

## β-ガラクトシダーゼ欠損症の遺伝子変異解析に関する研究

分担研究者：難波 栄二 (鳥取大学生命機能研究支援センター教授)

### 研究要旨

β-ガラクトシダーゼ欠損症患者 8 検体 (GM1-ガングリオシドーシス 6 検体、モルキオ B 病 2 検体) について遺伝子変異解析を行った。患者由来の皮膚線維芽細胞に対するケミカルシャペロン化合物 NOEV と 6S-NBI-DGJ の効果を検討し、シャペロン効果の変異型特異性を明らかにした。

### A. 研究目的

β-ガラクトシダーゼ欠損症の遺伝子変異解析を行った。β-ガラクトシダーゼ欠損症患者由来培養皮膚線維芽細胞に対するケミカルシャペロンの効果を検討し、新規シャペロン療法開発のための基礎的な知見を得る目的で研究を行った。

### B. 研究方法

#### 1. β-ガラクトシダーゼ遺伝子変異解析

β-ガラクトシダーゼ欠損症患者由来培養皮膚線維芽細胞および血液検体からゲノム DNA を抽出し、全エクソンについてシーケンス解析を行った。

#### 2. GM1-ガングリオシドーシス患者皮膚線維芽細胞に対するシャペロン効果の検討

培養皮膚線維芽細胞に対するシャペロン効果の検討は 0.2、2 μM の NOEV (N-octyl-4-epi-β-valienamine) または 20、80 μM の 6S-NBI-DGJ を含む培地で 4 日間培養後、細胞抽出液のβ-ガラクトシダーゼ酵素活性を 4-MU 人工基質を用い測定し行った。

### C. 研究結果

GM1-ガングリオシドーシス 6 検体について遺伝子変異解析を行い、Y333C/Y333C、H102D/L499Q、L162S/R590C、D640Y/?、M1C/R49G、R59H/R59H を同定した。モルキオ B 病 2 検体においては、R482H/T500A、R68Q/T500A 変異をそれぞれ同定した。

また、9 人の GM1-ガングリオシドーシス患者由来皮膚線維芽細胞について NOEV と 6S-NBI-DGJ のシャペロン効果を検討した結果、NOEV は 5 細胞に対し、6S-NBI-DGJ は 6 細胞に対し有意なシャペロン効果を認めた (図 1)。

### D. 考察

今回同定した変異のうち、M1C、R49G、H102D、L499Q および D640Y 変異は報告のない変異型であった。このうち H102D と L499Q は変異 cDNA 発現細胞系において活性低下をみとめたので、新規変異の可能性が高い。また、M1C と R49G は機能予測ソフト Polyphen2 において、共に機能欠損の可能性を示し、責任変異である可能性を示唆した。

#	Mutation	Phenotype	Ethnic Origin	NOEV	MTD118
1	p.L162S/p.R590C	G <sub>M1</sub>	Caucasian	Positive	Positive
2	p.I51T/?	G <sub>M1</sub>	Japanese	Positive	Positive
3	p.Y270D/p.Y270D	G <sub>M1</sub>	UK	Negative	Negative
4	p.R208C/IVS10,+1 G>A	Inf G <sub>M11</sub> 1	Japanese	Negative	Positive
5	p.R201C/?	Juv G <sub>M1</sub>	Japanese	Positive	Positive
6	p.Y333C/p.Y333C	G <sub>M1</sub>	UK	Positive	Positive
7	p.S54N/p.D640Y	Inf G <sub>M1</sub>	Russian	Negative	Negative
8	p.K578R/?	G <sub>M1</sub>	UK	Positive	Positive
9	p.R59H/p.R59H	Inf G <sub>M1</sub>	Japanese	Negative	Negative

図1 GM1-ガングリオシドーシス皮膚線維芽細胞に対するシャペロン効果

シャペロン活性について、新規シャペロン化合物 6S-NBI-DGJ は NOEV が効果を示さない I51T などの変異に対し有効性を示す (Higaki et al, 2011; Takai et al, 2013)。今回の培養線維芽細胞に対する検討においても、6S-NBI-DGJ は R208C に有効性を示したことから、NOEV とは異なる変異型に有効性を示す可能性がある。今後はこれらの化合物が有効でない変異型に対する新規化合物の探索が必要と考える。

#### E. 結論

β-ガラクトシダーゼ欠損症の遺伝子変異解析を行い、変異を同定した。2つのシャペロン化合物が異なる変異型に対する有効性を示した。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Li L, Higaki K, Ninomiya H, Luan Z, Iida M, Ogawa S, Suzuki Y, Ohno K, Nanba E. Chemical chaperone therapy: Luciferase assay for screening of β-galactosidase

mutations. *Mol Genet Metab*, 101, 354-369, 2010

- 2) Luan Z, Higaki K, Aquilar-Moncayo M, Li L, Ninomiya H, Nanba E, Ohno K, García-Moreno MI, Ortiz Mellet C, García Fernández JM, Suzuki Y, A fluorescent sp2-iminosugar with pharmacological chaperone activity for Gaucher disease: Synthesis and intracellular distribution studies. *ChemBioChem*, 11, 2453-2463, 2010

- 3) Higaki K, Li L, Bahrudin U, Okuzawa S, Takamura A, Yamamoto K, Adachi K, Paraguison RC, Takai T, Ikehata H, Tominaga L, Hisatome I, Iida M, Ogawa S, Matsuda J, Ninomiya H, Sakakibara Y, Ohno K, Suzuki Y, Nanba E. Chemical chaperone therapy: chaperone effect on mutant enzyme and cellular pathophysiology in β-galactosidase deficiency. *Hum Mutat*, 32, 843-852, 2011

- 4) Takamura A, Higaki K, Ninomiya H, Takai T, Matsuda J, Iida M, Ohno K, Suzuki Y, Nanba E. Lysosomal accumulation of Trk protein in brain of GM1-gangliosidosis mouse and its restoration by chemical chaperone. *J Neurochem*, 118, 399-406, 2011
  - 5) Otomo T, Higaki K, Nanba E, Ozono K, Sakai N. Lysosomal storage causes cellular dysfunction in mucopolidosis II skin fibroblasts. *J Biol Chem*, 286, 35283-35290, 2011
  - 6) Xiong H, Higaki K, Wei C, Bao CW, Zhanf YH, Fu N, Qui J, Adachi K, Kumura Y, Ninomiya H, Nanba E, Wu XR. Genotype/phenotype of 6 Chinese cases with Niemann-Pick disease type C. *Gene*, 498, 332-335, 2012
  - 7) Suzuki Y, Ichinomiya S, Kurosawa M, Matsuda J, Ogawa S, Iida M, Kubo T, Tabe M, Itoh M, Higaki K, Nanba E, Ohno K: Therapeutic chaperone effect of *N*-octyl 4-epi- $\beta$ -valienamine on murine GM<sub>1</sub>-gangliosidosis. *Mol Genet Metab* 106: 92-8, 2012.
  - 8) Aguilar-Moncayo M, Takai T, Higaki K, Mena-Barragán T, Hirano Y, Yura K, Li L, Yu Y, Ninomiya H, García-Moreno I, Ishii S, Sakakibara Y, Ohno K, Nanba E, Ortiz Mellet C, García Fernández JM, Suzuki Y: Tuning glycosidase inhibition through aglycone interactions: Pharmacological chaperones for Fabry disease and GM<sub>1</sub> gangliosidosis, *Chem Commun* 48: 6514-6, 2012.
  - 9) Castilla J, Riquez R. Cruz D, Higaki K, Nanba E, Ohno K, Suzuki Y, Diaz Y, Ortiz Mellet C, Carcia Fernandez JM, Castillon S: Conformationally-locked N-glycosides with selective  $\beta$ -glucosidase inhibitory activity: Identification of a new non-iminosugar-type pharmacological chaperone for Gaucher disease. *J Med Chem* 55:6857-65, 2012.
  - 10) Luan Z, Li L, Higaki K, Nanba E, Suzuki Y, Ohno K, The chaperone activity and toxicity of ambroxol on GD cells and normal mice. *Brain Dev*, 2013 35: 317-322.
  - 11) Takai T, Higaki K, Aguilar-Moncayo M, Mena-Barragán T, Hirano Y, Yura K, Yu L, Ninomiya H, García-Moreno I, Sakakibara Y, Ohno K, Nanba E, Ortiz Mellet C, García Fernández JM, Suzuki 1 Y, A bicyclic 1-deoxygalactonojirimycin derivative as a novel pharmacological chaperone for GM<sub>1</sub> gangliosidosis. *Mol Ther*, 2013 21: 526-532.
  - 12) Higaki K, Ninomiya H, Suzuki Y, Nanba E. Two candidate molecules for chemical chaperone therapy for GM<sub>1</sub>-gangliosidosis. *Future Med Chem*. 2013 5(13): 1551-1558.
2. 学会発表
    - 1) 難波栄二、檜垣克美 : GM<sub>1</sub>-ガングリオシド-  
シス脳神経細胞内のユビキチン化蛋白質の蓄積. 第 52 回 日本小児神経学会総会、福岡、2010.5
    - 2) 難波栄二 : ケミカルシャペロン療法. 第 52 回 日本先天代謝異常学会総会、大阪、2010.10
    - 3) 高井知子、檜垣克美、李林静、飯田真己、大野耕策、鈴木義之、難波栄二 : ベータガラクトシダーゼに対するシャペロン活性測定のため

- めの新規細胞系の構築. 第 52 回 日本先天代謝異常学会総会、大阪、2010.10
- 4) 高井知子、檜垣克美、李林静、榊原康文、鈴木義之、難波栄二：ヒト変異 $\beta$ -ガラクトシダーゼに対するシャペロン効果. 第 83 回 日本生化学会大会、神戸、2010.12
  - 5) 檜垣克美、栞卓、李林静、難波栄二、大野耕策、Carmen Ortiz Mellet、José M. García Fernández、鈴木義之：ゴーシェ病に対する蛍光標識薬理的シャペロンの効果に関する検討. 第 15 回日本ライソゾーム病シンポジウム、東京、2010. 12
  - 6) Nanba E. Chemical chaperone therapy for lysosomal storage diseases. Satellite Symposium of Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases 2011 Tokyo Meeting on Lysosomal Storage Disease Screening. Tokyo, 2011.8
  - 7) Takai T, Higaki K, Ohno K, Suzuki Y, Nanba E. Chemical chaperone therapy: chaperone effect on mutant enzyme and cellular pathophysiology in  $\beta$ -galactosidase deficiency. Satellite Symposium of Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases 2011 Tokyo Meeting on Lysosomal Storage Disease Screening. Tokyo, 2011.8
  - 8) 高井知子、檜垣克美、鈴木義之、難波栄二：ヒト変異 $\alpha$ -ガラクトシダーゼに対する新規シャペロン化合物. 第 84 回 日本生化学会大会、京都、2011.9
  - 9) 三浦弘子、檜垣克美、山内裕子、高井知子、難波栄二：ライソゾーム病神経変性とミトコンドリア異常. 第 84 回 日本生化学会大会、京都、2011.9
  - 10) 檜垣克美、高村歩美、大野耕策、鈴木義之、難波栄二：GM1 ガングリオシドーシスモデルマウス脳におけるシグナル伝達異常. 第 16 回日本ライソゾーム病シンポジウム、東京、2010. 9
  - 11) Higaki K, Ohno K, Suzuki Y, Nanba E. Chemical chaperone therapy for  $\beta$ -galactosidase deficiency. 12<sup>th</sup> International Congress of Human Genetics, Montreal, Canada, 2011,10
  - 12) 高井知子、檜垣克美、Ortiz Mellet C, Garcia Fernandez J, 大野耕策、鈴木義之、難波栄二：ベータガラクトシダーゼに対する新規シャペロン候補化合物の解析. 第 53 回 日本先天代謝異常学会総会、千葉、2011.11
  - 13) Yi Y, 檜垣克美、Ortiz Mellet C, Garcia Fernandez J, 大野耕策、鈴木義之、難波栄二：ファブリー病に対する新規シャペロン候補化合物の解析. 第 53 回 日本先天代謝異常学会総会、千葉、2011.11
  - 14) Takai T, Higaki K, Ortiz Mellet C, García Fernández JM, Ohno K, Suzuki Y, Nanba E. A novel chaperone compound for GM1-gangliosidosis. 第 17 回日本ライソゾーム病研究会、東京、2012.10.5-6.
  - 15) Yu Y, Higaki K, Takai T, Ortiz Mellet C, García Fernández JM, Ohno K, Suzuki Y, Nanba E. Tuning glycosidase inhibition through aglycone interactions: pharmacological chaperones for Fabry disease and GM1-gangliosidosis. 第 17 回ライソゾーム病研究会、東京、2012.10.5-6.
  - 16) 難波栄二、檜垣克美、高井知子、Yu Yi, 大野耕策、鈴木義之：ファブリー病ならびに GM1-ガングリオシドーシスに対する新しいシャペロン治療薬の開発. 第 57 回日本人類遺伝学会、

東京、2012.10.24-27.

- 17) 高井知子, 檜垣克美, Ortiz Mellet C, García Fernández JM, 大野耕策, 鈴木義之, 難波栄二: ヒトI51T変異 $\beta$ -ガラクトシダーゼに有効な新規ケミカルシャペロン化合物の解析. 第54回日本先天代謝異常学会、岐阜、2012.11.15-17.
- 18) 難波栄二. ライソゾーム病に対するシャペロン療法. 第2回先天代謝異常症患者会フォーラム. 東京, 2013. 8
- 19) 難波栄二, 檜垣克美, 高井知子, 由良敬, 榊原康文, Carmen Ortiz Mellet, Jose M. Garcia Fernandez, 鈴木義之.  $\alpha$ -ガラクトシダーゼ欠損症に対するシャペロン治療薬の開発. 第58回日本人類遺伝学会. 仙台, 2013. 11
- 20) Nanba E. Chaperone therapy for lysosomal storage diseases. The 3<sup>rd</sup> Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases / The 55<sup>th</sup> Annual Meeting for The Japanese Society for Inherited Metabolic Diseases. Chiba, Nov. 2013
- 21) Takai T, Higaki K, Suzuki Y, Nanba E. Comparison of two Chaperone candidates for treatment of GM1-gangliosidosis. The 3<sup>rd</sup> Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases / The 55<sup>th</sup> Annual Meeting for The Japanese Society for Inherited Metabolic Diseases. Chiba, Nov. 2013

22) Hossain MA, Higaki K, Nanba E, Suzuki Y, Ozono K, Sakai N. NOEV treatment option for Japanese late-onset Krabbe disease. The 3<sup>rd</sup> Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases / The 55<sup>th</sup> Annual Meeting for The Japanese Society for Inherited Metabolic Diseases. Chiba, Nov. 2013

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

Nanba E, Higaki K, Suzuki Y: Utilizacion de derivados biciclicos de 1-deoxygalactonojirimycina en la preparacion de un medicamento para el tratamiento de enfermedades relacionadas cn beta-enzimas galactosidasas lisosomicas mutantes humanas (Use of bicyclic derivatives of 1-deoxygalactonojirimycin for the formulation of drugs against lysosomal storage disorders associated to mutations on the acid  $\beta$ -galactosidase), ES P201232024 (December 26, 2012)