

機関番号：84408

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2007～2010

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) Basic Research on Congenital Disorders of Glycosylation(CDG)

研究代表者

和田 芳直(WADA YOSHINA O)

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)

研究者番号：00250340

研究成果の概要(和文):

原因不明の精神運動発達遅滞患者における先天性糖鎖合成不全症 CDG の実態を明らかにするため、分子診断法の改良を行った。特に、O型糖鎖の合成不全症について迅速・簡便な分析方法を開発した。これらの方法を用いて全国の小児科医に対する診断支援を行った結果、診断のつかない精神運動発達遅滞等患者 700 名から 7 名の CDG 患者を発見し、高頻度であることがわかった。また、新しい技術や考え方に基づく糖鎖分析方法を開発した。

研究成果の概要(英文):

Congenital Disorders of Glycosylation (CDG) is a large group of diseases caused by defects in glycan biosynthesis of glycoproteins. To obtain our knowledge of CDG that would be present in undiagnosed patients with developmental delay, methods for molecular diagnosis have been developed and introduced to clinical practice. Finally we found seven patients among 700 examined. The result tells us considerably high frequency of CDG. In addition, some technological developments for glycan analysis have been made.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2008年度	3,300,000	990,000	4,290,000
2009年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2010年度	3,200,000	960,000	4,160,000
総計	13,400,000	4,020,000	17,420,000

研究分野：分子医科学

科研費の分科・細目：6906

キーワード：糖鎖、生合成、代謝異常症、質量分析、糖タンパク質、精神運動発達遅滞

## 1. 研究開始当初の背景

生体のタンパク質の約半数は糖タンパク質である。糖タンパク質における糖鎖の機能は様々に説明されているが、糖鎖の重要性を圧倒的なインパクトをもって示すことができるのは糖鎖合成異常(不全)症(Congenital Disorders of Glycosylation: CDG)を解明す

ることである。実際、近年の糖鎖生物学の展開によって多数の糖鎖遺伝子がクローニングされたが、糖鎖異常によって影響を受けるであろうタンパク質が極めて多数であるので、生体レベルでの機能解析は困難であり、糖鎖研究は分子/細胞レベルに終始してきた。しかし、医学研究の目的はヒトの病気の

克服である。CDG は関連する遺伝子は 500 とも言われている疾患群の総称であることから、その頻度は高いはずであるが、ほとんどが診断されないまま、精神運動発達遅滞やてんかんなどとして放置されていると思われる。この問題に解決の突破口を開く必要がある。

## 2. 研究の目的

CDG の全貌解明へ向けての基盤づくりである本申請の研究目標は次の通りである。

(1) O 型糖鎖解析法の開発と O グリコプロテオームの実施 = ムチン型糖鎖付加部位の解析によるデータ蓄積

(2) ムチン型糖鎖合成を担う GalNAc 転移酵素の孤立性付加における基質特異性あるいはペプチド認識モチーフの解析

(3) N 型糖鎖 CDG 分子診断法の簡略化、および培養線維芽細胞を用いた病型診断法の確立、発症症例の病型により in vitro における治療の試み

## 3. 研究の方法

(1) O 型糖鎖解析法：血漿タンパクを糖ペプチドとし、レクチン (Jacalin) と独自の的方法による糖ペプチド濃縮の後、HPLC で分画し、質量分析を行う。

(2) ムチン型糖鎖付加ルール：上で得られた糖ペプチドについて糖鎖付加部位を決定する。

(3) 質量分析のための試料調製を改良する。

## 4. 研究成果

(1) まずは主要な血漿タンパクにおけるムチン型糖鎖付加タンパクを同定し、その付加部位を決定した。新規の付加部位を 16 ヶ所同定した。

(2) ムチン型糖鎖について、それぞれ cluster 状あるいは scatter 状の付加様式をもつ IgA とヘモペキシンについて、その付加部位を決定し、電子移動解離 - 質量分析により、それらの付加部位と付加率を決定した。IgA に関する結果からは、従来のペプチドを基質アクセプターとする糖転移では生体内の真の付加を再現できないことがわかった。また、マススペクトルから糖ユニットモル数の計算方法を開発し、関節リウマチ患者に適用し、関節リウマチ患者の IgA ヒンジ領域ムチン型糖鎖には、IgG の N 型糖鎖で報告されているガラクトース付加の減少はなく、糖鎖数すなわちタンパクに直接付加して糖鎖伸長の起点となる N アセチルガラクトサミン数が減少していることを見出した。

(3) 極めて簡便・迅速なムチン型糖鎖付加分析法を開発した。

全国の小児科医を対象として行った診断支援活動により原因不明の精神運動発達遅滞等患者 700 名を分析し、7 名の患者を発見

した。診断のつかないこのような患者は全国に多いが、その 1 % が CDG であることがわかった。驚くべき発見である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 15 件)

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

2. Wada Y, Dell A, Haslam SM, Tissot B, Canis K, Azadi P, Backstrom M, Costello CE, Hansson GC, Hiki Y, Ishihara M, Ito H, Kakehi K, Karlsson N, Hayes CE, Kato K, Kawasaki N, Khoo KH, Kobayashi K, Kolarich D, Kondo A, Lebrilla C, Nakano M, Narimatsu H, Novak J, Novotny MV, Ohno E, Packer NH, Palaima E, Renfrow MB, Tajiri M, Thomsson KA, Yagi H, Yu SY, and Taniguchi N. Comparison of methods for profiling O-glycosylation: Human Proteome Organisation Human Disease Glycomics/Proteome Initiative multi-institutional study of IgA1. *Mol Cell Proteomics* 9: 719-727, 2010.

3. Hayakawa S, Matsumoto S, Hashimoto M, Iwamoto K, Nagao H, Toyoda M, Shigeri Y, Tajiri M, and Wada Y. High-energy electron transfer dissociation (HE-ETD) using alkali metal targets for sequence analysis of post-translational peptides. *J Am Soc Mass Spectrom* 21: 1482-1489, 2010.

4. Shibukawa Y, Yamazaki N, Kumasawa K, Daimon E, Tajiri M, Okada Y, Ikawa M, and Wada Y. Calponin 3 regulates actin cytoskeleton rearrangement in trophoblastic cell fusion. *Mol Biol Cell* 21: 3973-3984, 2010.

5. Kitazume S, Tachida Y, Kato M, Yamaguchi Y, Honda T, Hashimoto Y, Wada Y, Saito T, Iwata N, Saido T, and Taniguchi N. Brain endothelial cells produce amyloid  $\beta$  from amyloid precursor protein 770 and preferentially secrete the O-glycosylated form. *J Biol Chem* 285: 40097-40103, 2010.

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

7. Sato Y, Isaji T, Tajiri M, Yoshida-Yamamoto S, Yoshinaka T, Somehara T, Fukuda T, Wada Y, and Gu J. An N-glycosylation site on the beta-propeller domain of the integrin alpha5 subunit plays key roles in both its function and site-specific modification by  $\beta$ 1,4-N-acetylglucosaminyltransferase III. *J Biol Chem* 284: 11873-11881, 2009.

8. Tajiri M, Takeuchi T, and Wada Y. Distinct features of matrix-assisted 6 μm infrared laser desorption/ionization mass spectrometry in biomolecular analysis. *Anal Chem* 81: 6750-6755, 2009.
9. Tajiri M, Ohyama C, and Wada Y. Oligosaccharide profiles of the prostate specific antigen in free and complexed forms from the prostate cancer patient serum and in seminal plasma: a glycopeptide approach. *Glycobiology* 18: 2-8, 2008.
10. Kariya Y, Kato R, Itoh S, Fukuda T, Shibukawa Y, Sanzen N, Sekiguchi K, Wada Y, Kawasaki N, and Gu J. N-Glycosylation of laminin-332 regulates its biological functions. A novel function of the bisecting GlcNAc. *J Biol Chem* 283: 33036-33045, 2008.
11. Nagai M, Nagai Y, Aki Y, Imai K, Wada Y, Nagatomo S, and Yamamoto Y. Effect of reversed heme orientation on circular dichroism and cooperative oxygen binding of human adult hemoglobin. *Biochemistry* 47: 517-525, 2008.
12. Nakano M, Nakagawa T, Ito T, Kitada T, Hijioka T, Kasahara A, Tajiri M, Wada Y, Taniguchi N, and Miyoshi E. 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.
13. Wada Y, Azadi P, Costello CE, Dell A, Dwek RA, Geyer H, Geyer R, Kakehi K, Karlsson NG, Kato K, Kawasaki N, Khoo KH, Kim S, Kondo A, Lattova E, Mechref Y, Miyoshi E, Nakamura K, Narimatsu H, Novotny MV, Packer NH, Perreault H, Peter-Katalinic J, Pohlentz G, Reinhold VN, Rudd PM, Suzuki A, and Taniguchi N. Comparison of the methods for profiling glycoprotein glycans--HUPO Human Disease Glycomics/Proteome Initiative multi-institutional study. *Glycobiology* 17: 411-422, 2007.
14. Wada Y. Mass spectrometry in the detection and diagnosis of congenital disorders of glycosylation. *Eur J Mass Spectrom (Chichester, Eng)* 13: 101-103, 2007.
15. Wada Y, Yanagishita T, and Masuda H. Ordered porous alumina geometries and surface metals for surface-assisted laser desorption/ionization of biomolecules: possible mechanistic implications of metal surface melting. *Anal Chem* 79: 9122-9127, 2007.

〔学会発表〕(計 39 件)

1. 田尻道子、竹内孝江、和田芳直 . 中赤外レーザーを用いる脱離イオン化の特性と酸性糖質およびSニトロソ化合物への応用 第58回質量分析総合討論会 . 2010.6.18 : つくば

シンポジウム

2. Wada Y. "A new perspective of O-glycoproteomics" The 13th Beijing Conference and Exhibition on Instrumental Analysis (BCEIA2009) 、2009.11.26、北京、基調講演
3. 和田芳直、角谷真知子、田尻道子 . 糖鎖バイオマーカー解析のための糖鎖プロファイル定量化 - IgG と IgA への応用 . 第 34 回日本医用マススペクトル学会年会、2009.9.10 : 東大阪、シンポジウム
4. 和田芳直 . ありふれたタンパクの疾患糖鎖マーカー . 日本ヒトプロテオーム機構第 7 回大会 . 2009.7.28 : 東京、シンポジウム
5. Wada Y. Soft ionization and dissociation required for glycoproteomic studies. 第 22 回オーストラリアニュージーランド質量分析学会 ANZSMS、2009.1.28 : シドニー、招待講演
6. Wada Y. Clinical glycoproteomics: from CDG to O-glycoproteomics. 日台科学技術セミナー・シンポジウム (タンパク質翻訳後修飾) 2008.12.3、台北
7. Wada Y. Getting a real picture of molecules for the diagnosis by MS. 2008 韓国質量分析学会 2008、2008.8.26、済州、韓国 plenary lecture
8. 和田芳直 . O-グリコプロテオームと電子移動解離 MS . 日本ヒトプロテオーム機構第 6 回大会、2008.7.29 : 吹田 シンポジウム
9. Wada Y. "Glyco-biomedical mass spectrometry" The 9th Asian Conference on Analytical Sciences 2007.11.5 : 韓国済州、招待講演 Keynote Lecture
10. 和田芳直 . N グリカン定量に関する HUPO HGPI パイロット研究 . 日本ヒトプロテオーム機構第 5 回大会 . 2007.7.30 : 東京、シンポジウム
11. Wada Y. MS of glycopeptides for glycoproteomics. 台湾質量分析学会 2007、2007.6.30 : 台南、plenary lecture
12. 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

など

〔図書〕(計 7 件)

1. 和田芳直 . グライコプロテオミクスによる疾患糖鎖マーカー探索 . 「創薬・タンパク質研究のためのプロテオミクス解析」実験医学別冊 . Pp104-111 (2010)、羊土社
2. Wada Y. "Detection and characterization of protein mutations by mass spectrometry" in "The Protein Protocols Handbook 3rd Ed" John M Walker (ed.) Humana Press (2009)

3. 和田芳直 . 先天性グリコシル化異常症 (CDG 症候群) . 小児の症候群 . 小児科診療 2009 増刊号、p366、診断と治療社、東京、(2009)

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

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

6. 和田芳直、田尻道子、久田美貴、伊藤喜之 . O-グリコプロテオームの解析戦略 . 細胞工学分冊「プロテオミクス・メタボロミクス - 質量分析の基礎からバイオ医薬への応用」、pp71-79 秀潤社 東京(2007)

7. 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)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 7 件)

名称: IgA ヒンジ部 O 結合型糖鎖構造に基づく疾患の判定方法

発明者: 飯島英樹、井上隆弘、和田芳直、三善英知、新崎信一郎、辻井正彦、林 紀夫、猪阪善隆、岩谷博次

権利者: 国立大学法人大阪大学、地方独立行政法人大阪府立病院機構

種類: 特許権

番号: PCT/JP2010/072238

出願年月日: 平成 22 年 12 月 10 日

国内外の別: 国外

名称: 二次元イメージング装置および方法

発明者: 永井亨、森本巖、横山稔、柳瀬悦也、和田芳直、田尻道子

権利者: 川崎重工業株式会社

種類: 特許権

番号: 特願 2010-136413

出願年月日: 平成 22 年 6 月 15 日

国内外の別: 国内

名称: 多糖類検査装置および多糖類検査方法

発明者: 永井亨、森本巖、横山稔、柳瀬悦也、和田芳直、田尻道子

権利者: 川崎重工業株式会社

種類: 特許権

番号: 特願 2010-136422

出願年月日: 平成 22 年 6 月 15 日

国内外の別: 国内

名称: I g A ヒンジ部 O 結合型糖鎖構造に基づく疾患の判定方法

発明者: 飯島英樹、井上隆弘、和田芳直、三善英知、新崎信一郎、辻井正彦、林 紀夫、

猪阪善隆、岩谷博次

権利者: 国立大学法人大阪大学、地方独立行政法人大阪府立病院機構

種類: 特許権

番号: 特願 2009-281519

出願年月日: 平成 21 年 12 月 11 日

国内外の別: 国内

名称: 質量分析法に用いられる試料ターゲットおよびその製造方法、並びに当該試料ターゲットを用いた質量分析装置

発明者: 益田秀樹、柳下崇、和田芳直

権利者: 神奈川科学技術アカデミー、大阪府立病院機構

種類: 特許権

番号: 特願 2009-017027

出願年月日: 平成 21 年 1 月 28 日

国内外の別: 国内

名称: 質量分析法に用いられる試料ターゲットおよびその製造方法、並びに当該試料ターゲットを用いた質量分析装置

発明者: 益田秀樹、柳下崇、和田芳直

権利者: 神奈川科学技術アカデミー、大阪府立病院機構

種類: 特許権

番号: 特願 2008-078976

出願年月日: 平成 20 年 3 月 25 日

国内外の別: 国内

名称: 細胞融合制御法、それに用いる遺伝子組換え用ベクターおよび細胞融合制御剤

発明者: 渋谷幸直、和田芳直

権利者: 独立行政法人科学技術振興機構

種類: 特許権

番号: 特願 2007-301832

出願年月日: 平成 19 年 11 月 21 日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 4 件)

名称: 標識アミド化を用いたタンパク質又はペプチドの解析法

発明者: 田中耕一、関谷禎規、和田芳直

権利者: 株式会社島津製作所、地方独立行政法人大阪府立病院機構

種類: 特許権

番号: 特許第 4551160 号

取得年月日: 平成 22 年 7 月 16 日

国内外の別: 国内

名称: 表面加工が施された試料保持面を有する試料ターゲットおよびその製造方法、並びに当該試料ターゲットを用いた質量分析装置

発明者: 奥野昌二、和田芳直、荒川隆一

権利者: 独立行政法人科学技術振興機構、地方独立行政法人大阪府立病院機構

種類：特許権  
番号：特許第 4512589 号  
取得年月日：平成 22 年 5 月 14 日  
国内外の別：国内

名称：電気泳動ゲルおよびその利  
発明者：和田芳直  
権利者：独立行政法人科学技術振興機構、地方独立行政法人大阪府立病院機構  
種類：特許権  
番号：特許第 4465209 号  
取得年月日：平成 22 年 2 月 26 日  
国内外の別：国内

名称：糖タンパク質構造解析手法  
発明者：田中耕一、和田芳直、山崎雄三  
権利者：株式会社島津製作所、地方独立行政法人大阪府立病院機構  
種類：特許権  
番号：特許第 4426365 号  
取得年月日：平成 21 年 12 月 18 日  
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等  
<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/inst-mch/MM/MM.html>

## 6. 研究組織

### (1) 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)・研究所長  
研究者番号：00250340

### (2) 研究分担者

渋川 幸直 (SHIBUKAWA YUKINAO)  
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・研究員  
研究者番号：90393264

### (3) 研究分担者

田尻 道子 (TAJIRI MICHIKO)  
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・流動研究員  
研究者番号：70581312

### (4) 研究分担者

大門 江津子 (DAIMON ETSUKO)  
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・研究技術員  
研究者番号：90581314

### (5) 研究分担者

岡本 伸彦 (OKAMOTO NOBUHIKO)  
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・遺伝診療科・科長  
研究者番号：30416242