称してスフィンゴ糖脂質蓄積症と言われ、分解されるべき糖脂質の細胞内への異常蓄積により、重篤な症状を発症します（図）。

スフィンゴ糖脂質蓄積症に分類されるファブリー病は、グロボトリアオシルセラミド（以下 Gb3 と略す、単糖を 3 つ持つセラミド）を分解する責任酵素・ α -ガラクトシダーゼ A が欠損、或いは活性の低下により生じる疾病で、分解基質である Gb3 が細胞内に異常蓄積し、様々な臨床症状を示す難治性遺伝病です。現在行われているファブリー病の根本的な治療は、組換えヒト α -ガラクトシダーゼ A を用いた酵素補充療法であり、多くの患者に効果的であると報告されていますが、長期投与で免疫応答等による副作用が発現し、当初期待された治療効果が得られないことがあります。

サポシン B は、リソソーム内で α -ガラクトシダーゼ A と共に働き、Gb3 の分解を促進するために必須な活性化タンパク質で、約 80 個のアミノ酸残基からなり、3 つのジスルフィド結合と糖鎖結合部位を有するコンパクトな糖タンパク質です。

酵素とサポシン B とを同時投与することで、酵素による Gb3 の分解活性を増強するため、*in vitro* の実験やファブリー病モデルマウス等を用いた基礎的実験を行っています。酵素とサポシン B との同時投与の有用性が確認されれば、今後の酵素補充療法に新たな展開が期待されます。

ファブリー病



図説：糖脂質グロボトリアオシルセラミド(Gb3)のリソソーム内の代謝。 α -ガラクトシダーゼ A の活性低下によりファブリー病が、SAP-B の欠損により異染性白質ジストロフィー様の症状を示す SAP-B 欠損症が起こる。

リソソーム酵素の精製と機能評価の方法を開発しました

徳島大学大学院 薬科学教育部 創薬生命工学分野

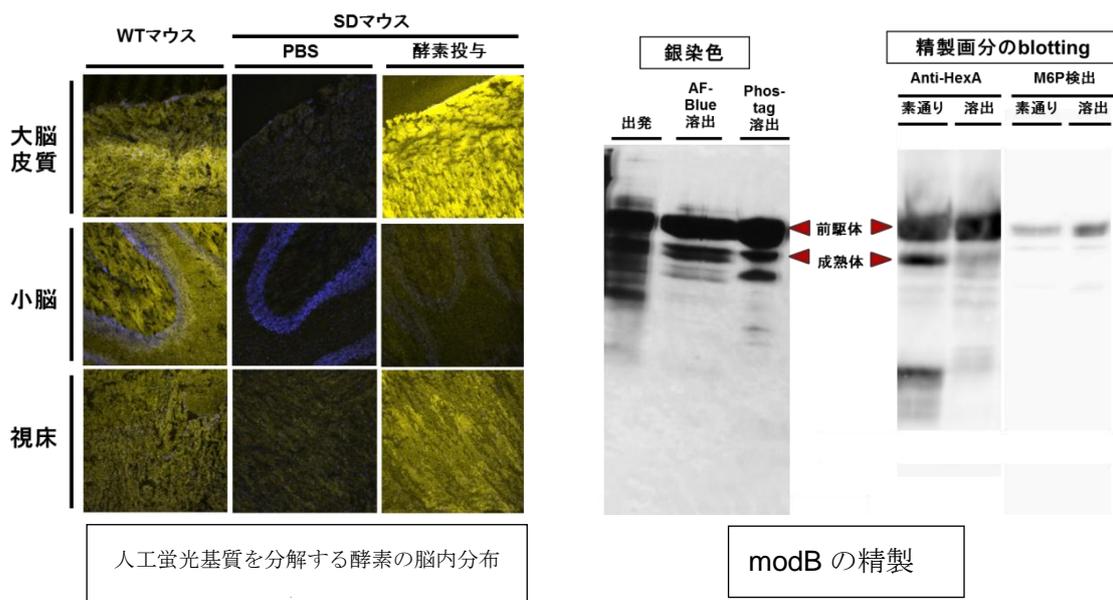
北風 圭介

糖脂質の一つである GM2 ガングリオシド(GM2)は、 α 鎖と β 鎖から構成される β -ヘキソサミニダーゼ A (HexA; $\alpha\beta$ ヘテロダイマー)によって分解されます。テイーサックス病とサンドホッフ病は、それぞれ α および β 鎖をコードする遺伝子の変異が原因で、GM2の脳内過剰蓄積を伴って発症するリソソーム病です。

演者らは、Hex β 鎖遺伝子(*Hexb*)のKOマウス(サンドホッフ病モデルマウス, SDマウス)に対して、機能改変型 HexB (modB)を投与する研究を行なっています。しかし、これまでに行われた解析手法はマウスの行動試験や生体内基質の解析などが中心で、投与した酵素の分布を調べることは困難でした。そこで、本研究では、新規に合成した人工蛍光基質を用い、酵素の分布を高感度に検出する方法を検討しました。その結果、脳脊髄液中に投与した modB は脳全体に分布していましたが、小脳への取込みがやや低いことが分かりました。

次に、演者らは、酵素に付加される糖鎖に着目しました。リソソーム酵素は、酵素に付加される末端マンノース6リン酸(M6P)型糖鎖と細胞のマンノース6リン酸受容体との相互作用により、細胞内に取り込まれます。そのため、M6P型糖鎖を豊富にもつ modB を獲得するための新たな酵素精製系を構築すれば、小脳への取り込み効率を上げることができると考えました。そして、新たな精製系を考案し、M6P型糖鎖をもつ modB を選択的かつ高収率で獲得することを可能にしました。

本研究で用いた解析系や精製系は、他のリソソーム酵素へも容易に応用できることから、多くのリソソーム病の研究や治療の発展に非常に有用だと考えられます。



ザンドホッフ病モデルマウス由来 iPS 細胞はニューロンに分化しにくいことを見つめました

明治薬科大学 薬理学教室

高田 昂、小川 泰弘、大石 一彦

ザンドホッフ病 (SD) は、*Hexb* 遺伝子の変異により GM2 ガングリオシドなどが主としてニューロンに蓄積し、進行性の神経障害を起こす遺伝病です。私たちは、*Hexb* 遺伝子をノックアウトしたマウス (SD モデルマウス) の細胞から iPS 細胞 (SD-iPS 細胞) を樹立しました。iPS 細胞は、ES 細胞 (胚性幹細胞) と同様な性質を持ち、体を構成する臓器や組織の細胞を作ることができる多能性幹細胞です。そこで、この SD-iPS 細胞を神経系の細胞に分化誘導したところ、アストロサイトへの分化比率は野生型のそれに比べて差がないものの、ニューロンへの分化比率が減少しました (図)。次に、このニューロンへの分化比率の減少が、*Hexb* 遺伝子の欠損によることを確かめるために、SD-iPS 細胞に *Hexb* 遺伝子を強制発現させたところ、ニューロンへの分化が回復しました。したがって、*Hexb* 遺伝子の欠損により、ニューロンへの分化能が低下することが明らかとなりました。

これらの知見は、SD-iPS 細胞から神経系への発生過程を *in vitro* で再現することで初めて明らかにすることができたもので、SD の病態解明や新たな創薬ターゲットの探索につながると期待されます。

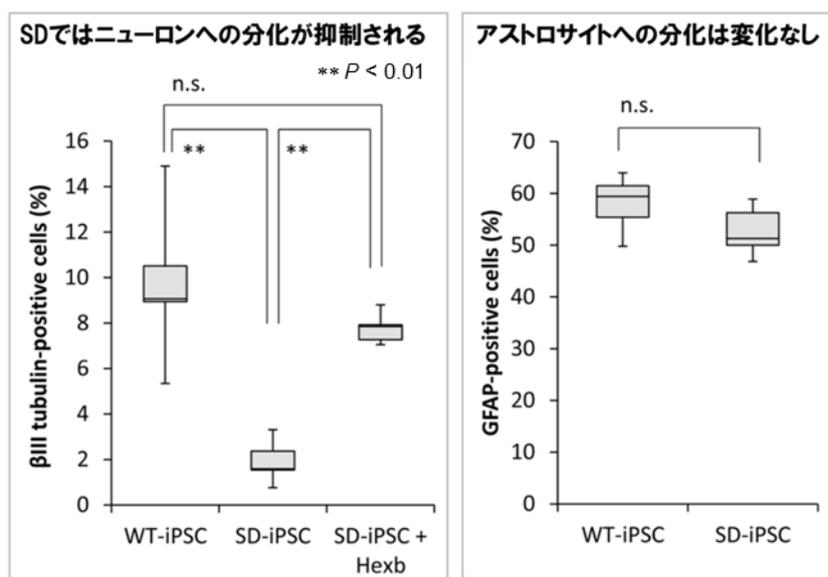


図 SDではニューロンへの分化能が低下している

α -L-イズロニダーゼの立体構造を明らかにしました

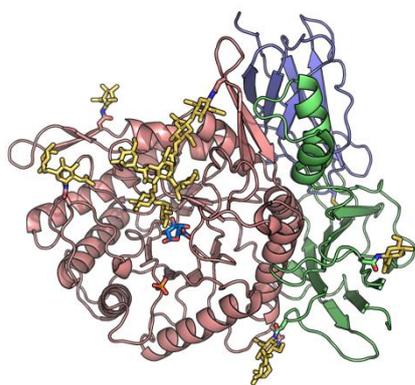
徳島大学 疾患酵素学研究センター

真板 宣夫

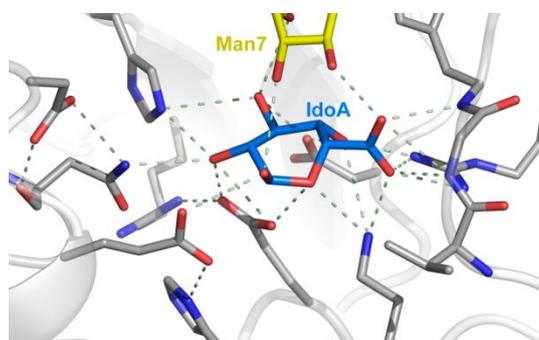
ムコ多糖症 I 型は、 α -L-イズロニダーゼという酵素の遺伝子に変異が起こることで発症する病気です。皮膚などに多く含まれるデルマトン硫酸と呼ばれる糖鎖がありますが、 α -L-イズロニダーゼはデルマトン硫酸中の末端のイズロン酸を切り離す活性を持っています。ムコ多糖症 I 型の治療には酵素補充療法が行われていますが、この病気の発症メカニズムを詳しく明らかにするためには、 α -L-イズロニダーゼの詳しい立体構造を明らかにすることが必要です。そのため、私たちは、 α -L-イズロニダーゼの結晶を作り、X線を当てて回折データを採り、立体構造を明らかにしました。

α -L-イズロニダーゼは、活性部位を含む TIM バレルと呼ばれる構造と、 β サンドイッチ構造およびイムノグロブリン様構造の 3 つの基本構造から構成されていました。 α -L-イズロニダーゼがどのようにイズロン酸を認識するか調べるために、イズロン酸と混合した状態での立体構造も明らかにすることが出来ました。

すると驚いたことに、イズロン酸はタンパク質とだけでなく、N型糖鎖とも相互作用していることが明らかになりました。N型糖鎖は、最も一般的なタンパク質の翻訳後修飾で、その役割はまだあまり解っていません。特に α -L-イズロニダーゼで見られた基質との相互作用はこれまでに報告がありませんでした。そこで糖鎖を切る処理をすると、糖鎖が切れる割合に応じて活性も下がっていくことが判りました。また、反応速度を詳しく解析すると、このN型糖鎖は基質を認識するだけでなく、活性にも影響を及ぼすことが明らかになりました。



α -L-イズロニダーゼの立体構造



活性部位に結合したイズロン酸

構造学的視点からファブリー病研究を進めています

明治薬科大学 分析化学教室・臨床遺伝学講座

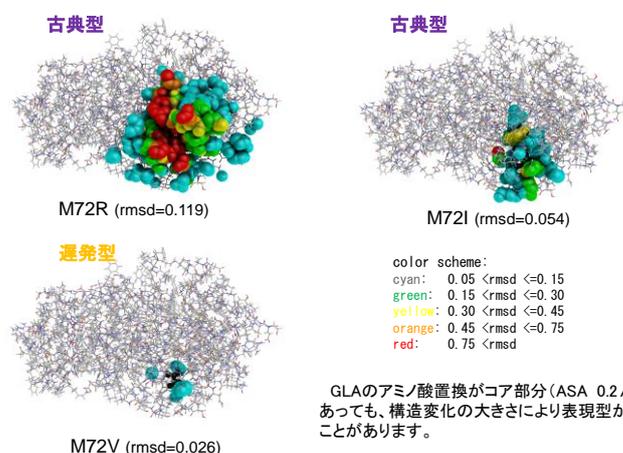
櫻庭 均 & 構造研究グループ

臨床遺伝学講座では、構造学的視点からファブリー病の研究を進めています。ファブリー病の原因となる α -ガラクトシダーゼ A (GLA) 遺伝子上の変異は、600 種類以上報告されています。その大部分を占めるのがミスセンス変異です。各種のミスセンス変異に基づく GLA のアミノ酸置換により、多様な臨床像の違いが生じます。我々は、各々のアミノ酸置換により、GLA 分子のどの位置にどんな構造変化が起こるのか、また、その変異を有する患者さんがどんな臨床像を示したかについて調べました。その結果、GLA のコア部分の異常や大きな構造変化により古典型ファブリー病が、GLA 表面近くの小さな構造変化により遅発型ファブリー病や機能的亜型が導かれる傾向があることがわかりました。また、同一部位の異常でも、アミノ酸置換の種類により、様々な構造変化や臨床像の違いが生じます (図)。

さらに、我々は、構造情報を利用して、ファブリー病の治療法開発を進めています。まず、分子設計により、 α -N-アセチルガラクトサミニダーゼ (NAGA) の 2 アミノ酸残基を置換した改変型 NAGA を作製しました。この新規酵素は、GLA としての酵素活性を持ち、ファブリー病患者由来の抗 GLA 抗体とは反応しませんでした。ファブリー病の患者さんは元々 NAGA を体内に持っているため、改変型 NAGA を繰り返し投与しても抗体を作りにくいと考えられます。この新規酵素は、抗体産生によるアレルギー性有害反応や効果減弱を起こし難い酵素補充療法治療薬として有望であると期待されます。また、我々は、低分子治療薬開発のため、酵素と低分子との分子間相互作用について物理化学的および構造学的解析を行い、基礎的情報を得ました。

構造学的解析は、ファブリー病の分子病態解明や治療法開発に大いに役立つと期待されます。

M72Iにおける変異と構造変化



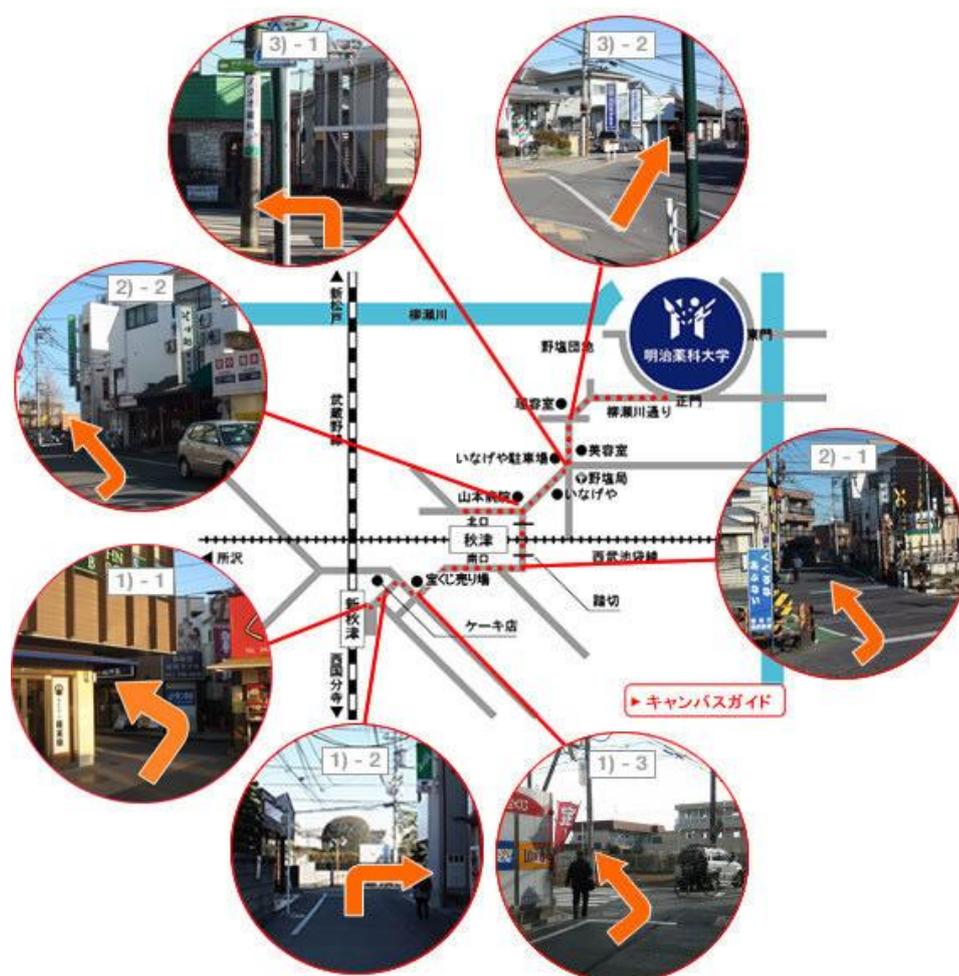
協力企業



genzyme

交通・アクセス

- ◆ 西武池袋線「秋津」駅下車・・・徒歩 12 分
- ◆ JR 武蔵野線「新秋津」駅下車・・・徒歩 17 分
- ◆ 西武池袋線「清瀬」駅からタクシー利用・・・約 10 分
- ◆ JR 武蔵野線「新秋津」駅からタクシー利用・・・約 10 分



明治薬科大学 臨床遺伝学講座

発行日 平成 25 年 3 月 5 日

発行元 明治薬科大学

〒204-8588

東京都清瀬市野塩 2-522-1

TEL: 042-495-8732