

平成21年6月20日現在

研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間：2006～2008  
 課題番号：18390303  
 研究課題名（和文） 機能領域の立体構造改変による新規高機能リソソーム病治療薬の開発  
 研究課題名（英文） Structure-based modification of lysosomal enzymes: development of new enzyme replacement therapy for lysosomal diseases  
 研究代表者 櫻庭 均（SAKURABA HITOSHI）  
 明治薬科大学・薬学部・教授  
 研究者番号：60114493

## 研究成果の概要：

リソソーム病に対して酵素補充療法が導入されたが、現在使用されている酵素薬には克服すべき多くの問題がある。そこで、リソソーム病の中でも重要なファブリー病と GM2 ガングリオシドーシスに対して、夫々の疾患責任酵素に構造が似た酵素を、分子設計により改変し、基質特異性を変換した新規酵素を作製した。これらは、野生型酵素に比べて安定で、細胞内取り込みに優れ、アレルギー反応を起し難いと考えられ、リソソーム病に対する新規酵素治療薬として期待出来る。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2007年度	3,000,000	900,000	3,900,000
2008年度	2,300,000	690,000	2,990,000
年度			
年度			
総計	10,100,000	3,030,000	13,130,000

## 研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・遺伝・先天異常学

キーワード：リソソーム病、ファブリー病、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、GM2 ガングリオシドーシス、テイ-サックス病、ザンドホッフ病、 $\beta$ -ヘキソサミニダーゼA

## 1. 研究開始当初の背景

「リソソーム病」は、細胞内のリソソームにある酵素活性が低下して起こる一群の遺伝病である。これまでリソソーム病に対する根本的治療法はなかったが、近年になり、組み換え酵素を定期的に血管内投与する「酵素補充療法」が導入され、効果を上げている。

しかし、既存の治療薬である組み換え酵素は、血中で不安定で、標的臓器への取り込み

が充分とは言えず、酵素が欠損した患者への繰り返し投与によりアレルギー反応が生じたり、効果が減じるなどの問題点が指摘されるようになった。このため、血中で安定で、臓器への取り込みがよく、その投与によりアレルギー反応を起し難い酵素治療薬の開発が強く求められている。

## 2. 研究の目的

リソソーム病治療用の優れた新規酵素を開発するための基盤情報を得ることを目的とした。研究対象疾患として、リソソーム病グループの中でも発生頻度が高く臨床的に重要なファブリー病 ( $\alpha$ -ガラクトシダーゼ欠損症) と GM2 ガングリオシドーシス (テイ-サックス病およびザンドホッフ病;  $\beta$ -ヘキソサミニダーゼ A 欠損症) を選択した。夫々の疾患責任酵素の構造情報を基に、病因となるアミノ酸置換による立体構造変化を *in silico* で解析し、その解析結果と既知の生化学的解析結果とを総合して、酵素分子の機能的な重要部位を同定した。次に、その情報を基に、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼおよび  $\beta$ -ヘキソサミニダーゼ A と構造が酷似しているが、基質特異性が異なる、夫々、 $\alpha$ -N-アセチルガラクトサミニダーゼと  $\beta$ -ヘキソサミニダーゼ B の構成アミノ酸の一部を置換させることにより、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼおよび  $\beta$ -ヘキソサミニダーゼ A としての基質特異性を持ち、安定で細胞内取り込みのためのマーカーを多く有し、患者に対してアレルギー反応を起し難いと考えられる新規酵素の生産を試みた。

### 3. 研究の方法

#### (1) ファブリー病に対する新規治療用酵素の開発

##### ① $\alpha$ -ガラクトシダーゼの機能部位の同定

ヒト  $\alpha$ -ガラクトシダーゼの X 線結晶構造情報 (PDB:1R46) を基に、ファブリー病の病因となるアミノ酸置換 (212 種類) による構造変化を分子モデリングソフトウェア TINKER を用いて解析した。これと既知の生化学的解析情報とを合わせて、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼの基質認識に関係するアミノ酸残基を同定した。

##### ② 改変 $\alpha$ -N-アセチルガラクトサミニダーゼの分子設計

ニワトリ  $\alpha$ -N-アセチルガラクトサミニダーゼの構造情報 (PDB:1KTB) を基に、ヒトの同酵素の立体構造を、分子モデリングソフトウェア Jackal を用いて、構築した。これを基に、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼに関する構造/機能情報を利用して、ヒト  $\alpha$ -N-アセチルガラクトサミニダーゼ分子の活性ポケット領域において、基質認識に係る 2 アミノ酸残基を特定した。 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ活性を持つ改変  $\alpha$ -N-アセチルガラクトサミニダーゼを作るため、分子設計により、この 2 残基を置換した。

##### ③ 改変 $\alpha$ -N-アセチルガラクトサミニダーゼ遺伝子の発現

ヒト野生型  $\alpha$ -N-アセチルガラクトサミニダーゼ cDNA を鋳型として、*in vitro* mutagenesis により、改変  $\alpha$ -N-アセチルガラクトサミニダーゼ cDNA を作製した。野生型

および改変酵素の cDNA を、夫々、レトロウイルスベクターに組み込み、これらをファブリー病患者由来の培養線芽細胞に感染させた後に、目的遺伝子が導入された細胞を選択した。

これらの細胞を試料として、4-メチルウムベリフェリル- $\alpha$ -D-ガラクトピラノシドを基質として  $\alpha$ -ガラクトシダーゼ活性を、4-メチル-2-アセトアミド-2-デオキシ- $\alpha$ -D-ガラクトピラノシドを基質として  $\alpha$ -N-アセチルガラクトサミニダーゼ活性を、夫々、蛍光法で測定した。蛋白質濃度の測定は、Micro BCA Protein Assay Reagent キットを用いて行った。

##### ④ 改変 $\alpha$ -N-アセチルガラクトサミニダーゼの生産と性状解析

目的蛋白質の分泌を促進するようにシグナルペプチド配列部分を変換した、改変  $\alpha$ -N-アセチルガラクトサミニダーゼ遺伝子をチャイニーズハムスター卵巣由来細胞に導入し、培地中に分泌された当該酵素をカラムクロマトグラフィーで精製して、その性状を生化学的に解析した。

#### (2) GM2 ガングリオシドーシスに対する新規治療用酵素の開発

##### ① $\beta$ -ヘキソサミニダーゼ A の機能部位の同定

ヒト  $\beta$ -ヘキソサミニダーゼ A ( $\alpha$  および  $\beta$  サブユニットのヘテロ 2 量体) の X 線結晶構造情報 (PDB:2GJX) を基に、50 種類のテイ-サックス病の病因となるアミノ酸置換と 2 種類のザンドホッフ病の病因となるアミノ酸置換による構造変化を、夫々、分子モデリングソフトウェア TINKER を用いて解析した。これと既知の生化学的解析情報とを合わせて  $\beta$ -ヘキソサミニダーゼ A の基質認識に係るアミノ酸残基を同定した。

##### ② 改変 $\beta$ -ヘキソサミニダーゼ B の分子設計

ヒト  $\beta$ -ヘキソサミニダーゼ A の構造/機能情報を利用して、ヒト  $\beta$ -ヘキソサミニダーゼ B ( $\beta$  サブユニットのホモ 2 量体) の基質認識に係る 6 アミノ酸残基を同定した。 $\beta$ -ヘキソサミニダーゼ A 活性を持つ  $\beta$ -ヘキソサミニダーゼ B を作るため、分子設計により、 $\beta$  サブユニット中の 6 残基を置換した。

##### ③ 改変 $\beta$ サブユニット遺伝子の作製と改変 $\beta$ -ヘキソサミニダーゼ B の生産および性状解析

ヒト野生型  $\beta$  サブユニット cDNA を鋳型として、*in vitro* mutagenesis により、改変  $\beta$  サブユニット cDNA を作製した。野生型および改変  $\beta$  サブユニット cDNA を、夫々、チャイニーズハムスター卵巣由来の細胞に導入して発現させた。この操作により得られた改変  $\beta$ -ヘキソサミニダーゼ B の性状を生化学的に解析した。

#### 4. 研究成果

##### (1) ファブリー病に対する新規治療用酵素の開発

###### ①構造学的解析結果

アミノ酸置換による $\alpha$ -ガラクトシダーゼ分子の立体構造変化について、当該アミノ酸置換により影響を受ける原子の数、root-mean-square distance および solvent-accessible surface area を計算することによって解析した。早期発症で重症の表現型を示すタイプでは、分子内部に大きな構造変化が、晩期発症で軽症の表現型を示すタイプでは、分子表面に小さな構造変化が起こると考えられた。これらの例のうち、酵素活性に影響を与えると考えられる変異体を詳しく解析すると共に、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼと $\alpha$ -N-アセチルガラクトサミニダーゼの立体構造を比較することにより、夫々の基質特異性を規定するアミノ酸残基を同定した。

###### ②改変 $\alpha$ -N-アセチルガラクトサミニダーゼの発現実験結果

改変 $\alpha$ -N-アセチルガラクトサミニダーゼ遺伝子をファブリー病患者由来細胞に導入した所、元々欠損していた細胞内 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ活性の著明な増加が認められたが、 $\alpha$ -N-アセチルガラクトサミニダーゼ活性の増加はみられなかった。一方、野生型 $\alpha$ -N-アセチルガラクトサミニダーゼ遺伝子を導入した場合、当該酵素活性の著明な活性増加が認められたが、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ活性の増加はみられなかった。これにより、改変 $\alpha$ -N-アセチルガラクトサミニダーゼでは基質特異性が変化したことが示された。

###### ③改変 $\alpha$ -N-アセチルガラクトサミニダーゼの性状解析結果

チャイニーズハムスター卵巣細胞で生産した、改変 $\alpha$ -N-アセチルガラクトサミニダーゼは、中性および酸性緩衝液中でもヒト血漿中でも、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼに比べて安定であった。また、改変 $\alpha$ -N-アセチルガラクトサミニダーゼの糖鎖中のマンノース 6-リン酸含量は 5.1 モル/モルであり、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼにおけるマンノース 6-リン酸含量 (2.1-3.6 モル/モル) に比べて高値を示した。さらに、改変 $\alpha$ -N-アセチルガラクトサミニダーゼは、抗 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ抗体に対して免疫反応性を示さなかった。改変 $\alpha$ -N-アセチルガラクトサミニダーゼを、ファブリー病患者由来の培養線維芽細胞の培養液中に添加した所、当該酵素は細胞内に取り込まれ、蓄積していた糖脂質を分解した。

これらの結果から、改変 $\alpha$ -N-アセチルガラクトサミニダーゼは、血中安定性が高く、マンノース 6-リン酸受容体を介した細胞内取り込みに優れ、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼが欠損しているファブリー病患者にアレルギー反応を起し難いと考えられ、ファブリー病に

対する新規治療薬として有望であると期待された。

##### (2) GM2 ガングリオシドーシスに対する新規治療用酵素の開発

###### ①構造学的解析結果

アミノ酸置換による $\alpha$ および $\beta$ サブユニットの立体構造変化について、当該アミノ酸置換により、影響を受ける原子の数と solvent-accessible surface area を計算することによって解析した。早期発症で重症の表現型を示す GM2 ガングリオシドーシスのタイプでは分子内部に大きな構造変化が、晩期発症で軽症の表現型を示す GM2 ガングリオシドーシスのタイプでは分子表面に小さな構造変化が起こると考えられた。特に、酵素活性に影響を与えることが知られている B1 異型について詳しく解析すると共に、 $\alpha$ および $\beta$ サブユニットの立体構造を比較した。これにより、 $\beta$ -ヘキソサミニダーゼ A と $\beta$ -ヘキソサミニダーゼ B の基質特異性を規定するアミノ酸残基を同定した。

###### ②改変 $\beta$ -ヘキソサミニダーゼ B の発現と性状解析結果

基質特異性に関連する 6 残基を置換した $\beta$ サブユニット cDNA を *in vitro* mutagenesis で作製し、これを発現ベクターに挿入した。これをチャイニーズハムスター卵巣細胞に導入して、改変 $\beta$ -ヘキソサミニダーゼ B を生産した。この改変酵素は、 $\beta$ -ヘキソサミニダーゼ A の特異的基質である GM2 ガングリオシドを分解する能力を持ち、血中で $\beta$ -ヘキソサミニダーゼ A と比べて安定であった。これらの結果から、改変 $\beta$ -ヘキソサミニダーゼ B は、テイ-サックス病やザンドホッフ病に対する新規治療薬として有望と考えられた。

#### 5. 主な発表論文等

(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 7 件)

1. Sugawara K., Saito S., Sekijima M., Ohno K., Tajima Y., Kroos M. A., Reuser A. J. J., Sakuraba H.: Structural modeling of mutant  $\alpha$ -glucosidases resulting in a processing/transport defect in Pompe disease. *J. Hum. Genet.*, Doi:10.1038/jhg.2009.32
2. Sugawara K., Tajima Y., Kawashima I., Tsukimura T., Saito S., Ohno K., Iwamoto K., Kobayashi T., Itoh K., Sakuraba H.: Molecular interaction of imino sugars with human  $\alpha$ -galactosidase: insight into the mechanism of complex formation and pharmacological chaperone action in

- Fabry disease. *Mol. Genet. Metab.*, 96: 233-238, 2009.
- Sugawara K., Ohno K., Saito S., Sakuraba H.: Structural characterization of mutant  $\alpha$ -galactosidases causing Fabry disease. *J. Hum. Genet.*, 53: 812-824, 2008.
  - Ohno K., Saito S., Sugawara K., Sakuraba H.: Structural consequences of amino acid substitutions causing Tay-Sachs disease. *Mol. Genet. Metab.*, 94: 462-468, 2008.
  - Kawashima I., Watabe K., Tajima Y., Fukushima T., Kanzaki T., Kanekura T., Sugawara K., Ohyanagi N., Suzuki T., Togawa T., Sakuraba H.: Establishment of immortalized Schwann cells from Fabry mice and their low uptake of recombinant  $\alpha$ -galactosidase. *J. Hum. Genet.*, 52: 1018-1025, 2007.
  - Sakuraba H., Chiba Y., Kotani M., Kawashima I., Ohsawa M., Tajima Y., Takaoka Y., Jigami Y., Takahashi H., Hirai Y., Shimada T., Hashimoto Y., Ishii K., Kobayashi T., Watabe K., Fukushige T., Kanzaki T.: Corrective effect on Fabry mice of yeast recombinant human  $\alpha$ -galactosidase with N-linked sugar chains suitable for lysosomal delivery. *J. Hum. Genet.*, 51: 341-352, 2006.
  - Sakuraba H., Murata-Ohsawa M., Kawashima I., Tajima Y., Kotani M., Ohshima T., Chiba Y., Takashiba M., Jigami Y., Fukushige T., Kanzaki T., Itoh K.: Comparison of the effects of agalsidase alfa and agalsidase beta on cultured human Fabry fibroblasts and Fabry mice. *J. Hum. Genet.*, 51: 180-188, 2006.

[学会発表] (計 6件)

- 桜庭 均: リソソーム病の酵素補充療法製剤の特徴～ファブリー病治療薬を中心に. 第35回日本小児臨床薬理学会年会 ランチョンセミナー, 2008. 12. 5-6, 東京
- 桜庭 均: リソソーム病の新規治療法開発: 脳障害克服を目指して. The 7th Cell Biology Summer Meeting, 2008. 7. 5-6, 鴨川
- 桜庭 均: ファブリー病の分子病態と診断・治療. 第51回日本腎臓病学会学術総会 ランチョンセミナー21, 2008. 6. 1, 福岡

- 桜庭 均: リソソーム病の分子病態の解明—その治療に向かって. 日本薬学会第128年会シンポジウム S19, 2008. 3. 26-28, 横浜
- 桜庭 均: ファブリー病の病態と遺伝子変異. 第29回心筋生検研究会, 招待講演, 2007. 11. 30- 12. 1, 名古屋
- 桜庭 均: 先天代謝異常症における治療概説. 第49回日本先天代謝異常学会, シンポジウム, 2007. 11. 15-17, 山形

[図書] (計 4件)

- 桜庭 均, 菅原佳奈子: 酸性  $\alpha$ -グルコシダーゼとポンペ病. **ポンペ病 (衛藤義勝/監修)**, 診断と治療社(東京), 18-24, 2009
- 桜庭 均: 異染性白質ジストロフィー. **小児科学, 第3版 (大関武彦, 近藤直実/総編集)**, 医学書院(東京), 503-504, 2008.
- 桜庭 均: Fabry病. **小児科学, 第3版 (大関武彦, 近藤直実/総編集)**, 医学書院(東京), 501-503, 2008.
- 桜庭 均: Fabry病. **今日の小児治療指針, 第14版 (大関武彦, 古川 漸, 横田俊一郎/編)**, 医学書院(東京), 171-172, 2006.

[産業財産権]

○出願状況 (計 1件)

名称: ヒト  $\beta$ -ヘキソサミニダーゼ B の基質特異性を変換した新規高機能酵素  
 発明者: 桜庭 均, 伊藤孝司, 辻 大輔  
 権利者: 学校法人明治薬科大学  
 種類: 特許  
 番号: 特願 2009-008039  
 出願年月日: 2009年1月16日  
 国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者  
 桜庭 均 (SAKURABA HITOSHI)  
 明治薬科大学・薬学部・教授  
 研究者番号: 60114493

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4)研究協力者

兔川忠靖 (TOGAWA TADAYASU)  
明治薬科大学・薬学部・准教授  
研究者番号：80260983

鈴木俊宏 (SUZUKI TOSHIHIRO)  
明治薬科大学・薬学部・講師  
研究者番号：80322527

菅原佳奈子 (SUGAWARA KANAKO)  
明治薬科大学・薬学部・助教  
研究者番号：00551087

伊藤孝司 (ITOH KOHJI)  
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研  
究部・教授  
研究者番号：00184656