

令和元年5月23日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19208

研究課題名(和文)糖鎖プライマー法を基盤とするムコ多糖症診断プローブの創製

研究課題名(英文) Development of diagnostic probes for mucopolysaccharidosis based on saccharide primer method

研究代表者

佐藤 智典 (Sato, Toshinori)

慶應義塾大学・理工学部(矢上)・教授

研究者番号：00162454

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：ムコ多糖症(MPS)は先天性のライソゾーム病のひとつである。本課題では、MPSの早期診断を実現するために、新生児マススクリーニングで利用可能な診断プローブとなる糖鎖ライブラリーを製作した。

糖鎖ライブラリーの作製には、糖鎖生合成経路の前駆体である糖鎖プライマーXyl-Ser-C12を用いた。糖鎖プライマーを、正常ヒト皮膚繊維芽細胞等の細胞培養液中に添加し、得られた糖鎖ライブラリーの構造をLC-MSにより解析した。得られた糖鎖ライブラリー中からMPS診断基質化合物を探索するために、糖分解酵素を用いて糖鎖の配列解析を行った。結果として、MPS型とII型の診断基質候補となる糖鎖が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ムコ多糖症とは先天性代謝疾患である。ムコ多糖症患者は生まれつきライソゾームに存在するグリコサミノグリカン(GAG)を分解する酵素が欠損しており、その結果、ムコ多糖が体内に蓄積し、臓器の肥大化や骨の変形など様々な障害を引き起こす。ムコ多糖症は進行性疾患のため、早期診断により、早期治療が必要である。そこで、新生児マススクリーニングにおいてムコ多糖症の診断を可能にする基質を開発することで、早期診断と早期治療が可能となる。

研究成果の概要(英文)：Mucopolysaccharidosis (MPS) is one of the congenital lysosomal diseases. In this study, in order to realize early diagnosis of MPS, we have prepared a saccharide library to be a diagnostic probe that can be used in newborn screening.

For preparation of a saccharide library, saccharide primer Xyl-Ser-C12, which is a precursor of a glycan biosynthesis pathway, was used. The saccharide primer was added to the cell culture medium of normal human skin fibroblasts, and the structure of the obtained saccharide library was analyzed by LC-MS. In order to search MPS diagnostic substrate compounds from the obtained saccharide library, sequence analysis was performed using glycolytic enzymes. As a result, sugar chains that can be used as diagnostic substrates for MPS type I and type II were obtained.

研究分野：生体分子工学

キーワード：糖鎖プライマー法 ムコ多糖症 グリコサミノグリカン 質量分析装置 糖鎖ライブラリー 早期診断

## 1. 研究開始当初の背景

ムコ多糖症 (MPS) は先天性代謝異常症のひとつであり、分解酵素の欠損によりグリコサミノグリカン (GAG) が蓄積するライソゾーム病である。欠損する酵素の種類により 7 種類の病型に分類されている。例えば、I 型はイズロニダーゼ、II 型はイズロン酸-2-スルファターゼが欠損している。幼児期には症状が目立たず、成長に従い症状が現れ、重症の場合には 10 歳代で呼吸や歩行が困難な状態になり成人前に死亡することが多い。症状は各病型で多様であるが、I 型では成長阻害・中枢神経症状、II 型は肝脾腫・成長障害・精神発達障害がみられる。この治療法としては、かつては骨髄移植しか方法がなくまさしく難病であった。近年、細胞内に蓄積する GAG を分解するための酵素補充療法が認可されている。しかしながら、患者の多くは症状が出始めてから各種検査を受けて診断され、治療が開始される。酵素補充療法では病気の進行を遅らせることはできても、それまでの成長阻害や骨の変形を回復することはできない。そこで、早期診断により発症前の幼児期から治療を開始することが望まれている。

一方、新生児の先天性代謝異常などの疾患を早期に発見する目的で新生児マススクリーニングが行われている。もし、新生児マススクリーニングにおいてムコ多糖症を診断することができれば、発症前診断により早期治療を開始することが可能になる。そこで必要となるのが、質量分析装置でのスクリーニングに利用可能な診断プローブである。診断プローブの候補となるのは GAG の分解酵素の基質となる糖鎖である。そのような基質として単糖誘導体が知られている。しかしながら、単糖誘導体では酵素との親和性が低く、基質特異性が乏しいことから、正確な診断ができないことも問題となっている。

以上の様な背景により、酵素との親和性に優れ、しかも質量分析装置での迅速診断に適用可能な GAG 型糖鎖の開発が期待されている。

## 2. 研究の目的

本研究では、ムコ多糖症の早期診断を実現するために、新生児マススクリーニングで利用可能な診断プローブとして GAG 型の糖鎖ライブラリーの作製を行った。新生児マススクリーニングで想定される検査では、診断プローブを検査対象者の血液と相互作用させ、血液中に正常な GAG 分解酵素が存在していれば診断プローブの分解が観察され、一方、分解が見られなければムコ多糖症の可能性があると判断される。このようなスクリーニング検査を経て、遺伝子検査などにより詳しい診断を行うことができる。ムコ多糖症は欠損している酵素により 7 種類の病型に分類されている。酵素補充療法が行われている病型での欠損酵素の標的となる GAG はデルマトン硫酸 (DS) 型である。DS はコンドロイチン硫酸 B とも言われており二糖の繰返し構造により構成されている。そこで、DS 型の GAG オリゴ糖の糖鎖ライブラリーを作製し、ムコ多糖症に関係した GAG 分解酵素との基質特異性を質量分析装置で評価して、新生児マススクリーニングへの応用の可能性を見いだすことを目的とした。

## 3. 研究の方法

### 1) 糖鎖プライマー法による GAG 型の糖鎖ライブラリーの作製

糖鎖プライマーとは糖鎖生合成経路の前駆体となる糖誘導体である。GAG はプロテオグリカンの多糖部分であり、タンパク質中のセリン (Ser) 残基にキシロース (Xyl) が結合することで GAG 型の生合成が起きる。そこで、GAG の生合成の前駆体構造となる糖鎖プライマーとして Xyl と Ser が結合した糖アミノ酸にラウリン酸を結合した Xyl-Ser-C12 を設計した (図 1)。糖

鎖プライマーを細胞培養液中に添加しておく  
と細胞内に取り込まれ、ゴルジ体へ運ばれて糖鎖伸長を受ける。糖鎖伸長を受けた生成物（糖鎖ライブラリー）の大部分は細胞外に分泌されるので、培養液を回収するだけで容易に糖鎖伸長生成物と細胞との分離を行える（図2）。得られた糖鎖ライブラリーの配列は質量分析装置（MS）により解析する。細胞としては、DS型の糖鎖ライブラリーを得るために、DSを高発現している正常ヒト皮膚繊維芽細胞（NB1RGB）などを用いた。また、DSを効率よく得るために、硫酸基転移遺伝子（UST）を正常ヒト皮膚繊維芽細胞に過剰

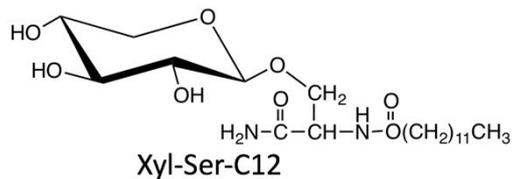


図1 糖鎖プライマー Xyl-Ser-C12 の構造

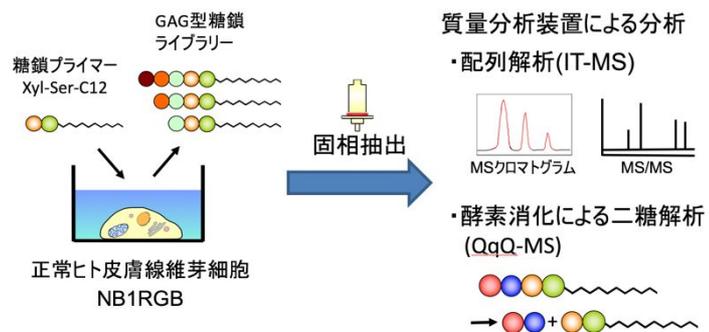


図2 糖鎖プライマー法による糖鎖の獲得と配列解析方法

発現させた細胞株を構築した。このために、USTを組み込んだレトロウイルスを作製して、USTをNB1RGB細胞に過剰発現させた。これらの細胞から得られた糖鎖ライブラリーの構造は、液体クロマトグラフィー（LC）とMSを接続したLC-MSにより解析した。糖鎖プライマー法により得られるGAG型糖鎖ライブラリーの分析に適した固相抽出法を検討した。シーケンスはイオントラップ型質量分析装置（IT-MS）により多段階のフラグメントイオンの解析により決定した。MSの測定では、定量性を高めるために、MRMモードでの測定を行った。そのために、糖鎖伸長生成物毎にパラメーターの決定を行った。さらに、DS型の二糖構造の存在を確認するために、GAGの加水分解酵素であるコンドロイチナーゼABCで処理をして、分解産物をトリプル四重極質量分析装置（QqQ-MS）で検出した。

## 2) 糖鎖ライブラリーの配列解析

DS型の糖鎖ライブラリーを用いて、ムコ多糖症と関係するGAG分解酵素に対する基質特異性を検討した。この実験では、試験管中で糖鎖ライブラリーと上記のGAG分解酵素を混合したのちに、酵素消化された生成物をLC-MSを用いて解析した。

## 4. 研究成果

NB1RGB細胞にXyl-Ser-C12を投与した結果、GAG型の糖鎖伸長生成物14種類を獲得した。検出量はMRM Modeにより測定した。得られた糖鎖伸長生成物を酵素処理することで、診断基質として利用可能な配列の探索を行った。末端にHexNAcを有する生成物が複数得られ、その構造を決めるために、 $\alpha$ -N-Acetylgalactosaminidase (GalNAcase)でGAG型糖鎖の末端のHexNAcの解離の有無を検討した。酵素処理後にLC-MSを測定したところ、3種類の糖鎖伸長生成物NRX5、NRX7、NRX9の検出量が減少していた。一方で、NRX4、NRX6、NRX8といったHexNAcが解離した生成物の検出量は増加していた。このことより、NRX5、NRX7、NRX9の末端のHexNAcは結合のGalNAcを含むことが示された（図3）。

以上の様に、GalNAcaseを処理して末端にHexAを有する糖鎖伸長生成物（NRX4、NRX6、NRX8）が増加した。次に、HexAを有するNRX4、NRX6、NRX8を $\alpha$ -L-iduronidase (IDUA)で処理した。その結果、NRX6、NRX8ではIDUAによりほぼ完全に末端のHexAの解離が見

られ、NRX5 と NRX7 の検出量が増加した。一方で、NRX4 の検出量に変化は見られなかった。これにより、NRX6, NRX8 の末端の HexA は IdoA であり ( 図 4 )、NRX4 の末端はグルクロン酸 (GlcA) であることが示された。

以上の結果より、NRX6 と NRX8 はムコ多糖症 I 型の診断基質となる可能性が示された。

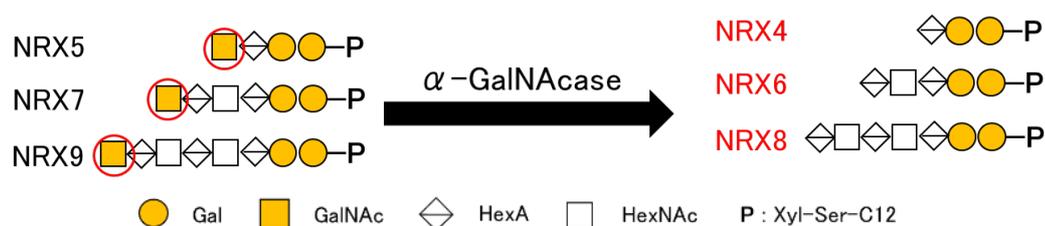


図 3 GalNAcase による糖鎖構造の変換

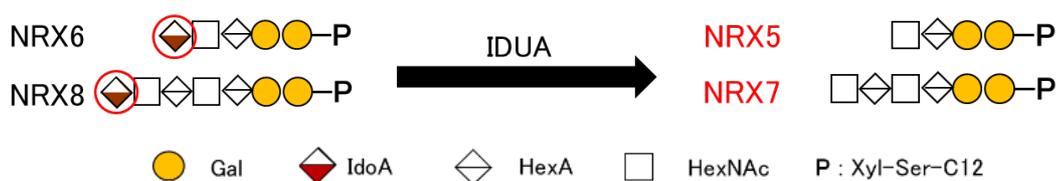


図 4 IDUA による糖鎖構造の変換

ムコ多糖症 I 型診断基質になり得る糖鎖伸長生成物を獲得するため、DS 型 GAG の合成促進を目的として、NB1RGB 細胞に硫酸基転移酵素遺伝子 (UST) の安定的な過剰発現細胞株 (NB1RGB-UST) を樹立した。Real time RT-PCR で過剰発現を評価した結果、野生株と比較して、発現量が約 811 倍に増加していた。また、ウエスタンブロットングにより、タンパク質の過剰発現も確認された。Xyl-Ser-C12 を NB1RGB-UST 細胞株に投与した結果、mock 細胞株と比較して、硫酸化糖鎖伸長生成物の種類や量の増加がみられた。二糖解析を行ったところ、糖鎖伸長生成物中の二糖組成が変化していることが明らかになった。特に、ヘキスロン酸 (HexA) の 2 位が硫酸化された二糖の増加がみられた。過剰発現した UST の作用により DS 型の糖鎖の合成が向上していることが示唆された。よって、IdoA の 2 位が硫酸化された構造が増加したことから、得られた糖鎖伸長生成物はムコ多糖症 I 型に対する診断基質になり得ることが示唆された。

以上により、日本人での患者数が多い、ムコ多糖症 I 型および II 型の診断基質の候補となる化合物が糖鎖プライマー法により合成できることが示された。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. Comparative Quantification Method for Glycosylated Products Elongated on  $\beta$ -Xylosides Using a Stable Isotope-Labeled Saccharide Primer, Yuya Otsuka, Toshinori Sato, Anal. Chem., **90**, 5201-5208 (2018). DOI: 10.1021/acs.analchem.7b05438 ( 査読あり )
2. Saccharide primers comprising xylosyl-serine primed phosphorylated oligosaccharides act as intermediates in glycosaminoglycan biosynthesis, Yuya Otsuka, Toshinori Sato, ACS Omega, **2**, 3110-3122 (2017) DOI: 10.1021/acsomega.7b00073 ( 査読あり )

〔学会発表〕(計5件)

1. 糖鎖プライマー法を用いたムコ多糖症の診断基質の開発、八木柚香、渡辺摩周、松林慶一、中島英規、小野寺雅史、佐藤智典、第68回高分子学会年次大会、2019年5月29日
2. 糖鎖プライマー法によるがん細胞のラクト/ネオラクト型糖鎖発現プロファイル解析と細胞運動能との相関解析、城代航、佐々木克昌、佐藤智典、GlycoTOKYO2018シンポジウム、2018年12月1日
3. 糖鎖プライマー法を用いたがん細胞で発現するムチン型O-グリカンの多様性及びアミノ酸及びアミノ酸残基選択性の解析、長井香、佐々木克昌、佐倉隆馬、佐藤智典、第37回糖質学会年会、2018年8月29日
4. ムコ多糖症の新生児マススクリーニングに向けたGAG型オリゴ糖基質の開発、渡辺摩周、松林慶一、小野寺雅史、市田悠、中島英規、佐藤智典、日本化学会第98春季年会、2018年3月20日
5. Structure analysis of glycosaminoglycan intermediate oligosaccharides elongated on  $\beta$ -xylosides, Yuya Otsuka, Toshinori Sato, 65<sup>th</sup> Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, June4-7, 2017, Indiana, USA

〔図書〕(計1件)

糖鎖プライマー法によるバイオコンビナトリアル合成、佐藤智典、「中分子創薬に資するペプチド・核酸・糖鎖の合成技術」、シーエムシー出版、pp241-247 (2018)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1)連携研究者

氏名：小野寺 雅史(オノデラ マサフミ)

所属：国立成育医療研究センター成育遺伝研究部

職：部長

研究者番号：10334062

氏名：中島 英規(ナカジマ ヒデキ)

所属：国立成育医療研究センターマススクリーニング研究室

職：研究員

研究者番号：30450620

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。