

「糖鎖の生物機能の解明と利用技術」

平成15年度採択研究代表者

伊藤 孝司

(徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・  
薬科学教育部附属医薬資源教育研究センター 教授)

「糖鎖機能を利用した組換えリソソーム酵素の脳内補充療法の開発」

## 1. 研究実施の概要

リソソーム病は、リソソーム性加水分解酵素の欠損とその基質の過剰蓄積を伴って発症する遺伝性代謝異常症である。本研究では、近年実用化されている糖鎖レセプターを介した酵素補充療法を、中枢神経障害を伴うリソソーム病の治療に応用することを目的として、糖鎖生合成の酵母変異株を用いてヒト型様糖鎖含有組換えリソソーム酵素の大量生産系を確立するとともに、リソソーム病における当該酵素遺伝子変異やX線結晶構造情報に基づく高度機能化酵素の分子デザインを行う。また血液脳関門透過能をもつ機能改変型酵素あるいは当該酵素を恒常発現する脳内侵入性細胞株を作製し、欠損症モデルマウスの中枢神経系由来不死化細胞株や個体に投与する際に、末梢血液中から脳実質内へ、またニューロンやグリア細胞内へと酵素を送達するための新技術を開発する。これまでに活性型 $\beta$ -ヘキサミンダーゼ ( $\beta$ -Hex) を恒常発現・分泌する酵母変異株の作製、脳標的化ペプチドの同定、 $\beta$ -Hex欠損症モデルマウス由来の中枢神経系構成細胞株の樹立、さらにバイオインフォマティクスを用いた $\beta$ -Hexアイソザイムの分子モデリングに成功している。今後これらの知見を統合しつつ、高機能化組換え $\beta$ -Hexの脳内補充技術を確立し、将来はこの技術をリソソーム病のみならず脳神経疾患の分子補充療法に応用していきたいと考えている。

## 2. 研究実施体制

徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部

薬科学教育部附属医薬資源教育研究センター・創薬生命工学グループ

① 研究分担グループ長：伊藤 孝司（徳島大学大学院・薬科学教育部、教授）

② 研究項目：Sandhoff病 ( $\beta$ -ヘキサミンダーゼ $\beta$ -サブユニット欠損症) モデル

マウスの中枢神経系への酵素補充効果の評価システムの構築

$\beta$ -ヘキサミンダーゼ ( $\beta$ -Hex) の遺伝的欠損とGM2ガングリオシド (GM2) の脳内蓄積および中枢神経障害を伴って発症するGM2ガングリオシドーシスの治療法の開発を目的として、 $\beta$ -Hex $\beta$ 鎖の欠損症であるSandhoff病の疾患モデルマウス (SDマウス) を研究対象に下記の項目を検討中である。

1. ヒトおよびマウス $\beta$ -Hexを構成する $\alpha$ および $\beta$ 鎖遺伝子を各々単独および同時に恒常発現する哺乳類細胞株の樹立

当該遺伝子を発現するチャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO）株を樹立し、分泌・活性型の各組換え $\beta$ -Hexアイソザイムの単離を可能にした。

2. SDマウス由来の中樞神経系構成細胞株の樹立

SDマウス（胎児・新生児）脳の初代培養系に、SV40 T抗原等の不死化遺伝子を導入して細胞株の作製を試み、Nestin陽性のグリア前駆細胞株を樹立した。細胞表面にマンノース-6-リン酸レセプターの発現を確認し、1. で得た組換え $\beta$ -Hexアイソザイムの補充効果を検討中である。

3. 遺伝子改変に基づくヒトおよびマウスの $\alpha$ および $\beta$ 鎖間相互作用の解析

セレストラ社との共同で、ヒト $\beta$ -HexB（ $\beta\beta$ ホモダイマー）のX線結晶構造に基き、ヒトおよびマウスの $\alpha$ および $\beta$ 鎖間の相互作用の違いを予測し、アミノ酸置換型遺伝子の発現実験により活性型のキメラHexA（ $\alpha\beta$ ヘテロダイマー）の発現を検討している。

4. 組換え $\beta$ -Hexの高度機能化のためのタグ融合タンパク質遺伝子の構築と発現

機能性ペプチド融合 $\beta$ -Hex作製の前段階として、ヒトおよびマウスの $\beta$ 鎖のNまたはC末端にタグ配列を連結した融合タンパクをコードする遺伝子をCHO細胞に導入したところ、活性型のタグ融合 $\beta$ -HexBの発現が観察された。

5. マウス $\beta$ -Hexの $\alpha$ および $\beta$ 鎖遺伝子を発現・分泌する脳侵入性ミクログリア細胞株の樹立

藤田保健衛生大で樹立された脳侵入性ミクログリア細胞株に、マウス $\beta$ -Hexの $\alpha$ および $\beta$ 鎖遺伝子を同時に導入するために、組換えレンチウイルスベクターを作製中である。

#### 産業技術総合研究所・糖鎖工学研究センターグループ

- ① 研究分担グループ長：地神 芳文（産業技術総合研究所・糖鎖工学研究センター、センター長）

- ② 研究項目：メタノール資化性酵母によるリソソーム酵素の発現系の構築

1. ヒト $\beta$ -Hex  $\alpha$ および $\beta$ 鎖遺伝子を各々単独発現するメタノール資化性酵母変異株の樹立

より高い生産能を持つメタノール資化性酵母*Ogatae minuta*にヒト $\alpha$ および $\beta$ 鎖遺伝子をそれぞれ単独で導入し、異なる人工基質に対し各々分解活性を示す、活性型HexS（ $\alpha\alpha$ ）およびHexB（ $\beta\beta$ ）が分泌されることを明らかにした。それぞれについて精製法を検討し、抗体作製用の抗原として用いる予定である。

2. ヒト $\beta$ -Hex  $\alpha$ および $\beta$ 鎖遺伝子を同時発現するメタノール資化性酵母株の樹立

1. で得たヒト $\beta$ -Hex  $\alpha$ 鎖単独発現株にさらに $\beta$ 鎖遺伝子を導入して、両者を共発現させる酵母株を作製した。これらの遺伝子産物より構成される活性型HexA（ $\alpha\beta$ ）、HexS（ $\alpha\alpha$ ）およびHexB（ $\beta\beta$ ）が分泌された。GM2ガングリオンド分解能をもつHexAについて

でも精製条件を検討中である。

### 3. ヒト $\beta$ 鎖前駆体と成熟体を識別するペプチド抗体の作製

セレスター社との共同で分子モデルに基き $\beta$ 鎖前駆体と成熟体を識別できるペプチド配列を予測し、合成ペプチドに対するウサギポリクローナル抗体を作製した。イムノブロットにおいて、ヒト $\beta$ 鎖の前駆体と成熟体の両者と反応するポリクローナル抗体が得られた。

## 東京都臨床医学総合研究所・臨床遺伝学研究部門グループ

① 研究分担グループ長：桜庭 均（東京都臨床医学総合研究所・臨床遺伝学研究部門、部長）

② 研究項目：神経難病の分子病態解明と疾患関連特異抗体群の作製

### 1. Tay-Sachs 病および Sandhoff 病の分子病態の解明

$\beta$ -HexAの $\alpha$ および $\beta$ 鎖の遺伝子異常によって起こる、それぞれTay-Sachs病およびSandhoff病の日本人患者由来の培養線維芽細胞を試料として生化学的分析を行い、それぞれにおける責任蛋白質の異常とGM2ガングリオシドの蓄積との相関を明らかにした。またセレスター社との共同研究により、各々の遺伝子変異が発現産物（酵素）の立体構造に及ぼす影響をホモロジーモデリングで予測し、生化学的分析結果と比較検討した。

### 2. ヒト $\beta$ -HexAの $\alpha$ および $\beta$ 鎖の分子表面領域のオリゴペプチドに対するポリクローナル抗体の作製（セレスター社との共同研究）

ヒト $\beta$ -Hexの $\alpha$ および $\beta$ 鎖の分子モデルから、抗体産生に適すると考えられる分子表面のペプチド領域を予測し、それぞれに相当するオリゴペプチドを合成した。これらをウサギに免疫し、イムノブロットでヒト $\beta$ 鎖と特異的に結合するポリクローナル抗体を得た。

### 3. Sandhoff病モデルマウスからの培養Schwann細胞株の作製

SDマウスの後根神経節からほぼ純粋なSchwann細胞を単離し、継代培養を行うことにより不死化細胞株を樹立した。これらは、Schwann細胞マーカー陽性で、細胞質内に顆粒状にGM2ガングリオシドの蓄積を認めた。この細胞株は、Sandhoff病の末梢神経系のモデルとして病態解明や治療実験に使用できると考えられる。

## 藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・難病治療研究部門グループ

① 研究分担グループ長：澤田 誠（藤田保健衛生大学・総合医科学研究所、教授）

② 研究項目：脳標的化ペプチドおよび脳特異的侵入性細胞を用いた脳への酵素導入と血液脳関門透過機能の検討

### 1. 脳標的化ペプチドを提示するファージの脳内移行性の検討

脳標的化ペプチドを提示するM13ファージをアイソトープ標識シラットに投与した結果、有意な脳移行活性が観察された。またM13ファージに対するモノクローナル抗

体を作製し、pIIIタンパクに反応性を持つ抗体が得られた。

## 2. リポソームへの脳標的化ペプチドの付加

組成の異なる脳標的化リポソームを作成してマウスに投与し、活性や毒性について検討し、脂質としてDOTAPを、ミセル化剤としてPEGを用いたハイブリッド型リポソームが有用であることを明らかにした。またPEGへの脳標的化ペプチドの結合に関してはPEGマレイミドが有効であることが判った。

マウス脳血管内皮細胞株 (MBEC4) を用いた人工血液脳関門モデル系で、直鎖状の脳移行性ペプチドでは有意な内皮細胞層透過が観察されないことが確認された。

セレスター・レキシコ・サイエンシズ (株) 幕張R&Dセンターグループ

① 研究分担グループ長：土居 洋文 (セレスター・レキシコ・サイエンシズ社、代表取締役)

② 研究項目：3次元構造情報に基づく $\beta$ -Hexサブユニット間相互作用の解析と機能改変酵素分子のデザイン

### 1. 酵素分子の構造モデルの構築とサブユニット間相互作用の解析

X線結晶解析で決定されたHexB ( $\beta\beta$ ホモダイマー) の立体構造から、ホモロジーモデリングの手法を用いて、 $\alpha$ -サブユニット単量体の構造モデルを作成すると共にHexA ( $\alpha\beta$ ヘテロダイマー) およびHexS ( $\alpha\alpha$ ホモダイマー) の二量体構造モデルを構築した。構築した二量体構造モデルをHexBと比較した結果、3種類のアイソザイムに共通に存在する二量体形成に必須と考えられるアミノ酸残基を特定することができた。

### 2. 構造モデルに基づく分子病態解析 (東京都臨床研との共同研究)

Tay-Sachs病およびSandhoff病の日本人患者で同定された遺伝子変異が酵素の立体構造に与える影響について解析するため、各遺伝子変異に基づいて該当するアミノ酸残基を置換した変異体の構造モデルを構築した。

### 3. 酵素の機能改変方法の検討

HexAの安定化を目指した *in silico*での酵素の機能改変方法として、1. で特定したサブユニット間での二量体形成に関与するアミノ酸残基の中で、各アイソザイムに固有のアミノ酸残基を他の残基に置換し、置換した残基の周辺構造に対してエネルギー最小化計算を行うことによって二量体の状態での構造安定性を評価する手法について検討した。