

「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創薬生命工学分野 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

リソソーム酵素のリソソームへの輸送には、酵素に付加される特異的な糖鎖構造の認識機構が重要な役割を果たしている。近年、組換え酵素の糖鎖と標的細胞表面に存在する糖鎖レセプターとの結合及び細胞内取り込みを利用した酵素補充療法が、リソソーム病（リソソーム酵素欠損症）の根本治療法として実用化されている。本研究では、中枢神経障害を伴うリソソーム病の治療への応用を目指して、糖鎖生合成に関する酵母変異株を用いたヒト型様糖鎖含有組換えリソソーム酵素の大量生産系の確立とリソソーム病の分子病態を基盤とした高機能化酵素のデザインを行う。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・分泌する脳内侵入性細胞株を作製して欠損症モデルマウスの神経系構成培養細胞株や個体に投与し、末梢血管から脳実質内へ、またニューロン及びグリア細胞内へと酵素を送達するための技術開発と評価を進めている。これまでに活性型 $\beta$ -ヘキササミニダーゼ (Hex) アイソザイムを恒常発現・分泌する酵母変異株の作製、脳標的化ペプチドの同定とコンジュゲートタンパク質及び正常マウス骨髄由来前駆細胞の脳内移行、Hex欠損モデルマウス由来の不死化グリア前駆細胞株、初代ミクログリア及び骨髄間葉系幹細胞の樹立、さらにHexアイソザイムの分子モデリングに基づく酵素機能の改変に成功している。今後はHex欠損モデルマウスを用いた、神経系構成細胞の糖鎖レセプターシステムの解明と脳標的化ペプチド-Hexコンジュゲートあるいは融合タンパク質の脳内移行能を検討していく予定である。

## 2. 研究実施内容

### 【研究目的】

中枢神経障害を伴うリソソーム病の酵素補充療法の開発を目指して、GM2-ガングリオシドーシスであるTay-Sachs病 (Hex $\alpha$ 欠損症) 及びSandhoff病 (Hex $\beta$ 鎖欠損症) を対象として、酵母発現系を用いた組換えHexアイソザイムの大量生産システムの確立、疾患の分子病態解析に基づくHex分子モデルの構築と高機能化分子のデザイン、血液脳関門透過性ペプチド配列の探索と脳標的化技術の開発及びSandhoff病モデルマウス (SDマウス) 由来の神経系

培養細胞を用いた酵素補充及び治療効果の評価を行う。

#### 【研究方法】

1. ヒトHexBのX線結晶構造を基に、HexAアイソザイム ( $\alpha\beta$ ヘテロダイマー) の分子モデルを構築し、国内外のTay-Sachs病及びSandhoff病患者で同定された遺伝子変異による構造変化を解析し、基質認識及びサブユニット間相互作用に及ぼす影響を予測した。
2. HexA分子モデルとホモロジー解析から、各サブユニットの分子表面に存在するエピトープを予測し、各々を特異的に認識する抗ペプチド抗体を作製した。
3. 糖鎖生成に関するメタノール資化酵母変異株にヒトHex $\alpha$ 及び $\beta$ 鎖遺伝子を同時に導入し、ヒト型様糖鎖構造をもつ組換えHexAを大量生産・精製し、糖鎖構造の改変と補充効果との相関を検討する。
4. SDマウス由来の神経系構成細胞の培養モデル系を構築するため、不死化グリア前駆細胞株、シュワン細胞株、初代ミクログリア等を樹立・調製した。またヒトHexAを恒常発現・分泌するCHO細胞株の培養上清から組換え酵素を分離し、培養系での補充効果を検討した。
5. 脳標的化ペプチドをビオチン-アビジン高分子複合体上に提示させ、酵素タンパク質や人工担体 (金属ナノ粒子) とのコンジュゲートを作製し、人工血液脳関門モデル系や実験動物における脳移行性を検討し、最適化を行う。

#### 【結果・結論】

1. ヒトHexBの構造情報を基に、HexA及びHexS ( $\alpha\alpha$ ホモダイマー) の分子モデルを構築し、サブユニット間相互作用に関与するアミノ酸残基を特定し、Hex欠損症患者で同定されたアミノ酸置換型変異の構造に及ぼす影響と、またエネルギー最小化計算によりHexAを安定化するための人為的アミノ酸置換の候補を予測することができた。
2. 分子モデルから予測されたヒトHex $\alpha$ 及び $\beta$ サブユニットの各々に特異的なエピトープ (ペプチド配列) 識別する、抗ペプチド抗体の作製に成功した。また $\beta$ サブユニットの前駆体から成熟体へのプロセスに伴い変動するエピトープを認識する抗ペプチド抗体を作製した。
3. ヒトHex $\alpha$ 及び $\beta$ 鎖遺伝子を同時導入したメタノール資化酵母 *Ogatae minuta* 株から約 6.4mg/Lの組換えHexが産生されることを明らかにした。また部分精製したHexAアイソザイムは *in vitro* で天然基質であるGM2ガングリオシドを分解することが示された。
4. ビオチン-アビジン高分子複合体上に提示した脳移行性ペプチドと、酵素タンパク質 (抗体分子、GFP等) や金属ナノ粒子とのコンジュゲートが人工血液脳関門モデル系および正常マウスにおいて脳移行性を示すことを明らかになった。また脳移行配列を組み込んだ発現ベクターを作成し、EGFP、アザミグリーン等の組換え融合タンパク質を作製したところ、脳移行活性が再現された。
5. SDマウス由来の不死化グリア前駆細胞株、シュワン細胞株、初代ミクログリア等を樹

立・調製に成功した。遺伝子導入CHO細胞株由来の組換えヒトHexAは、グリア前駆細胞株及びシュワン細胞株では細胞表面に存在するカチオン非依存性マンノース-6-リン酸レセプター（P型レクチン）を介して、またミクログリアでは加えてマンノースレセプター（C型レクチン）を介して細胞内に取り込まれ、蓄積しているGM2及びGlcNAc-oligosaccharideを分解し、酵素補充効果が示された。

6. 正常マウスの骨髄から、脳移行性を示す前駆細胞を分離した。またSDマウスの骨髄から間葉系幹細胞を樹立し、JAK inhibitor等の共存下で、神経様細胞に分化誘導することに成功した。

今後は、これらの知見を統合し、神経系モデルやSDマウスを用い、大量生産・精製した組換えヒトHexAの神経系構成細胞や脳内への補充・治療効果を検討するとともに、脳内へのHexAのデリバリーを最適化できるよう、技術改良を進めていく。

### 3. 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 グループ

- ①研究分担グループ長：伊藤 孝司（徳島大学薬科学教育部附属医薬資源教育研究センター・創薬生命工学分野、教授）
- ②研究項目：Sandhoff病（ $\beta$ -ヘキソサミニダーゼ  $\beta$ -サブユニット欠損症）モデルマウスの中樞神経系への酵素補充効果の評価システムの構築
  1. CHO細胞株由来の組換えヒトHexAアイソザイム酵素補充効果の解析
  2. マウス*Hexb*（ $\beta$ 鎖）遺伝子の組換えレンチウイルスの作製とSDマウス脳由来細胞への遺伝子導入効果の検討
  3. SDマウスの発症過程における脳内ケモカインの発現変動解析
  4. SDマウス由来の骨髄間葉系幹細胞の樹立と神経細胞への*in vitro*分化誘導系の確立
  5. ヒト及びマウスHexサブユニット間相互作用の解析

#### 産業技術総合研究所 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・糖鎖生合成チーム、センター長）
- ②研究実施項目：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. 組換えヒトHexAの大量生産と精製条件の検討
  2. 組換えヒトHexアイソザイムの*in vitro*系における基質分解能の解析
  3. 酵母におけるHexサブユニットのプロセッシング機構の解析とプローブの作製

### 東京都臨床医学総合研究所 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研究実施項目：

1. 構造生物学的分析によるTay-Sachs病およびSandhoff病の分子病態の解明
2. 疾患責任酵素の立体構造情報を基にした特異抗体の作製とその評価
3. Sandhoff病モデルマウス由来培養Schwann細胞への組み換えヘキソサミニダーゼの取り込みについての解析
4. 脳移行性ペプチドを付加したグルコセレブロシダーゼの人工脳血管系細胞の通過についての解析

### 藤田保健衛生大学（現：名古屋大学） グループ

①研究分担グループ長：澤田 誠（名古屋大学・環境医学研究所・脳生命科学部門、教授）

②研究実施項目：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. 能移行型ペプチドコンジュゲートの作製と機能解析
2. 能標的化タグ（BT tag）融合タンパク質の発現と機能解析
3. 脳内侵入性骨髄前駆細胞の同定と分離

### セレスター・レキシコ・サイエンシズ株式会社 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・サイエンシズ株式会社、代表取締役社長）

②研究実施項目：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. Hex酵素分子の構造モデルの構築
2. 構造モデルに基づくHex欠損症の分子病態解析
3. ヒト及びマウスHexサブユニット間相互作用の解析
4. 高機能化HexA酵素分子の設計

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

(1) 論文（原著論文）発表

徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部

○ Itoh, K\*, Satoh, Y., Kadota, Y., Oheda, Y., Kuwahara, Y., Shimmoto, M., Sakuraba, H.

Expression of lysosomal protective protein/cathepsin A in a stably transformed human neuroblastoma cell line during bi-directional

differentiation into neuronal and Schwannian cells.

*Neurochem. Int.*, 44, 447-457, 2004

- Satoh, Y., Kadota, Y., Oheda, Y., Kurwahara, J., Aikawa, S., Matsuzawa, F., Doi, H., Aoyagi, T., Sakuraba, H., Itoh, K\*.  
Microbial serine carboxypeptidase inhibitors - comparative analysis of actions on homologous enzymes derived from man, yeast and wheat -.  
*J. Antibiot.*, 57, 316-325, 2004
- Ishiwatari, K., Kotani, M., Suzuki, M., Pumbo, E., Suzuki, A., Kobayashi, T., Ueno, T., Fukushige, T., Kanzaki, T., Imada, M., Itoh, K., Akioka, S., Tajima, Y., Sakuraba, H.  
Clinical, biochemical, and cytochemical studies on a Japanese Salla disease case associated with a renal disorder.  
*J. Hum. Genet.*, 49, 656-663, 2004
- Tsuji, D., Kuroki, A., Ishibashi, Y., Itakura, T., Kuwahara, J., Yamanaka, S., Itoh, K\*.  
Specific induction of macrophage inflammatory protein 1-alpha in glial cells of Sandhoff disease model mice associated with accumulation of N-acetylhexosaminyl glycoconjugates.  
*J. Neurochem.*, 92, 1497-1507, 2005

#### 東京都臨床医学総合研究所

- Sakuraba, H. ,\* Matsuzawa, F. , Aikawa, S. , Doi, H. , Kotani, M. , Nakada, H. , Fukushige, T. , Kanzaki, T. : Structural and immunocytochemical studies on  $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase deficiency (Schindler/Kanzaki disease). *J. Hum. Genet.* , 49 : 1-8, 2004
- Hermans, M. M. P. , van Leenen, D. , Kroos, M. A. , Beesley, C. E. , Van der Ploeg, A. T. , Sakuraba, H. , Wevers, R. , Kleijer, W. , Michelakakis, H. , Kirk, E. P. , Fletcher, J. , Bosshard, N. , Basel, L. , Besley, G. , Reuser, A. J. J. : Twenty two novel mutations in the lysosomal  $\alpha$ -glucosidase gene (*GAA*) underscore the genotype-phenotype correlation in glycogen storage disease type II. *Hum. Mut.* , 23 : 47-56, 2004
- Itoh, K. , Satoh, Y. , Kadota, Y. , Oheda, Y. , Kuwahara, J. , Shimamoto, M. , Sakuraba, H. : Expression of lysosomal protective protein/cathepsin A in a stably transformed human neuroblastoma cell during bi-directional differentiation into neuronal and Schwannian cells. *Neurochem. Int.* , 44 : 447-457, 2004

- Kotani, M. , Yamada, H. , Sakuraba, H.\* : Cytochemical and biochemical detection of intracellularly accumulated sialyl glycoconjugates in sialidosis and galactosialidosis fibroblasts with *Maackia amurensis*. *Clin. Chim. Acta*, 344 : 131-135, 2004
- Sato, B. S. , Ishii, K. , Makino, A. , Iwabuchi, K. , Yamaji-Hasegawa, A. , Satoh, Y. , Nagaoka, I. , Sakuraba, H. , Kobayashi, T. : Distribution and transport of cholesterol-rich membrane domains monitored by a membrane-impermeant fluorescent poly ethylene glycol-derivatized cholesterol. *J. Biol. Chem.* , 279 : 23790-23796, 2004
- Satoh, Y. , Oheda, Y. , Kadota, Y. , Kuwahara, J. , Aikawa, S. , Matsuzawa, F. , Doi, H. , Aoyagi, T. , Sakuraba, H. , Itoh, K. : Microbial serine carboxypeptidase inhibitors—Comparative analysis of actions on homologous enzymes derived from man, yeast and wheat. *J. Antibiotics.* , 57 : 316-325, 2004
- Motegi, A. , Fujimoto, J. , Kotani, M. , Sakuraba, H. , Yamamoto, T : ALK receptor tyrosine kinase promotes cell growth and neurite outgrowth as revealed by an agonist anti-ALK monoclonal antibody. *J. Cell Sci.* , 117 : 3319-3329, 2004
- Hoshikawa, M. , Kase, R. , Tadokoro, M. , Sakuraba, H. , Sakiyama, T. : Long-term expressed human  $\alpha$ -galactosidase A in tissues of HaG transgenic mice. *Pediatr. Int.* , 46 : 673-677, 2004
- Ishiwari, K. , Kotani, M. , Suzuki, M. , Pumbo, E. , Suzuki, A. , Kobayashi, T. , Ueno, T. , Fukushige, T. , Kanzaki, T. , Imada, M. , Itoh, K. , Akioka, S. , Tajima, Y. , Sakuraba, H.\*: Clinical and biochemical studies on a Japanese Salla disease case associated with a renal disorder. *J. Hum. Genet.* , 49 : 656-663, 2004
- Kanekura, T. , Sakuraba, H. , Matsuzawa, F. , Aikawa, S. , Doi, H. , Hirabayashi, Y. , Yoshii, N. , Fukushige, T. , Kanzaki, T. : Three dimensional structural studies of  $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase ( $\alpha$ -NAGA) in  $\alpha$ -NAGA deficiency (Kanzaki disease): Different gene mutations cause peculiar structural changes in  $\alpha$ -NAGAs resulting in different substrate specificities and clinical phenotypes. *J. Dermatol. Sci.* , 37 : 15-20, 2005

#### 藤田保健衛生大学（現：名古屋大学）

- Adachi, K., Yimin, Y., Satake, K., Matsuyama, Y., Ishiguro, N., Sawada, M., Hirata, Y., Kiuchi, K. (2005). Localization of cyclooxygenase-2 induced following traumatic spinal cord injury. *Neurosci. Res.* 51(1): 73-80.
- Himeda, T., Ohara, Y., Asakura, K., Kontani, Y., Murakami, M., Suzuki, H., Sawada, M. (2005). A lentiviral expression system demonstrates that L (\*) protein of Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV) is essential for virus growth in a murine macrophage-like cell line. *Virus Res.* 108(1-2): 23-28.
- Ueyama, T., Lennartz, MR., Noda, Y., Kobayashi, T., Shirai, Y., Rikitake, K., Yamasaki, T., Hayashi, S., Sakai, N., Seguchi, H., Sawada, M., Sumimoto, H., Saito, N. (2004) Superoxide production at phagosomal cup/phagosome through beta I protein kinase C during Fc gamma R-mediated phagocytosis in microglia. *J Immunol.* 173(7): 4582-9.

#### セレスター・レキシコ・サイエンシズ株式会社

- Satoh, Y., Kadota, Y., Oheda, Y., Kurwahara, J., Aikawa, S., Matsuzawa, F., Doi, H., Aoyagi, T., Sakuraba, H., Itoh, K\*. Microbial serine carboxypeptidase inhibitors - comparative analysis of actions on homologous enzymes derived from man, yeast and wheat -. *J. Antibiot.*, 57, 316-325, 2004
- Sakuraba, H.,\* Matsuzawa, F., Aikawa, S., Doi, H., Kotani, M. , Nakada, H., Fukushige, T. , Kanzaki, T. : Structural and immunocytochemical studies on  $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase deficiency (Schindler/Kanzaki disease). *J. Hum. Genet.* , 49 : 1-8, 2004
- Satoh, Y. , Oheda, Y. , Kadota, Y. , Kuwahara, J. , Aikawa, S. , Matsuzawa, F. , Doi, H. , Aoyagi, T. , Sakuraba, H. , Itoh, K. : Microbial serine carboxypeptidase inhibitors—Comparative analysis of actions on homologous enzymes derived from man, yeast and wheat. *J. Antibiotics* , 57, 316-325, 2004
- Kanekura, T. , Sakuraba, H. , Matsuzawa, F. , Aikawa, S., Doi, H., Hirabayashi, Y., Yoshii, N. , Fukushige, T. , Kanzaki, T. : Three dimensional structural studies of  $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase ( $\alpha$ -NAGA) in  $\alpha$ -NAGA deficiency (Kanzaki disease): Different gene mutations cause peculiar structural changes in  $\alpha$ -NAGAs resulting in different substrate specificities and clinical phenotypes. *J. Dermatol. Sci.* , 37 : 15-20,

2005

(2) 特許出願

H16年度特許出願件数：4 件 (CREST研究期間累積件数：4件)