

日本人ムコリピドーシスⅡ/Ⅲの遺伝子解析

分担研究者：酒井 規夫(大阪大学大学院医学系研究科 小児科学講座)

研究要旨

ムコリピドーシスⅡ/Ⅲ型はリソソーム病の一つであり、著明な骨病変、心弁膜症、神経症状を来す疾患である。我々はこの3年間において日本人患者40名について原因遺伝子GNPTAG, GNPTGの遺伝子解析を行ない、自然歴調査によって臨床病型との関連をまとめた。また培養皮膚線維芽細胞を用いて、Inclusion bodyの形成にオートファジーの亢進が関与しており、ミトコンドリア機能障害が病態に関わっていることを示した。

A. 研究目的

- 1) ムコリピドーシスⅡ/Ⅲの遺伝子解析；日本における遺伝子変異を解明し、表現型との関連を調べることを目的とした。
- 2) ムコリピドーシスⅡ/Ⅲ (MLⅡ/Ⅲ)の患者の培養皮膚線維芽細胞においてリソソームが本質的に関わるオートファジーが病態にどのように関与するかを調べることを目的とした。

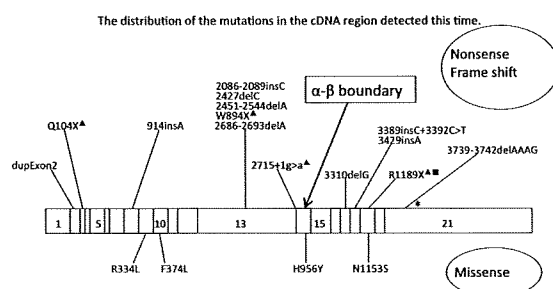
B. 研究方法

- 1) 患者40人について、培養皮膚線維芽細胞からRNAを抽出し、RT-PCR法により遺伝子の増幅を行い、GNPTAG遺伝子の全翻訳領域を塩基配列決定を行った。GNPTAGに変異の見つからない症例に関してはGNPTGの解析も行なった。
- 2) MLⅡ/Ⅲの培養皮膚線維芽細胞を用いたオートファジーのマーカー蛋白の評価をMLⅡ1名、MLⅢ1名と正常対照の皮膚線維芽細胞の蛋白を用いてWestern blotによって評価した。培養皮膚線維芽細胞をオートファジーマーカーで免疫染色して細胞内局在の評価を行なった。ミトコンドリアの形態、機能の解析を行い、オートファジーの阻害剤である3-MAの処理

でどのように変化するか観察した。

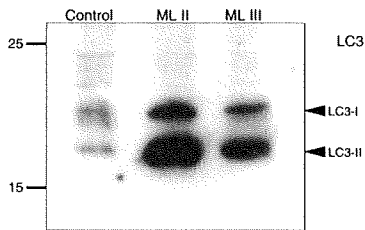
C. 研究結果

- 1) I-cell病患者25名とやや軽症でMLⅢと考えられる患者15名に関して、GNPTAG遺伝子の変異を解析し、14の新規変異を含む18種類の変異を同定した。変異を認めなかった症例に関してはGNPTGについても解析したが変異は見いだされなかった。日本人における変異も停止コドン、frame shiftが大半であり、なかでもR1189X変異はアリアル頻度で41%に及ぶと考えられ、日本人に最も多い変異と考えられる。またいくつかのミスセンス変異はMLⅢに見いだされ、片方でもこの変異の場合表現型が軽症となると考えられた。

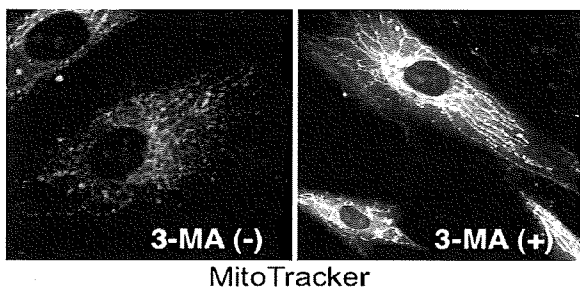


NEW mutation / Previously reported mutation by Korean[▲] and Israeli[■] group

- 2) オートファジーのマーカー蛋白 LC3は ML II/ III 細胞でともに著明な増加を認めたが、 beclin-1 の変化は認めなかった。



Lysotracker でリソソームが染色されるが、 Inclusion body と思われるものの中に LC3 に染色される特に大きなベジクルがオートファジーと考えられた。mitotracker 染色によりミトコンドリアの形態が正常に比して、 ML II/ III 細胞において分断化していることが観察された。またオートファジーの阻害薬 3-MG の処理により、この患者細胞における形態変化が著しく改善することを観察した。



D. 考 察

ムコリピドーシスは典型的なものが II 型 (I-cell 病)、軽症のものが III 型と呼ばれるが、GPTAB 遺伝子の変異はその両者に見られ、日本人においても停止コドン、frame shift 変異が多いことが判明した。また F374L, dup ex2 などの変異を持つ場合には比較的軽症の III 型になると考えられ、予後推定にも役立つと考えられる。ムコリピドーシスにおいてオートファジーが亢進していることが示唆された。Inclusion body と言われていた膨大化したリソソームと思われていたベジクルの一部は巨大なオートファゴソームであることが示された。またこのオートファジーの亢進に伴い、ミトコンドリアの形態及び機能が障害されていることが初めて示され、これがオートファジーを阻害するこ

とにより改善することが示されることより、今後の治療法の開発に重要な知見と考えられる。

E. 結 論

本研究において日本人における大多数のムコリピドーシス患者の変異の情報が解明され、遺伝子型表現型の相関関係が明らかになった。これから遺伝子診断の実施が確定診断のみならず、病型診断にも役立つと考えられる。I-cell 病の名前のもとになった Inclusion がリソソームのみならず、膨大したオートファゴソームを含むことが判明し、またこの存在がミトコンドリア機能に影響を及ぼすことにより細胞機能の障害を来している可能性が示された。今後は更に治療に向けた研究をこれらの成果の上におすすめしたい。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Otomo T, Muramatsu T, Sakai N et al. : Mucopolidosis II and III alpha/beta: mutation analysis of 40 Japanese patients showed genotype phenotype correlation, *J Hum Genet*, 54(3) : 145-51, 2009
- 2) Araya K, Sakai N, Mohri I, et al. : Localized donor cells in brain of a Hunter disease patient after cord blood stem cell transplantation., *Mol Genet Metab*, 98(3) : 255-63, 2009.11
- 3) Otomo T, Higaki K, Sakai N. et al. : Inhibition of autophagosome formation restores mitochondrial function in mucopolidosis II and III skin fibroblasts., *Mol Genet Metab*, 98(4) : 393-9, 2009.12.
- 4) Sakai N : Pathogenesis of leukodystrophy for Krabbe disease: molecular mechanism and clinical treatment., *Brain Dev*, 31(7) : 485-7, 2009.8

2. 学会発表

- 1) 西田千夏子, 金川武司, 小巻正泰, 吉津紀久子, 水田依久子, 谷口真理子, 酒井規夫, 野口眞三郎, 戸田達史; 当院における羊水染色体検査の現状と遺伝子診療部の取り組み. 第 33 回日本遺伝カウンセリング学会学術集会, 兵庫, 2009.5
- 2) 折居恒治, 酒井規夫, 大友孝信, 折居忠夫, 三浦良介, 寺澤厚志, 岩井明日香, 伊藤玲子, 今村 淳: 頭蓋骨早期癒合症を合併した Mucopolidosis III 型の 1 例. 第 51 回日本小児神経学会総会, 米子, 2009.5
- 3) 新谷 研, 森田祥子, 北井征宏, 富永康仁, 下野九理子, 沖永剛志, 毛利育子, 酒井規夫, 谷池雅子, 大藺恵一: 乳児期早期の Sturge Weber 症候群における患側大脳白質の髄鞘化促進の可能性: 画像的及び病理学的検討. 第 51 回日本小児神経学会総会, 米子, 2009.5
- 4) 武田泰輔, 田中あけみ, 山岡小百合, 大友孝信, 酒井規夫, 山野恒一: 尿中ムコ多糖分析の異常から診断に至ったムコリピドーシス III 型の 2 症例. 第五回近畿先天代謝異常症研究会, 大阪, 2009.6
- 5) 酒井規夫, 濱田悠介, 富永康仁, 沖永剛史, 大藺恵一: ハンター病 5 例の酵素補充療法の経験. 第五回近畿先天代謝異常症研究会, 大阪, 2009.6
- 6) 酒井規夫; リソソーム病の診断と治療法の最前線—蓄積病を疑うべきとき—. 小児成長研究会, 東京, 2009.7
- 7) 酒井規夫: シンポジウム; 先天性代謝異常症の遺伝カウンセリング. 「副腎白質ジストロフィーの遺伝カウンセリング」, 第 51 回日本先天代謝異常学会総会, 東京, 2009.11
- 8) 新谷 研, 酒井規夫, 毛利育子, 下野九理子, 沖永剛史, 橋井佳子, 太田秀明, 谷池雅子, 大藺恵一: 臍帯血幹細胞移植を施行した Hunter 症候群の中樞神経系における組織学的検討. 第 51 回日本先天代謝異常学会総会, 東京, 2009.11
- 9) 濱田悠介: ハンター病に対する酵素補充療法の効果について. 第 51 回日本先天代謝異常学会総会, 東京, 2009.11
- 10) 大友孝信, 檜垣克美, 難波栄二, 大藺恵一, 酒井規夫: ムコリピドーシス II 型/III 型の皮膚線維芽細胞におけるオートファジーの解析. 第 51 回日本先天代謝異常学会総会, 東京, 2009.11
- 11) 山崎早苗, 甲斐明彦, 高尾大士, 井石倫弘, 笹野衣里, 木下大介, 西川嘉英, 隅清彰, 酒井規夫: 胎児期より多発奇形を指摘されていたピルビン酸脱水素酵素欠損症の 1 例. 第 51 回日本先天代謝異常学会総会, 東京, 2009.11

ニーマンピック病 A/B 病の臨床および病態に関する研究

分担研究者：高橋 勉(秋田大学大学院医学系研究科医学専攻機能展開医学系小児科学講座)

研究要旨

ニーマンピック病 A/B 型はライソゾーム酵素である酸性スフィンゴミエリナーゼの異常で、肝脾腫や肺機能異常、重症では神経学的退行を主症状にする稀な遺伝性疾患である。国内のニーマンピック病の診断を行い A 型 1 例、B 型 1 例、C 型 3 例を確定診断し、A/B 型として ASM 遺伝子異常 c.567delT、c.575delC、c.1481-9T>G を同定した。また C 型として NPC1 遺伝子異常 c.2974G>T、c.2800C>T、c.3418G>A、c.1891A>G、c.581_592delinsG を同定した。ニーマンピック病 A/B 型の基本病態は細胞内エンドゾームへのスフィンゴミエリンおよびコレステロールの蓄積である。患者培養細胞を用いて、細胞内脂質輸送に関わる ABCA1、ABCG1 及び NPC1 の調節因子による病態への影響、スフィンゴミエリンの細胞内合成系抑制剤による病態への影響を調べた。その結果、ABCA1 及び ABCG1 の発現レベルを調節する LXR アゴニスト T0901317 の患者細胞内蓄積脂質の減少作用が示唆された。ニーマンピック病 A/B 型の病態に細胞内脂質輸送に関する機構が二次的に関わっていることが示され、今後治療法の開発へ結び付く可能性がある。

A. 研究目的

ニーマンピック病 A/B 型(NP-A/B)はライソゾーム酵素である酸性スフィンゴミエリナーゼ(ASM)の異常で、肝脾腫や肺機能異常、重症では神経学的退行を主症状にする稀な遺伝性疾患である。難治ではあるが欧米にて酵素補充療法が開発され、今後、積極的治療の対象となる疾患である。

本研究の目的は国内症例の酵素・遺伝子診断を通じて日本人患者の臨床的検討を行う。次に、本症の基本病態は細胞内エンドゾームへのスフィンゴミエリン(SM)とコレステロール(Ch)蓄積であるが、最近、細胞内脂質輸送に関わる分子機構が次々と解明されており、これらの知見を用いて NP-A/B の細胞内 SM 及び Ch 蓄積の病態を明らかとすることである。

B. 研究方法

国内症例を対象に培養皮膚線維芽細胞を用いて

ニーマンピック病の確定診断を酸性スフィンゴミエリナーゼ活性測定し行った。酵素活性低下を認めれば NP-A/B とし、活性が正常の場合にフィリピン染色を行い蓄積 Ch 陽性であればニーマンピック病 C 型(NP-C)とした。

NP-A/B の基本病態である SM 代謝異常は、SM および SM と親和性の強い Ch の細胞内輸送障害を引起す。疾患細胞を用いて SM および Ch の細胞内輸送に関わる新規蛋白との関係を調べた。

- 1) NP-A/B 培養皮膚線維芽細胞を用いて Ch 輸送に関与する ABC 蛋白(ABCA1、ABCA3、ABCA7、ABCG1)の mRNA および蛋白発現レベルを調べた。
- 2) ABCA1 および ABCG1 の細胞内発現レベルを調節する LXR アゴニスト T0901317 の NP-A/B 細胞蓄積 SM および Ch への影響を調べた。
- 3) NP-A/B 細胞において SM 合成系酵素インヒ

ビターの蓄積 SM、Ch への影響を調べた。

- NP-A/B 細胞においてエンドゾーム内 Ch 排泄に関与する NPC1 に関与する薬剤の影響を調べた。細胞内 SM は SM 結合蛋白ライセニンを使用した免疫染色、Ch はフィリピン染色を用いた免疫染色を用いて解析した。

C. 研究結果及び考察

- 国内症例の診断を行い、NP-A/B の A 型 1 例、B 型 1 例、C 型 3 例を診断した。遺伝子解析の結果、NP-A/B に関して ASM 遺伝子異常として c.567delT、c.575delC、c.1481-9T>G を同定した。NP-C に関しては NPC1 遺伝子異常として c.2974G>T、c.2800C>T、c.3418G>A、c.1891A>G、c.581_592delinsG を同定した。
- NP-A/B 細胞において ABCA1 および ABCG1 の発現低下が確認された。特に ABCG1 に関し蛋白レベルでの低下が確認された。ABCG1 は細胞から SM や Ch の細胞外排出に関与する。したがって疾患特徴的な泡沫細胞形成を説明する病態かも知れない。
- NP-A/B 細胞に対して LXR アゴニスト T0901317 を用いると ABCG1 の蛋白発現量の上昇が観察された。蓄積 SM および Ch の減少も観察された。
- SM 細胞内合成系に関与する酵素 SPT 抑制薬 myriocin、SMS 抑制剤 D609 のエンドゾーム蓄積 SM、Ch への影響を調べたが明らかでなかった。また、エンドゾームから Ch の細胞内輸送を調節する NPC1 を調節する薬剤 forskolin、thapsigargin も同様に明らかな影

響を示さなかった。SM に関しては形質膜からエンドゾームへの経路に関与する薬剤の影響を調べるのが今後の課題である。

D. 結論

NP-A/B の病態に細胞内脂質輸送に関わる機構が二次的に病態に関与している可能性を示した。

E. 論文発表

1. 論文発表

- Tatano Y, Fujinawa R, Kozutsumi Y, Takahashi T, Tsuji D, Takeuchi N, Tsuta K, Takada G, Sakuraba H, Itoh K: Tropoelastin regulates chemokine expression in fibroblasts in Costello syndrome. *BBRC*, 372 : 681-687, 2008
- Miura S, Ishida-Nakajima W, Ishida A, Kawamura M, Ohmura A, Oguma R, Sato Y, Takahashi T : Ascorbic acid protects the newborn rat brain from hypoxic-ischemia. *Brain Dev*, 31 : 307-17, 2008
- Hebiguchi M, Hirokawa M, Guo YM, Saito K, Wakui H, Komatsuda A, Fujishima N, Takahashi N, Takahashi T, Sasaki T, Nunomura W, Takakuwa Y, Sawada K : Dynamics of human erythroblast enucleation. *Int J Hematol*, 88 : 498-507, 2008.

F. 知的所有権の出願・取得状況

なし

微量の血液検体を用いたファブリー病診断法の開発とバイオマーカーの探索

分担研究者：櫻庭 均(明治薬科大学分析化学・臨床遺伝学 教授)

研究要旨

微量の血液試料を用いて、ファブリー病の診断法を開発し、バイオマーカーを探索するため、研究を行った。タイタープレートを用いた血清の α -ガラクトシダーゼ (GLA) 活性測定法は、エッペンドルフチューブを用いた従来法に比べて簡便であり、多数の検体を処理できることから、ファブリー病のハイリスク・スクリーニングに使用可能と思われる。MUSTag 法による血中 GLA 蛋白質の測定法の感度は極めて高く、酵素補充療法開始時におけるアレルギー反応の予測などに利用出来る可能性がある。また、血漿中のリゾグロボトリアオシルセラミドは、ファブリー病ヘミ接合体男性だけでなく、ファブリー病ヘテロ接合体女性においても、対照に比べて増加しており、本症のバイオマーカーとして利用出来ると思われる。

研究協力者：

兎川 忠靖(明治薬科大学分析化学 准教授)
鈴木 俊宏(明治薬科大学分析化学 講師)
菅原佳奈子(明治薬科大学臨床遺伝学 助教)
芝崎 太
(東京都臨床医学総合研究所 プロジェクトリーダー)
大橋 十也
(東京慈恵会医科大学 DNA 医学研究所 教授)
遠藤 文夫(熊本大学大学院小児科学 教授)
中村 公俊(熊本大学大学院小児科学 講師)

A. 研究目的

ライソゾーム病の中で発生頻度が最も高く、臨床的重要性が高いファブリー病(α -ガラクトシダーゼ欠損症)をライソゾーム病の疾患モデルとして、診断法開発とバイオマーカー探索を目指して研究を行った。

B. 研究方法

1) タイタープレートを用いた血清中の α -ガラクトシダーゼ(GLA) 活性測定

10名のファブリー病ヘミ接合体男性、27名のファブリー病ヘテロ接合体女性および10名の対照者由来の血清 10 μ l を試料として、検体中に含

まれる GLA と人工蛍光基質との酵素反応を 96 穴のタイタープレートで 1 時間行わせることにより、各試料中の GLA 活性を測定した。また、同じ試料を用いて、2 ml のエッペンドルフチューブ内で酵素反応を行う、従来の方法で GLA 活性を測定し、タイタープレート法での測定値と比較検討した。

2) MUSTag 法による乾燥濾紙血中の GLA 蛋白質量の測定

微量の試料中に含まれる GLA 蛋白質を定量するため、2 種類の抗 GLA 抗体を用いた免疫固相法とそのうちの 1 種類の抗 GLA 抗体に付けたオリゴ DNA を Real-Time PCR で増幅定量する方法とを組み合わせ、MUSTag 法による GLA 蛋白質測定法を開発した。

4 名のファブリー病ヘミ接合体男性と 10 名の対照者由来の乾燥濾紙血を試料とし、MUSTag 法で GLA 蛋白質を定量した。

3) 血漿中のリゾグロボトリアオシルセラミド (Lyso-Gb3) の測定

8 名のファブリー病ヘミ接合体男性、8 名のファブリー病ヘテロ接合体女性(臨床症状を伴うもの

5例と無症状のもの3例を含む)および6名の対照者由来の血漿 100 μ l を試料として、脂質画分を抽出した。次に、この画分を *O*-フタルアルデヒド(OPA)で処理した後に、高速液体クロマトグラフィーにより Lyso-Gb3 を同定し、定量した。

(倫理面への配慮)

患者由来の血液検体の使用に関しては、患者の同意を得ると共に、大学倫理委員会の承認を得た。

C. 研究結果

1) タイタープレート法による血中 GLA 活性の測定

本法による血清中 GLA 活性の測定値は、ファブリー病ヘミ接合体男性において、全例で 0.1 nmol/h/ml 以下であった。また、ファブリー病ヘテロ接合体女性グループおよび対照グループの GLA 活性の平均値は、それぞれ、0.8nmol/h/ml (範囲 0.1~2.0)および 3.6nmol/h/ml(範囲 2.6~4.0)であった。ファブリー病ヘミ接合体男性グループと対照グループとの間には明らかな差がみられた。一方、ファブリー病ヘテロ接合体女性グループの場合、GLA 活性の平均値は対照グループとファブリー病ヘミ接合体グループとの中間の値を示したが、個々の例についてみると、その一部は対照における GLA 活性の値に極めて近い値を示した。

タイタープレート法を用いた場合、GLA 活性の測定値は、従来法による GLA 活性の測定値に比べてやや低い値を示したが、両者の間には高い相関性が認められた。

2) MUSTag 法による血中 GLA 蛋白質の定量

MUSTag 法を用いた場合、直径 3mm spot における濾紙血中の GLA 蛋白質の検出限界は 0.38 pg/spot であった。本法を用いて測定されたファブリー病ヘミ接合体男性グループおよび対照グループの血中 GLA 蛋白質の平均値は、それぞれ 2.06pg/spot (範囲 1.80~2.38)および 160 pg/spot (範囲 58~432)であった。

今回測定したファブリー病患者グループと対照グループとを比較すると、前者で明らかな血中 GLA の減量が認められた。

3) 血中 Lyso-Gb3 の測定

対照者における血中 Lyso-Gb3 の値は、全例で 2 nmol/l 以下であったのに対して、ファブリー病ヘミ接合体男性グループおよびファブリー病ヘテロ接合体女性グループの血中 Lyso-Gb3 の平均値は、それぞれ 160 nmol/l(範囲 58~403)および 18 nmol/l(範囲 9~35)であった。ファブリー病男性患者において、血中 Lyso-Gb3 の著明な増加が認められた。また、症状のあるなしを問わずファブリー病ヘテロ接合体女性においては、全例で、血中 Lyso-Gb3 の中等度増加がみられた。

D. 考察

微量の血液試料を用いて、プレートリーダー法による GLA 活性測定を行い、本法がファブリー病の診断に利用出来るか否かを検討した。その結果、ファブリー病ヘミ接合体男性では、全例で、GLA 活性の著明な低下が確認され、対照との間に明らかな違いが認められた。また、ファブリー病ヘテロ接合体女性グループにおいても、その平均値は、ファブリー病ヘミ接合体男性グループと対照グループとの中間の値を示した。また、プレートリーダー法による GLA 活性測定値は、従来法による測定値とよく相関していた。プレートリーダー法は、従来法に比べて簡便であり、多数の検体を処理するのに便利であることから、ファブリー病のハイリスク・スクリーニングに適していると考えられる。

また、同様に、微量の血液試料を用いて、MUSTag 法により、GLA 蛋白質を定量する方法を開発した。本法による血中 GLA 蛋白質の検出感度は、直径 3mm の血液濾紙スポットあたり 0.38pg であり、極めて高かった。最近、体内に GLA 蛋白質を持たないファブリー病患者に対して組み換え GLA を用いた酵素補充治療を行うと、

GLA に対する抗体が出来てしまい、アレルギー反応を起こすことが問題になっている。酵素補充治療を開始する前に、本法により、患者における GLA 欠損の有無を調べることが出来れば、酵素補充療法によるアレルギー性反応の発生をあらかじめ予測して、その対処を行うことが可能になると期待される。

ファブリー病では、GLA 活性の低下により、GLA の基質となるグロボトリアオシルセラミド (Gb3) が体内に蓄積し、多くの患者の血中や尿中の Gb3 が増加することが知られている。しかし、患者の中には必ずしも対照との間の差が認められない症例もあり、バイオマーカーとして充分ではないことが報告されている。今回、Gb3 の誘導体である Lyso-Gb3 に注目し、血漿を試料として測定を行った。その結果、ファブリー病へミ接合体男性のみならずヘテロ接合体女性の症例においても、全例において、血漿中 Lyso-Gb3 の増加がみられた。血漿中 Lyso-Gb3 の値は、本症の良いバイオマーカーになると思われる。

E. 結論

プレートリーダー法による血清中の GLA 活性測定は、簡便で多数の検体を処理出来ることから、ファブリー病のハイリスク・スクリーニングに利用可能であると思われた。また、MUSTag 法による血中 GLA 蛋白量測定法の感度は、極めて高く、酵素補充療法開始時のアレルギー反応出現の予測への利用が期待される。血漿 Lyso-Gb3 は、ファブリー病のバイオマーカーとして有用と考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Kawashima I, Ohsawa M, Fukushige T, et al. : Cytochemical analysis of storage materials in cultured skin fibroblasts from patients with I-cell disease. *Clin Chim Acta* 378 : 142-146, 2007

- 2) Tajima Y, Matsuzawa F, Aikawa S, et al. : Structural and biochemical studies on Pompe disease and a "pseudodeficiency of acid α -glucosidase". *J Hum Genet*, 52: 898-906, 2007
- 3) Kawashima I, Watabe K, Tajima Y, et al. : Establishment of immortalized Schwann cells from Fabry mice and their low uptake of recombinant α -galactosidase. *J Hum Genet*, 52 : 1018-1025, 2007
- 4) Saito S, Ohno K, Sugawara K, et al. : Structural and clinical implications of amino acid substitutions in N-acetylgalactosamine-4-sulfatase: Insight into mucopolysaccharidosis type VI. *Mol Genet Metab*, 93 : 419-425, 2008
- 5) Yoshimizu M, Tajima Y, Matsuzawa F, et al. : Binding parameters and thermodynamics of the interaction of imino sugars with a recombinant human acid α -glucosidase (alglucosidase alfa): Insight into the complex formation mechanism. *Clin Chim Acta*, 391: 68-73, 2008
- 6) Sugawara K, Saito S, Ohno K, et al. : Structural study on mutant α -L-iduronidase: Insight into mucopolysaccharidosis type I. *J Hum Genet*, 53 : 467-474, 2008
- 7) Ohno K, Saito S, Sugawara K, et al. : Structural consequences of amino acid substitutions causing Tay-Sachs disease. *Mol Genet Metab*, 94 : 462-468, 2008
- 8) Sugawara K, Ohno K, Saito S, et al. : Structural characterization of mutant α -galactosidases causing Fabry disease. *J Hum Genet*, 53 : 812-824, 2008
- 9) Tsukimura T, Tajima Y, Kawashima I, et al. : Uptake of a recombinant human α -L-iduronidase (laronidase) by cultured

fibroblasts and osteoblasts. Biol Pharm Bull
31 : 1691-1695, 2008

- 10) Sugawara K, Tajima Y, Kawashima I, et al. : Molecular interaction of imino sugars with human α -galactosidase: Insight into the mechanism of complex formation and pharmacological chaperone action in Fabry disease. Mol Genet Metab, 96 : 233-238, 2009
- 11) Sugawara K, Saito S, Sekijima M, et al. : Structural modeling of mutant α -glucosidases resulting in a processing/transport defect in Pompe disease. J Hum Genet, 54 : 324-330, 2009

2. 学会発表

- 1) 野田雅裕, 梅田 陽, 山田直人, 成井研治, 石井ちぐさ, 内田 寛, 河野寿夫, 志倉圭子, 難波栄二, 櫻庭 均 : ガラクトシアリドーシス(晩期乳児型)の1例. 第110回日本小児科学会, 京都, 2007.4
- 2) 櫻庭 均 : Pompe 病の構造生化学的研究. 第49回日本小児神経学会, 大阪, 2007.7
- 3) 松岡和彦, 辻 大輔, 相川聖一, 相川史子, 櫻庭 均, 伊藤孝司 : 糖鎖追加型変異導入に基づくヒト β -hexosaminidase の高機能化. 第48回日本生化学会中国・四国支部例会, 高知, 2007.5
- 4) Itoh K, Matsuoka K, Tsuji D, Aikawa S, Matsuzawa F, Akeboshi H, Chiba Y, Jigami Y, Sakuraba H. Molecular design of superfunctional human β -hexosaminidase A for enzyme replacement therapy of Tay-Sachs disease and Sandhoff disease. 14th International Symposium on Glycoconjugates, Cairns, 2007.7
- 5) 明星裕美, 笠原由子, 安岡寛子, 伊藤孝司, 櫻庭 均, 千葉靖典, 地神芳文 : メタノール資化性酵母 *Ogataea minuta* における高リン酸化

型糖鎖含有 HexA の産生. 第27回日本糖質学会年会, 福岡, 2007.8

- 6) 伊藤孝司, 松岡和彦, 安岡寛子, 辻 大輔, 相川聖一, 松澤史子, 櫻庭 均, 明星裕美, 千葉靖典, 地神芳文 : Tay-Sachs 病および Sandhoff 病の酵素補充療法への応用を目指した高機能化ヒト β -ヘキソサミニダーゼの発現. 第27回日本糖質学会年会, 福岡, 2007.8
- 7) Sugawara K, Tajima Y, Matsuzawa F, Aikawa S, Sakuraba H : Structural and biochemical basis of Pompe disease. 10th Annual Asia LSD Symposium. Kuala Lumpur, 2007.11
- 8) 櫻庭 均 : 先天代謝異常症における治療概説. 第49回日本先天代謝異常学会 シンポジウム. 山形, 2007.11
- 9) 櫻庭 均, 月村孝宏, 田島陽一, 川島育夫, 福重智子, 神崎 保, 金蔵拓郎 : ムコ多糖症 I 型患者由来の培養線維芽細胞に対するラロニダーゼの取り込み効果. 第49回日本先天代謝異常学会, 山形, 2007.11
- 10) 櫻庭 均, 吉水美智留, 田島陽一, 松澤史子, 相川聖一, 岩本邦彦, 小林俊秀, Edmunds Tim, 伊藤孝司. 組換えヒト酸性 α -グルコシダーゼとその基質アナログとの分子間相互作用. 第49回日本先天代謝異常学会, 山形, 2007.11
- 11) 櫻庭 均, 田島陽一, 松澤史子, 相川聖一, 吉水美智留, 月村孝宏, 奥宮敏可, 辻野精一, 柴崎 太 : ポンペ病および pseudodeficiency と思われる症例群の分子病態の解明. 第49回日本先天代謝異常学会, 山形, 2007.11
- 12) 櫻庭 均, 川島育夫, 渡部和彦, 田島陽一, 福重智子, 神崎 保, 金蔵拓郎 : ファブリー病マウスからのシュワン細胞株樹立とその細胞への組み換え α -ガラクトシダーゼの取込み. 第49回日本先天代謝異常学会, 山形, 2007.11
- 13) 櫻庭 均 : ファブリー病の病態と遺伝子変異. 第29回心筋生検研究会 招待講演, 名古屋,

- 2007.11
- 14) 明星裕美, 千葉靖典, 笠原由子, 八木絵美, 安岡寛子, 伊藤孝司, 櫻庭 均, 地神芳文: メタノール資化性酵母 *Ogataea minuta* による高リン酸化糖鎖含有リソソーム酵素の生産. 第80回日本生化学会, 横浜, 2007.12
- 15) 田島陽一, 松澤史子, 相川聖一, 吉水美智留, 月村孝宏, 奥宮敏可, 辻野精一, 芝崎 太, 櫻庭 均: ポンペ病および pseudodeficiency と思われる症例群の分子病態の解明. 第80回日本生化学会, 横浜, 2007.12
- 16) 山田陽子, 石川雄一郎, 槇坂典子, 田島陽一, 櫻庭 均, 芝崎 太: 高感度多項目測定技術 (MUSTag) をもちいた Fabry 病の新規診断法の確立. 第80回日本生化学会, 横浜, 2007.12
- 17) 川島育夫, 田島陽一, 小谷政晴, 竹内一郎, 猪又孝元, 和泉 徹, 櫻庭 均: 心臓型ファブリー病と臨床及び病理学的に酷似した心臓型リン脂質蓄積症—第一例目と思われる「リソソーム性リン脂質蓄積症」症例の臨床型, 生化学的解析. 第80回日本生化学会, 横浜, 2007.12
- 18) 松岡和彦, 辻 大輔, 伊藤孝司, 明星裕美, 千葉靖典, 地神芳文, 土居洋文, 相川聖一, 松澤史子, 櫻庭 均: in silico デザインに基づく組換え β -ヘキソサミニダーゼの高機能化. 第80回日本生化学会, 横浜, 2007.12
- 19) 櫻庭 均: リソソーム病の分子病態の解明—その治療に向かって. 日本薬学会第128年会シンポジウム, 横浜, 2008.3
- 20) Sugawara K, Ohno K, Saito S, Sakuraba H: Structural study on mutant α -galactosidases: Insight into Fabry disease. 8th International Symposium on Lysosomal Storage Disorders. Paris, 2008.4
- 21) 櫻庭 均: テーサックス病: ヘキソサミニダーゼ A における構造変化と臨床表現型との関連性. 第50回日本小児神経学会, 東京, 2008.5
- 22) 櫻庭 均: ファブリー病の分子病態と診断・治療. 第51回日本腎臓病学会学術総会 ランチョンセミナー, 福岡, 2008.6
- 23) 明星裕美, 笠原由子, 辻 大輔, 伊藤孝司, 櫻庭 均, 千葉靖典, 地神芳文: メタノール資化性酵母生産系を利用したリソソーム病治療薬の生産とその評価. 第28回日本糖質学会年会, つくば, 2008.8
- 24) 伊藤孝司, 辻 大輔, 松岡和彦, 宮崎絵梨, 明星裕美, 笠原由子, 千葉靖典, 川島育夫, 櫻庭 均, 地神芳文: Sandhoff 病モデルマウスに対する組換えヒト β -ヘキソサミニダーゼの脳内補充効果. 第28回日本糖質学会年会, つくば, 2008.8
- 25) 松岡和彦, 辻 大輔, 相川聖一, 松澤史子, 櫻庭 均, 伊藤孝司: リン酸化 N-グリカン追加型組換えヒト β -ヘキソサミニダーゼ A を用いた Sandhoff 病モデルマウスに対する効率的脳内補充. 第28回日本糖質学会年会, つくば, 2008.8
- 26) 兎川忠靖, 鈴木俊宏, 櫻庭 均: ファブリー病患者血漿中リゾ-CTHの測定. 第50回日本先天代謝異常学会総会/第7回アジア先天代謝異常学会総会, 米子, 2008.11
- 27) 櫻庭 均, 川島育夫, 月村考宏, 田島陽一, 芝崎 太, 福重智子, 神崎 保, 金蔵拓郎: リソソーム病酵素補充療法に用いる酵素の脳移行のための試み. 第50回日本先天代謝異常学会総会/第7回アジア先天代謝異常学会総会, 米子, 2008.11
- 28) 田島陽一, 菅原佳奈子, 大野一樹, 齊藤静司, 川島育夫, 月村考宏, 芝崎 太, 櫻庭 均: 組み換えヒト α -ガラクトシダーゼとその基質アナログとの分子間相互作用と酵素増強作用の解析. 第50回日本先天代謝異常学会総会/第7回アジア先天代謝異常学会総会, 米子, 2008.11
- 29) 櫻庭 均, 月村考宏, 田島陽一, 川島育夫, 芝崎 太: 基質アナログによる変異の α -ガラク

- トシダーゼの安定化. 第 50 回日本先天代謝異常学会総会/第 7 回アジア先天代謝異常学会総会, 米子, 2008.11
- 30) 櫻庭 均: リソソーム病の酵素補充療法製剤の特徴〜ファブリー病治療薬を中心に. 第 35 回日本小児臨床薬理学会年会 ランチョンセミナー, 東京, 2008.12
- 31) 田島陽一, 吉水美智留, 大野一樹, 月村考宏, 川島育夫, 岩本邦彦, 小林俊秀, 芝崎 太, 櫻庭 均: 組み換えヒト酸性 α -グルコシダーゼとその基質アナログであるデオキシノジリマイシン誘導体との分子間相互作用・複合体形成メカニズムの解析. 第 81 回日本生化学会大会/第 31 回日本分子生物学会年会, 神戸, 2008.12
- 32) 川島育夫, 渡部和彦, 田島陽一, 芝崎 太, 福重智子, 神崎 保, 金蔵拓郎, 櫻庭 均: ファブリー病モデルマウスからのシュワン細胞株の樹立と当該細胞株への α -ガラクトシダーゼの取り込み効果. 第 81 回日本生化学会大会/第 31 回日本分子生物学会年会. 神戸, 2008.12
- 33) 櫻庭 均: ファブリー病: 分子病態の解明から診断と治療へ. 第 73 回日本循環器学会総会学術集会 ファイアサイドセミナー, 大阪, 2009.3
- 34) 菅原佳奈子, 兎川忠靖, 鈴木俊宏, 大野一樹, 田島陽一, 岩本邦彦, 櫻庭 均: ファブリー病の発生機構と薬剤作用機序に関する構造学的研究. 日本薬学会第 129 年会, 京都, 2009.3
- 35) 兎川忠靖, 鈴木俊宏, 菅原佳奈子, 櫻庭 均: ファブリー病患者血漿中のリゾ-CTH の測定. 日本薬学会第 129 年会, 京都, 2009.3
- 36) 伊藤孝司, 辻 大輔, 松岡和彦, 宮崎絵里, 明星裕美, 千葉靖典, 櫻庭 均: 組換えリソソーム酵素の脳内補充療法の開発. 日本薬学会第 129 年会, 京都, 2009.3
- 37) 櫻庭 均: ファブリー病: その診断から治療へ. 第 50 回日本神経学会総会, ランチョンセミナー, 仙台, 2009.5
- 38) 菅原佳奈子, 櫻庭 均: 耐性 α -グルコシダーゼ変異蛋白質の構造学的研究. 第 51 回日本小児神経学会総会, 米子, 2009.5
- 39) Sakuraba H, Tajima Y, Kawashima I, Tsukimura T, Sugawara K, Kuroda M, Suzuki T, Togawa T, Chiba Y, Jigami Y, Ohno K, Fukushige T, Kanekura T, Ohashi T, Itoh K : Development of new enzyme replacement therapy for Fabry disease utilizing a modified α -N-acetylgalactosaminidase. The 3rd International Symposium of Lysosomal Storage Disease, Nagoya, 2009.9
- 40) Togawa T, Suzuki T, Sugawara K, Tsukimura T, Sakuraba H : Measurement of plasma lyso-Gb3 in Fabry disease. The 3rd International Symposium of Lysosomal Storage Disease, Nagoya, 2009.9
- 41) Sugawara K, Togawa T, Suzuki T, Tsukimura T, Tajima Y, Kobayashi T, Sakuraba H : Biophysical and structural study on the complex formation of imino sugars with α -galactosidase. The 3rd International Symposium of Lysosomal Storage Disease, Nagoya, 2009.9
- 42) Kuroda M, Suzuki T, Kotani M, Tajima Y, Kawashima I, Togawa T, Sugawara K, Sakuraba H : Characterization of the neurosphere from a Sandhoff disease model mouse. The 3rd International Symposium of Lysosomal Storage Disease, Nagoya, 2009.9
- 43) Tsukimura T, Tajima Y, Kawashima I, Chiba Y, Sugawara K, Suzuki T, Togawa T, Sakuraba H. Stabilization of the M51I mutant α -galactosidase by imino sugars. The 3rd International Symposium of Lysosomal Storage Disease, Nagoya, 2009.9
- 44) Sugawara K, Ohno K, Saito K, Sakuraba H. Structural characterization of mutant α -galactosidase: Insight into Fabry disease.

- 12th Annual Asia LSD Symposium, Taipei, 2009.9
- 45) 黒田麻祐子, 鈴木俊宏, 小谷政晴, 田島陽一, 川島育夫, 兎川忠靖, 菅原佳奈子, 櫻庭 均 : Sandhoff 病モデルマウス由来ニューロスフェアの生化学的特徴. 第 82 回日本生化学会大会, 神戸, 2009. 10
- 46) 月村考宏, 田島陽一, 川島育夫, 千葉靖典, 菅原佳奈子, 鈴木俊宏, 兎川忠靖, 櫻庭 均 : 基質アナログにより安定化する変異 α -ガラクトシダーゼの性状解析. 第 82 回日本生化学会大会, 神戸, 2009. 10
- 47) 菅原佳奈子, 兎川忠靖, 鈴木俊宏, 田島陽一, 月村考宏, 岩本邦彦, 櫻庭 均 : ファブリー病の責任酵素 α -ガラクトシダーゼと基質類似体との分子間相互作用の解析. 第 82 回日本生化学会大会, 神戸, 2009. 10
- 48) 田島陽一, 月村考宏, 大野一樹, 川島育夫, 芝崎 太, 櫻庭 均 : ケミカルシャペロンによるポンペ病変異酵素の安定化作用の解析. 第 82 回日本生化学会大会, 神戸, 2009. 10
- 49) 川島育夫, 田島陽一, 芝崎 太, 福重智子, 神崎保, 金蔵拓郎, 月村考宏, 櫻庭 均 : リソソーム病酵素補充療法における酵素投与方法の検討. 第 82 回日本生化学会大会, 神戸, 2009. 10
- 50) 兎川忠靖, 鈴木俊宏, 菅原佳奈子, 月村考宏, 川島育夫, 櫻庭 均 : ファブリー病の新規マーカーとしての血漿中リゾ-CTH の測定. 第 82 回日本生化学会大会, 神戸, 2009. 10
- 51) 田島陽一, 月村考宏, 川島育夫, 芝崎 太, 櫻庭 均 : 遅発型ポンペ病細胞におけるデオキシノジリマイシン誘導体のケミカルシャペロン作用の検討. 第 51 回日本先天代謝異常学会総会, 東京, 2009. 11
- 52) 川島育夫, 芝崎 太, 菅原佳奈子, 櫻庭 均 : ティーサックス病における変異酵素蛋白質の構造特性. 第 51 回日本先天代謝異常学会総会, 東京, 2009. 11
- 53) 黒田麻祐子, 鈴木俊宏, 兎川忠靖, 菅原佳奈子, 小谷政晴, 田島陽一, 川島育夫, 櫻庭 均 : Sandhoff 病モデルマウス由来ニューロスフェアの樹立. 第 51 回日本先天代謝異常学会総会, 東京, 2009. 11
- 54) 川島育夫, 芝崎 太, 菅原佳奈子, 櫻庭 均 : ティーサックス病における変異酵素蛋白質の構造特性. 第 51 回日本先天代謝異常学会総会, 東京, 2009. 11
- 55) 兎川忠靖, 鈴木俊宏, 菅原佳奈子, 月村考宏, 大橋十也, 櫻庭 均 : ファブリー病の新規マーカーとしての血漿中 lyso-Gb3 の測定. 第 51 回日本先天代謝異常学会総会, 東京, 2009. 11
- 56) 菅原佳奈子, 兎川忠靖, 鈴木俊宏, 櫻庭 均 : 酸性 α -グルコシダーゼの立体構造の構築と変異蛋白質の構造学的研究. 第 51 回日本先天代謝異常学会総会, 東京, 2009. 11
- 57) Sugawara K, Saito S, Sekijima M, Ohno K, Tajima Y, Kroos MA, Reuser AJJ, Sakuraba H : Structural modelling of mutant alpha-glucosidase resulting in a processing/transport defect in Pompe disease. Steps Forward in Pompe Disease Symposium, Munich, 2009.11
- 58) Eussen B, Kroos MA, Lesnussa M, de Klein A, Knoch TA, Sugawara K, Sakuraba H : Holistic visualization of the GAA locus on chromosome 17q25 and its mutations within the complexity of the genome organization. Steps Forward in Pompe Disease Symposium, Munich, 2009.11

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

抗原定量方法、国内出願 : 特願 2007-30302 (2007.11.22 出願)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

ライソゾーム病(ファブリー病含む)に関する研究

分担研究者：辻 省次(東京大学大学院脳神経医学専攻神経内科)

研究要旨

Glucocerebrosidase (GBA) 遺伝子のヘテロ接合性病原性変異は孤発性パーキンソン病患者と有意に関連し、発症年齢を若年化させる。

研究協力者氏名：

三井 純(東京大学神経内科大学院生)

戸田 達史(神戸大学神経内科教授)

など

伝子変異はパーキンソン病と有意に関連した。次世代シーケンサーの error rate から、全てのサンプルの変異を網羅的に同定するため必要な DNA pooling の水準を得た。過剰発現マウスの作成に成功した。

A. 研究目的

ゴーシェ病の変異キャリアがパーキンソン病の発症リスクになることを検証して、パーキンソン病の病態機序解明・新たな治療法開発を目指す。

B. 研究方法

日本人パーキンソン病患者群と対照群に対して GBA 遺伝子の塩基配列決定を行い、全ての変異を網羅的に同定して、関連を検証した。国際多施設共同研究を行い各施設のデータをメタ解析した。既に resequencing されているサンプルと領域を用いて DNA pooling を行い、次世代シーケンサーで解析した。GBA 変異過剰発現マウスを作成した。

(倫理面への配慮)

研究対象者に対する書面によるインフォームドコンセントのうえ、検体は匿名化して解析した。

C. 研究結果

GBA 遺伝子変異のキャリアはパーキンソン病の 10%弱に認められ、オッズ比 28 倍の強い危険因子であった。メタ解析による検証でも、GBA 遺

D. 考 察

多型を用いた関連解析では、検出が難しい稀で多様な変異がパーキンソン病と強く関連することを、resequencing を基盤とした網羅的解析により示した。

E. 結 論

ゴーシェ病の変異キャリアがパーキンソン病の発症リスクになることを関連解析にて確立した。病態との関連は不明な点が多いが、ライソゾーム関連遺伝子を候補とした大規模 resequencing によるパーキンソン病の新たな危険因子の同定、GBA 遺伝子変異の細胞系・モデル動物系による病態解析を中心に解析を進めていき、パーキンソン病の病態機序解明・新たな治療法の開発を目指したい。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Mitsui J, Mizuta I, Toyoda A, et al. Mutations for Gaucher disease confer a high susceptibility to Parkinson disease. Arch

Neurol 2009;66:571-6

- 2) Sidransky E, Nalls MA, Aasly JO, et al.
Multicenter Analysis of Glucocerebrosidase
Mutations in Parkinson's Disease. N Engl J
Med 2009;361:1651-61

2. 学会発表

- 1) Mitsui J, Kyo Azuma, Hirokazu Tozaki, et al.
Multiplexed resequencing analysis to
identify rare variants in pooled DNA of
barcode-indexed DNAs. American Society of

Human Genetics 59th Annual Meeting,
Honolulu, October 2009

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

ペルオキシソーム病に関する診断・病態解明に関する研究

分担研究者：下澤 伸行(岐阜大学生命科学総合研究支援センターゲノム研究分野 教授)

研究要旨

診断に関しては、国内唯一のペルオキシソーム病診断センターとして、ペルオキシソーム病の疾患周知活動を行うとともに、平成 19-21 年の 3 年間に約 240 例に及ぶ血清の脂肪酸分析を行い、90 例のペルオキシソーム病患者及びその保因者を診断した。また国際貢献としてサウジアラビア国立病院とペルオキシソーム病患者の診断協力に関する協定を締結し、20-21 の 2 年間にアラブ地域において副腎白質ジストロフィーを除く 11 例のペルオキシソーム病患者の確定診断を行っている。病態解明に関しては、温度感受性を有する複数のペルオキシソーム形成異常症患者細胞と対照細胞において培養温度を変えて得られた RNA を用いた Gene chip 解析により、網羅的な転写産物のデータベースを作成し、新たなペルオキシソーム代謝機能の探索を行うとともに、モデルマウスを用いた解析も併せて神経変性疾患や生活習慣病とペルオキシソーム代謝機能との関連を明らかにし、治療法の開発へと繋げて行く。

研究協力者

長瀬 朋子(岐阜大学ゲノム研究分野・助教)

荒井 綾子(岐阜大学ゲノム研究分野・研究補佐員)

梶原 尚美(岐阜大学ゲノム研究分野・技術補佐員)

A. 研究目的

リソソーム病やミトコンドリア病とともに新たな疾患概念として確立しているペルオキシソーム病患者の正確かつ迅速な診断を目的に、ペルオキシソーム病患者診断スクリーニングから確定診断のシステムを確立して、全国の医療機関にその情報を提供する。さらにそのシステムをアジア地域における医療機関にも共同研究として適応し、国際貢献を目指している。一方で、集積した患者細胞等を対象に転写産物や代謝産物を網羅的に解析するシステムを確立し、本症の病態解明から新たなペルオキシソーム代謝機能を探索する。さらにモデルマウスを用いた解析も併せて神経変性疾患や生活習慣病の発症への関わりも明らかにし、治

療法の開発に繋げて行く。

B. 研究方法

ペルオキシソーム病の診断システムは臨床症状よりペルオキシソーム病が疑われた患者血清を用いて、ガスクロマトグラフィー質量分析装置(GC-MS)により極長鎖脂肪酸、フィタン酸、プラスマローゲンなどペルオキシソーム代謝産物を測定し、異常を認めた患者については皮膚生検による培養線維芽細胞の樹立から細胞、タンパク、遺伝子レベルの解析を経て、確定診断を行う。その際に同意を得られた患者試料については本症の病態解明から治療法の開発研究を進めて行く。

その1つとしてペルオキシソーム形成異常症と対照細胞から全転写産物と代謝産物をマイクロアレイおよび GC-MS+LC-タンデムマスにて網羅的に解析することにより、ペルオキシソームの新たな機能や生活習慣病に関連する脂質代謝異常症や神経変性疾患における疾患感受性遺伝子として

D. 考 察

ペルオキシソーム病診断システムの確立とその広報活動については、血清、遺伝子、細胞を用いた効率的、迅速な診断体制を確立するとともに、診断パンフレットやホームページも作成して、充分機能している。患者細胞やマウスを用いた病態解明研究については、先天代謝異常症の病態解明にとどまらず、より広い範囲での代謝病におけるペルオキシソーム機能の検討が可能となっている。

社会的貢献については難病であるペルオキシソーム病の診断システムを確立し、多くの医療機関や患者支援を行うとともに、国際貢献としても、本分野での研究途上国の診断にも寄与し、その取り組みは新聞にも掲載されている(中日新聞2008年11月18日朝刊総合面)。また学術的にもその形成機構から代謝機能まで解明途上にあるオルガネラのペルオキシソームを、病態を通じた解明を進めている。

今後、さらに診断スクリーニングシステムを拡充し、新たなペルオキシソーム病の疾患単位の発見を目指す一方で、早期発見、早期介入を目的としたマススクリーニング法の開発研究も行っていく。また既存の診断システムによる国際的な共同研究も対象国を広げて進めていく。さらに患者検体を用いた転写産物や代謝産物の網羅的解析法を充実させ、生活習慣病と神経変性疾患を対象にした代謝病におけるペルオキシソーム機能の関与を明らかにしていく。

E. 結 論

国内唯一のペルオキシソーム病診断施設として副腎白質ジストロフィーを除くほとんどのペルオキシソーム病国内症例を診断するとともに、倫理面を配慮し、患者検体による遺伝性ペルオキシソーム病の病態解明から、神経変性疾患や生活習慣病等、広い意味での代謝病におけるペルオキシソーム機能異常の解明、治療法の開発を目指している。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Shimozawa N : Molecular and clinical aspects of peroxisomal diseases. *J Inher Metab Dis*, 30(2) : 193-197, 2007
- 2) Takahashi N, Morita M, Maeda T et al. : Adrenoleukodystrophy : subcellular localization and degradation of adrenoleukodystrophy protein (ALDP/ABCD1) with naturally occurring missense mutations, *J. Neurochem*, 101 : 1632-43, 2007
- 3) Kuratsubo I, Suzuki Y, Shimozawa N, et al. : Parents of Childhood X-linked Adrenoleukodystrophy : High Risk for Depression and Neurosis, *Brain & Development*, 30 : 477-482, 2008
- 4) Morita M, Kanai M, Shimozawa N, et al. : Bicaiein 5,6,7- trimethyl ether activates peroxisomal but not mitochondrial fatty acid beta-oxidation, *J Inher Metab Dis* 31 : 442-449, 2008
- 5) Al-Dirbashi OY, Santa T, Shimozawa N, et al. : Rapid UPLC-MS/MS method for routine analysis of plasma pristanic, phytanic and very-long chain fatty acid markers of peroxisomal disorders, *J Lipid Res*, 49 : 1855-1862, 2008
- 6) Saito M, Yamashita S, Shimozawa N, et al. : Changes in the amounts of myelin lipids and molecular species of plasmalogen PE in the brain of an autopsy case with d-bifunctional protein deficiency, *Neuroscience let*, 442: 4-9, 2008
- 7) Takahashi Y, Seki N, Ishiura H, et al. : Development of a high-throughput microarray-based resequencing system for neurological disorders and its application to molecular genetics of amyotrophic lateral

- sclerosis, Arch Neurol, 65 : 1326-32, 2008
- 8) Al-Dirbashi OY, Shaheen R, Al-Sayed M, et al. : Zellweger syndrome caused by PEX13 deficiency : Report of two novel mutations, Am J Med Genet 149A, 1219- 1223, 2009
 - 9) 下澤伸行, 鈴木康之 : ペルオキシソーム形成異常症-Zellweger症候群を中心に-. 小児内科, 39(増) : 536-538, 2007
 - 10) 下澤伸行:副腎白質ジストロフィーの造血幹細胞移植療法の現状と問題点 -疾患の克服に向けて-. 日本先天代謝異常学会雑誌, 24 : 20-24, 2008
 - 11) 下澤伸行 : Zellweger 症候群. 小児科学 第3版 大関武彦, 近藤直実編, 481-484, 医学書院, 東京, 2008
 - 12) 福原 忍, 水江伸夫, 坂井拓郎, 他 : 同一遺伝子異常を持ちながら臨床型が異なる ALD 兄弟例, 小児科臨床, 62 : 457-461, 2009
 - 13) 下澤伸行:日本人が発見に関わった疾患遺伝子ペルオキシソーム病. 小児科 50 増刊号. 特集「小児疾患における臨床医田楽の進歩」907-913, 2009
 - 14) 下澤伸行 : ペルオキシソーム病, 小児内科, 41 増刊号, 小児疾患診療のための病態生理 2 479-486, 2009
 - 1) Shimozawa N, Arai A, Kajiwara N, et al. : Genotype and phenotype of Japanese patients with X-linked adrenoleukodystrophy. 59th Annual Meeting of American Society of Human Genetics, Honolulu, 2009.10
 - 2) 中村和幸, 加藤光広, 松永 明, 他 : ペルオキシソーム形成異常症と Sandhoff 病を合併した 1 女児例. 第 50 回日本先天代謝異常学会, 米子, 2008.11
 - 3) 下澤伸行, 荒井綾子, 梶原尚美, 他 : 小沢 所, 流せとも子, 竹本靖彦, 鈴木康之. 副腎白質ジストロフィー早期診断・早期治療へ向けての取組み-発症前診断に関するガイドライン作成に向けて-第 54 回日本人類遺伝学会, 東京, 2009.9
 - 4) 鈴木康之, 下澤伸行 : ペルオキシソーム病との 30 年 : 二人三脚の旅 学会賞受賞講演. 第 51 回日本先天代謝異常学会, 第 8 回アジア先天代謝異常症シンポジウム, 東京, 2009.11
 - 5) 長瀬朋子, 玉置也剛, 梶原尚美, 他 : ES 細胞からの分化系を用いたペルオキシソーム病解析の試み. 第 51 回日本先天代謝異常学会, 第 8 回アジア先天代謝異常症シンポジウム, 東京, 2009.11

1. 論文発表

G. 知的所有権の取得状況

なし

ペルオキシソーム膜形成の分子病態機構

分担研究者：今中 常雄(富山大学大学院医学薬学研究部 教授)

研究要旨

ペルオキシソーム膜形成は、ペルオキシソーム形成因子 Pex3p、Pex19p を介したペルオキシソーム膜タンパク質(PMP)の局在化を必要とする。遊離型ポリソームで生合成された PMP は細胞質で Pex19p と複合体を形成する。次いで PMP のペルオキシソーム膜への局在化は、ペルオキシソーム膜上の Pex3p が Pex19p と結合し、積荷である PMP をペルオキシソーム膜に降ろすことにより完了する。この過程の分子機構を明らかにするため、リコンビナント Pex3p と Pex19p との相互作用を解析し、両者の相互作用に必須のアミノ酸残基を特定した。さらに Pex3p ならびに Pex19p 欠損ヒト線維芽細胞に野生型ならびに変異型 Pex3p、Pex19p を発現させることにより、ペルオキシソームの形成には Pex3p と Pex19p の相互作用が必須であることを実証した。

研究協力者氏名

柏山 恭範(富山大学大学院医学薬学研究部助教)

守田 雅志(富山大学大学院医学薬学研究部准教授)

A. 研究目的

生合成されたペルオキシソーム膜タンパク質(PMP)は、ペルオキシソーム膜に局在する Pex3p と PMP を輸送する Pex19p との相互作用を介してペルオキシソーム膜へ局在化する。その過程は正常なペルオキシソーム膜を形成するために必須であり、その異常はペルオキシソーム膜形成障害を示す Zellweger syndrome の原因となる。ペルオキシソーム病におけるペルオキシソーム膜形成異常の分子機構を明らかにすることを目的として、Pex3p と Pex19p との相互作用の分子基盤およびその異常とペルオキシソーム膜形成障害について解析した。

B. 研究方法

野生型ならびに変異型ヒト Pex3p の細胞質ドメインに His-tag を導入した His₁₀-Pex3p、野

生型ならびに変異型ヒト Pex19p に GST-tag を導入した GST-Pex19p を大腸菌に発現させ、精製した。Pex3p と Pex19p との相互作用は、ゲル濾過、トリプトファンの蛍光スペクトル、表面プラズモン共鳴、pull down assay 等により解析した。Pex3p ならびに Pex19p によるペルオキシソーム形成能は、Pex3p もしくは Pex19p を欠失した CHO 細胞や Zellweger syndrome 患者線維芽細胞に、目的とする遺伝子を導入し、ペルオキシソームの形成をペルオキシソームマトリックスタンパク質ならびに膜タンパク質 PMP70 に対する抗体を用いた蛍光抗体法で解析した。

(倫理面での配慮)

Zellweger syndrome 患者線維芽細胞は、提供者が乳児のため、両親の同意を得て採取したものを、岐阜大生命科学総合研究支援センター下澤伸行教授より供与を受けた。

C. 研究結果

リコンビナント Pex3p と Pex19p は単量体と

して存在し、両者は 1:1 の複合体を形成した。Pex19p 存在下での Pex3p のトリプトファン蛍光 (340 nm) の blue shift、GSP-Pex19p との pull down assay 等より、Pex3p 中の Trp-104 が Pex19p との結合に重要であることが示唆された。さらに Pex3p を欠損している CHO 細胞ならびに Zellweger syndrome 患者線維芽細胞に野性型もしくは変異型 Pex3p (W104A) を発現させると、野性型 Pex3p ではペルオキシソームが形成されたが、変異型 Pex3p (W104A) では形成されなかった。よって、Trp-104 が Pex19p との結合ならびにペルオキシソーム膜形成に重要であることが示唆された。なお、この患者線維芽細胞では、*pex3* に 97 塩基の欠失があり、Pex3p の C 末端側から 32 アミノ酸が欠失し、3 アミノ酸が付加された Pex3p が生合成されているが、細胞内で分解されているためペルオキシソームが形成されないと推定された。

一方、Pex19p の Pex3p との相互作用には、pull down assay 等により Pex19p の N 末端から 44 アミノ酸残基が関与することが示唆された。この配列中の特徴あるドメイン構造より各種の変異型 Pex19p を作製し pull down assay を行った結果、Leu-21、Leu-22、Phe-29 が Pex3p との結合に重要であることが示唆された。さらに Pex19p を欠損した Zellweger syndrome 患者線維芽細胞に野生型もしくは変異型 *pex19p* (L21A)、Pex19p (L22A)、Pex19p (W29A) を発現させると、野生型ではペルオキシソームが形成されたが、変異型では形成されなかった。よって、Pex19p N 末端の疎水性アミノ酸の重要性が示唆された。一方、Pex19p の N 末側の Pex3p 結合領域と N 末端 90 アミノ酸以降の PMP 結合領域を結ぶリンカー領域を欠失させた Pex19p (D45-90)、Pex19p (D57-90) は、Pex3p との結合能は有していたが、ペルオキシソームの形成は回復しなかった。さらに、Pex3p 結合領域の酸性アミノ酸クラスターを塩基性アミノ酸に置換した Pex19p (E20KE23KD27KD30K) もペルオキシ

ソームの形成を回復させなかった。よって、Pex19p によるペルオキシソームの形成は、Pex3p との結合のみでなく、Pex3p との結合領域と PMP との結合領域がある程度の距離をもっていることが必要であることが示唆された。なお患者線維芽細胞では Pex19p の N 末端から 255 番目の Met がフレームシフトにより Asn に変異し、続いて 24 アミノ酸が変異し終止コドンとなっている。大腸菌で発現した本変異体は Pex3p との結合能を有するので、患者線維芽細胞内での変異型 Pex19p の分解がペルオキシソーム形成異常の原因であると推定された。

D. 考 察

遊離型ポリソームで生合成された PMP と Pex19p とが複合体を形成し、ペルオキシソーム膜前駆体上の Pex3p と相互作用し、PMP をペルオキシソーム膜に挿入することにより、ペルオキシソーム膜が形成される。我々はこれまでに、生合成された PMP70 の Pex19p との相互作用に必要な領域を明らかにするとともに、Pex19p の N 末端側の領域が Pex3p との相互作用に重要であることを報告してきた。今回、Pex3p の細胞質ドメインに存在する Trp-104 が Pex19p との結合に重要な役割を果たしていることを見出した。また、細胞内で正常なペルオキシソーム膜が形成されるためには、Pex3p と Pex19p との間で nM オーダーの強い結合が必要であることが示唆された。一方 Pex19p に関しては、Pex19p の Pex3p 結合領域における疎水性アミノ酸 Leu-21、Leu-22、Phe-29 が Pex3p との結合に重要な役割を果たしていることを見出した。さらに、細胞内で正常なペルオキシソームが形成されるためには、Pex3p 結合領域の酸性アミノ酸クラスターならびに N 末側の Pex3p 結合領域と N 末端 90 アミノ酸以降の PMP 結合領域を結ぶリンカー領域が一定の距離をもつことが必要であることが示唆された。これらの部位は、Pex19p がペルオキシソーム膜上の Pex3p と結合後、積み荷である PMP をペルオ