

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究報告書

分担研究課題名

先天性 GPI 欠損症をはじめとする先天性糖鎖異常症に関する研究

分担研究者： 村上良子 （大阪大学微生物病研究所 特任教授）

研究要旨

網羅的な遺伝子解析によって見つかった国内の IGD 症例について機能解析を行い、PIGO（姉妹例）と PIGT の新規症例を診断した。今年度は海外から多数の依頼があり 9 カ国からの 10 症例の IGD の機能解析を行った。CDG についても 3 症例の新規症例の糖鎖解析を行った。N 型およびムチン型糖鎖解析のエス・アール・エル社への技術移転を行い、正常コントロールを測定し、カットオフ値の設定を行なった。

研究協力者氏名

所属機関名及び所属機関における職名

井上徳光 公立大学法人和歌山県立医科大学  
分子遺伝学講座 教授

岡本伸彦 大阪府立病院機構大阪母子医療センター・遺伝診療科 研究所長

高橋幸利 国立病院機構 静岡てんかん・神経医療センター 院長

A. 研究目的

GPI (Glycosylphosphatidylinositol) アンカーは 150 種以上の蛋白質を細胞膜につなぐ糖脂質でその生合成に 30 個の遺伝子が関与する。これら GPI 遺伝子群の変異により精神・運動発達遅滞やてんかん、奇形等の症状を来す先天性 GPI 欠損症 (IGD) となる。現在 24 種類の遺伝子変異による先天性 GPI 欠損症 (IGD) が報告されている。IGD は先天性糖鎖異常症 (CDG) の 1 病型で、臨床症状も類似しているため、国内では共通のラインで、FACS (IGD) と糖鎖解析 (CDG) によるスクリーニングを実施している。一方国内外の網羅的な遺伝子解析から見つかる例についてはその機能解析を実施している。症例を集積することにより鋭敏な疾患マーカーを見つけ、早期の正確な診断を目指す。また検査の継続性を担保するために検査会社に技術移転をして IGD に対するフローサイトメトリー検査と質量分析による糖鎖解析検査の保険収載を目指している。

B. 研究方法

IGD を含めた CDG のスクリーニングについては構築済みの系を運用した。IGD はエス・アール・

エル社に委託しているフローサイトメトリー検査による顆粒球上 CD16 の発現レベルがカットオフ値以下になった症例を陽性としてさらに疾患マーカーとして CEA 値を参考とした。残余血清を母子医療センターに送り、質量分析による糖鎖解析を実施した。網羅的な遺伝子解析から見つかる例については、IGD については末梢顆粒球のフローサイトメトリーによる CD16 の発現解析とともに、ノックアウト細胞を用いたレスキュー実験により、機能解析を行った。CDG については血清タンパク質の糖鎖解析を行った。昨年度に引き続き母子医療センターで実施しているトランスフェリンの糖鎖解析による N 型糖鎖解析と apo-CIII タンパク質の糖鎖解析によるムチン型糖鎖の解析についてエス・アール・エル社に技術移転を行い、正常コントロールを測定し、カットオフ値の設定を行なった。

(倫理面への配慮)

大阪大学における倫理委員会に申請し承認されている。検体の解析、保管、データベースへの登録、遺伝子診断に伴う利益、不利益などにつき書面提示し、患者の保護者に対して説明し同意を得た。また、診断や結果に対して、不安が生じた場合は、遺伝カウンセリングを提供できる体制を整えており、いつでも相談できる旨を併せて説明した。

C. 研究結果

スクリーニングについて IGD については陽性例がなく、CDG については 3 例の明らかな糖鎖異常を確認し、現在遺伝子解析中である。遺伝

子解析からは国内のIGDでは PIGO欠損症と（姉妹例）とPIGT欠損症の新規症例が見つかった。いずれも新規の変異で、末梢顆粒球フローサイトメトリーとノックアウト細胞のレスキューによる機能解析法により病的変異であることを確認した。海外ではメキシコからPIGA、アメリカからPIGGとPIGQ、カナダからPIGN、チリからPIGO、チュニジアからPIGT、イタリアからPIGT、インドからPIGV、スペインからPIGW、イギリスからPIGUのそれぞれ変異の機能解析の依頼があり、解析した。それぞれ確定症例については海外担当者が論文として投稿、あるいは準備をしている。国内のCDGについてはALG6、SLC39A8、NGLY1の欠損症の機能解析を行った。NGLY1はN型糖鎖の合成過程においてフォールディングが失敗した糖タンパク質の細胞質での分解に関わる酵素であり、その診断は血中、尿中Asn-GlcNAcの蓄積を質量分析による定量することによる。この定量法を確立し患者サンプルで機能解析を行った。

#### D. 考察

IGDを含め、CDGは症状が広範で、症状から診断をすることが困難である。IGDの遺伝子パネル検査が保険収載されたが、症例を絞り込むためにはスクリーニング検査が必須であるので保険収載に向けて準備中である。遺伝子解析が多くの施設でされているが依然としてデータのシェアが進んでいない。新規の原因遺伝子を見つける上ではスクリーニングは重要であるが、既知の責任遺伝子については、網羅的な遺伝子解析が威力を発揮する。疾患登録の必要性もあるので、データシェアリングのシステムが早く構築されることを期待している。

#### E. 結論

網羅的な遺伝子解析によって見つかった国内外のIGD症例について機能解析を行い、多数の新規症例の確定診断を行った。また国内のCDG症例についても糖鎖解析による機能解析を行った。NGLY1の機能解析として血中、尿中Asn-GlcNAcの蓄積を質量分析によって定量する方法を確立した。N型およびムチン型糖鎖解析のエス・アール・エル社への技術移転を行い、正常コントロールを測定し、カットオフ値の設定を行なった。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Thompson MD, Li X, Spencer-Manzon M, Andrade DM, Murakami Y, Kinoshita T, Carpenter TO. Excluding Digenic Inheritance of *PGAP2* and *PGAP3* Variants in Mabry Syndrome (OMIM 239300) Patient: Phenotypic Spectrum Associated with *PGAP2* Gene Variants in Hyperphosphatasia with Mental Retardation Syndrome-3 (HPMRS3) *Genes (Basel)*. 14(2):359. 2023

Liu YS, Wang Y, Zhou X, Zhang L, Yang G, Gao XD, **Murakami Y**, Fujita M, Kinoshita T. Accumulated precursors of specific GPI-anchored proteins upregulate GPI biosynthesis with ARV1 *J Cell Biol*. 222(5) :e202208159. 2023

Salinas-Marín R, **Murakami Y**, González-Domínguez CA, Cruz-Muñoz ME, Mora-Montes HM, Morava E, Kinoshita T, Monroy-Santoyo S, Martínez-Duncker I. Case report: Functional characterization of a *de novo* c.145G>A p.Val49Met pathogenic variant in a case of PIGA-CDG with megacolon *Front Genet*. 13:971473. 2022

Loong L, Tardivo A, Knaus A, Hashim M, Pagnamenta AT, Alt K, Böhrer-Rabel H, Caro-Llopis A, Cole T, Distelmaier F, Edery P, Ferreira CR, Jezela-Stanek A, Kerr B, Kluger G, Krawitz PM, Kuhn M, Lemke JR, Lesca G, Lynch SA, Martinez F, Maxton C, Mierzevska H, Monfort S, Nicolai J, Orellana C, Pal DK, Płoski R, Quarrell OW, Rosello M, Rydzanicz M, Sabir A, Śmigiel R, Stegmann APA, Stewart H, Stumpel C, Szczepanik E, Tzschach A, Wolfe L, Taylor JC, **Murakami Y**, Kinoshita T, Bayat A, Kini U. Biallelic variants in PIGN cause Fryns syndrome, multiple congenital anomalies-hypotonia-seizures syndrome, and neurologic phenotypes: A genotype-phenotype correlation study *Genet Med*. 25(1):37-48. 2023

Shichinohe N, Kobayashi D, Izumi A, Hatanaka K, Fujita R, Kinoshita T, Inoue N, Hamaue N, Wada K, **Murakami Y**. Sequential hydrolysis of FAD by ecto-5' nucleotidase CD73 and alkaline phosphatase is required for uptake of vitamin B<sub>2</sub> into cells *J Biol Chem.* ;298(12):102640 2022

Kuwayama R, Suzuki K, Nakamura J, Aizawa E, Yoshioka Y, Ikawa M, Nabatame S, Inoue I, Shimmyo Y, Ozono K, Kinoshita T, **Murakami Y** Establishment of mouse model of inherited PIGO deficiency and therapeutic potential of AAV-based gene therapy *Nat Commun* 13:3107 doi.org/10.1038/s41467-022-30847-x 2022

Ishida M, Maki Y, Ninomiya A, Takada Y, Campeau P, Kinoshita T, **Murakami Y** The ethanolamine phosphate on the second mannose as an alternative bridge in GPI anchored proteins: Implications in the study of inherited GPI deficiency *EMBO Rep*, e54352.doi: 10.15252/embr.202154352 2022

Wang Y, Menon AK, Maki Y, Liu YS, Iwasaki Y, Fujita M, Guerrero PA, Varón Silva D, Seeberger PH, **Murakami Y**, Kinoshita T Genome-wide CRISPR screen reveals CLPTM1L as a lipid scramblase required for efficient glycosylphosphatidylinositol biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 119(14): e2115083119 2022

## 2. 学会発表

村上良子 GPI 異常症:先天性 GPI 欠損症と発作性夜間ヘモグロビン尿症 第 63 回日本神経学会シンポジウム 東京 2022 5 月

村上良子 先天性 GPI 欠損症 第 18 回先天代謝学会セミナー 東京 2022 7 月

村上良子 鈴木啓一郎 木下タロウ 先天性 PIGO 欠損症のモデルマウスの作製とその遺伝子治療 第 41 回日本糖質学会 大阪 2022 9 月

Yoshiko Murakami, Tian Tian Lu, Xueying Li, Yicheng Wang, Taroh Kinoshita ARV1 works as a component of the first step complex of GPI biosynthesis facilitating the recruitment of the substrate; phosphatidylinositol.

第 95 回生化学会 名古屋 2022 11 月

村上良子 先天性 GPI 欠損症の診断と治療 第 45 回分子生物学会 ワークショップオーガナイザー 千葉 2022 11-12 月

## 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