

平成 22 年 5 月 14 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2011

課題番号：19390093

研究課題名（和文）糖タンパク質糖鎖合成不全症 CDG の研究基盤形成

研究課題名（英文）Establishment of the basis for the elucidation of CDG, a syndrome of glycosylation defects

研究代表者

和田 芳直（WADA YOSHINAO）

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪府立母子保健総合医療センター（研究所）・代謝部門・部長（研究所長）

研究者番号：00250340

研究代表者の専門分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：異常代謝学、糖鎖

1. 研究計画の概要

- (1) N型糖鎖合成異常症の診断解析により N 型糖鎖 CDG の我が国における頻度と病型を明らかにする。
- (2) O型糖鎖異常症解析に適した O型糖鎖含有糖タンパク質の探索を行い、従来困難とされた付加部位決定の方法を確立する。さらに、バイオマーカーとしての O型糖鎖の探索を行う。
- (3) その他、糖鎖解析に関する従来の問題を解決する。

2. 研究の進捗状況

- (1) 年間約 100 例のペースで発達遅滞児について糖タンパク質糖鎖構造異常の探索を行い、依頼を受けたうちの 1/100 の頻度で CDG を発見している。コーカサス人種において最頻のタイプ CDG- a (ホスホマンノムターゼ 2: *PMM2*) は我が国においても最頻であるが欧州高頻度の R141H 変異は日本人では見つかっておらず、反対に R238P 変異が高頻度に見つかっている。また、シアル酸付加不全患者において *cutis laxa-2* を発見した。我々が用いている診断法の有効性を確かめるためにオランダ Nijmegen の St. Radbaoud 大学医療センターと共同研究を開始した。
- (2) 血中 O 型（ムチン型）糖タンパク質で最も豊富に存在するのが IgA1、次に hemopexin である。IgA1 はクラスター状に糖鎖が付加し、hemopexin は散在する形である。IgA1 の糖鎖付加部位を電子移動解離により分析した結果、次のことを明らかにした。まず、IgA1 にムチン型

糖鎖を付加する起点となる GalNAc 転移酵素は GalNT2 とされているが、*in vitro* での GalNT2 によるクラスター的な付加反応の観察においてペプチドを基質に用いる従来の方法では真の付加順序は明らかにできないことがわかった。次に、関節リウマチ患者では従来 IgG の N 型糖鎖における末端ガラクトース欠損が知られているが、このような患者における O 型糖鎖異常はガラクトース欠損でなく、Ser/Thr に付加する GalNAc の減少、すなわち O 型糖鎖自体の減少であることを明らかにした。一連の研究において、O 型糖鎖を構成する各糖ユニットの定量法を開発した。さらに、hemopexin が O 型糖鎖 CDG の探索に適していることを明らかにした。

- (3) 酸性糖鎖 / 糖脂質の高感度な分析について、従来の紫外レーザーを用いるマトリックス支援レーザー脱離イオン化法に比べて中赤外波長レーザーを用いる方法が、感度とソフトさの点でまさっていることを明らかにした。

3. 現在までの達成度

当初の計画以上に進展している。当初予想していたよりも実際の疾患についての分析経験を豊富にもつことができたことと、(2),(3)については、武田科学振興財団の助成による機器整備が行われたため。

4. 今後の研究の推進方策

予想以上に進展したので、最終年度はグリコサミノグリカンおよびジストログリカン糖鎖の解析と疾患解析に研究を広げる。

5. 代表的な研究成果

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計12件)

Wada Y, Azadi P, (28名中1番目)
"Comparison of the methods for profiling glycoprotein glycans—HUPO Human Disease Glycomics/Proteome Initiative multi-institutional study" *Glycobiology* 17: 411-422 (2007)

Wada Y. "Mass spectrometry in the detection and diagnosis of congenital disorders of glycosylation" *Eur. J Mass Spectrom* 13, 101-103 (2007)

Tajiri M, Ohyama C, Wada Y.
"Oligosaccharide profiles of the prostate specific antigen in free and complexed forms from prostate cancer patient serum and in seminal plasma: a glycopeptide approach" *Glycobiology*. 18, 2-8, 2008

Kariya Y, Kato R, (10名中8番目)
"N-Glycosylation of laminin-332 regulates its biological functions. A novel function of the bisecting GlcNAc" *J Biol Chem* 283, 33036-33045 (2008)

Nagai M, Nagai Y, (7名中5番目)"Effect of reversed heme orientation on circular dichroism and cooperative oxygen binding of human adult hemoglobin" *Biochemistry* 47, 517-525 (2008)

Nakano M, Nakagawa T, (10名中8番目)
"Site-specific analysis of N-glycans on haptoglobin in sera of patients with pancreatic cancer: A novel approach for the development of tumor markers." *Int J Cancer*. 122, 2301-2309 (2008)

Wada Y, Tajiri M. "Tackling difficulties in the determination of O-glycosylation sites: approaches to mucin-type glycoproteins" *Trends Glycosci. Glycotecnol.* 20, 69-80 (2008)

Tajiri M, Kadoya M, Wada Y. "Dissociation profile of protonated fucosyl glycopeptides and quantitation of fucosylation levels of glycoproteins by mass spectrometry." *J Proteome Res* 8(2), 688-693 (2009) Feb

Sato Y, Isaji T, (9名中8番目) *J Biol Chem*
"An N-glycosylation site on the -propeller domain of the integrin 5 subunit plays key roles in both its function and site-specific modification by 1,4-N-acetylglucosaminyltransferase III" *J Biol Chem* 284(18), 11873-11881 (2009)

Tajiri M, Takeuchi T, Wada Y. "Distinct features of matrix-assisted 6 μ m infrared laser desorption/ionization mass spectrometry in biomolecular analysis" *Anal Chem* 81(16) 6750-6755 (2009)

Wada Y, Tajiri M, Ohshima S. "Quantitation of saccharide compositions of O-glycans by mass spectrometry of glycopeptides and its application to rheumatoid arthritis" *J Proteome Res* 9(3):1367-1373 (2010) Mar-5

Wada Y, Dell A, (30名中1番目)
"Comparison of methods for profiling O-glycosylation: HUPO Human Disease Glycomics/Proteome Initiative multi-institutional study of IgA1" *Mol Cell Proteomics* 9(4): 719-727 (2010)

[学会発表](計39件)

田尻道子、和田芳直. N型糖鎖付加ペプチドにおけるコア 1,6-フコースとルイス型 1,3-フコースの解離について. 第55回質量分析総合討論会 2007、2007.5.16: 広島、口頭発表

田尻道子、和田芳直. 糖ペプチド構造解析における MALDI と ESI の比較. 第55回質量分析総合討論会 2007、2007.5.16: 広島、ポスター発表

和田芳直. HUPO 多施設共同パイロット研究 - MS による糖鎖定量 -. 第55回質量分析総合討論会 2007、2007.5.18: 広島、シンポジウム

Takeuchi T, Tajiri M, Wada Y. Theoretical study on fragmentation mechanism of positive and negative ions of oligosaccharides.. 55th ASMS Conference on Mass Spectrometry, 2007.6.5. : Indianapolis, USA、一般講演ポスター
<以下35件は割愛>

[図書](計4件)

和田芳直. 生体分子の質量分析. 実験化学講座 20-1、PP432-442、丸善、東京、(2007)

Wada Y. "Mass spectrometry of glycopeptides" in *Experimental glycoscience: Glycochemistry* (eds. Taniguchi N et al.) Springer pp98-99 (2008)

Wada Y. "Molecular diagnosis of congenital disorders of glycosylation" in *Experimental glycoscience: Glycobiology* (eds. Taniguchi N et al.) Springer pp319-322 (2008)

Wada Y. "Detection and characterization of protein mutations by mass spectrometry" in *"The Protein Protocols Handbook 3rd Ed"* John M Walker (ed.) Humana Press pp1081-1094 (2009)