

プロテアーゼ抵抗性を持つ
改変型ヒト β -ヘキソサミニダーゼの作製と
GM2 ガングリオシドーシスモデルに対する治療効果

2016

北風圭介

目次

本論文で用いた省略形	3
第一章 緒論	6
第二章 実験方法	13
第三章 結果	26
3-1. 改変型 HexB の設計と発現系の構築	26
3-2. 各改変型 HexB の精製	28
3-3. X 線結晶構造解析	29
3-4. GSEP ループ構造のモデリング	31
3-5. 各改変型 HexB の <i>in vitro</i> における性質解析	32
3-6. 患者由来皮膚線維芽細胞への酵素補充	35
3-7. 培養細胞への酵素補充のイメージング	40
3-8. SD マウス脳室内への酵素補充	44
3-9. イメージング質量分析 (IMS)	49
3-10. SD マウスに対する治療効果	55
第四章 考察	58
参考文献	62
謝辞	70

本論文で用いた省略形

4-MU	4-Methylumbelliferone
4-MUG	4-Methylumbelliferyl- <i>N</i> -acetyl- β -D-glucosaminide
4-MUGS	4-Methylumbelliferyl-6-sulfo- <i>N</i> -acetyl- β -D-glucosaminide
AAV	Adeno-associated virus, アデノ随伴ウイルス
AFO	AcidiFluor ORANGE TM
ANOVA	Analysis of variance, 分散分析
BMP	Bis(monoacylglycero)phosphate
BSA	Bovine serum albumin, ウシ血清アルブミン
BW	Body weight, 体重
CB	Cerebellum, 小脳
Cer	Ceramide
CHO	Chinese hamster ovary, チャイニーズハムスター卵巣
CI-M6PR	Cation-independent M6P receptor, カチオン非依存性 M6P 受容体
CM	Conditioned medium
CV	Column volume, カラム容量
CX	Cerebral cortex, 大脳皮質
Cy3	Cyanine 3
Da	Dalton
DABCO	1,4-Diazabicyclo [2.2.2]octane
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindole
DHA	Docosahexaenoic acid
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTPs	Deoxyribonucleotide triphosphates
Dom9	Recombinant domain 9 of human CI-M6PR
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
Elu	Elution fraction, 溶出画分
ERT	Enzyme replacement therapy, 酵素補充療法
F218	TSD 患者由来皮膚線維芽細胞
F572	SD 患者由来皮膚線維芽細胞
FBS	Fetal bovine serum, ウシ胎仔血清
FITC	Fluorescein isothiocyanate
GA2	AsialoGM2
Gal	Galactose

GalNAc	<i>N</i> -Acetylgalactosamine
GFP	Green fluorescent protein, 緑色蛍光タンパク質
Glc	Glucose
GlcNAc	<i>N</i> -Acetylglucosamine
GM1	GM1 ganglioside
GM2	GM2 ganglioside
GM2AP	GM2 activator protein , GM2 活性化タンパク質
H&E	Hematoxylin and eosin
Ham's F-10	Nutrient Mixture F-10 Ham
Hex	β -Hexosaminidase
HIP	Hippocampus, 海馬
HMDER	9-[2-(Hydroxymethyl)phenyl]-3-(diethyliminio)-6-oxylato-3H-xanthene
HRP	Horseradish peroxidase, 西洋ワサビペルオキシダーゼ
Hs68	健常者由来皮膚線維芽細胞
HY	Hypothalamus, 視床下部
<i>i.c.v.</i>	Intracerebroventricular, 脳室内
IgG	Immunoglobulin G, 免疫グロブリン G
IgM	Immunoglobulin M, 免疫グロブリン M
IMS	Imaging mass spectrometry, イメージング質量分析
<i>i.t.</i>	Intrathecal, 髄腔内
ITO	Indium-tin-oxide, 酸化インジウムスズ
<i>i.v.</i>	Intravenous, 静脈内
LAMP-1	Lysosomal associated membrane protein-1
LSN	Lateral septal nucleus, 外側中隔核
M	Mature form, 成熟体
<i>m/z</i>	Mass-to-charge ratio, 質量電荷比
M6P	Mannose 6-phosphate, マンノース-6-リン酸
mAb	Monoclonal antibody, モノクローナル抗体
MALDI	Matrix assisted laser desorption/ionization, マトリックス支援レーザー脱離イオン化法
Mip1 α	Macrophage inflammatory protein 1 α
mod2B	Modified HexB, 改変型 HexB
mod2B	Modified HexB2, 改変型 HexB2
N	Normal, 健常者
NaPB	Sodium phosphate buffer, リン酸ナトリウム緩衝液
NeuAc	<i>N</i> -Acetylneuraminic acid

NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimide
NIM	Negative ion mode
<i>OmHexA</i>	Recombinant human HexA produced by <i>Ogataea minuta</i>
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
pAb	Polyclonal antibody, ポリクローナル抗体
PAS	Periodic acid Schiff
PBS	Phosphate buffered saline, リン酸緩衝生理食塩水
PBST	0.01% (v/v) Tween 20/PBS
PC	Phosphatidylcholine
PCR	Polymerase chain reaction
PD	Proteolytically-degraded product, 分解物
PDB	Protein Data Bank
PFA	Paraformaldehyde
PhOH	Phenol
PI	Phosphatidylinositol
PIM	Positive ion mode
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride
PT	Pass through fraction, 素通り画分
PVDF	Polyvinylidene difluoride
RMSD	Root-mean square difference, 平均二乗偏差
SD	Sandhoff disease, サンドホッフ病
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	SDS-polyacrylamide gel electrophoresis
SD マウス	Sandhoff 病モデルマウス
SP	Sulfopropyl
SPF	Specific pathogen-free, 特定病原体除去
TAB	Tris-acetate buffer
TBS	Tris-buffered saline
TBST	0.1% (v/v) Tween 20/TBS
TLC	Thin-layer chromatography, 薄層クロマトグラフィー
TRITC	Tetramethylrhodamine
TSD	Tay-Sachs disease, テイ-サックス病
v/v	Volume/volume
w/v	Weight/volume
WA	Whole area, 全域
WT	Wild-type, 野生型

第一章 緒論

リソソーム病 (ライソゾーム病)

リソソームは細胞内外の生体分子の分解代謝に関わるオルガネラであり、その内部は pH 5 前後に保たれている。リソソーム内には、酸性条件下で働く加水分解酵素および活性化因子が存在し、エンドサイトーシスやオートファジー等由来の生体分子を分解・リサイクルしている。現在およそ 60 種類のリソソーム酵素が知られているが、これら関連因子の遺伝子に変異が起こると、その遺伝子産物である酵素タンパク質が欠損し、当該酵素の基質が分解されず、リソソーム内に過剰蓄積する。その結果、細胞の機能障害により、全身性の様々な臨床症状を伴うリソソーム病が発症する [1]。その発症頻度は数万～数十万新生児に 1 人の希少疾患であるが、約 40 種類が知られており、小児科や内科等の幅広い臨床領域で現れる重篤な疾患群である。また、我が国においては厚生労働省の特定疾患「難病」に指定されている。

GM2 ガングリオシドーシス

リソソーム病の一種である GM2 ガングリオシドーシスは、リソソーム酵素である β -Hexosaminidase (Hex)あるいは GM2 活性化タンパク質 (GM2AP)の遺伝的欠損により、糖脂質基質である GM2 ガングリオシド (GM2)が主に神経細胞に蓄積し、それに伴って神経障害を発症する常染色体劣性遺伝病である [2]。GM2 は GalNAc ($\beta 1 \rightarrow 4$) [NeuAc ($\alpha 2 \rightarrow 3$)] Gal ($\beta 1 \rightarrow 4$) Glc ($\beta 1 \rightarrow 1'$) Cer で示される構造を持つ。GM2 の分解に関与する遺伝子には *HEXA*, *HEXB* および *GM2A* の 3 種があり、それぞれ Hex の α -サブユニット、 β -サブユニットおよび GM2AP をコードしている。Hex は α -および β -サブユニットから構成されるダイマーを形成するが、その組み合わせにより、HexA ($\alpha\beta$ ヘテロダイマー)、HexB ($\beta\beta$ ホモダイマー)および HexS ($\alpha\alpha$ ホモダイマー)の 3 種のアイソザイムが存在する。 β -サブユニットは主に中性基質を、 α -サブユニットは中性基質および負電荷を帯びた基質を認識する [3]。そして HexA のみが、GM2AP と協同して GM2 を分解することができる [4-6]。ヒトでは *HEXA*, *HEXB* および *GM2A* の遺伝子変異に基づき GM2 ガングリオシドーシスが発症し、それぞれ Tay-Sachs 病 (TSD, OMIM: #272800)、Sandhoff 病 (SD, OMIM: #268800)および GM2AP 欠損症 (OMIM: #272750)として知られている (Fig. 1-1)。

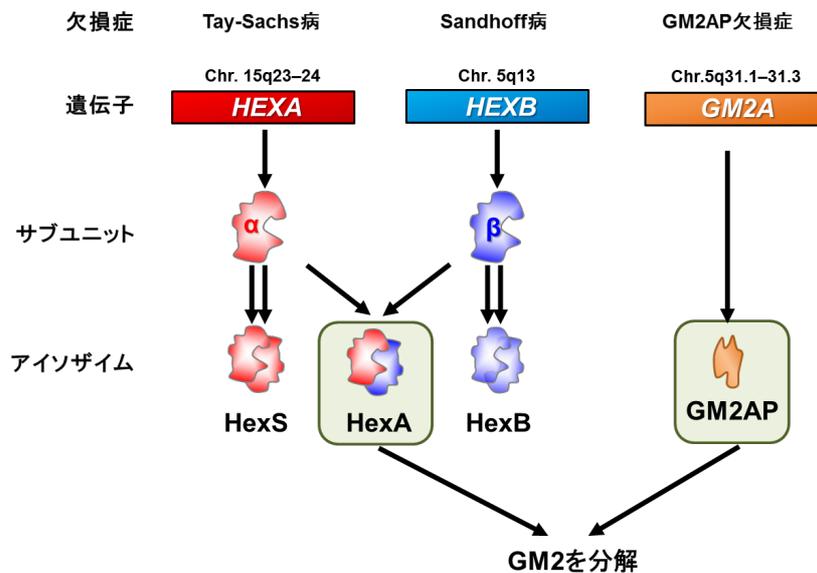


Fig. 1-1. GM2 ガングリオシドーシスと β -Hexosaminidase 関連因子

GM2 の分解に関与する遺伝子には *HEXA*, *HEXB* および *GM2A* の 3 種があり、それぞれ Hex の α -サブユニット、 β -サブユニットおよび GM2AP をコードしている。Hex は α -および β -サブユニットからなるダイマーを形成し、HexA ($\alpha\beta$)、HexB ($\beta\beta$) および HexS ($\alpha\alpha$) の 3 種のアイソザイムが存在する。そして HexA のみが GM2AP と協同して GM2 を分解することができる。*HEXA*, *HEXB* あるいは *GM2A* の遺伝子変異に基づき、それぞれ Tay-Sachs 病、Sandhoff 病あるいは GM2AP 欠損症が発症する。

Tay-Sachs 病 (TSD) と Sandhoff 病 (SD)

TSD および SD では Hex の α - あるいは β -サブユニットの遺伝子変異により HexA 活性が低下または欠損し、生体内基質である GM2 が、特に神経細胞のリソソームにおいて過剰蓄積する。臨床病型としては、生後 6 ヶ月頃より発症する乳児型、2-10 歳の小児期に発症する若年型、そして 20-30 代前半までに発症する成人遅発型がある。乳児型では精神運動発達遅滞やミオクローヌス、若年/成人型では認知障害や運動失調等の多彩な進行性の中樞神経症状が現れる。また、SD においては GM2 だけでなく、アシアロ GM2 (GA2) やグロボシドの蓄積も認められ、肝脾腫や骨髄内泡沫組織球における蓄積症状を認めることがある。TSD はアシュケナージ系ユダヤ人、フランス系カナダ人およびユダヤ系モロッコ人等の人種における発症頻度が特に高く [7]、アシュケナージ系ユダヤ人では約 3,000 新生児に 1 人とされている。日本人の発症頻度は TSD が 8-10 万新生児に 1 人、SD は TSD の 1/6-1/8 程度である [8]。現在まで TSD および SD に対する根本的治療法は確立されていないが、遺伝子治療 [9, 10]、酵素補充療法 [11, 12]、基質枯渇療法 [13, 14]、薬理的シャペロン療法 [15] 等の治療研究が行われている。

Sandhoff 病モデルマウス

Sango らは、マウス Hex β 鎖遺伝子 (*Hexb*) のノックアウトマウス (Sandhoff 病モデルマウス: SD マウス) を作製し、ヒトの TSD および SD と極めて類似した病態を示すこと [16, 17] を報告した。このマウスでは、個体の発達に伴い、脳では GM2 を含む Periodic acid Schiff (PAS) 染色陽性物質が進行性に蓄積し、GM2 や GA2 が蓄積物質として検出される。生後 10 週頃までは明らかな症状は認めないが、それ以後は次第に動きが鈍くなり、振戦、驚愕反応および歩行障害を認め、約 4 ヶ月で死に至る (Fig. 1-2)。

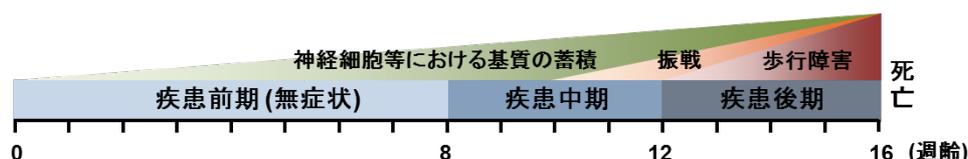


Fig. 1-2. SD マウスの症状

生後 10 週頃まで明らかな異常は認めないが、それ以後、振戦や歩行障害等が見られ、約 4 ヶ月で死亡する。

酵素補充療法 (Enzyme replacement therapy: ERT)

酵素補充療法 (ERT) とは、機能的に欠損している酵素を持つ患者に対して、精製された治療用組換え酵素を点滴静注によって補充する治療法である。一般的に、ERT に用いる酵素はヒト酵素遺伝子を導入したチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞やヒト線維肉腫 (HT-1080) 細胞等から調製され、精製・製剤化を経て患者に静脈注射される。投与された酵素は、酵素の表面に存在するマンノース-6-リン酸 (M6P) 型糖鎖が、標的組織細胞表面に存在するカチオン非依存性 M6P 受容体 (CI-M6PR) [18] により認識される。その後、エンドサイトーシスを介してリソソームへ輸送され、蓄積基質の分解を促進することで治療効果を発揮する (Fig. 1-3)。2016 年現在、末梢症状を呈するリソソーム病であるゴーシェ病、ファブリー病、ポンペ病、ムコ多糖症 (I 型、II 型、IVA 型、VI 型) および酸性リパーゼ欠損症に対する酵素製剤が国内外で承認されている [19, 20] (Table1-1)。一方で中枢神経症状を伴うリソソーム病に対しては、血液脳関門の存在により、患者の末梢血管内に投与された酵素が脳実質内にほとんど到達しないため、ERT の有効性は認められていない。しかし、最近になって中枢神経系に酵素を送り込む方法として、酵素の脳室内投与や髄腔内投与といった外科的な手法が注目されており、中枢神経症状を伴う 6 種類のリソソーム病に対する臨床試験が米国で進められている (Table1-2, ClinicalTrials.gov, <https://clinicaltrials.gov/> より、2016 年 6 月現在)。そのため、GM2 ガングリオシドーシスに対しても、これらの手法を応用できると考えられる。

	一般名	総称名	発現系	投与量・頻度	
ゴーシェ病	アルグルセラーゼ	セレデース	ヒト胎盤		※製造終了
	イミグルセラーゼ	セレザイム	CHO 細胞	60 U/kg, 隔週	
	ベラグルセラーゼ アルファ	ビプリブ	ヒト線維肉腫細胞		
	タリグルセラーゼ アルファ	ELELYSO	ニンジン培養細胞		※日本では未承認
ファブリー病	アガルシダーゼ アルファ	リブレガル	ヒト線維肉腫細胞	0.2 mg/kg, 隔週	
	アガルシダーゼ ベータ	ファブラザイム	CHO 細胞	1 mg/kg, 隔週	
ポンペ病	アルグルコシダーゼ アルファ	マイオザイム ルミザイム	CHO 細胞	20 mg/kg, 隔週	※日本では未承認
ムコ多糖症 I 型	ラロニダーゼ	アウドラザイム	CHO 細胞	0.58 mg/kg, 毎週	
ムコ多糖症 II 型	イデュルスルファーゼ	エラプレース	ヒト線維肉腫細胞	0.5 mg/kg, 毎週	
ムコ多糖症 IVA 型	エロスルファーゼ アルファ	ビミジム	CHO 細胞	2 mg/kg, 毎週	
ムコ多糖症 VI 型	ガルスルファーゼ	ナグラザイム	CHO 細胞	1 mg/kg, 毎週	
酸性リパーゼ 欠損症	セベリパーゼ アルファ	カヌマ	遺伝子組換え ニワトリの卵白	1-3 mg/kg, 毎週	

Table. 1-1. リソソーム病に対する酵素補充療法

末梢症状を呈する 8 種類のリソソーム病に対して酵素補充療法が臨床応用されている。

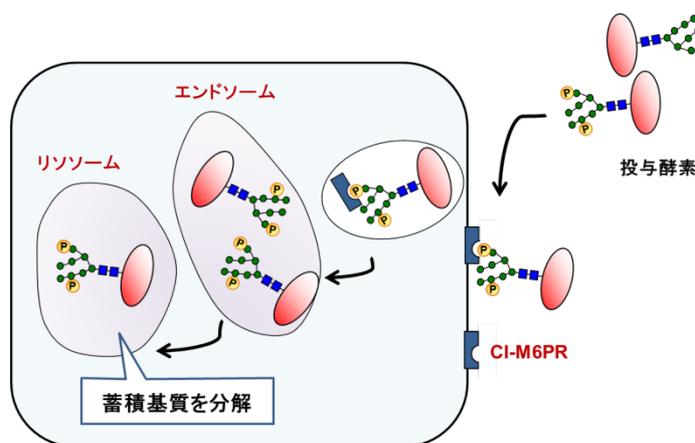


Fig. 1-3. 標的細胞へのリソソーム酵素の取り込みメカニズム

補充用酵素は、細胞表面のカチオン非依存性マンノース-6-リン酸受容体 (CI-M6PR) と結合し、エンドサイトーシスを介して細胞内へと取り込まれ、リソソームへと輸送される。

投与方法	疾患名	Phase
髄腔内投与	ムコ多糖症 I 型 (Hurler 症候群)	1
	ムコ多糖症 II 型 (Hunter 症候群)	2/3
	ムコ多糖症 IIIA 型 (Sanfilippo 症候群 A 型)	2
	異染性白質ジストロフィー	1/2
脳室内投与	セロイドリポフスチノーシス II 型 (Batten 病)	2
	ムコ多糖症 IIIB 型 (Sanfilippo 症候群 B 型)	1/2

Table. 1-2. 中枢神経症状を伴うリソソーム病に対する酵素補充療法の臨床試験
中枢神経症状を伴う 6 種類のリソソーム病に対する臨床試験が進められている。

HEXB 遺伝子の改変による新規 ERT

前述のように、Hex の α -サブユニットと β -サブユニットは触媒部位のアミノ酸が異なり、 α -サブユニットは酸性基質認識能を持つが β -サブユニットは持たない。また、 α -サブユニットには GM2AP と結合するためのループ構造が存在するが、 β -サブユニットには存在しない。これら 2 点の違いにより、HexA は GM2 分解能を持つが、HexB は GM2 分解能を持たないことが知られている。しかしながら、HexB は HexA と比較して熱安定性に優れていること、細胞に取り込まれる際に指標となる M6P 型糖鎖数が多いため、細胞内取り込み効率が高いこと等の酵素学的な利点を持つ。したがって、このような酵素学的特性を持つ HexB へ、HexA 様の GM2 分解能を付加することで、ERT の有効性をより高める治療用酵素が得られると考えられる。当研究室の Matsuoka らは、 α -および β -サブユニットの構造比較に基づき、改変型 HexB (modified HexB: modB) を作製した [12]。ModB モデルは、ヒト HexA および HexB の X 線結晶構造解析 [21, 22] に基づいて構築され、 β -サブユニットの活性中心を構成する 13 アミノ酸残基のうち、D452 と L453 をそれぞれ α -サブユニットに存在する N と R に置換した。さらに、 α -サブユニット特異的なループ構造を β -サブユニットへ導入するために、312-315 の RQNK を GSEP に置換した。その結果、modB ($\beta_1'\beta_1'$ ホモダイマー) は HexA 様の GM2 分解能および HexB 様の高い熱安定性を保持していることが確認された [12]。一方で modB は細胞内でプロテアーゼによる分解を受け、GM2 分解能を失った分解物へと変化することが示唆されている (Table1-3, Fig. 1-4)。

Hex アイソザイム	modB	HexA	HexB
ダイマーの構成	$\beta_1'\beta_1'$	$\alpha\beta$	$\beta\beta$
天然基質	GM2, GA2 β GlcNAc-R	GM2, GA2 β GlcNAc-R	β GlcNAc-R
人工基質	4-MUG, 4-MUGS	4-MUG, 4-MUGS	4-MUG
<i>In vitro</i> における熱安定性 (37°C, $t_{1/2}$) [12]	> 1 week	< 2 d	> 1 week
M6P 型糖鎖/N 型糖鎖 [23]	4/8	3/7	4/8
Western blotting で 検出される分子量 (kDa) [12, 24]	β_1' -前駆体 (63) β_1' -成熟体 (51) β_1' -分解物 (25)	α -前駆体 (67) α -成熟体 (54) β -前駆体 (63) β -成熟体 (29)	β -前駆体 (63) β -成熟体 (29)

Table 1-3. Hex アイソザイムの特徴

modB ($\beta_1'\beta_1'$ ホモダイマー)は、HexA 様の GM2 分解能を持ち、さらに HexB 様の高い熱安定性や細胞内取り込み効率を保持している。一方で modB は細胞内でプロテアーゼによって分解され、GM2 分解能を失うことが示唆されている。

4-MUG: 4-methylumbelliferyl-*N*-acetyl- β -D-glucosaminide,

4-MUGS: 4-methylumbelliferyl-6-sulfo-*N*-acetyl- β -D-glucosaminide.

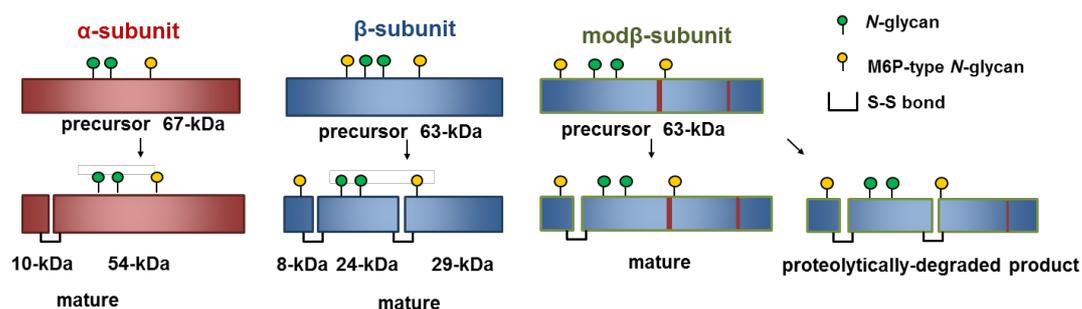


Fig. 1-4. Hex サブユニットのプロセッシングパターン

Hex の α -サブユニットは 67-kDa の前駆体がプロセッシングを受け、10-および 54-kDa のフラグメントが S-S 結合でつながった成熟体となる。また、 β -サブユニットは 63-kDa の前駆体がプロセッシングを受け、8-, 24-および 29-kDa のフラグメントが S-S 結合でつながった成熟体となる。一方、mod β -サブユニットは 8-および 53-kDa のフラグメントが S-S 結合でつながった成熟体となるが、一部は β -サブユニット様のプロセッシングを受け、GM2 分解能を失った分解物となることが示唆されている。

研究目的

以上で述べたように、現在までに GM2 ガングリオシドーシスに対する有効な治療法は確立されておらず、新規治療法・治療薬の開発が求められている。改変型 HexB (modified HexB: modB)は、その候補と成り得るが、細胞内でプロテアーゼによる分解を受けやすいという欠点を持つ。そこで本研究では modB の一部をさらに α -サブユニット型に置換することで、細胞内でより安定な改変型 HexB2 (mod2B)を作製し、GM2 ガングリオシドーシス患者由来皮膚線維芽細胞および Sandhoff 病モデルマウスに対する酵素補充効果の評価を行った。

第二章 実験方法

実験動物

横浜市立大学 山中正二 准教授から分与して頂いた Sandhoff 病モデルマウス (*Hexb*^{-/-}, 129sv) [16, 17]を C57BL/6 (Japan SLC)と交配し、その子孫を specific pathogen-free (SPF)環境下で飼育した。マウスを用いた実験は徳島大学動物実験委員会から承認を受け、徳島大学大学院医歯薬学研究部 総合研究支援センター 動物資源研究部門の施設において、徳島大学動物実験指針に則って行った。

細胞

タンパク質過剰発現株作製のために用いた CHO-K1 細胞は理化学研究所 バイオリソースセンターから分与された。この細胞は 10% (v/v)ウシ胎仔血清 (FBS, Gibco)、100 µg/mL streptomycin (Sigma-Aldrich)および 70 µg/mL penicillin G (Sigma-Aldrich)含有 Nutrient Mixture F-10 Ham (Ham's F-10, Sigma-Aldrich, N6635)培地中、37°C、5% CO₂-air 条件下で培養した。また、研究対象として TSD 患者由来皮膚線維芽細胞 (F218) [25]、SD 患者由来皮膚線維芽細胞 (F572) [12]およびコントロールとして健康者由来皮膚線維芽細胞 Hs68 (Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank から分与)を用いた。これらの細胞は collagen type I-coated dish (AGC Techno Glass)で 10% (v/v) FBS, 100 µg/mL streptomycin および 70 µg/mL penicillin G 含有 Ham's F-10 (Sigma-Aldrich, N6908)培地中、37°C、5% CO₂-air 条件下で培養した。尚、本研究は、ヘルシンキ宣言に従い、徳島大学病院臨床研究倫理審査委員会の承認を得て行った。

抗体

抗 GM2 mAb (GMB28, mouse IgM) [26]および抗末端 GlcNAc 含有糖鎖 mAb (OMB4, mouse IgM) [27]は東京都医学総合研究所 川島育夫 博士より供与された。抗 HexA pAb (anti-NAG (A), [28])は明治薬科大学 櫻庭均 教授より供与された。

酵素活性測定

各 Hex アイソザイムは必要に応じて終濃度 0.5 mg/L の bovine serum albumin (BSA, Sigma-Aldrich) で希釈した。その後、Suzuki の方法 [29] に従い、HexA の活性測定は、人工蛍光基質 4-methylumbelliferyl-6-sulfo-*N*-acetyl- β -D-glucosaminide (4-MUGS, Merck) を用い、また全 Hex 活性測定は 4-methylumbelliferyl-*N*-acetyl- β -D-glucosaminide (4-MUG, Sigma-Aldrich) を用いた。具体的にはサンプル 15 μ L と基質 15 μ L をそれぞれ pH 4.2 および 4.5 の 0.1 M ケン酸-リン酸バッファー中で 37°C、15 分間反応させた後、0.2 M Glycine (Sigma-Aldrich)-NaOH (Sigma-Aldrich), pH 10.7 を 375 μ L 加えて反応を停止させた。その後遊離した 4-MU の蛍光強度を測定し (励起波長 355 nm, 蛍光波長 460 nm)、4-MU (Sigma-Aldrich) を標準物質として検量線を作成することで、酵素活性を算出した。

タンパク質濃度は、DCTM Protein Assay あるいは Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad) を用い、BSA を標準物質として検量線を作成し、算出した。

マウスゲノムの抽出および遺伝子型の判定

生後 4–5 週のマウスの尻尾の先端 0.5–1.0 cm を切断し、200 μ L の溶解バッファー [50 mM Tris (Sigma-Aldrich)-HCl (Wako) pH 8.0, 20 mM EDTA (Sigma-Aldrich), 2% (w/v) SDS (Sigma-Aldrich)] を浸漬し、Proteinase K (Merck) を 500 μ g/mL となるように加え、55°C、3 時間以上処理した。その後、RNase A (Sigma-Aldrich) を 50 μ g/mL となるように加え、37°C、一晩静置した。この溶液に Phenol (PhOH, Sigma-Aldrich) を等量加え、13,200 \times g で遠心した上清を抽出した。さらに PhOH/chloroform (CHCl₃, Sigma-Aldrich) = 1/1 を等量加えて同様に処理し、100 μ L の超純水 (Direct-Q UV, Merck Millipore) に溶解させ、DNA サンプルとし、全量 50 μ L で PCR を行った。反応液組成は 1 \times PCR buffer, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs (Promega)、各 0.5 μ M #1、#2、#3 プライマー、1.25 U Taq DNA polymerase (Promega)、反応条件は 94°C、3 分 (1 サイクル)、94°C、30 秒、55°C、30 秒、72°C、30 秒 (40 サイクル) で行い、反応後は 4°C に冷却して 2% (w/v) アガロース (Sigma-Aldrich) で電気泳動を行い、パターンを比較した。

#1 プライマー: 5'-CATAGCGTTGGCTACCCGTGA-3'

#2 プライマー: 5'-CATTCTGCAGCGGTGCACGCG-3'

#3 プライマー: 5'-ATTTTAAAATTCAGGCCTCGA-3'

改変型 *HEXB2* 遺伝子発現ベクターの構築

真核細胞発現ベクターである pCXN₂ vector [30]をもとに構築した pCXN₂-modified *HEXB-Neo* vector [12]を鋳型とし、改変型 *HEXB* および *HEXB2* 遺伝子をそれぞれコードする DNA 断片 1 および 2 を Table 2-1 に示すプライマーおよび PCR 条件で増幅した。反応液組成は 500 ng 鋳型 DNA, 1×buffer for KOD plus, 1 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 各 0.5 μM プライマー, 1.0 U KOD Plus (Takara)で行った。反応後、1% (w/v) アガロースで電気泳動し、QIAGEN Gel Extraction Kit (Qiagen)を用いて製造者のプロトコルに従って精製した。ライゲーション反応は、XhoI および BglIII (Toyobo)により線状化した pCXN₂-*Neo* ベクターとインサートを In-Fusion system (Takara)により、製造者のプロトコルに従って行った。得られたプラスミドベクター (pCXN₂-modified *HEXB2-Neo*)は MAX Efficiency DH5α Competent Cells (Life Technologies)に形質転換し、大腸菌培養液からプラスミド DNA を Wizard[®] Plus Midipreps DNA Purification System (Promega)を用いて製造者のプロトコルに従って精製した。また、インサートを XhoI および BglIII で切断後、ライゲーション反応により pCX-*Hygro* vector の CAG promoter 下流に存在する XhoI-BglIII サイトに組み込むことで、pCX-modified *HEXB2-Hygro* ベクターを作製した。得られたプラスミドの配列は、徳島大学大学院医歯薬学研究部 総合研究支援センター 先端医療研究部門でシーケンシングを行ない、確認した。

Fragment	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	アニーリング温度 (°C)	サイクル数
1	AAAGAATTCC	GGTGCCAGAG	65	30
	TCGAGCACCA	GGCTCAGACC		
	TGCTGCTGGC	CACTGTAACAT		
	GCTG	GGAGTCAG		
2	GAGCCCTCTG	GAGGGAAAAA	60	30
	GCACCTTTGG	GATCTTACATG		
	ACCTATAAAC	TTCTCATG		

Table 2-1. プライマーの配列と PCR 条件

Mod2B 恒常発現 CHO 細胞株の樹立

Lipofectamine[®] 2000 (Thermo Fisher Scientific)を用いたリポフェクション法により、製造者のプロトコルに従って CHO 細胞に pCXN₂-modified *HEXB2-Neo* ベクターを導入し、終濃度 300-600 µg/mL G418 (Sigma-Aldrich)による薬剤セレクションを行った。その後、限界希釈法により mod2B 高発現株を選別した (1 回導入株)。得られた細胞株に対し、再度 pCXN₂-modified *HEXB2-Neo* ベクターを導入し、限界希釈法により、mod2B 高発現株を選別した (2-3 回導入株)。さらに、pCXN₂-modified *HEXB2-Hygro* ベクターを導入し、終濃度 400-800 µg/mL Hygromycin (Wako)による薬剤セレクション後、限界希釈法により、mod2B 高発現株を選別した (4 回導入株)。各選別は無血清培地である EX-CELL[®] ACF CHO Medium (Sigma-Aldrich)中の 4-MUGS 分解活性を指標とした。

各改変型 HexB の精製

ModB の発現培養は和光純薬の組換えタンパク質の発現受託サービスにより、10 L スケールで培養した。Mod2B の発現培養の際には、樹立した各細胞株を φ100 mm dish (BD Biosciences)にて増殖させ、phosphate buffered saline [PBS; 8.1 mM Na₂HPO₄ (Sigma-Aldrich), 1.5 mM KH₂PO₄ (Wako), 137 mM NaCl (Nacalai tesque), 2.7 mM KCl (Sigma-Aldrich), pH 7.4]で洗浄後、EX-CELL[®] ACF CHO Medium 中、37°C, 5% CO₂ 条件下で 7 日間培養後、その上清を回収し、出発材料とした。1 段階目の精製としては、TOYOPEARL AF-Blue HC-650 (Tosoh)を用いた群特異的アフィニティークロマトグラフィーを行った。まず、出発材料に等量の超純水を加え、Steritop-GP (0.22 µm, Merck Millipore)で濾過した。AF-Blue HC-650 を 0.1 M Tris-acetate (Sigma-Aldrich)バッファー (TAB, pH 7.5)で平衡化した後、サンプルを添加した。10 column volumes (CV)の TAB および 150 mM NaCl/TAB で洗浄後、0.6 M NaCl/TAB で溶出した。続いて 2 段階目の精製として、Phos-tag agarose (Wako) [31]を用いたアフィニティークロマトグラフィーを行った。Phos-tag agarose を 20 mM 酢酸亜鉛 (Wako)/TAB で活性化した後、サンプルを加えた。40 CV の TAB で洗浄後、0.2 M リン酸ナトリウムバッファー (NaPB, pH 6.0)で溶出した。溶出画分は Amicon ultra device (30,000 MWCO, Merck Millipore)で 10 mM NaPB に緩衝液交換した。さらに 3 段階目の精製として、HiTrap SP HP (GE Healthcare)を用いた陽イオン交換クロマトグラフィーを行った。HiTrap SP HP column を 10 mM NaPB で平衡化した後、サンプルを加えた。洗浄後、0-1 M NaCl で溶出し、4-MUG 分解活性を含む画分を回収した。Amicon ultra device (30,000 MWCO)で濃縮後、Pierce Detergent Removal Spin Column (Thermo Fisher Scientific)を用い、製造者のプロトコルに従って界面活性剤を除去し、

最終精製画分とした。それぞれの画分に含まれる組換え Hex は超純水で一定量とした後、6 分の 1 量の 6×SDS サンプルバッファー [0.3 M Tris-HCl (pH 6.8) /36% (v/v) glycerol (Wako) /1.2% (v/v) 2-mercaptoethanol (Wako) /24% (w/v) SDS /0.012% (w/v) bromophenol blue (Kishida Chemical)]を加え、100°C, 3 分間処理した。SDS-PAGE は 10% (w/v)のポリアクリルアミドゲルで行った。銀染色は Dodeca Silver Stain Kit (Bio-Rad)を用い、製造者のプロトコルに従って行った。また、Hex サブユニットの分子量は APRO marker (APRO Science)より算出した。

X 線結晶構造解析

まず、modB の SP 精製画分をゲルろ過にてさらに精製した。具体的には Superdex 200 (10/300) column (GE Healthcare)を PBS で平衡化した後、サンプルをアプライし、12.6 mL (~135-kDa)のシングルピークを分取し、Amicon ultra device (30,000 MWCO)にて 7.2 mg/mL に濃縮した。Index #90 [0.2 M sodium formate, 20% (w/v) PEG 3350] (Hampton Research)条件下で、桿状の結晶が観察されたため、microseeding にて単結晶を獲得した。結晶を cryoprotectant solution [20% (v/v) glycerol, 0.16 M sodium formate, 16% (w/v) polyethylene glycol (PEG) 3350]に 10 秒間移した後、液体窒素で凍結保存した。高エネルギー加速器研究機構 物質構造科学研究所の放射光科学研究施設 Photon Factory のビームライン AR-NE3a にて、100 K, ビーム波長 1.000 Å 条件で、ADSC Quantum 270 で検出し、modB 結晶の X 線回折像を取得した。ヒト HexB の構造 [22]をモデルとし、得られたデータは iMosflm [32]を用いて精密化した後、Molrep [32]を用いた分子置換法により位相を決定した。構造精密化は Refmac5 [32]を用い、Coot program [33]を用いてモデルを修正した。modB のラマチャンドランプロット解析は Rampage software program [32]を用いた。

各改変型 HexB のループ構造予測

各改変型 HexB のループ構造予測は、Desmond version 3.8 software program [34]を用いた分子動力学シミュレーションにより決定した。アミノ酸置換は Maestro (Schrödinger)を用いて計算的に行い、OPLS (Optimized Potentials for Liquid Simulations) 2005 力場をシミュレーションに用いた。初期構造モデルは 150 mM NaCl を含む TIP3P 水分子中に設置した。最適化後、Langevin dynamics を用い、等温定圧集団 (300 K, 1 bar)における 50 ナノ秒間の MD phase を算出した。GSEP ループの分子動力学軌道と平均二乗偏差 (RMSD)は MOE program (Chemical Computing Group)を用いた。長距離静電的相互作用の解析は Smooth Particle Mesh Ewald method を用いた。画像は PyMOL (Schrödinger)を用いて作成した。

速度論的パラメータの算出

各改変型 HexB の K_m および V_{max} 値は以前の報告 [12]を参考とし、0.125–4 mM の 4-MUGS を用い、Lineweaver-Burk プロットより算出した。

熱安定性の評価

マウス血漿は 14 週齢の SD マウスより、ヘパリンナトリウム (清水製薬)を用いて調製した。各改変型 HexB の *in vitro* における安定性は以前の報告 [12]を参考とし、30% (v/v)の SD マウス血漿を含む 10 mM NaPB (pH 6.0)溶液中、37°C でインキュベーションし、各時間の酵素活性を測定した。活性は開始時における活性値を 100%とした相対値で算出した。

M6P 型糖鎖の検出と定量

組換え Hex は抗ヒト HexA pAb を用いた western blotting にて検出した。具体的には、それぞれの精製画分に含まれる組換え Hex を超純水で一定量とした後、6 分の 1 量の 6×SDS サンプルバッファーを加え、100°C、3 分間処理した。SDS-PAGE は 10% (w/v) のポリアクリルアミドゲルで行った後、Trans-blot sd semi-dry transfer cell (Bio-Rad)を用いて Immobilon[®]-P PVDF Membrane (Merck Millipore)に 0.1 A、1 時間転写した。50% (v/v) Blocking One (Nacalai tesque)-TBS (25 mM Tris, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, pH 7.4)により室温、1 時間ブロッキング処理を行った後、1 次プローブとして抗ヒト HexA pAb を 50% (v/v) Blocking One-TBS で 1,000 倍希釈し、4°C、一晩処理した。0.1% (v/v) Tween 20 (Sigma-Aldrich)/TBS (TBST)で洗浄後、2 次プローブとしてビオチン標識 抗ウサギ IgG 抗体 (Cat. No.; BA-1000, Vector Laboratories)を 50% (v/v) Blocking One-TBS で 1,000 倍希釈し、室温、1 時間処理した。TBST で洗浄後、3 次プローブとして HRP 標識 抗ビオチン抗体 (Cat. No.; 7075, Cell Signaling Technology)を 50% (v/v) Blocking One-TBS で 1,000 倍希釈し、室温、1 時間処理した。TBST および TBS で洗浄後、Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus-ECL (Perkin Elmer)および画像解析装置 LAS-4000miniEPUV (Fuji Film)を用いて検出した。分子量は Biotinylated Protein Ladder (Cell Signaling Technology)より算出した。

組換え CI-M6PR domain9 を用いた lectin blotting では、ブロッキング後の膜に対し、1 次プローブとして Recombinant domain 9 of human CI-M6PR with a histidine tag (Dom9His, 産業総合研究所 糖鎖創薬技術研究センター 千葉靖典 博士から供与)を 50% (v/v) Blocking One-TBS で 5 µg/mL に希釈し、4°C、一晩処理した。TBST で洗浄後、2 次プローブとして抗 penta His mAb (Cat. No.; 34660, Qiagen)を 50% (v/v)

Blocking One-TBS で 1,000 倍希釈し、室温, 1 時間処理した。TBST で洗浄後、3 次プローブとして HRP 標識 抗マウス IgG, IgM 抗体 (Cat. No.; 31446, Thermo Fisher Scientific) を 50% (v/v) Blocking One-TBS で 1,000 倍希釈し、室温, 1 時間処理した。検出は Western Lightning Chemiluminescence Reagent Ultra (Perkin Elmer) を用いて western blotting と同様の方法で行った。

各改変型 HexB に含まれる M6P 残基の定量は Togawa らの方法 [35] に従った。

GM2AP 存在下での GM2 分解能の検討

GM2-degradation assay は Sato らの方法 [36] に従った。具体的には、GM2 ガングリオシド標品 (Enzo Life Sciences) とメタノール資化酵母株 *Ogataea minuta* 由来 hHexA (*OmHexA* [11], 産業総合研究所 糖鎖創薬技術研究センター 千葉靖典 博士から供与) あるいは各改変型 HexB (4-MUGS 分解活性 $2 \mu\text{mol h}^{-1}$) を 0.1% (w/v) BSA, 10 mM クエン酸 Na バッファー (pH 4.5) 中で混合し、化学合成 GM2AP (徳島大学大学院医歯薬学研究部 機能分子合成薬学分野 大高章 教授から供与) 5 μg の存在下または非存在下で 37°C , 22 時間反応させた。その後、糖脂質を C18 Sep-Pak Cartridge (Waters) で精製し、HPTLC silica gel 60 plate (Merck) にスポットした。TLC プレートを $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (Sigma-Aldrich)/0.2% (w/v) CaCl_2 (Wako) = 60/40/9 (v/v) で展開した後、11.4% (v/v) H_2SO_4 (Katayama Chemical)/ 0.05% (w/v) orcinol (Sigma-Aldrich) を噴霧し、TLC plate heater III (Camag) を用いて 120°C に加熱することで、糖脂質を検出した。

培養細胞における 4-MUGS 分解活性の回復

患者由来皮膚線維芽細胞を collagen type I-coated 12-well plate (AGC Techno Glass) に播種し、一定期間培養後、各改変型 HexB (4-MUGS 分解活性, $2 \mu\text{mol h}^{-1}$) を添加した。また、一部の実験では同時に 5 mM M6P (Sigma-Aldrich) を加えた。4 日間の培養後、trypsin-EDTA (Life technologies) により細胞を剥離し、回収した。細胞ペレットに対し、1% (v/v) nonidet P-40 (NP-40, Roche) および各種プロテアーゼ阻害剤 1 μM pepstatin A (Peptide Institute), 20 μM leupeptin (Peptide Institute), 1 mM EDTA, 1 mM PMSF (Wako) を含む PBS を加え、超音波破碎した。遠心後、その上清を細胞抽出液とし、細胞抽出液中の 4-MUGS 活性を測定した。

間接蛍光抗体法

TSD 患者由来皮膚線維芽細胞 (F218)を 0.05% (w/v) atelocollagen (Koken)でコーティングした 8-well Lab-Tek chamber slides (Thermo Fisher Scientific)に 5.5×10^5 cells/well となるよう播種した。3 日間培養後、各改変型 HexB (4-MUGS 分解活性 $2.5 \mu\text{mol h}^{-1}$) を加え、さらに 7 日間培養した。4% (w/v) paraformaldehyde (PFA, Wako)/PBS で 4°C 、一晩固定後、PBS で洗浄し、5% (v/v) goat serum (Cedarlane)/1% (w/v) BSA/PBS で室温、2 時間ブロッキングした。1 次プローブとして、抗 GM2 mAb (50 倍希釈)および抗 HexA pAb (1,000 倍希釈)を 5% (v/v) goat serum/1% (w/v) BSA/PBS で希釈し、 4°C 、一晩処理した。0.01% (v/v) Tween20/PBS (PBST)で洗浄後、2 次プローブとして、FITC 標識抗マウス IgG+M 抗体 (Cat. No.; ab47830, abcam, 1,000 倍希釈)および Cy3 標識抗ウサギ IgG 抗体 (Cat. No.; 111-165-006, Jackson ImmunoResearch, 2,000 倍希釈)を 5% (v/v) goat serum/1% (w/v) BSA/PBS で希釈し、室温、1 時間処理した。PBST で洗浄後、0.26% (w/v) 1,4-Diazabicyclo [2.2.2]octane (DABCO, Wako), 50% (v/v) glycerol/PBS で封入し、LSM700 confocal fluorescent microscope (Carl Zeiss)を用いて蛍光を観察した (FITC: 励起波長 488nm, 蛍光波長 518 nm, Cy3: 励起波長 555 nm, 蛍光波長 585 nm)。各蛍光強度の定量は ZEN2012 (Carl Zeiss)を用いて算出した。

GM2-ELISA

GM2-ELISA は Tsuji らの方法 [37]に従った。具体的には、TSD 患者由来皮膚線維芽細胞 (F218)を collagen type I-coated 96-well plate (AGC Techno Glass, 1×10^4 cells/well)に播種した。一定期間培養後、各改変型 HexB (MUGS 分解活性 $1 \mu\text{mol h}^{-1}$)を加え、さらに 7 日間培養した。4% (w/v) PFA/PBS で 4°C 、一晩固定した。PBS で洗浄後、0.6% (v/v) H_2O_2 (Sigma-Aldrich)/PBS を 30 分間処理した。5% (v/v) goat serum/1% (w/v) BSA/PBS で 37°C 、2 時間ブロッキングした後、1 次抗体として抗 GM2 mAb を 5% (v/v) goat serum/1% (w/v) BSA/PBS で 100 倍希釈し、 4°C 、一晩処理した。PBS で洗浄後、2 次抗体として ビオチン標識抗マウス IgG, IgM 抗体 (Cat. No.; 31807, Thermo Fisher Scientific)を 5% (v/v) goat serum/1% (w/v) BSA/PBS で 1,000 倍希釈し、室温、1 時間処理した。洗浄後、HRP 標識ストレプトアビジン (Cat. No.; P0397, Dako)を 5% (v/v) goat serum/1% (w/v) BSA/PBS で 2,000 倍希釈し、室温、1 時間処理した。洗浄後、peroxidase assay kit for ELISA (Sumitomo Bakelite)を製造者のプロトコルに従って用い、450 nm の吸光度を測定した。

培養細胞内におけるプロテアーゼ抵抗性の評価

各細胞抽出液 (7.5 μg of protein)をサンプルとし、SDS-PAGE および抗 HexA pAb を用いた western blotting により各 Hex の分子種を評価した。また、 β -actin をローディングコントロールとし、抗 β -actin mAb (Cat. No.; A5316, Sigma-Aldrich)を 50% (v/v) Blocking One-TBS で 5,000 倍希釈して用いることで検出した。

細胞内半減期の算出

TSD あるいは SD 患者由来皮膚線維芽細胞を collagen type I-coated 12-well plate あるいは 96-well plate に播種した。5 日間の培養後、CHO 細胞発現系由来 hHexA [12]および各改変型 HexB を同じ 4-MUGS 分解活性分加えた。4 日後、培地交換し、0–12 日間の培養後に細胞を回収した。その後、抽出液を作製し、4-MUGS 分解活性を測定した。

HMDER- β GlcNAc の合成と評価

2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-galactopyranosyl bromide の代わりに 2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-deoxy- α -D-glucopyranosyl chloride を用いる点を除き、HMDER- β GlcNAc の合成の大部分は HMDER- β Gal の合成方法 [38]に従った。生成物は JNM-LA300 instrument (JEOL)および JMS-T100LC AccuToF (JEOL)により NMR とマスペクトルを確認した (data not shown)。得られた HMDER- β GlcNAc は dimethyl sulfoxide (fluorometric grade, Dojindo)に溶解させ、ストック溶液とした。HMDER- β GlcNAc を 0.2 M NaPB (pH 7.4)中、1 U β -*N*-acetylglucosaminidase (Sigma-Aldrich, A2264)を加え、25°C, 30 秒間反応させた。FP-6500 fluorescence spectrometer (JASCO)を用いて励起波長 525 nm および蛍光波長 550 nm の蛍光強度を測定した。また、蛍光生成物が HMDER であることを高速液体クロマトグラフィーで確認した (data not shown)。

HMDER-βGlcNAcを用いた生細胞イメージング

SD 患者由来皮膚線維芽細胞 (F572)および健常者由来線維芽細胞 (Hs68)を 0.05% (w/v) atelocollagen でコートした 8-well Lab-Tek chamber slides に播種し、一定期間培養した。各改変型 HexB (4-MUGS 分解活性 $2 \mu\text{mol h}^{-1}$)を添加した後、さらに 24 時間培養した。その後、終濃度 $20 \mu\text{M}$ の HMDER-βGlcNAc を添加し、 37°C , 1 時間静置した。また、 $10 \mu\text{g/mL}$ bisbenzimidazole H33342 (Sigma-Aldrich)により核を染色した。BIOREVO BZ-9000 device (Keyence)を用いて、励起波長 540 nm および蛍光波長 605 nm の蛍光を観察した。

AcidiFluor ORANGE を用いた蛍光イメージング

各改変型 HexB と AcidiFluor ORANGETM-NHS (AFO-NHS, Goryo Chemical, [39]) のコンジュゲートは、製造者のプロトコルに従って作製した。AFO-NHS, -modB および -mod2B (各 100 pmol)を SD 患者由来皮膚線維芽細胞 (F572)に添加し、さらに 24 時間培養した。その後、生細胞を LSM700 confocal fluorescent microscope を用いて、励起波長 555 nm および蛍光波長 585 nm の蛍光を観察した。一方で、酵素添加後の細胞を 4% (w/v) PFA/PBS で固定後、抗 LAMP-1 pAb (Cat. No.; sc-5570, Santa Cruz Biotechnology)を 5% (v/v) goat serum/1% (w/v) BSA/PBS で 200 倍希釈して用い、酢酸 Na バッファー (pH 4.5)中で AFO-HexBs と LAMP-1 の共局在を LSM700 で観察した。

SD マウスに対する脳室内投与

脳室内投与は(財)東京都臨床医学総合研究所動物実験マニュアルに従って行った。具体的には、10 週齢の SD マウスに対し、ジエチルエーテル (Sigma-Aldrich)で軽く麻酔を行い、PBS で 10 倍希釈したソムノペンチル (Kyoritsu Seiyaku, 有効成分 64.8 mg/mL ペントバルビタールナトリウム)を $150 \mu\text{L}$ 腹腔内投与した。頭頂部の皮膚をはさみで切り、深度 2 mm の二段針 (Hoshiseido)を用いて右側脳室内へ投与した。投与は矢状縫合と冠状縫合の接点であるブレグマを目安に、尾側へ 0.5 mm 、右側へ 1 mm の位置に行った。投与量は、各改変型 HexB 投与群は $1\text{--}5 \text{ mg/kg BW}$ とし、PBS 投与群は同容量の $25 \mu\text{L}$ とした。また、繰り返し投与の際は、1 回目投与の 2 週間後に、同じ手法で同じ位置に投与した。

マウス組織抽出液の作製

投与 1 週間後にマウスをジエチルエーテルで麻酔し、PBS で灌流後、脳、肝臓および脾臓を摘出した。各臓器はドライアイスでただちに凍結し、 -80°C で保存した。脳は投与側の半球を使用し、前脳・中脳 (投与部位を含む画分)・後脳 (小脳を含む画分) の 3 つに分割した。各種プロテアーゼ阻害剤 $1\mu\text{M}$ pepstatin A, $20\mu\text{M}$ leupeptin, 1mM EDTA, 1mM PMSF を含む PBS を、各組織片の湿重量の 5 倍量となるように加えた。超音波処理後、 $13,200\times\text{g}$, 15 分間遠心を行い、上清を回収して組織抽出液サンプルとした。4-MUGS 分解活性は湿重量あたりの値を算出した。

マウス脳の凍結切片作製

-80°C で凍結保存した脳を半分に切断し、投与部位と逆側の半球を O.C.T. compound (Sakura Seiki)を用いて -20°C 条件下で包埋皿に固定した。Microm HM550 cryostat (Microedge Instruments)を使用して厚さ $10\mu\text{m}$ の切片を作製し、silanized slides (Dako)あるいはindium-tin-oxide (ITO)-coated slide glasses (Matsunami Glass)に貼り付けた後、 -80°C で保存した。

マウス脳抽出液の免疫沈降

Protein A-agarose (Bio-Rad)を 1% (v/v) TritonX-100 (Nacalai tesque)/TBS (pH 7.4) で洗浄後、抗 HexA pAb を 4°C , 一晩反応させた。 1% (v/v) TritonX-100/TBS で洗浄後、脳抽出液を加え、室温、2 時間反応させた。洗浄後、結合したタンパク質を SDS サンプルバッファーで溶出し、SDS-PAGE および western blotting を行った。ブロッキング後の PVDF 膜に対し、1 次プローブとして抗ヒト HexA pAb を 50% (v/v) Blocking One-TBS で $1,000$ 倍希釈し、 4°C , 一晩処理した。TBST で洗浄後、Clean-Blot IP Detection solution (Thermo Fisher Scientific)を 50% (v/v) Blocking One-TBS で 500 倍希釈し、室温、1 時間処理した。バンド強度は Image J software program (ver. 1.46) [40] を用いて定量した。

免疫組織化学

HexA の染色では、silanized slides に貼り付けた切片を 4% PFA/PBS で 4°C, 一晩固定した。PBS で洗浄後、10%ヤギ正常血清 (Nichirei Bioscience)で室温, 1時間ブロッキングした。1次プローブとして、抗 HexA pAb を 5% (v/v) goat serum/1% (w/v) BSA/PBS で 2,000 倍希釈し、4°C, 一晩処理した。PBST で洗浄後、2次プローブとして、Cy3 標識抗ウサギ IgG 抗体を 5% (v/v) goat serum/1% (w/v) BSA/PBS で 2,000 倍希釈し、室温, 1時間処理した。また、10 µg/mL bisbenzimidazole H33342 により核を染色した。洗浄後、0.26% (w/v) DABCO, 50% (v/v) glycerol/PBS で封入し、BIOREVO BZ-9000 で観察した。

末端 GlcNAc 含有糖鎖の染色では、1次プローブとして、抗末端 GlcNAc 含有糖鎖 mAb (20 倍希釈)、2次プローブとして、ビオチン標識抗マウス IgG, IgM 抗体 (1,000 倍希釈)、3次プローブとして、FITC 標識ストレプトアビジン (Cat. No.; 554060, BD Biosciences, 2,000 倍希釈)を用いた。蛍光強度の解析は、BZ-II 解析アプリケーション (BZ-H2A, Keyence)を用い、顆粒状の蛍光数をカウントした。

青: DAPI-BP フィルタ, 励起波長 360 ± 20 nm, 蛍光波長 460 ± 25 nm

緑: GFP-BP フィルタ, 励起波長 470 ± 20 nm, 蛍光波長 535 ± 25 nm

赤: TRITC フィルタ, 励起波長 540 ± 12.5 nm, 蛍光波長 605 ± 27.5 nm

HMDER-βGlcNAc を用いた *in situ* イメージング

Silanized slides に貼り付けた切片に 20 µM HMDER-βGlcNAc/150 mM NaCl/20mM クエン酸リン酸バッファー (pH 6.0)を添加し、37°C, 30 分間、遮光し静置した。PBS で洗浄後、0.26% (w/v) DABCO, 50% (v/v) glycerol/PBS で封入し、BIOREVO BZ-9000 で観察した。

Mip1α-ELISA

各脳抽出液 25 µL を使用し、Quantikine® ELISA, mouseCCL3/MIP1α (R&D Systems)のプロトコルに従い、マウス Mip1α を定量した。

イメージング質量分析

ITO-coated slide glasses に貼り付けた凍結切片を室温に戻し、iMLayer device (Shimadzu)を用いて 9-aminoacridine (Merck)を膜厚 1.5 μm となるようスライドに塗布した。全ての質量分析は iMScope のプロト機である Mass microscope (Shimadzu)を用いた。Positive ion mode では質量電荷比 (m/z) 790–1,300, negative ion mode では m/z 850–1,700 のシグナル強度を計測した。レーザー径は 5 μm とし、scan pitch は 10 μm あるいは 70 μm で行い、各測定地点においてレーザー照射数 200 回で行った。各シグナルの構造は MS/MS 解析により確認した。GM2, GA2 および bis(monoacylglycerol)phosphate (BMP)の相対シグナル強度は phosphatidylinositol (PI, 38:4)あるいは phosphatidylcholine (PC, 34:1)との比で算出した。画像解析は Imaging MS Solution ver. 1.01.02 (Shimadzu)を用いた。また、連続切片を Mayer's hematoxylin (Muto Pure Chemicals)および eosin Y (Sigma-Aldrich)で染色した。

ローターロッド試験

Tsuiji らの方法 [11]に従い、一定速度で回転する円柱上でバランスを保ち乗り続けることができる時間を測定し、運動機能を調べた。実際には、10 週齢から 16 週齢のマウスに対し、MK-610A (Muromachi Kikai)を使用し、120 秒かけて 4 rpm から 40 rpm まで加速する設定とした。マウス 1 匹当たり 5 回試験し、平均値を算出した。

体重測定および寿命解析

体重測定は毎週ローターロッド試験前に行った。寿命は Kaplan-Meier 法により評価した。

統計解析

全ての統計解析は SigmaPlot11 (Systat Software)を用いた。3 群以上間の比較では一元配置分散分析 (one-way analysis of variance, one-way ANOVA)および事後検定として Tukey test を行った。熱安定性および半減期の比較では二元配置分散分析 (two-way ANOVA)および事後検定として Tukey test を行った。2 群間の比較では 2-tailed unpaired t -test を用いた。生存率の比較では log-rank test および事後検定として Holm-Sidak test を用いた。各検定において、 P 値が 0.05 未満の場合、有意な差があると判断した。

第三章 結果

3-1. 改変型 HexB の設計と発現系の構築

3-1-1. プロテアーゼ抵抗性を持つ改変型 HexB2 の設計

我々は以前に、Hex の α -サブユニットと β -サブユニットの相同性に基づき、 β -サブユニットの基質特異性を α -サブユニット様に変えるため、および GM2AP との相互作用に必要なループ構造を β -サブユニットに導入するためのアミノ酸置換を行い、改変型 HexB (modified HexB; modB) を作製した。具体的には、負電荷を帯びた基質を認識できるように、DL (β 452–453) を NR (α 423–424) へと置換した。さらに、GM2AP と相互作用できるように、RQNK (β 312–315) を GSEP (α 280–283) へと置換した。改変型 *HEXB* 遺伝子を CHO 細胞へ導入すると、mod β -サブユニット (β_1') のホモダイマーが培養上清中に分泌されることを確認している。一方で、modB の一部は細胞内でプロテアーゼによる分解を受け、GM2 分解活性を失った分解物へと変化することが明らかとなっている。

そこで本研究では、GSEP 配列をプロテアーゼによる分解から保護するために、 β_1' -サブユニットの LDS (β 316–318) をさらに SGT (α 284–286) へと置換した mod2 β -サブユニットおよび β_2' β_2' ホモダイマーである改変型 HexB2 (mod2B) をデザインした (Fig. 3-1)。

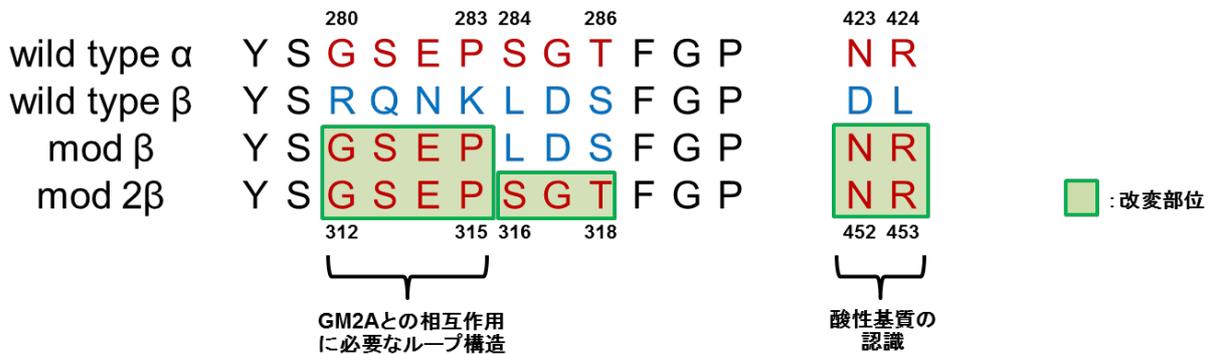


Fig. 3-1. 改変型 HexB2 の設計

β -サブユニットの DL (β 452–453) を NR (α 423–424) へ、RQNK (β 312–315) を GSEP (α 280–283) へと置換した β_1' -サブユニットを作製した。さらに、GSEP 配列をプロテアーゼによる分解から保護するために、 β_1' -サブユニットの LDS (β 316–318) を SGT (α 284–286) へと置換した mod2 β -サブユニット (β_2') をデザインした。

3-1-2. Mod2B 発現系の構築

構築した pCX-N₂/mod2B ベクターあるいは pCX-Hygro/mod2B ベクターを CHO 細胞に導入し、mod2B 恒常発現 CHO 細胞株を樹立した。また、培養上清中に分泌された組換え Hex の 4-MUGS 分解活性を測定した。その結果、ベクターを複数回導入することで培養上清中に分泌される Hex 量が増大することが明らかとなり、mod2B 高発現 CHO 細胞株を獲得することができた (Fig. 3-2)。

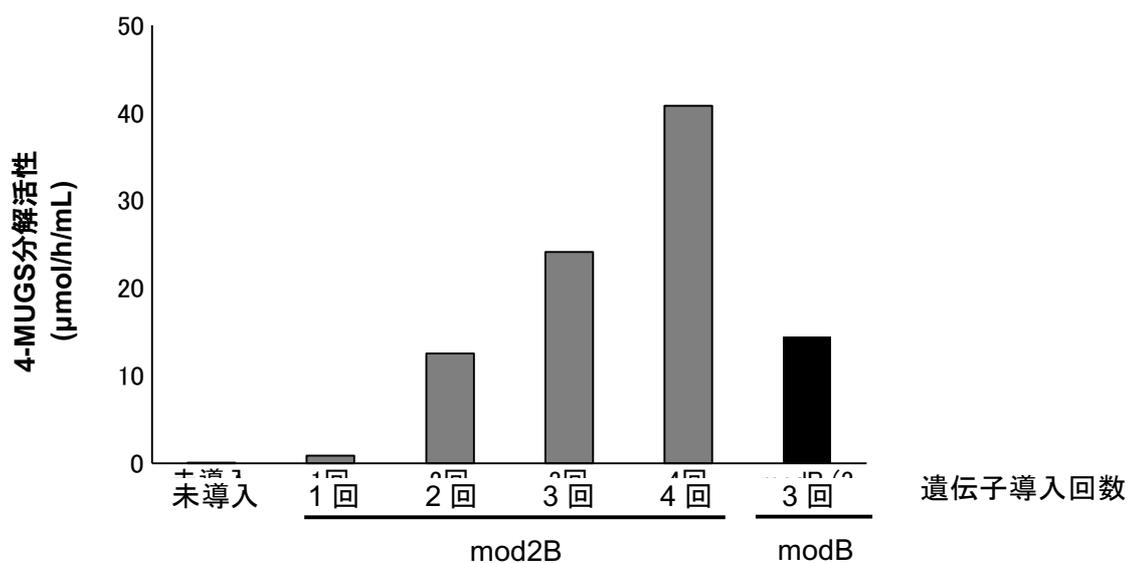


Fig. 3-2. Mod2B 発現 CHO 細胞株培養上清中の 4-MUGS 分解活性

Mod2B 発現ベクターを CHO 細胞に導入し、培養上清中に分泌された組換え Hex の 4-MUGS 分解活性を測定した。また、以前に当研究室で樹立した modB 発現株と比較した。

3-2. 各改変型 HexB の精製

無血清培地中に分泌された各改変型 HexB を 3 段階のカラムクロマトグラフィーにより精製した。本精製系では、M6P 型糖鎖を豊富に持つ各改変型 HexB を獲得するために、従来リン酸化タンパク質の分離・精製・分析に利用されていた Phos-tag [31]を用いることで、リン酸化糖鎖との結合を介したアフィニティークロマトグラフィーを行った。Conditioned medium (CM)中には 63-kDa の前駆体 (β_1' -P および β_2' -P) および 51-kDa の成熟体 (β_1' -M および β_2' -M)が含まれていたが、3 段階の精製により、精製度の高い前駆体を獲得することができた (Fig. 3-3)。4-MUGS 比活性は modB で $10.3 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ 、mod2B で $12.6 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ であり、出発材料の 2.6–3.3 倍に上昇し、収率は 22–28%であった。また、CM 1 L あたり 16.1 mg の modB、あるいは 17.7 mg の mod2B を獲得した (Table.3-1)。

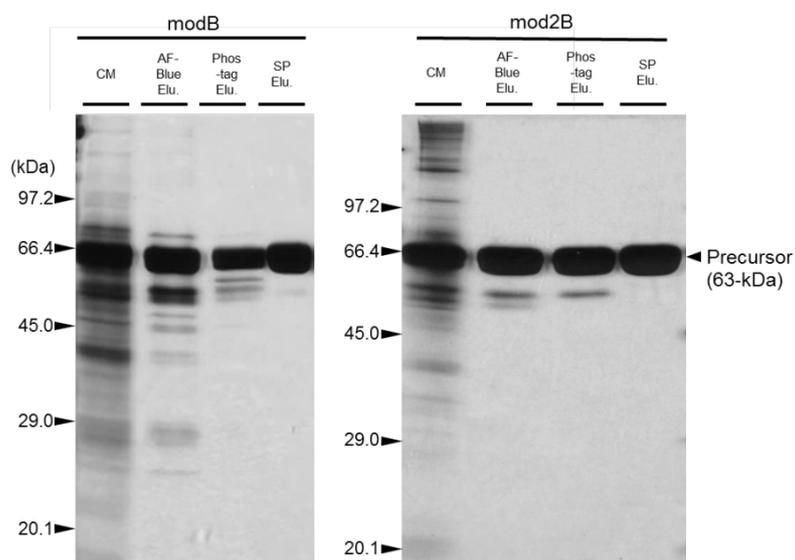


Fig. 3-3. 各精製段階の改変型 HexB の銀染色

3 段階のカラムクロマトグラフィーにより、各改変型 HexB を精製した。SDS-PAGE により各レーン 2 μg protein を分離し、銀染色で検出した。CM: conditioned medium, Elu: 溶出画分。

	modB		mod2B	
	PF	Yield (%)	PF	Yield (%)
Conditioned medium	1.0	100	1.0	100
AF-Blue elution	2.1	83	1.9	80
Phos-tag elution	2.7	62	2.1	61
SP elution	3.3	28	2.6	22

Table 3-1. 各改変型 HexB の精製結果

3 段階のカラムクロマトグラフィーにより、4-MUGS の比活性は 2.6–3.3 倍に上昇し、活性の収率は 22–28%であった。PF: purification factor.

3-3. X線結晶構造解析

改変部位の立体構造を調べるために、精製 modB を用いて X 線結晶構造解析を行い、HexA の結晶構造 [21] と比較した。β₁'-サブユニットの活性中心の構造は α-サブユニットの活性中心と非常に近かった。また、GSEP ループ構造が導入されていることも確認できた。ModB (β₁' β₁'ホモダイマー) と HexA (αβ ヘテロダイマー) の RMSD 値は 0.404 Å であった (Fig. 3-4 A-C, Table 3-2)。

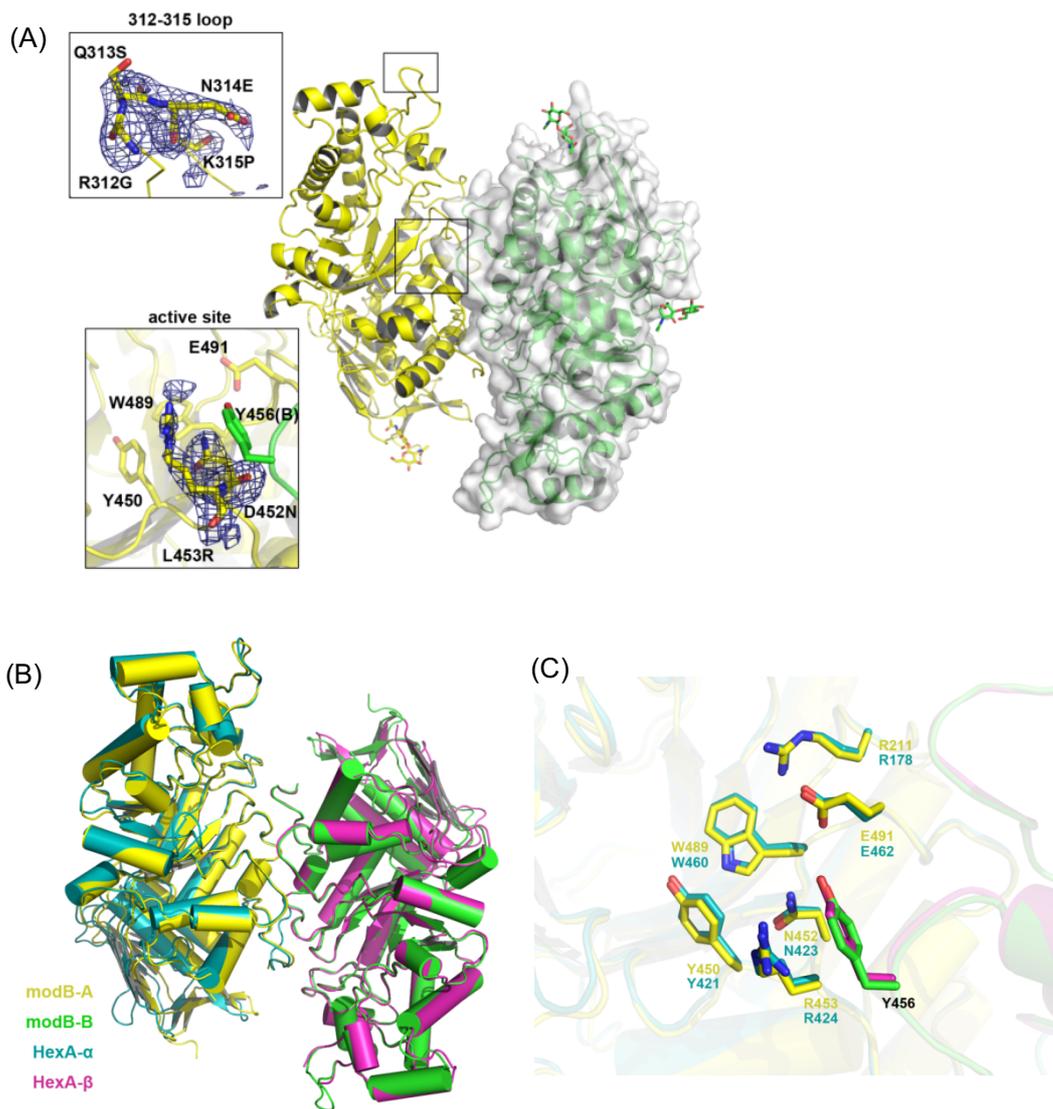


Fig. 3-4. modB の X 線結晶構造

(A) modB (β₁' β₁'ホモダイマー)の構造 (2.4 Å)。拡大図は活性中心と β₁'312-315 のループ構造であり、omit map による電子密度についても示した。(B) modB (PDB ID: 5BRO)と HexA (PDB ID: 2GJX)の重ね合わせ。(C) β₁'-および α-サブユニットの活性中心。

Data collection	
Space group	<i>P4₂2₁2</i>
Cell dimensions	
<i>a, b, c</i> (Å)	126.47, 126.47, 88.31
α, β, γ (°)	90, 90, 90
Resolution (Å)	40–2.4(2.5–2.4)*
<i>R</i> _{merge}	0.143(0.698)
<i>I</i> / σI	12.3(2.6)
Completeness (%)	100(98.8)
Redundancy	12.0(9.2)
Refinement	
Resolution (Å)	40–2.4
No. reflections	27,149
<i>R</i> _{work} / <i>R</i> _{free}	0.187/0.240
No. atoms	
Protein	3,952
Ligand/ion	65
Water	150
<i>B</i> -factors	
Protein	35.9
Ligand/ion	76.2
Water	31.0
R.M.S. deviations	
Bond lengths (Å)	0.013
Bond angles (°)	1.610

A single crystal was used for data collection.

* Values in parentheses are for the highest-resolution shell.

Table 3-2. 結晶構造のデータ収集と精密化

3-4. GSEP ループ構造のモデリング

hHexA (PDB ID: 2GJX)および modB (PDB ID: 5BRO)の結晶構造解析の結果をもとに、各改変型 HexB の GSEP ループ近傍の構造を予測した。分子動力学シミュレーションによる軌跡解析の結果、modB および mod2B の GSEP ループ構造の average pairwise RMSD はそれぞれ 2.315 および 3.869 Å であった (Fig. 3-5 A, B)。modB では S318とD317が水素結合を形成するのに対し、mod2B では S311, S316 および T318 がそれぞれ S316, T318 および C309 と水素結合を形成する (Fig. 3-5 C, D)。これらの結果より、mod2B の GSEPSGT ループは modB の GSEPLDS ループよりも、フレキシブルであることが示唆される。

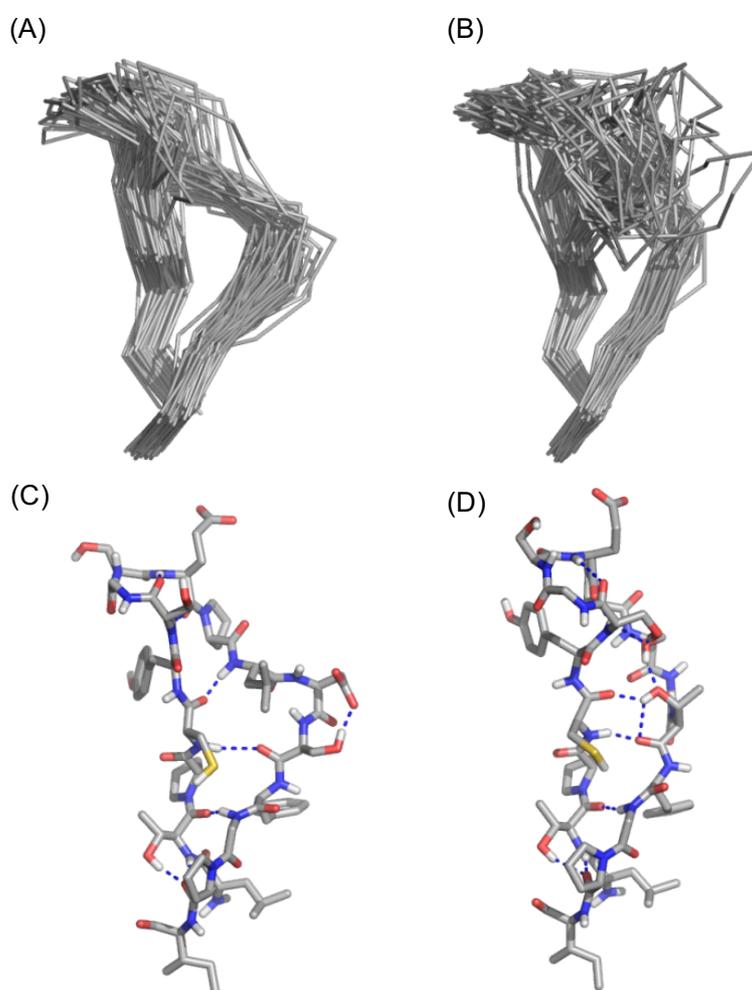


Fig. 3-5. GSEP ループ構造のモデル

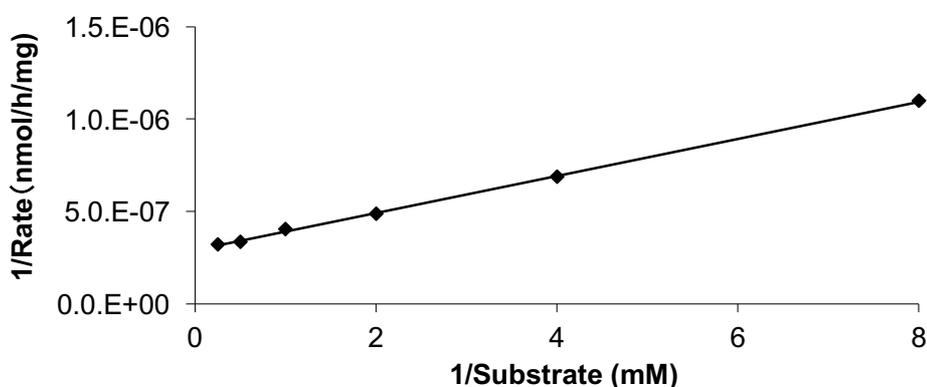
(A, B)分子動力学シミュレーションにより modB (A)および mod2B (B)の 307 から 322 番目のアミノ酸の 1 ns ごとの軌跡を解析した。(C, D) modB (C)および mod2B (D)の GSEP ループの構造を球棒モデルで示した。非極性の水素原子は省略し、水素結合は青の破線で示した。

3-5. 各改変型 HexB の *in vitro* における性質解析

3-5-1. 速度論的パラメータの算出

4-MUGS を用いて各改変型 HexB の速度論的解析を行った。modB の 4-MUGS に対する K_m は 0.34 mM、 V_{max} は $5.7 \times 10^{-5} \text{ mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ であった (Fig. 3-6 A)。一方、mod2B の 4-MUGS に対する K_m は 0.32 mM、 V_{max} は $5.8 \times 10^{-5} \text{ mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ であり (Fig. 3-6 B)、両者に違いはほとんど無かった。

(A)



(B)

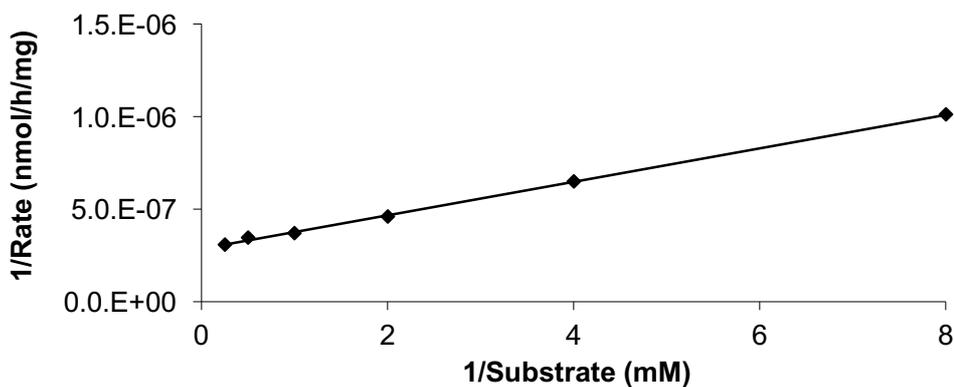


Fig. 3-6. 速度論的パラメータの算出

modB (A)および mod2B (B)の K_m および V_{max} 値を Lineweaver-Burk plot より算出した。

3-5-2. 熱安定性の評価

各改変型 HexB 前駆体の SD マウス血漿中における安定性を評価するために、30% (v/v) SD マウス血漿を含むリン酸バッファー (pH 6.0) 中、37°C における安定性を検討した。その結果、各改変型 HexB はほぼ同等の安定性を保持していることが示された ($P = 0.453$, two-way ANOVA) (Fig. 3-7)。また、7日後においても前駆体の状態を維持していた (data not shown)。

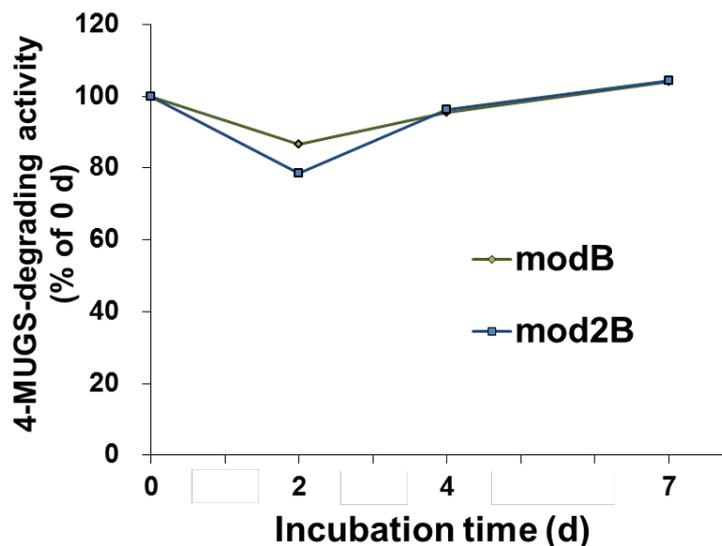


Fig. 3-7. 各改変型 HexB の熱安定性

各改変型 HexB 前駆体の SD マウス血漿中、37°C での安定性を評価した。活性は 0 日目を 100%とした相対値で算出した。

3-5-3. M6P 型糖鎖の検出と定量

各改変型 HexB に M6P 型糖鎖が付加されているかどうかを調べるために、組換え CI-M6PR domain9 (Dom9)を用いたレクチンブロットを行った。抗 HexA pAb を用いた western blotting の結果から、各精製段階において、mod2 β -サブユニットは 63-kDa の前駆体および 51-kDa の成熟体から構成されていた (Fig. 3-8 A)。一方で、Dom9 を用いた lectin blotting の結果から、Dom9 は mod2B 前駆体に対して反応したが、成熟体には反応しなかった (Fig. 3-8 B)。また、Phos-tag 素通り画分の Hex では M6P 型糖鎖が検出されなかった。これらの結果から、M6P 型の N 型糖鎖が付加された各改変型 HexB 前駆体を精製できたことが示された。

さらに、Togawa らの方法 [35]に従い、各改変型 HexB 1 分子あたりの M6P 含量を定量した結果、modB では 5.1 ± 0.6 、mod2B では 5.6 ± 0.3 (mol/mol Hex)の M6P が検出され、両者に大きな違いはなかった (Table 3-3)。

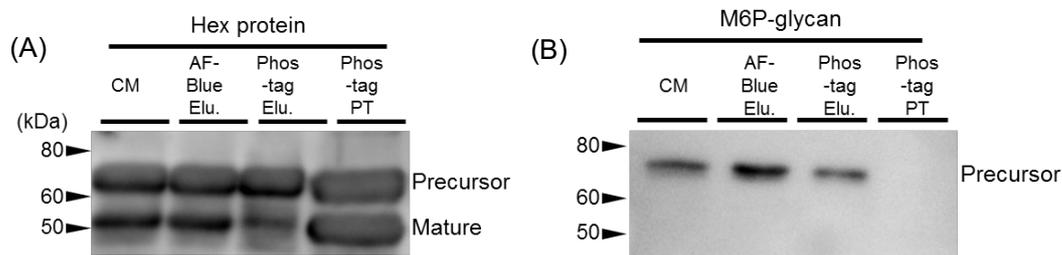


Fig. 3-8. M6P 型糖鎖の検出

各精製段階の mod2B (4-MUGS 分解活性 100 nmol h^{-1}) を SDS-PAGE により分離し、抗 HexA pAb (A) および組換え CI-M6PR domain9 (B) を用いたブロッティングを行った。

Hex アイソザイム	mod2B	modB
M6P 型糖鎖/N 型糖鎖	4/8	4/8
M6P contents (mol/mol Hex)	5.6 ± 0.3	5.1 ± 0.6

CM:

conditioned medium, Elu.: 溶出画分, PT: 素通り画分。

Table 3-3. M6P 残基の定量

各改変型 HexB 1 分子あたりの M6P 含量を定量した。M6P 含量は平均値 \pm 標準偏差 ($n = 3$) で示した。

3-5-4. GM2AP 存在下での GM2 分解能の評価

各改変型 HexB の *in vitro* での GM2 分解能を検討するために、GM2, 各 Hex および化学合成 GM2AP [36] を混合し、GM2 が分解されるかどうかを評価した。その結果、mod2B 前駆体は HexA 同様に GM2 を分解したが、modB 前駆体は GM2 分解活性が低いことが明らかとなった (Fig. 3-9)。

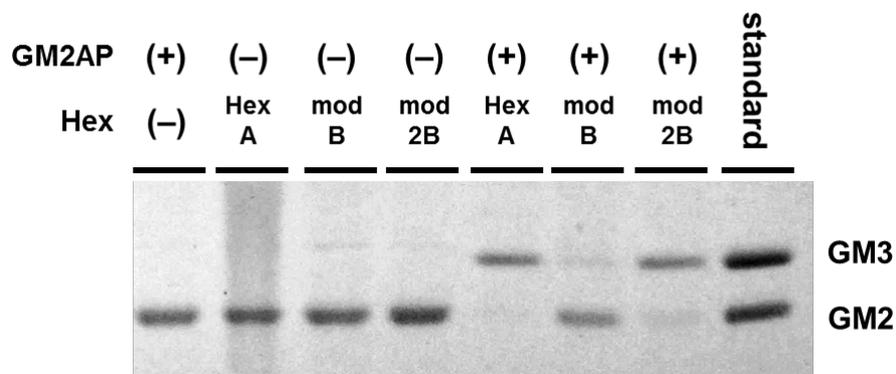


Fig. 3-9. GM2AP 存在下での GM2 分解能の評価

OmHexA [11], *modB* あるいは *mod2B* (4-MUGS 分解活性 $2 \mu\text{mol h}^{-1}$) を GM2 および化学合成 GM2AP と混合した。糖脂質を精製後、TLC で分離し、オルシノールで発色した。

3-6. 患者由来皮膚線維芽細胞への酵素補充

3-6-1. 人工基質分解活性の回復

精製した各改変型 HexB を SD 患者由来皮膚線維芽細胞の培養液中に添加し、培養細胞に対する酵素補充効果を検討した。4 日間の酵素補充を行った結果、細胞抽出液中の人工基質 4-MUGS に対する分解活性が有意に増大した。また、酵素添加と同時に 5 mM M6P を培養液に加えると、この回復は抑制されたことから、各改変型 HexB は CI-M6PR を介して細胞内に取り込まれることが示唆される (Fig. 3-10)。

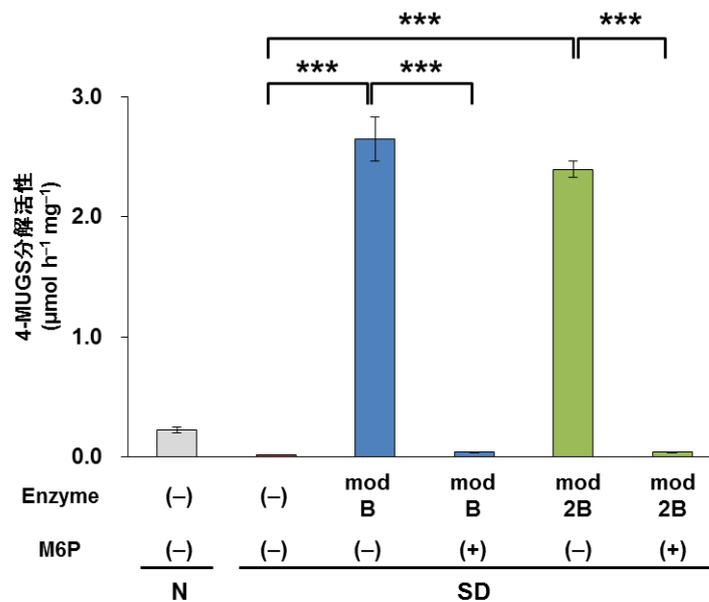


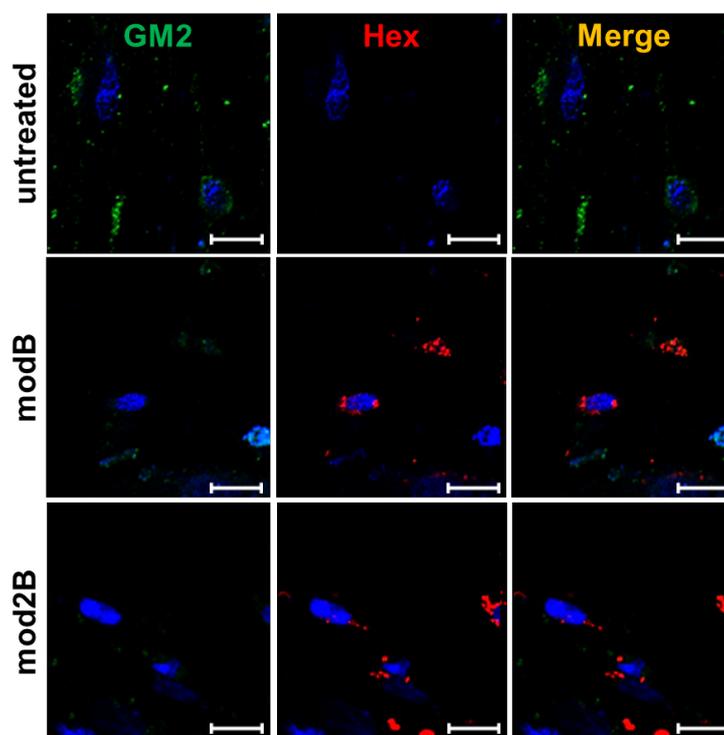
Fig. 3-10. 患者由来皮膚線維芽細胞における 4-MUGS 分解活性の回復

各改変型 HexB を SD 患者由来皮膚線維芽細胞に処理し、細胞抽出液中の 4-MUGS 分解活性を測定した。また、M6P (+) のサンプルは酵素添加と同時に 5 mM M6P を培養液に加えた。エラーバーは平均値 \pm 標準誤差 ($n = 3$) を示す。P 値は one-way ANOVA および Tukey *post-hoc* test より算出した (***) $P < 0.001$ 。

3-6-2. GM2 分解能の評価

培養細胞系において、各改変型 HexB の GM2 分解活性を調べるために、TSD 患者由来皮膚線維芽細胞に各改変型 HexB を添加し、蓄積 GM2 の減少を評価した。抗 GM2 抗体を用いた免疫染色の結果、未処理で見られた緑色の顆粒状蛍光が各改変型 HexB を処理することで顕著に減少した。また、抗 HexA pAb による染色の結果、Hex を示す赤色の蛍光は GM2 を示す緑色の蛍光と一致せず、酵素が到達したリソソームでは GM2 が分解されていることが示唆される (Fig. 3-11 A, B)。さらに、GM2-enzyme-linked immunosorbent assay (GM2-ELISA)によって、蓄積 GM2 を定量した結果においても、各改変型 HexB の添加により蓄積 GM2 が有意に減少した (Fig. 3-11 C)。

(A)



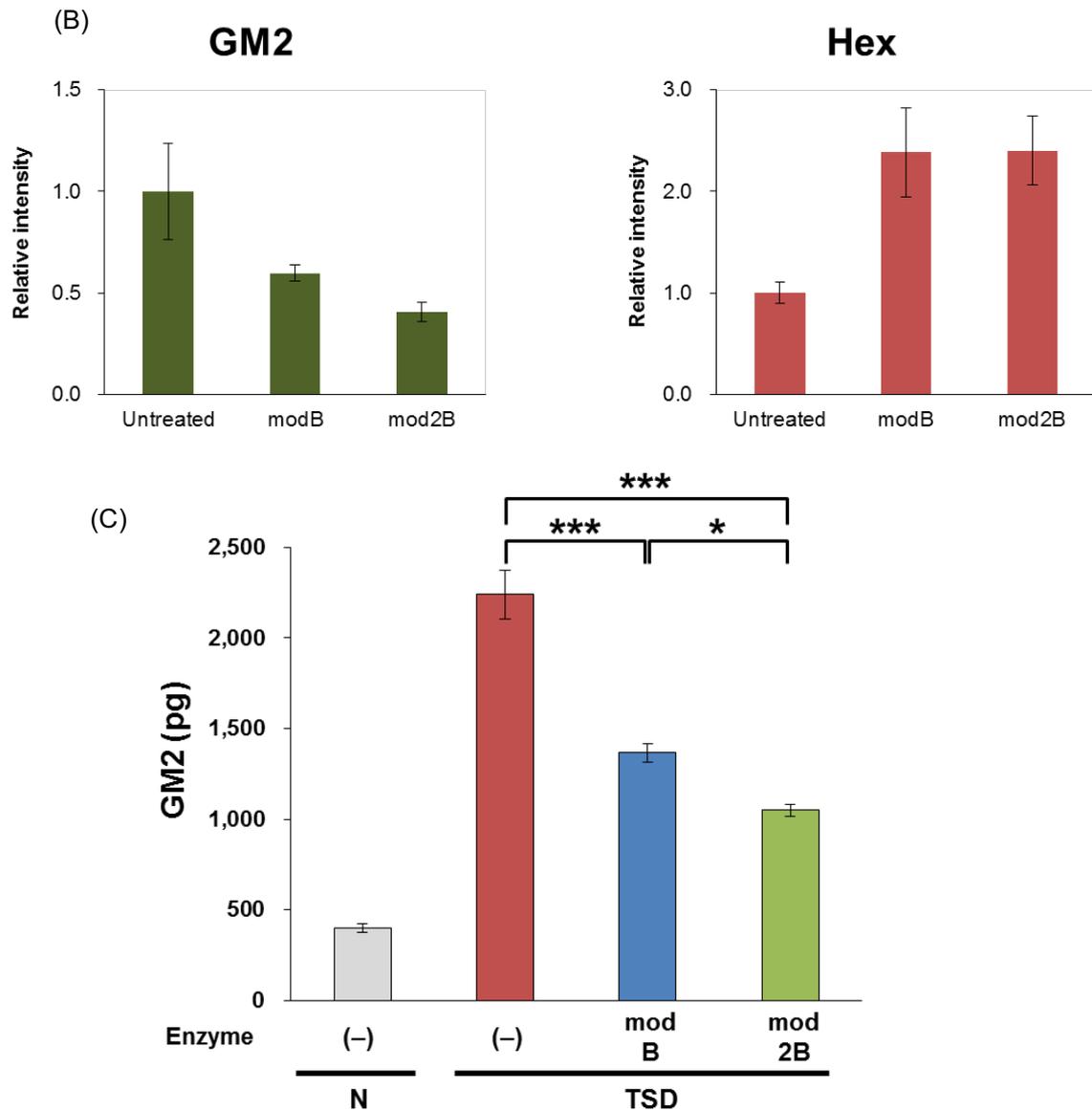


Fig. 3-11. 各改変型 HexB の GM2 分解活性

(A)各改変型 HexB を TSD 患者由来皮膚線維芽細胞に処理し、GM2 (緑)および Hex (赤)を免疫染色により評価した。スケールバーは 20 μm を示す。(B) GM2 および Hex の蛍光強度の定量。各値は未処理群を 1 とした相対値で算出した。エラーバーは平均値 \pm 標準誤差 ($n = 6-7$)を示す。 P 値は one-way ANOVA および Tukey *post-hoc* test より算出した ($*P < 0.05$, vs untreated-control)。(C) GM2-ELISA により蓄積 GM2 を定量した。エラーバーは平均値 \pm 標準誤差 ($n = 7$)を示す。 P 値は one-way ANOVA および Tukey *post-hoc* test より算出した ($*P < 0.05$, $***P < 0.001$)。N: normal.

3-6-3. プロテアーゼ抵抗性の評価

患者由来細胞内における各改変型 HexB のプロテアーゼ抵抗性を評価するために、抗 HexA pAb を用いた western blotting により分子種を確認した。その結果、健常者では 51-kDa の α -サブユニット成熟体および 25-kDa の β -サブユニット成熟体が検出された。一方で SD 患者では 51-kDa の α -サブユニット成熟体のみが検出された。modB では 51-kDa の β_1' -サブユニット成熟体 (M) および 25-kDa の分解物 (PD) が検出されたのに対し、mod2B では大部分が 51-kDa の β_2' -サブユニット成熟体であった。これらの結果から、mod2B は細胞内においてプロテアーゼによる分解を受けづらいことが示唆される (Fig. 3-12)。

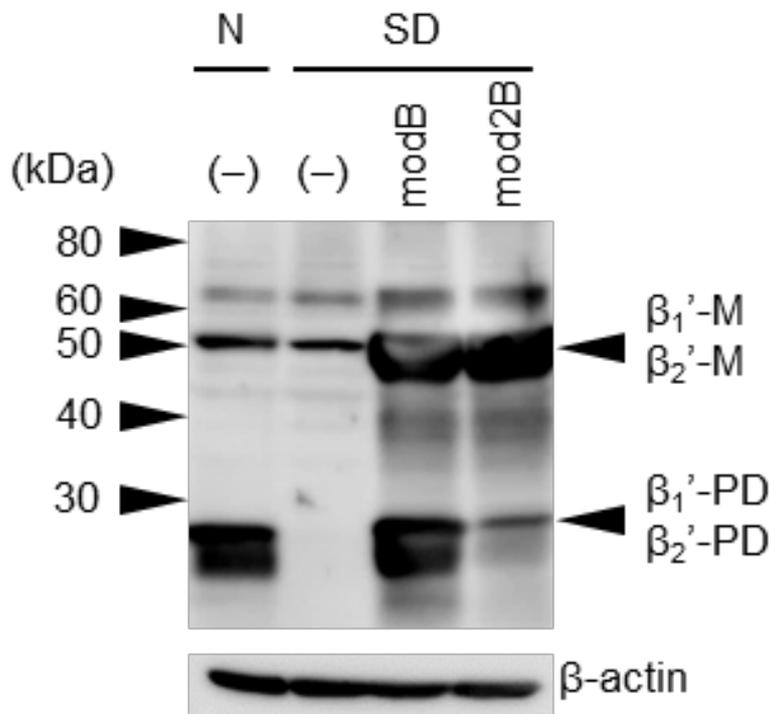


Fig. 3-12. 培養細胞内における各改変型 HexB のプロテアーゼ感受性

SD 患者由来皮膚線維芽細胞に各改変型 HexB を処理後、各細胞抽出液 7.5 μ g protein 中の Hex 分子種を western blotting により検出した。また、同じサンプルを用い、 β -actin を検出した。M: 成熟体, PD: 分解物, N: normal.

3-6-4. 細胞内半減期の算出

以前に HexA と HexB の混合物の細胞内半減期は 2.6 日 (HexA: HexB = 53: 47) あるいは約 6 日 (HexA: HexB = 6 : 4) [41, 42]であることが報告されている。患者由来細胞内における各改変型 HexB の半減期を評価するために、4 日間の酵素補充後、培地交換し、一定期間培養した。細胞抽出液中の 4-MUGS 活性の推移から細胞内半減期を算出した。その結果、それぞれの細胞内半減期は HexA では 2.1 日、modB では 10.6 日、mod2B では 12.5 日であり、各改変型 HexB の半減期は HexA よりも有意に長かった (Fig. 3-13)。また、各改変型 HexB 間に有意な差は認められなかった ($P = 0.964$)。

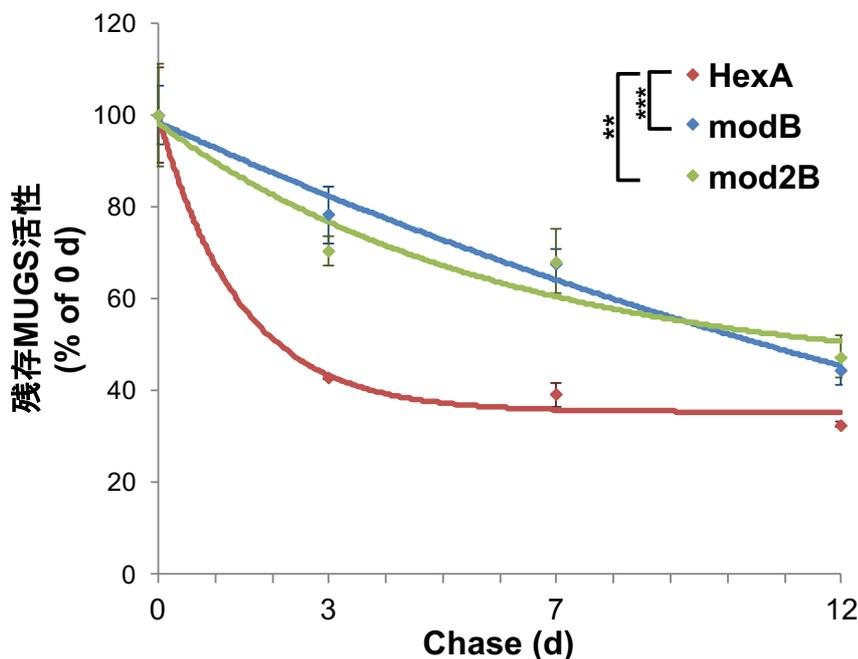


Fig. 3-13. 酵素補充後の培養細胞内における 4-MUGS 活性の推移

患者由来皮膚線維芽細胞に各 Hex を処理後、培地交換し、一定時間後の 4-MUGS 活性を算出した。酵素活性は培地交換時 (0 day)を 100%とした相対値で算出した。エラーバーは平均値±標準誤差 ($n = 3$)を示す。P 値は two-way ANOVA および Tukey *post-hoc* test より算出した (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)。

3-7. 培養細胞への酵素補充のイメージング

3-7-1. 各イメージングの概略

HMDER- β GlcNAc は細胞膜透過性をもつ蛍光プローブである。HMDER- β GlcNAc は蛍光を発しないが、 β -Hex により GlcNAc 残基が切断され、HMDER に変化すると蛍光を発するようになる。この性質を利用し、組換え Hex 処理後の生細胞で β -Hex 活性イメージングを行った (Fig. 3-14 A)。一方、pH 活性化型蛍光プローブである AcidiFluor ORANGE™ (AFO) は、中性 pH 条件下では蛍光を発しないが、酸性 pH 条件下では強い蛍光を発する [39]。N-ヒドロキシスクシンイミド (NHS) エステルにより組換え Hex タンパク質表面のリジン残基に AFO を標識すると、酸性コンパートメントである後期エンドソーム/リソソームへ到達した組換え Hex は蛍光を発するようになる (Fig. 3-14 B)。

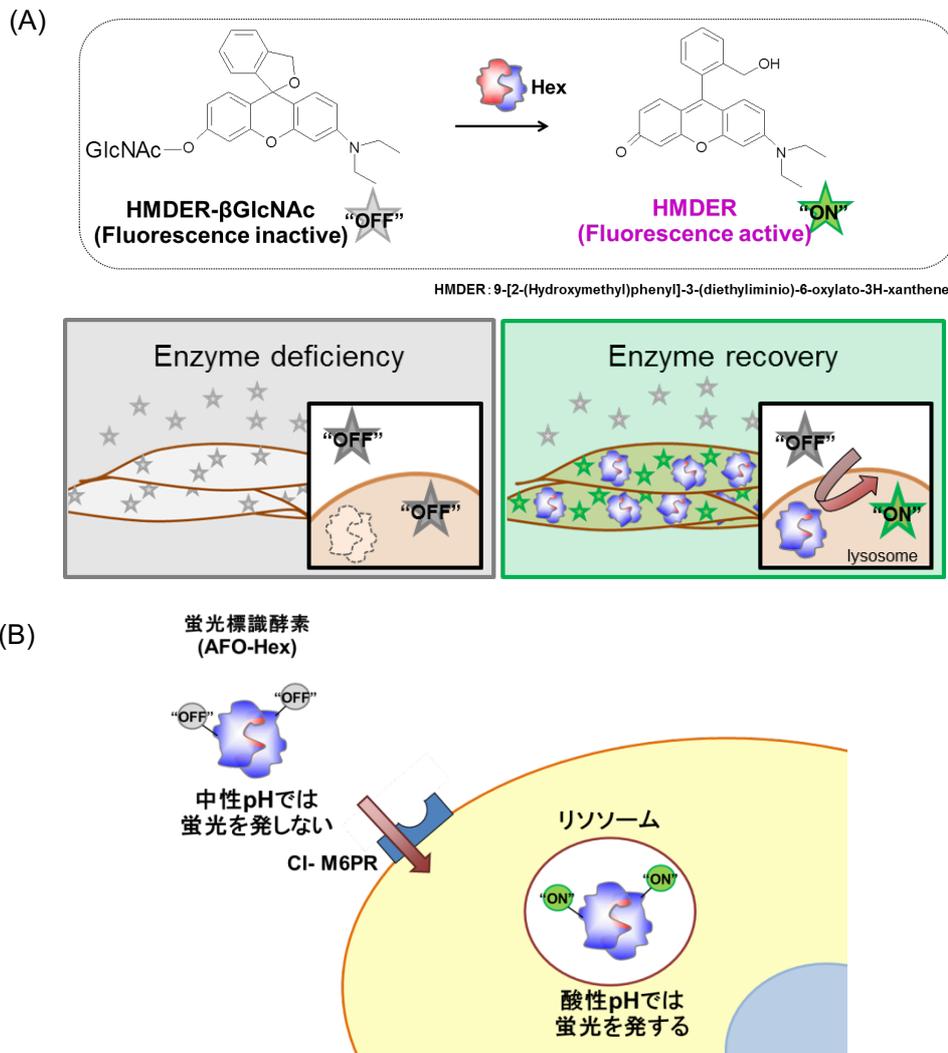


Fig. 3-14. 蛍光イメージングの概略

3-7-2. HMDER の合成と評価

HMDER- β GlcNAc は以前に合成した HMDER- β Gal [38] に倣って作製した (Fig. 3-15 A)。HMDER- β GlcNAc に対し、 β -*N*-acetylglucosaminidase を処理すると、蛍光強度は 57 倍に上昇した (Fig. 3-15 B, C)。以前の報告では、HMDER- β Gal に β -galactosidase を処理した場合、蛍光強度は 76 倍に上昇しており [38]、同様の結果が得られたと考えられる。これらの結果より、HMDER- β GlcNAc は β -Hex 活性のイメージングに使用できると判断した。

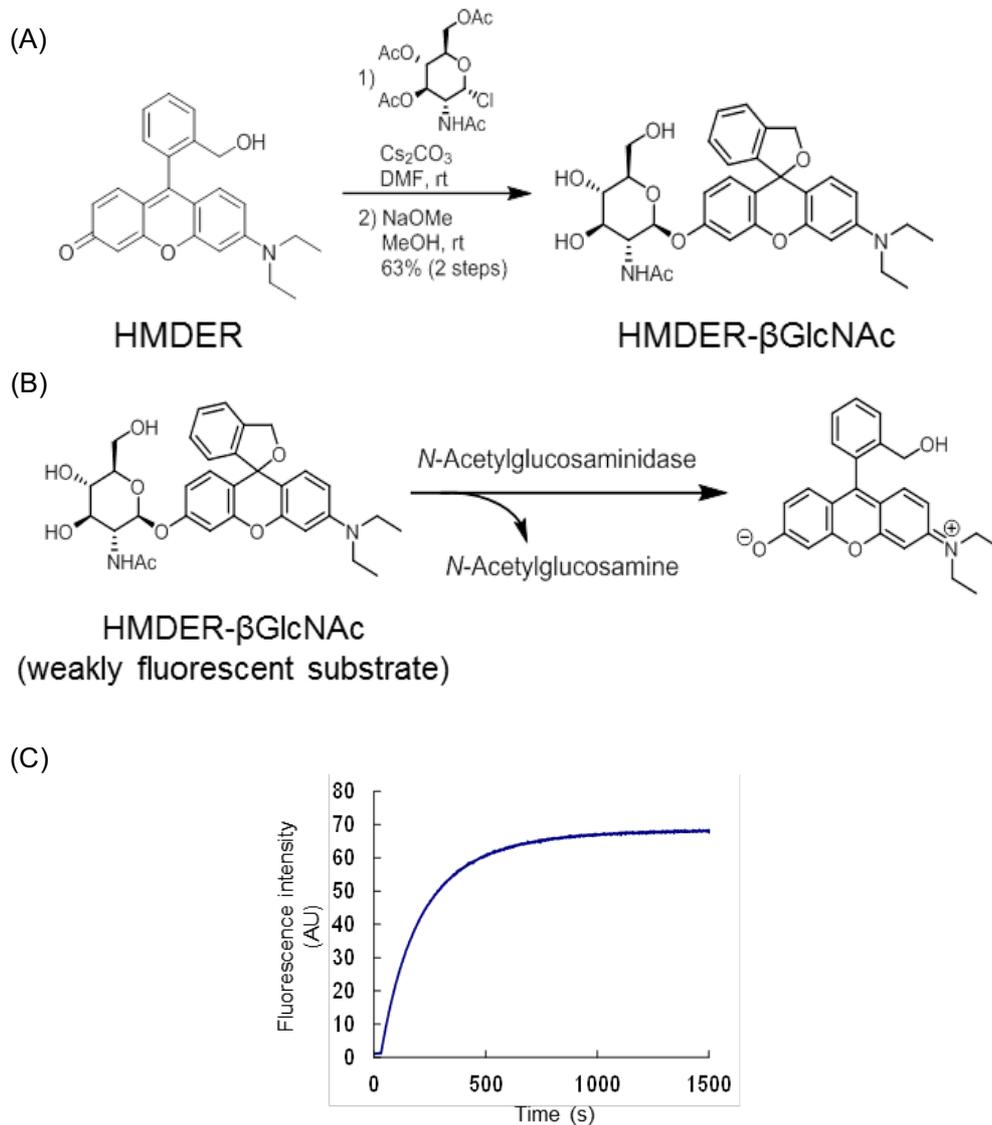


Fig. 3-15. HMDER- β GlcNAc の合成と評価

(A) HMDER- β GlcNAc の合成 (B, C) β -*N*-acetylglucosaminidase による酵素反応。

3-7-3. HMDER を用いた β -Hex 活性の生細胞イメージング

作製した HMDER- β GlcNAc を用い、生細胞内における β -Hex 活性回復のイメージングを行った。健常者由来細胞では一部で蛍光が見られたのに対し、内在性の β -Hex 活性を持たない SD 患者由来細胞では蛍光はほとんど観察されなかった。対照的に、SD 患者由来細胞に各改変型 HexB を 24 時間処理すると、強い蛍光が観察された (Fig. 3-16)。

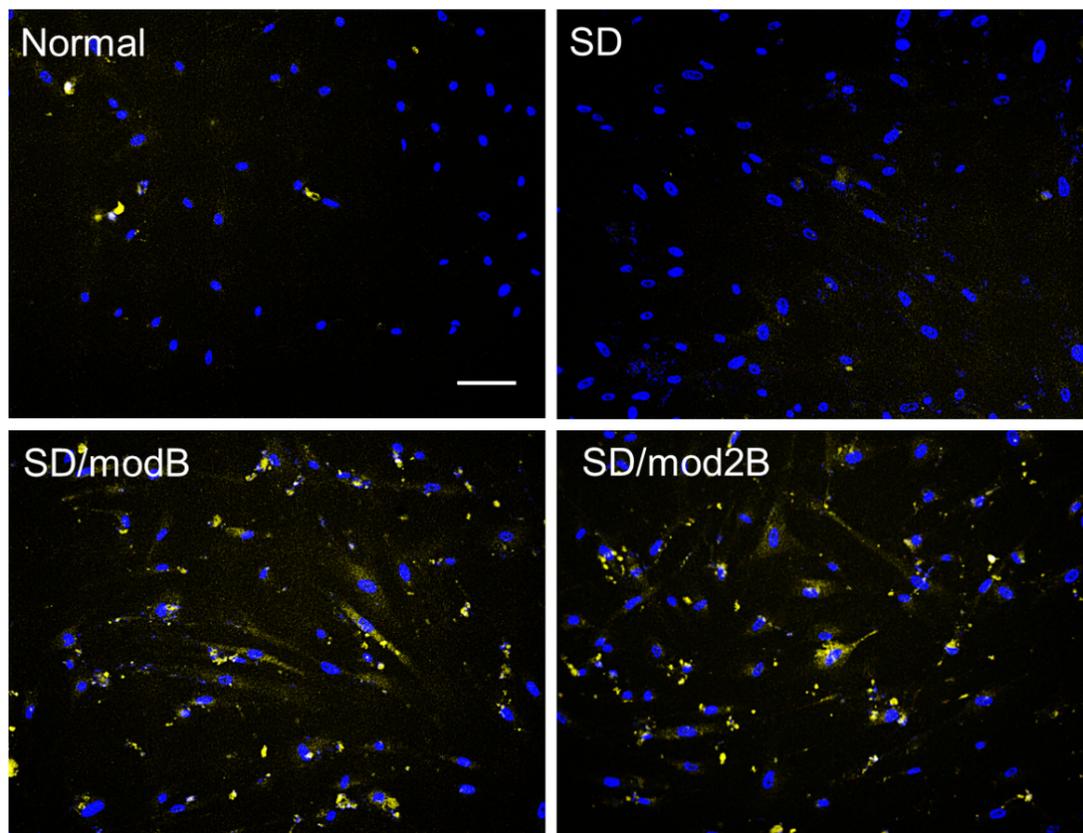


Fig. 3-16. β -Hex 活性の生細胞イメージング

SD 患者由来細胞に各改変型 HexB を処理後、HMDER- β GlcNAc を添加した。スケールバーは 100 μ m を示す。青: 核, 黄色: HMDER.

3-7-4. AcidiFluor™ ORANGE を用いたリソソームへの輸送のイメージング

添加した酵素が後期エンドソーム/リソソームへと輸送されているかの生細胞イメージングを行うために、各改変型 HexB と AcidiFluor™ ORANGE (AFO) のコンジュゲートを作製し (AFO-modB および -mod2B)、SD 患者由来細胞へ添加した。未処理および AFO-NHS を処理した細胞では蛍光がほとんど観察されなかったのに対し、AFO-modB あるいは AFO-mod2B を処理した細胞では、顆粒状の蛍光が観察された。一方で、M6P を同時に処理すると蛍光が見られなくなったことから、AFO-Hex は CI-M6PR を介して後期エンドソーム/リソソームへと輸送されることが示唆される (Fig. 3-17 A)。さらに、AFO-Hex を処理後、PFA で細胞を固定し、後期エンドソーム/リソソームマーカーである LAMP-1 との共染色を行った。その結果、ほとんどの AFO は LAMP-1 と共局在しており、各改変型 HexB は後期エンドソーム/リソソームへと到達していることが示された (Fig. 3-17 B)。

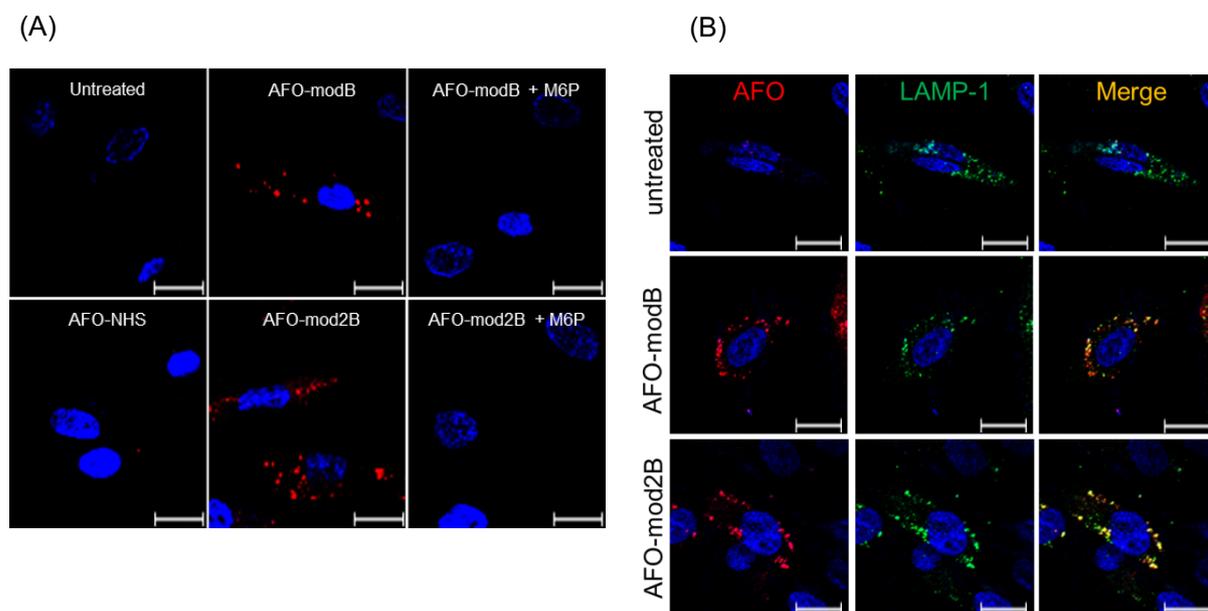


Fig. 3-17. AcidiFluor™ ORANGE を用いたイメージング

(A) AFO 標識した各改変型 HexB の生細胞イメージング。スケールバーは 20 μm を示す。青: 核, 赤: AFO (B) PFA 固定後の AFO と LAMP-1 の共局在解析。AFO-Hex を各 100 pmol 処理後、抗 LAMP-1 pAb で染色した。スケールバーは 20 μm を示す。青: 核, 赤: AFO, 緑: LAMP-1。

3-8. SD マウス脳室内への酵素補充

3-8-1. 人工基質分解活性の回復

各改変型 HexB を 10 週齢の SD マウス脳室内へ 1–5 mg/kg BW 投与した。投与 1 週間後、組織抽出液中の 4-MUGS 分解活性を測定した。その結果、脳、肝臓および脾臓において 4-MUGS 分解活性の有意な回復が認められた (Fig. 3-18 A–C)。

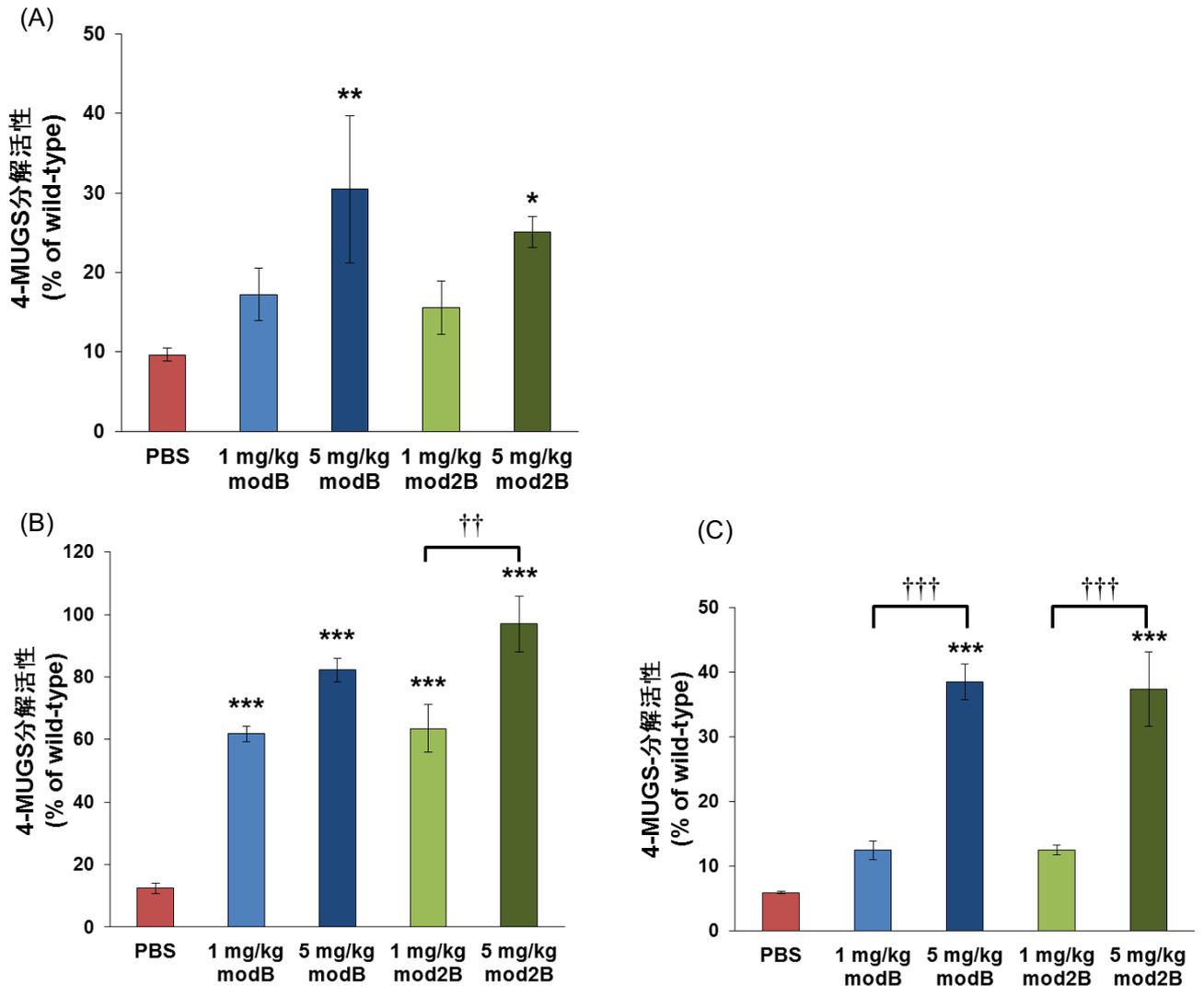


Fig. 3-18. 各改変型 HexB の脳室内投与による 4-MUGS 分解活性の回復

SD マウス脳室内へ各改変型 HexB を 1 または 5 mg/kg BW 投与した。1 週間後の脳 (A), 肝臓 (B) および脾臓 (C) 抽出液中の 4-MUGS 分解活性を算出した。活性は野生型マウスを 100 とした相対値で示した。エラーバーは平均値±標準誤差 (PBS-treated, $n = 8-10$, 1 mg/kg BW dose, $n = 3$, 5 mg/kg BW dose, $n = 4$) を示す。P 値は one-way ANOVA および Tukey *post-hoc* test より算出した (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs PBS-treated control, †† $P < 0.01$, ††† $P < 0.001$)。

3-8-2. 免疫組織化学および β -Hex 活性イメージングによる投与酵素の分布解析

各改変型 HexB の脳内分布を調べるために、抗 HexA pAb を用いた免疫組織化学および HMDER- β GlcNAc を用いた β -Hex 活性イメージングを行った。各改変型 HexB 投与後 1 週間の脳切片を抗 HexA pAb を用いた免疫組織化学の結果、各改変型 HexB 投与により、特に投与部位近傍である海馬体で強いシグナルが観察された (Fig. 3-19 A)。また、HMDER- β GlcNAc を用いた β -Hex 活性イメージングの結果、視床下部等の広い領域で β -Hex 活性が検出された (Fig. 3-19 B)。これらの結果より、脳室内投与した改変型 HexB は脳脊髄液を介して脳全体へ広がり、 β -Hex 活性を保持したまま脳実質内へと到達していることが示唆される。

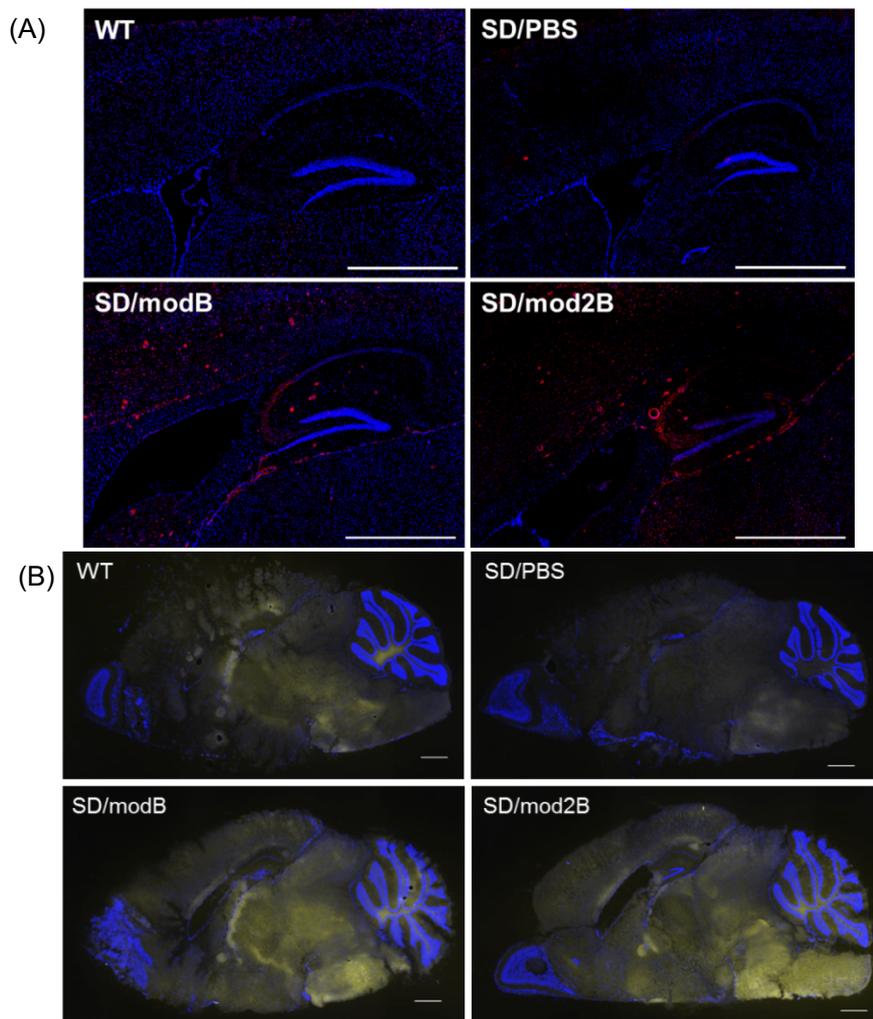


Fig. 3-19. 脳室内投与した改変型 HexB の脳内分布

(A) 抗 HexA pAb を用いた免疫組織化学。10 週齢の SD マウスに各改変型 HexB を 5 mg/kg BW 投与し、1 週間後の脳切片を用いた。スケールバーは 1 mm を示す。青: 核, 赤: Hex (B) HMDER- β GlcNAc を用いた β -Hex 活性イメージング。10 週齢の SD マウスに各改変型 HexB を 1 mg/kg BW 投与し、1 週間後の脳切片を用いた。スケールバーは 1 mm を示す。青: 核, 黄: HMDER.

3-8-3. 脳内における各改変型 HexB のプロテアーゼ抵抗性評価

投与した各改変型 HexB の SD マウス脳内での分子種を調べるために、抗 HexA pAb を用いた免疫沈降および western blotting を行った。脳の各部位において、各改変型 HexB は 46-kDa の成熟体および 24-kDa の分解物として検出された。modB は主として分解物であったのに対し、mod2B の大部分は成熟体であった (Fig. 3-20 A, B)。これらの結果より、mod2B は神経細胞内のプロテアーゼに対する抵抗性を持ち、GSEP ループを保持していることが示唆される。

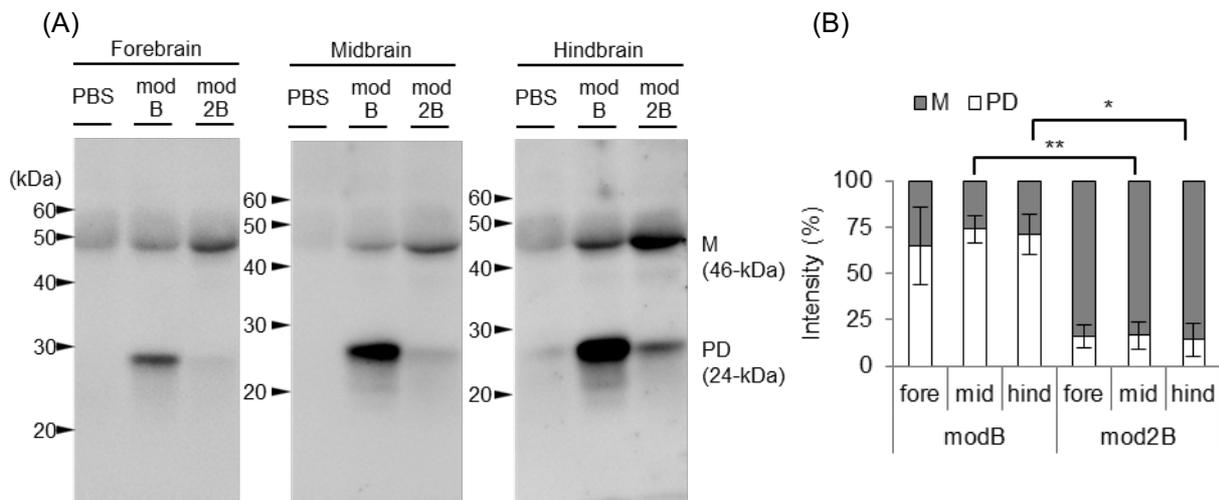


Fig. 3-20. 脳内における各改変型 HexB の分子種

(A) SD マウス脳内における各改変型 HexB のプロテアーゼ感受性。各改変型 HexB 投与後の SD マウス脳抽出液を抗 HexA pAb を用いた免疫沈降および western blotting により解析した。(B) バンド強度の算出。エラーバーは平均値±標準誤差 ($n = 3$)を示す。 P 値は Unpaired t-test により算出した ($*P < 0.05$, $**P < 0.01$)。M: 成熟体 (46-kDa), PD: 分解物 (24-kDa)。

3-8-4. 末端 GlcNAc 含有糖鎖の検出

各改変型 HexB 投与による蓄積基質への影響を解析するために、抗末端 GlcNAc 含有糖鎖 mAb を用いた免疫組織化学を行った。PBS 投与した SD マウスでは、末端 GlcNAc 含有糖鎖を示す蛍光が脳皮質 (CX), 小脳 (CB), 視床下部 (HY), 海馬 (HIP) 等の脳全体で観察された。それに対し、各改変型 HexB の投与により、シグナルが顕著に減少した (Fig. 3-21 A, B)。

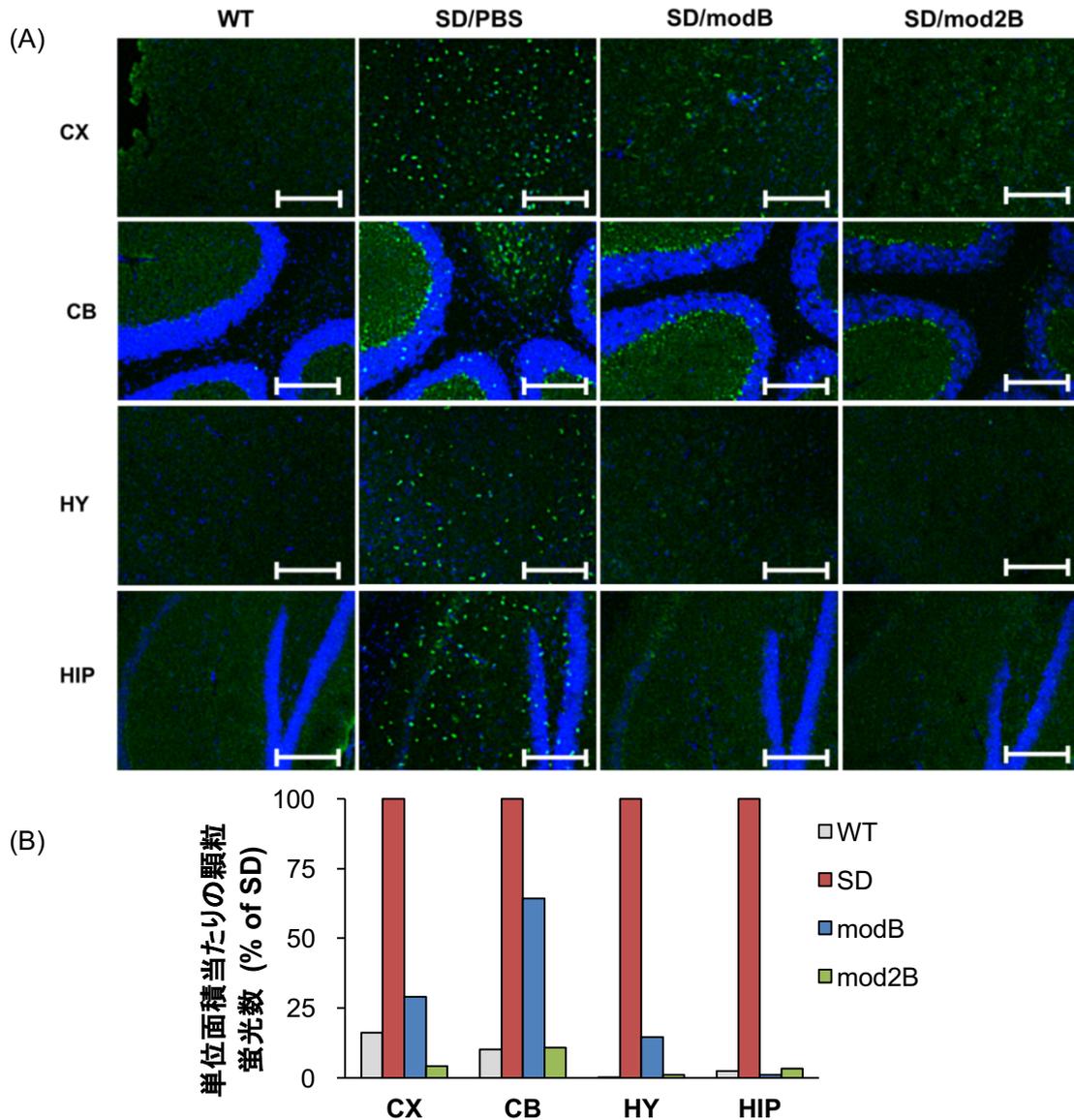


Fig. 3-21. 末端 GlcNAc 含有糖鎖の検出

(A) 抗末端 GlcNAc 含有糖鎖 mAb を用いた免疫組織化学。10 週齢の SD マウスに各改変型 HexB を 1 mg/kg BW 投与し、1 週間後の脳切片を用いた。スケールバーは 200 μm を示す。青: 核, 緑: 末端 GlcNAc 含有糖鎖 (B) 顆粒状蛍光数の定量。各値は PBS 投与した SD マウスの値を 100 とした相対値で示した。

3-8-5. 脳内 Mip1 α の定量

SD マウス脳内ではグリア細胞の活性化による神経炎症が起きており、特に炎症性ケモカインである Mip1 α の発現が顕著に増大していることが報告されており [11, 43]、ヒトにおいても MIP1 α はガングリオシドーシスのバイオマーカーとして注目されている [44]。各改変型 HexB 投与による Mip1 α への影響を解析するために、脳抽出液中の Mip1 α を ELISA により定量した。WT マウスに比べ、PBS 投与群では、Mip1 α 量が脳の各部位で増大しており、特に小脳を含む後部で顕著であった。modB 投与群は PBS 投与群とほとんど変わらなかったのに対し、mod2B 投与群は Mip1 α の存在量が顕著に低下していた (Fig. 3-22)。

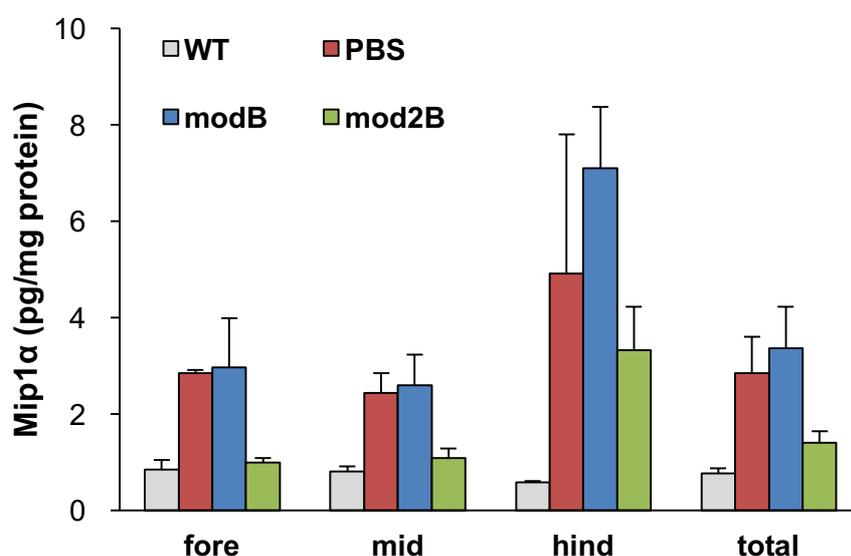


Fig. 3-22. 脳内 Mip1 α の定量

10 週齢の SD マウスに各改変型 HexB を 5 mg/kg BW 投与し、1 週間後の脳抽出液中の Mip1 α を ELISA により定量した。エラーバーは平均値 \pm 標準誤差 (WT, $n = 3$, PBS-treated, $n = 2-3$, modB-treated, $n = 3-4$, mod2B-treated, $n = 4$)を示す。

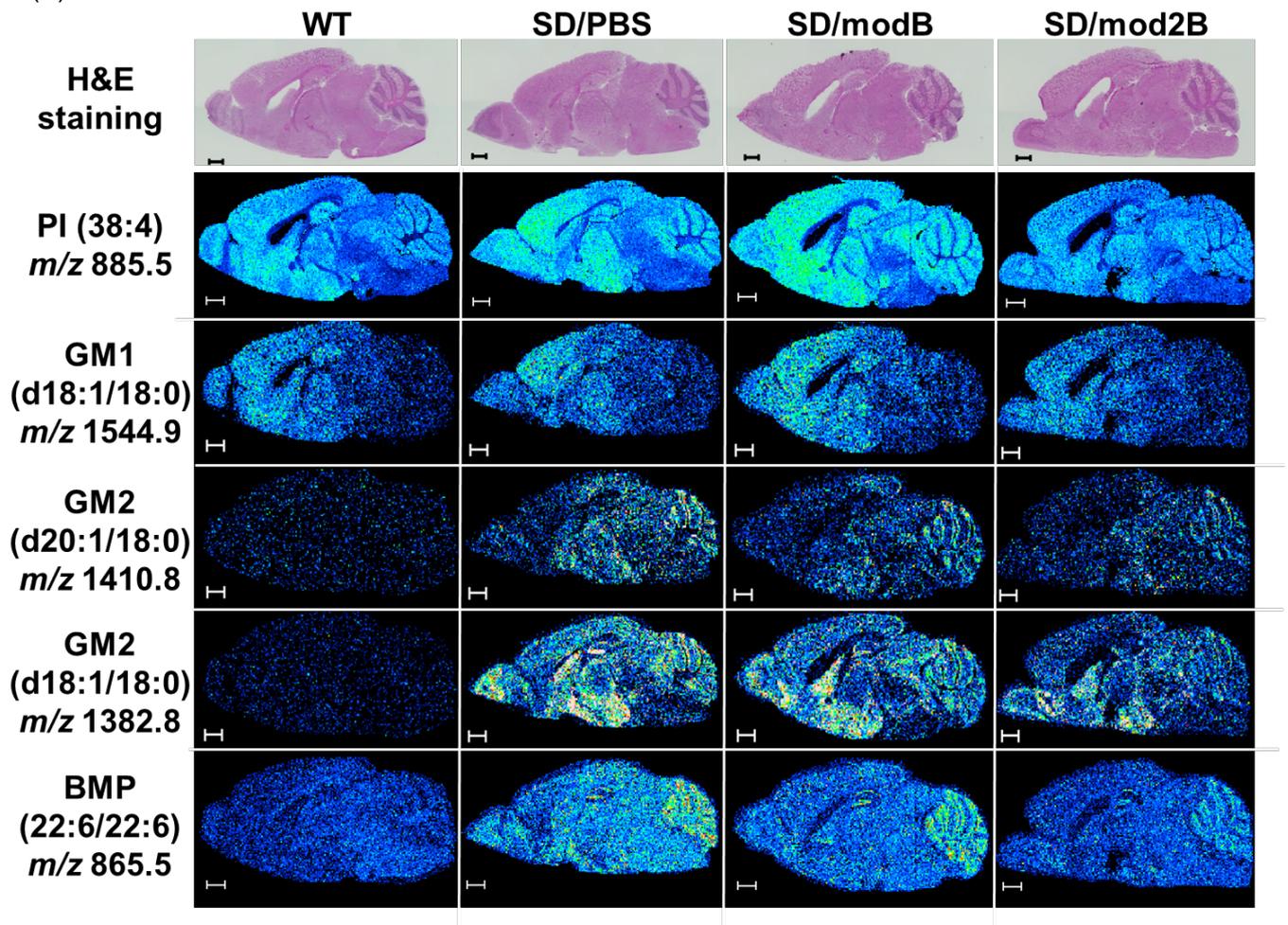
3-9. イメージング質量分析 (IMS)

各改変型 HexB 投与による蓄積脂質への影響を解析するために、マトリックス支援レーザー脱離イオン化イメージング質量分析 (MALDI-IMS)を行った。

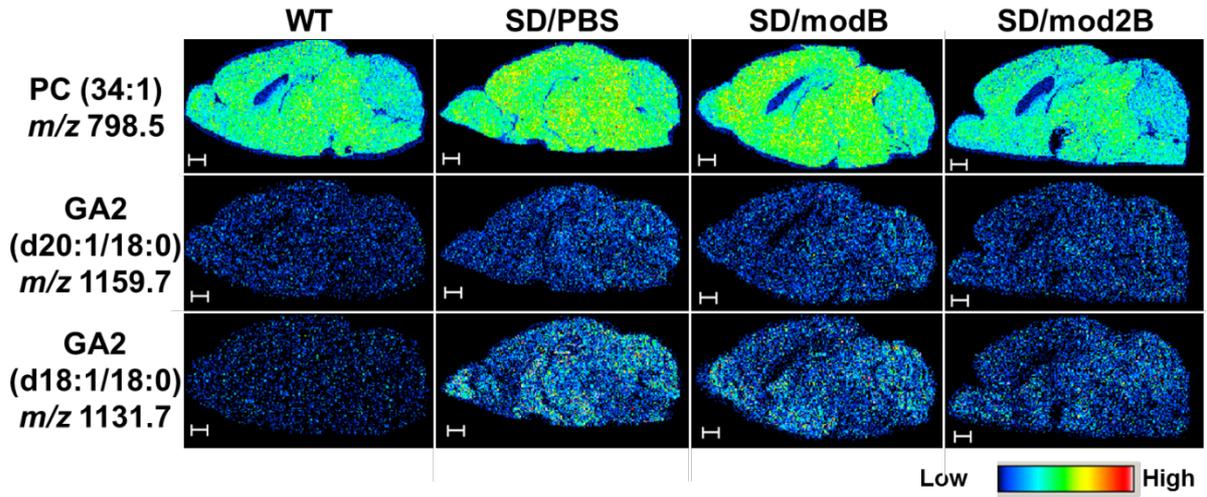
3-9-1. 脳全体の IMS

PBSを投与した11週齢のSDマウスを解析した結果、GM2 (d18:1/18:0)は視床下部 (HY)、外側中隔核 (LSN)および海馬 (HIP)で顕著に蓄積していた。一方で、GM2 (d20:1/18:0)の蓄積は小脳で顕著であった。GA2 (d18:1/18:0)およびGA2 (d20:1/18:0)は脳全体で蓄積していた。さらに、後期エンドソームに局在するリン脂質 BMP (22:6/22:6)がSDマウス小脳で顕著に蓄積していることを見出した。また、mod2Bを投与したSDマウスでは、modBを投与したマウスに比べ、これらの脂質の蓄積が顕著に減少していた (Fig. 3-23 A-K)。

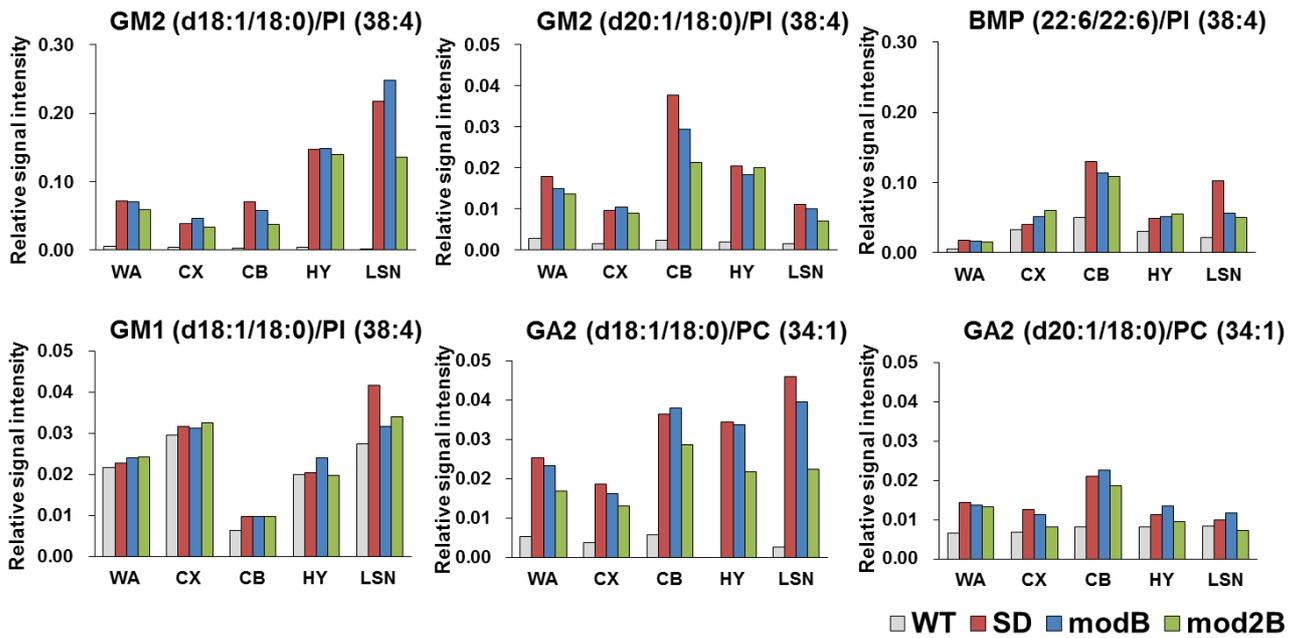
(A)



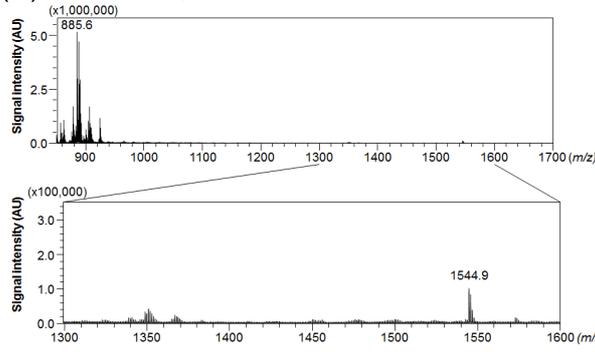
(B)



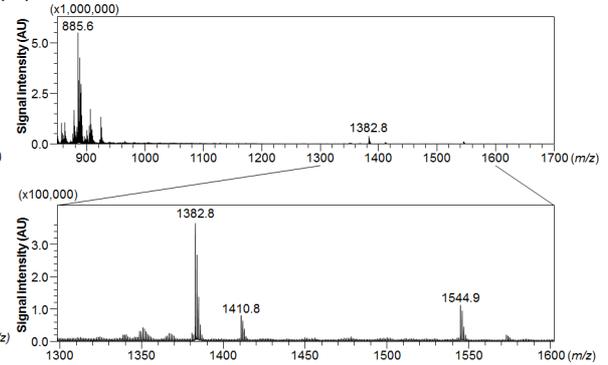
(C)



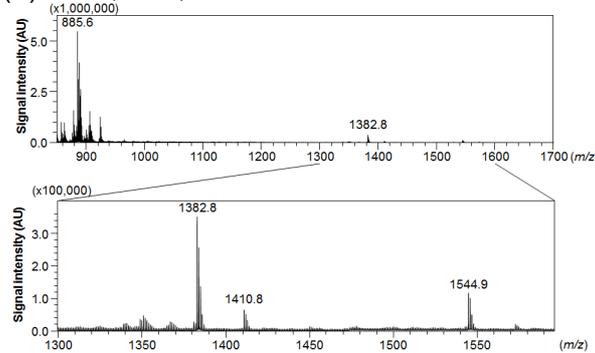
(D) WA, NIM, WT



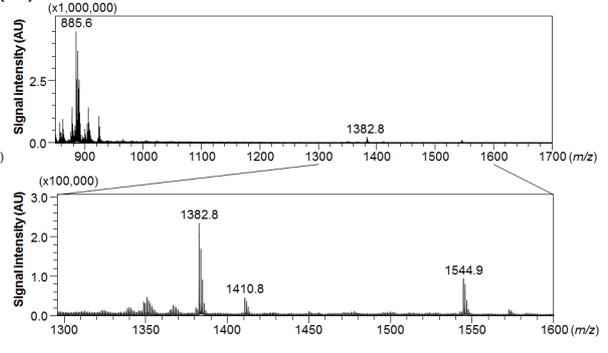
(E) WA, NIM, SD/PBS



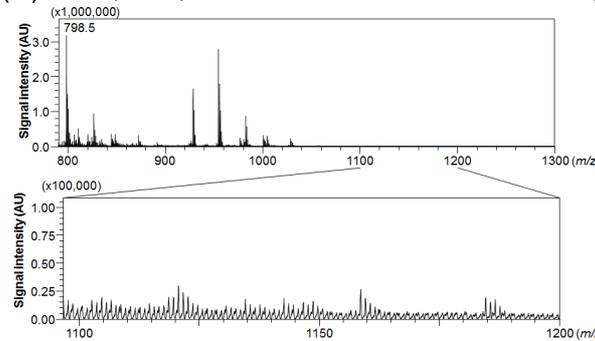
(F) WA, NIM, SD/modB



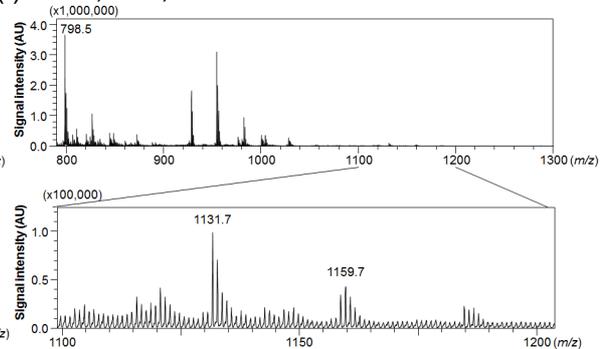
(G) WA, NIM, SD/mod2B



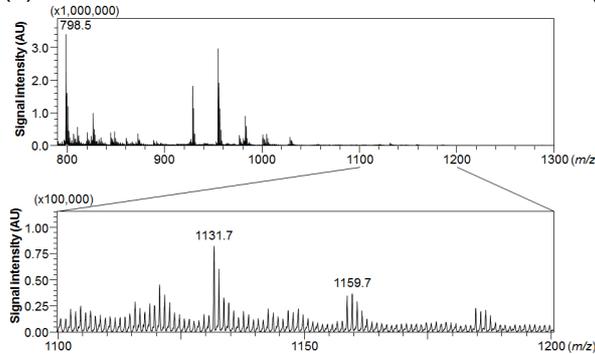
(H) WA, PIM, WT



(I) WA, PIM, SD/PBS



(J) WA, PIM, SD/modB



(K) WA, PIM, SD/mod2B

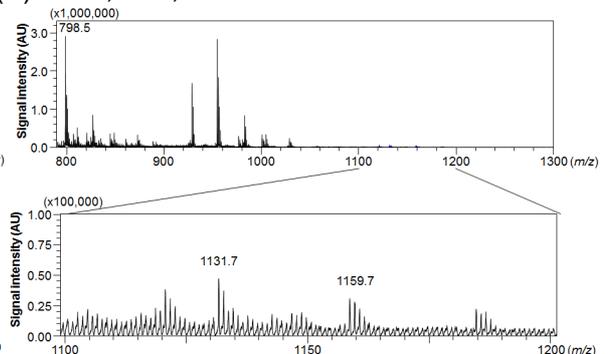
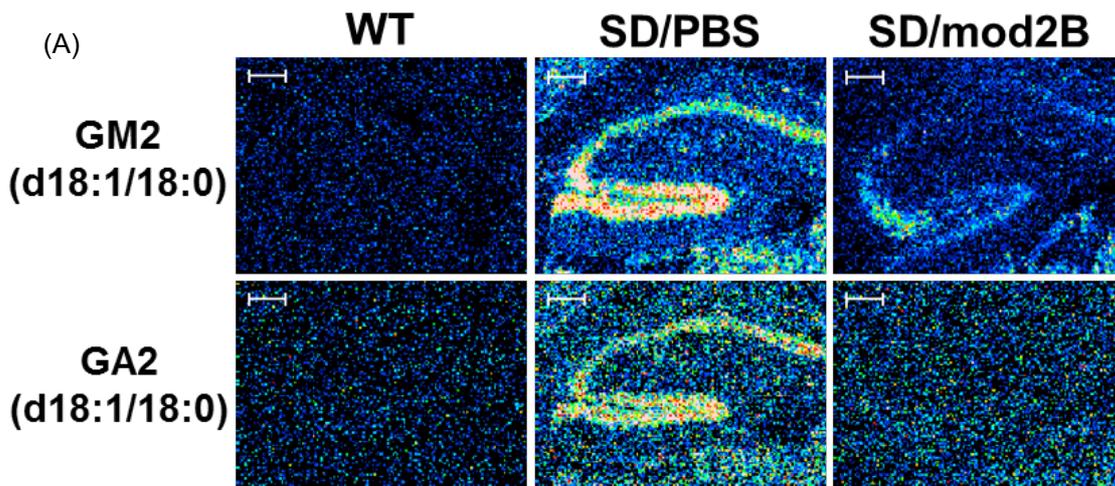


Fig. 3-23. IMS による脂質解析

(A, B) 11 週齢の WT および PBS, modB あるいは mod2B を投与した SD マウス (1 mg/kg BW dose) の脳切片を用い、negative (A) あるいは positive (B) ion modes で検出した。スケールバーは 1 mm を示し、scan pitch は 70 μm で行った。PI: phosphatidylinositol, GM1: GM1 ganglioside, BMP: bis(monoacylglycero)phosphate, PC: phosphatidylcholine, GA2: asialoGM2, m/z : mass-to-charge ratio. (C) GM2, BMP, GM1 および GA2 の各脳領域における相対シグナル強度。WA: whole area, CX: cerebral cortex, CB: cerebellum, HY: hypothalamus, LSN: lateral septal nucleus. (D-K) マススペクトル。NIM: negative ion mode, PIM: positive ion mode, WA: whole area.

3-9-2. 海馬周辺の IMS

海馬周辺における高解像度のイメージング質量分析を行った。その結果、PBS を投与した SD マウスでは海馬の歯状回やアンモン角で GM2 および GA2 が顕著に蓄積していた。それに対し、mod2B を投与した SD マウスではこれらの蓄積が顕著に減少していた (Fig. 3-24 A-G)。



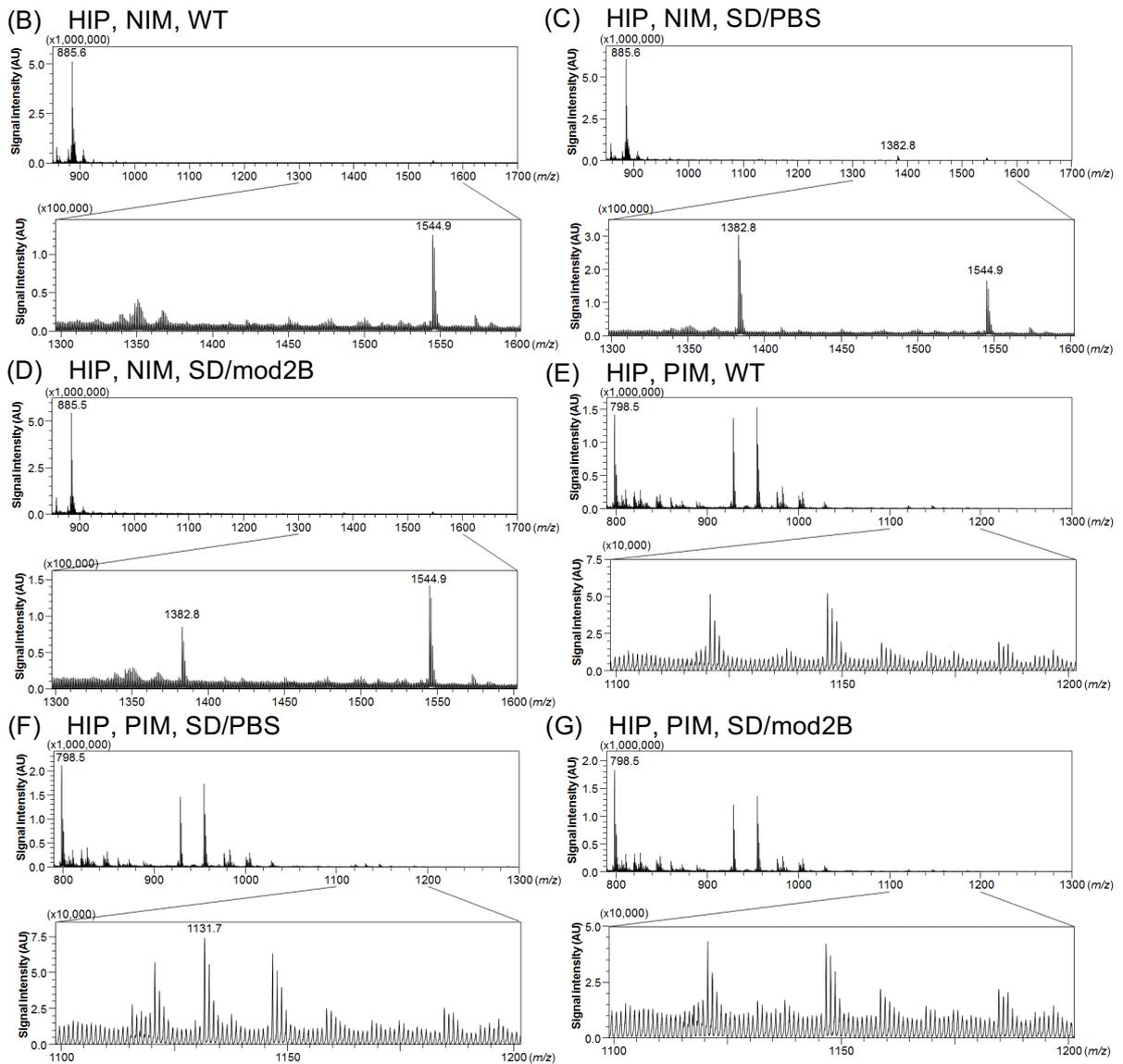


Fig. 3-24. 海馬周辺の IMS

(A)海馬体の GM2 (d18:1/18:0)および GA2 (d18:1/18:0)の IMS。スケールバーは 200 μm を示し、scan pitchは 10 μm で行った。(B–G)マススペクトル。NIM: negative ion mode, PIM: positive ion mode, HIP: hippocampus.

3-9-3. 脳切片上での MALDI-MS/MS 解析

本研究で IMS の対象とした脂質は、MS/MS により構造を確認した (Fig. 3-25 A-H)。

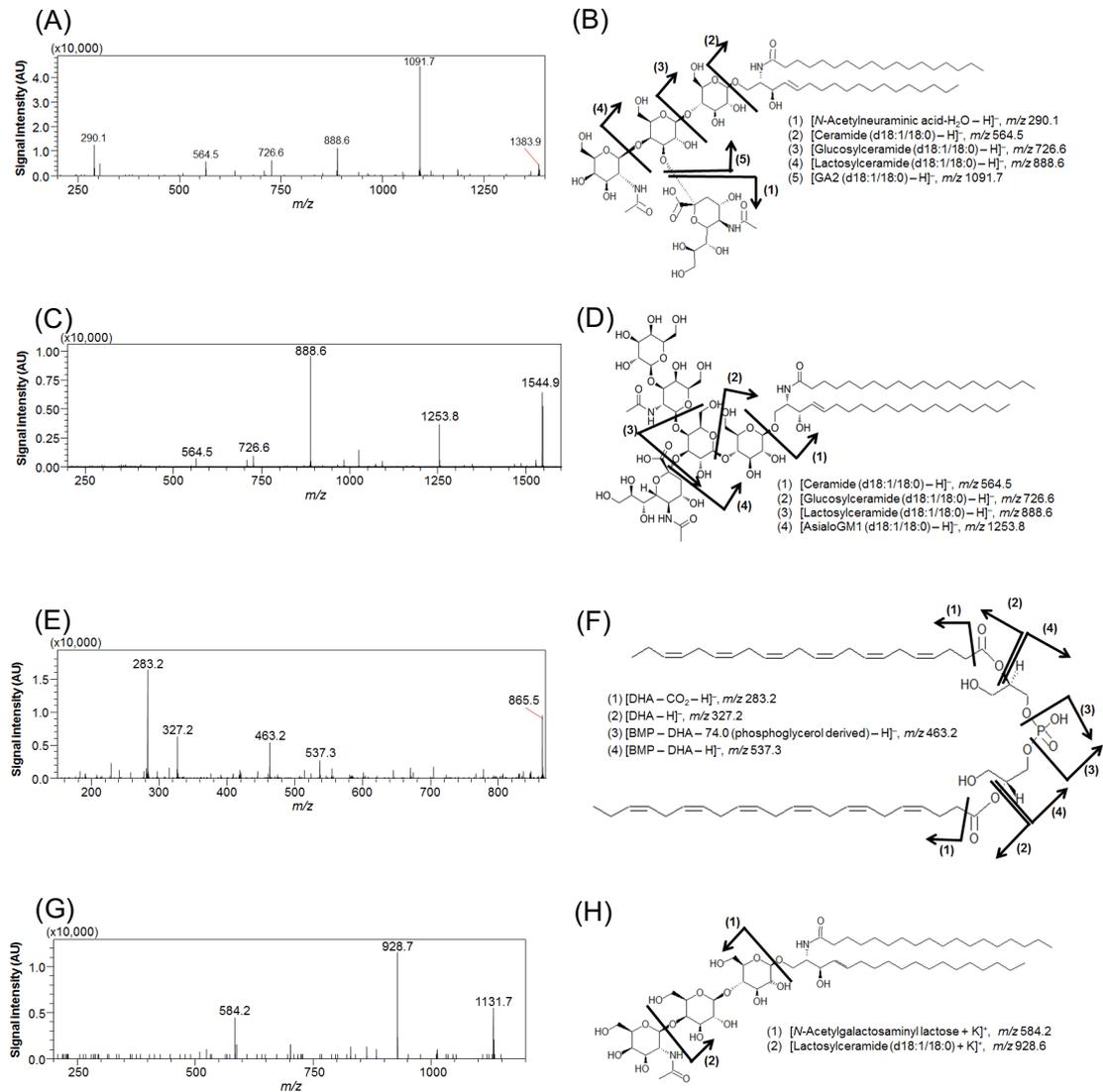


Fig. 3-25. MALDI-MS/MS 解析

(A, B) GM2 (d18:1/18:0)は m/z 290.1, 564.5, 726.6, 888.6 および 1091.7 のイオンとして検出され、これは以前の報告 [45]とよく一致した。(C, D) GM1 (d18:1/18:0)は m/z 564.5, 726.6, 888.6 および 1253.8 のイオンとして検出され、以前の報告 [46]とよく一致した。(E, F) BMP (22:6/22:6)は m/z 283.2, 327.2, 463.2 および 537.3 のイオンとして検出された。DHA: docosahexaenoic acid. (G, H) GA2 (d18:1/18:0)は m/z 584.2 および 928.6 のイオンとして検出された。

3-10. SD マウスに対する治療効果

各改変型 HexB のより長期的な効果を調べるために、10 週齢以降の表現型を解析した。

3-10-1. 体重の推移

PBS 投与群では 14 週齢以降、体重が減少したのに対し、各改変型 HexB の投与により、体重減少が抑制された。特に mod2B 2mg/kg BW の繰り返し投与群では有意に体重減少が抑制された (Fig. 3-26)。

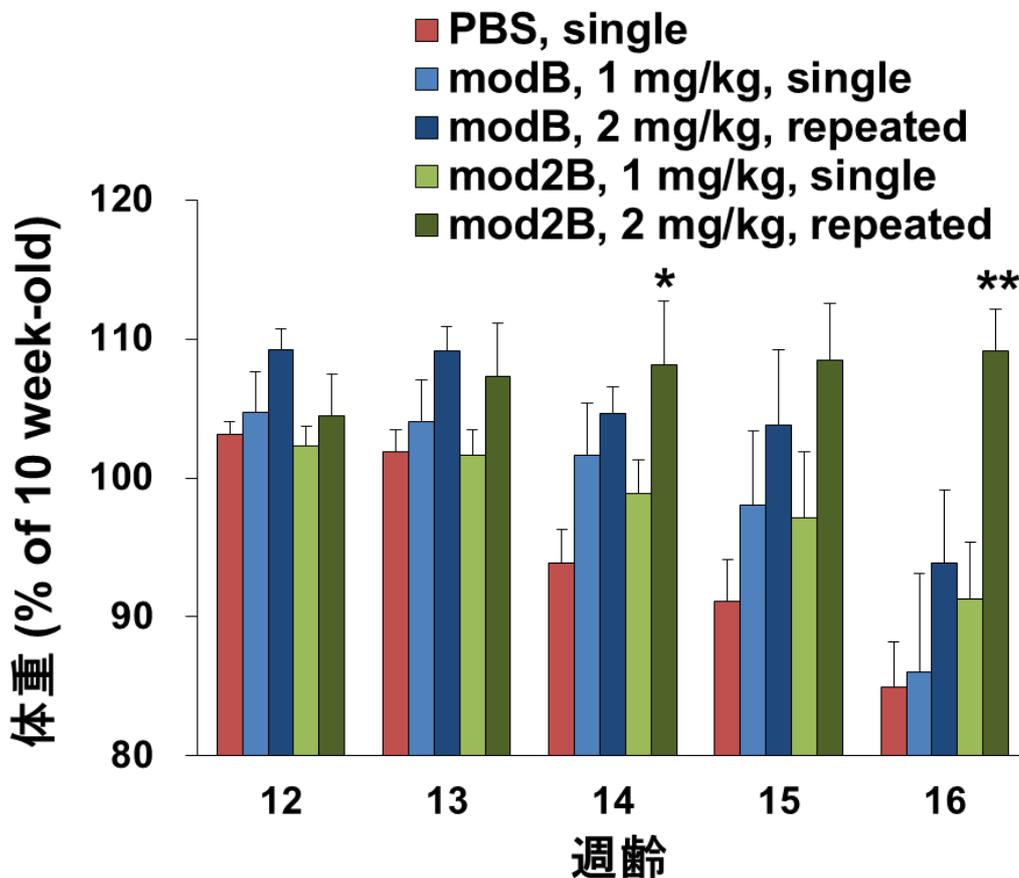


Fig. 3-26. 体重の推移

PBS, modB あるいは mod2B (1 or 2 mg/kg BW dose) を 1 または 2 回 SD マウス脳室内に投与した。エラーバーは平均値±標準誤差 (PBS-treated, $n = 11$, modB single injection, $n = 4$, modB repeated injection, $n = 4$, mod2B single injection, $n = 6$, mod2B repeated injection, $n = 4$) を示す。P 値は one-way ANOVA および Tukey *post-hoc* test より算出した (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, vs PBS-treated control)。

3-10-2. 運動機能の評価

PBS 投与群では 12 週齢以降、運動機能の低下が見られた。modB の投与ではほとんど変化が見られなかったのに対し、mod2B の投与により、運動機能の低下が抑制された。特に mod2B 2mg/kg BW の繰り返し投与群では 14 週齢以降において有意に運動機能低下が抑制された (Fig. 3-27)。

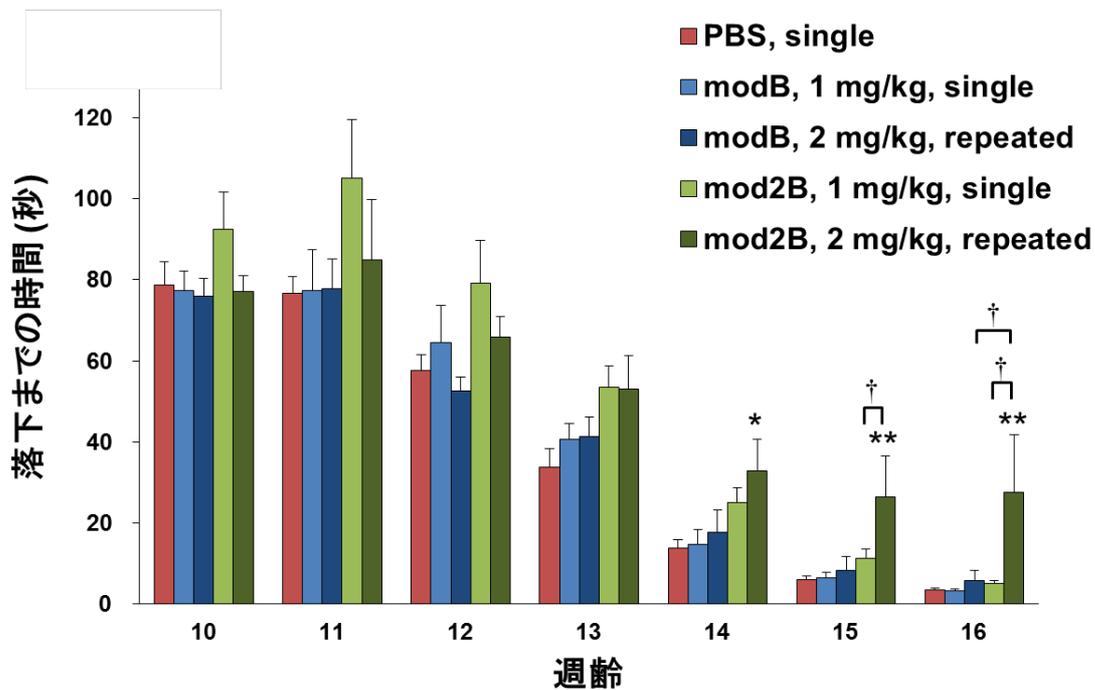


Fig. 3-27. ローターロードテストによる運動機能の評価

PBS, modB あるいは mod2B を 1 回 (1 mg/kg BW dose) または 2 回 (2 mg/kg BW, two-week interval) SD マウス脳室内に投与した。エラーバーは平均値±標準誤差 (PBS-treated, $n = 11$, modB single injection, $n = 4$, modB repeated injection, $n = 4$, mod2B single injection, $n = 6$, mod2B repeated injection, $n = 4$) を示す。P 値は one-way ANOVA および Tukey *post-hoc* test より算出した ($*P < 0.05$, $**P < 0.01$ vs PBS-treated control, $†P < 0.05$)。

3-10-3. 寿命の評価

PBS 投与群の平均寿命は 123.2 日であった。modB 1 mg/kg BW 投与群では 128.8 日、modB 2 mg/kg BW 投与群では 125.3 日であり、寿命はほとんど変わらなかった。mod2B 1 mg/kg BW 投与群では 126.7 日であったが、modB 2 mg/kg BW 投与群では 156.5 日であり、寿命が 1 ヶ月以上延長した (Fig. 3-28)。

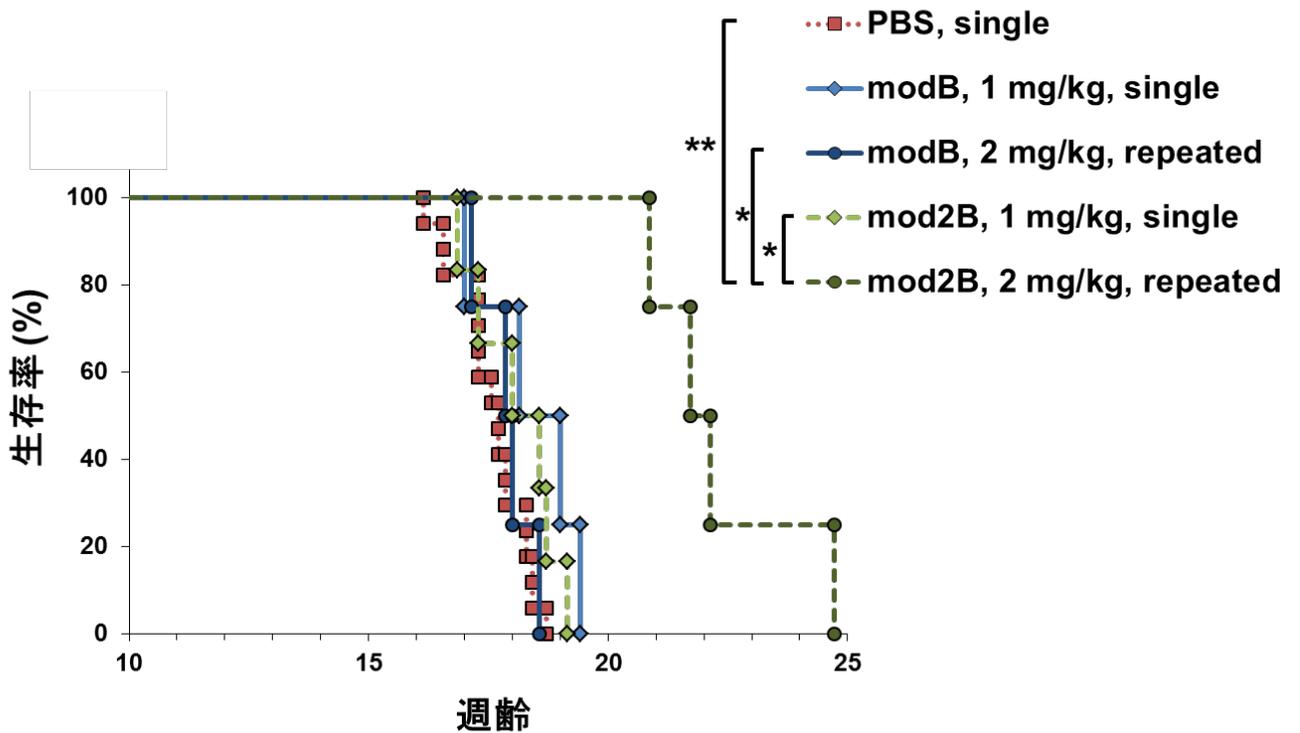


Fig. 3-28. 寿命測定

modB および mod2B の単回投与群 ($n = 4, 6$)、あるいは modB の 2 回投与群 ($n = 4$)では、PBS 投与群 ($n = 17$)との間に有意な差は認められなかった。一方で、mod2B の 2 回投与群 ($n = 4$)では、寿命が有意に延長した。 P 値は log-rank test および Holm-Sidak *post-hoc* test より算出した ($*P < 0.05$, $**P < 0.01$)。

第四章 考察

これまでにCHOやヒト線維肉腫細胞株等から生産された組換えヒトリソソーム酵素を用いて、末梢症状を呈するリソソーム病に対し、静脈内酵素補充療法 (*i.v.*ERT)が行われてきた [19, 20]。しかしながら、この治療法は血液脳関門の存在により、中枢神経症状の改善は認められていない。そのため、中枢神経症状を伴うリソソーム病に対する治療法の開発が強く求められており、近年、髄腔内 (*i.t.*-)あるいは脳室内酵素補充療法 (*i.c.v.*ERT)に関する前臨床研究 [47, 48]や臨床試験 [49, 50]が、ムコ多糖症 I 型 (Phase 1), II 型 (Phase 2/3), IIIA 型 (Phase 2), IIIB 型 (Phase 1/2), 異染性白質ジストロフィー (Phase 1/2)および Batten 病 (Phase 2)に対して行われている (ClinicalTrials.gov, <https://clinicaltrials.gov/>より、2016 年現在)。一方で、血液脳関門透過性のタグを用いた *i.v.*ERT の前臨床研究も報告されている [51, 52]。また、adeno-associated virus (AAV)ベクターを用いた脳内遺伝子治療の臨床試験 [53]についても、ムコ多糖症 IIIA 型 (Phase 1/2)や異染性白質ジストロフィー (Phase 1/2)に対して進められている (ClinicalTrials.gov より)。

本研究では、新たに改変型 β_2' -前駆体をコードする改変型ヒト *HEXB2* 遺伝子を構築し、*mod2B* の *i.c.v.*ERT によりSDマウスに対する治療効果を評価した。*mod* β_2' -サブユニットは、以前に報告した *mod* β_1' -サブユニットの LDS (β 316–318)をSGTに追加置換している。CHO細胞に改変型ヒト *HEXB2* 遺伝子を導入し、組換え *mod2B* の恒常発現株を樹立した。精製 *mod2B* は modified β_2' -前駆体サブユニットのホモダイマーであり、M6P型糖鎖が付加されていた。

次に、SDマウス脳室内へ *mod2B* を投与した結果、蓄積基質の減少や炎症性ケモカインの低減が見られた。また、*mod2B* の繰り返し投与の結果、運動機能低下の改善および寿命の延長といった顕著な治療効果を示した。これらの結果は、治療酵素が神経細胞表面の CI-M6PR を介して取り込まれ、リソソームへ到達することで蓄積基質が減少したことを示唆しており、以前の報告 [11, 12, 25]もこれを支持している。速度論的パラメータ、熱安定性、M6P型糖鎖数および細胞内取込み効率に関して、*mod2B* と *modB* との間に大きな差が無かったにも関わらず、*mod2B* は *modB* よりも高い GM2 分解活性を *in vitro* および *in vivo* 示した。この原因は、*mod2B* はプロテアーゼ抵抗性を持つことで、細胞内あるいは脳内でより長期間 GSEP ループ構造が維持され、GM2 分解活性を保持し続けたからだと考えられる。このことは、両者の 4-MUGS 分解活性や末端 GlcNAc 含有糖鎖の分解活性に大きな差が無かったことから支持され、蓄積 GM2 を減少させることが疾患治療において重要であることを示している。

患者由来皮膚線維芽細胞やSDマウス由来ミクログリア [54]への酵素補充の際にロイペプチン进行处理すると、*modB* の分解物生成が抑制されたことから (data not shown)、

modB がリソソームへと到達した後、 β_1' -サブユニットの GSEPLDS ループ構造はカテプシン L や B といったリソソーム性エンドプロテアーゼによって分解されているかもしれない。

HexA や modB に比べ、mod2B には以下の利点があり、脳内 ERT においてより有用であると考えられる。

(i) 細胞内でプロテアーゼ抵抗性を示し、生体内基質である GM2 や GA2 の分解活性を長期間維持する。また、GM2AP 存在下において modB よりも高い GM2 分解活性を示す。これは、modB の GSEPLDS ループに比べ、mod2B の GSEPSGT ループはよりフレキシブルであり、GM2AP との相互作用において構造的に有利であることを示唆する。

(ii) mod2B ($\beta_2' \beta_2'$ ホモダイマー)は 37°C 条件下、*in vitro* や細胞内において HexA よりも高い熱安定性を示した。これは、製造段階や生体内での安定性が高いことを示唆する。

(iii) HexA はダイマー1 分子あたり最大 3 本の M6P 型糖鎖が付加されるのに対し、mod2B はダイマー1 分子あたり最大 4 本の M6P 型糖鎖が付加される。そのため、mod2B は HexA よりも効率的に CI-M6PR を介して細胞内に取り込まれることが示唆される。

*I.v.*ERT においては 1-2 週に 1 回の継続投与が必要であるため、中和抗体が産生されることは大きな問題である [55]。中和抗体が産生されると、投与酵素の標的臓器への取込みや酵素機能が阻害され、*i.v.*ERT の治療効果は大きく減弱してしまう。そのため、リソソーム病治療において、アレルギー反応や免疫応答を起こしづらい低抗原性の治療酵素の開発が求められている。我々のデザインした改変型 β -サブユニットは、 β_1' では 6 アミノ酸、 β_2' では 9 アミノ酸という、わずかなアミノ酸置換により、GM2 分解活性を付加することに成功している。TSD 患者は HexA ($\alpha\beta$ ヘテロダイマー)や HexS ($\alpha\alpha$ ホモダイマー)が欠損している一方で、内在性の HexB ($\beta\beta$ ホモダイマー)は正常に発現している。そのため、改変型 β -サブユニットから成る modB および mod2B は、TSD 患者体内で「カモフラージュ酵素」として機能し、HexA よりも抗原性が低くなることが期待される。しかしながら、種差の問題から、マウスを用いた実験ではヒト組換え酵素の免疫原性を予測することは難しい。免疫原性予測プログラムである NetMHC [56]あるいは SYFPEITHI [57]を用いて HexB と mod2B を比較した結果、改変したことによる免疫原性の違いはほとんど無かった (data not shown)。また、Tajima らはファブリー病に対するカモフラージュ酵素として、 α -galactosidase (GLA)の一部をアミノ酸置換した改変型 α -N-acetylgalactosaminidase A (NAGA)を報告している [58]。Gla ノックアウト/*hNAGA*トランスジェニックマウスに対して組換え改変型 NAGA を静脈内投与した結果、

免疫応答を誘導しないことが明らかとなっている (Sakuraba, H., unpublished observations)。これらの知見から、TSD に対して *mod2B* を投与した場合においても、HexA に比べ免疫原性が低いことが期待される。

最近、Cachón-González らは、SD マウス脳内へヒト *HEXA* および *HEXB* 遺伝子をコードする AAV ベクターを導入することにより、糖脂質や α -シヌクレイン等の蓄積および神経炎症が改善することを報告した [9]。しかしながら、遺伝子治療により神経細胞で合成・分泌された HexA もまた、抗原性を示すことが予想される。また、AAV ベクターには目的遺伝子サイズに制限があるため、この遺伝子治療には 2 種類のベクターが必要であり、両方のベクターが導入された細胞でのみ HexA が発現すると考えられる。Sinici らは改変型 *HEXB* 遺伝子を用いた AAV 遺伝子治療であれば、単一遺伝子によって治療効果が期待できることを述べており [59]、将来的には *mod2B* 遺伝子をコードする AAV ベクターを用いることで、TSD 患者に対する低抗原性の単一遺伝子治療が行えるかもしれない。

近年、癌をはじめとした様々な疾患において、蛍光プローブを用いたイメージングが前臨床研究における治療効果のモニタリングに利用されている [60, 61, 62]。本研究において、我々は以前の報告 [38]をもとに HMDER- β GlcNAc を合成し、培養細胞系において、生細胞内の β -Hex 活性を可視化した。さらに、マウス脳室内へ各改変型 HexB を投与し、 β -Hex 活性の脳内分布を明らかにすることで、治療メカニズムや組換え酵素の機能を評価した。他の酵素に関しても HMDER 誘導体を用いることで、培養細胞系や *in vivo* におけるイメージングを行うことができると考えられる。また、培養細胞系において、酸性 pH 活性化型蛍光プローブである AcidiFluor™ ORANGE (AFO) [39]を用い、組換えリソソーム酵素の後期エンドソーム/リソソームへの輸送を可視化した。AFO に関しても、他のリソソーム酵素や関連タンパク質のイメージングに有用であると考えられる。アルツハイマー病モデル動物においては、アミロイド β の近赤外蛍光分子イメージングが治療効果のモニタリングに用いられている [62]。これらの手法は前臨床研究だけでなく、臨床試験における治療効果モニタリングにおいても有用であると考えられる。

イメージング質量分析 (IMS)は、生体試料から多数の分子の分布情報を同時に検出できる方法である。脂肪酸組成の違いまで区別できることから、特に脂質の解析に有用であり、これまでに病変組織における様々な脂質分子の局在が報告されてきた [45, 63, 64]。一方で侵襲的な方法であるため、特に動物モデルに対する治療効果の評価法として有用であると考えられる。本研究では SD マウス脳内において、 β -Hex の生体内基質である GM2 や GA2 の分布を明らかにするだけでなく、後期エンドソーム

に局在するリン脂質として知られる BMP [65, 66]が特に小脳で蓄積していることを初めて明らかにした。さらに、mod2B の脳内補充によって、GM2 や GA2 だけでなく、BMP も減少することを明らかにした。BMP とガングリオシドは酸性 pH 条件下で membranous cytoplasmic body (MCB)様の構造を形成することが報告されている [67]。BMP と GM2 (d20:1/18:0)はともに小脳に顕著に蓄積をしていることから、これらが特に MCB を形成しやすいのかもしれない。modB 投与では GM2 がほとんど減少しなかったのに対し、mod2B 投与では GM2 が顕著に減少しているので、蓄積した MCB が減少する、あるいは新たに形成される MCB が減少し、結果として間接的に BMP 蓄積が減少している可能性が考えられる。また、基質蓄積が mod2B 補充によって減少することは、運動機能低下の抑制や寿命の延長といった表現型の改善とよく相関していた。加えて、視床下部、海馬あるいは小脳に基質が蓄積していることは、以前に報告された運動機能の低下、短期記憶および空間学習記憶の低下、あるいは不安・恐怖の低下といった SD マウスの表現型 [68, 69]ともよく相関していた。これらの結果は、IMS のデータと治療効果の相関を示す初めての例である。GM2 ガングリオシドーシスにおける神経変性は、lyso-GM2, リン脂質あるいはセレブロシドやスルファチド等との関連も示唆されている [9, 70, 71, 72]ことから、IMS により多数のバイオマーカーを同時に検出することは、前臨床研究において非常に有用であると考えられる。

以上をまとめると、本研究では蛍光イメージングやイメージング質量分析を用いた前臨床研究における治療効果モニタリングの新たな手法を確立した。また、本研究で作製した改変型 *HEXB2* を用いた脳内酵素補充療法あるいは遺伝子治療は GM2 ガングリオシドーシス患者に対する新規治療法として有用であると考えられる。

参考文献

1. Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S. & Valle, D. LYSOSOMAL DISORDERS. In: Scriver, C. R., Beaudet, A. L., Valle, D., Sly, W. S., Childs, B., Kinzler, K. W. & Vogelstein, B., editors. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. 2001; New York: McGraw-Hill. 3371–3896.
2. Gravel, R.A., Kaback, M.M., Proia, R.L., Sandhoff, K., Suzuki, K. & Suzuki, K. The GM2 gangliosidoses. In: Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S. and Valle, D., editors. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. 2001; New York: McGraw-Hill. 3827–3876.
3. Kytzia, H.J. & Sandhoff, K. Evidence for two different active sites on human β -hexosaminidase A. Interaction of GM₂ activator protein with β -hexosaminidase A. *J. Biol. Chem.* 1985; **260**(12), 7568–7572.
4. Wu, Y.Y., Lockyer, J.M., Sugiyama, E., Pavlova, N.V., Li, Y.T. & Li, S.C. Expression and specificity of human GM2 activator protein. *J. Biol. Chem.* 1994; **269**(23), 16276–16283.
5. Smiljanic-Georgijev, N., Rigat, B., Xie, B., Wang, W. & Mahuran, D.J. Characterization of the affinity of the GM₂ activator protein for glycolipids by a fluorescence dequenching assay. *Biochim. Biophys. Acta* 1997; **1339**(2), 192–202.
6. Zarghooni, M., Bukovac, S., Tropak, M., Callahan, J. & Mahuran, D.J. An α -subunit loop structure is required for GM2 activator protein binding by β -hexosaminidase A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004; **324**(3), 1048–1052.
7. Mahuran, D.J. Biochemical consequences of mutations causing the GM2 gangliosidoses. *Biochim. Biophys. Acta* 1999; **1455**(2-3), 105–138.
8. 厚生労働省難治性疾患等政策研究事業 ライソゾーム病 (ファブリー病を含む)に関する調査研究班, ライソゾーム病・ペルオキシソーム病診断の手引, 診断と治療社, 2015, 10–11.
9. Cachón-González, M.B., Wang, S.Z., Ziegler, R., Cheng, S.H. & Cox, T.M. Reversibility of neuropathology in Tay-Sachs-related diseases. *Hum. Mol. Genet.* 2014; **23**(3), 730–748.
10. Bradbury, A.M., Cochran, J.N., McCurdy, V.J., Johnson, A.K., Brunson, B.L., Gray-Edwards, H., Leroy, S.G., Hwang, M., Randle, A.N., Jackson, L.S., Morrison, N.E., Baek, R.C., Seyfried, T.N., Cheng, S.H., Cox, N.R., Baker, H.J., Cachón-González, M.B., Cox, T.M., Sena-Esteves, M. & Martin, D.R. Therapeutic response in feline Sandhoff disease despite immunity to intracranial gene therapy. *Mol. Ther.* 2013; **21**(7), 1306–1315.

11. Tsuji, D., Akeboshi, H., Matsuoka, K., Yasuoka, H., Miyasaki, E., Kasahara, Y., Kawashima, I., Chiba, Y., Jigami, Y., Taki, T., Sakuraba, H. & Itoh, K. Highly phosphomannosylated enzyme replacement therapy for GM2 gangliosidosis. *Ann. Neurol.* 2011; **69**(4), 691–701.
12. Matsuoka, K., Tamura, T., Tsuji, D., Dohzono, Y., Kitakaze, K., Ohno, K., Saito, S., Sakuraba, H. & Itoh, K. Therapeutic potential of intracerebroventricular replacement of modified human β -hexosaminidase B for GM2 gangliosidosis. *Mol. Ther.* 2011; **19**(6), 1017–1024.
13. Platt, F.M., Neises, G.R., Reinkensmeier, G., Townsend, M.J., Perry, V.H., Proia, R.L., Winchester, B., Dwek, R.A. & Butters, T.D. Prevention of lysosomal storage in Tay-Sachs mice treated with *N*-butyldeoxynojirimycin. *Science* 1997; **276**(5311), 428–431.
14. Maegawa, G.H., Banwell, B.L., Blaser, S., Sorge, G., Toplak, M., Ackerley, C., Hawkins, C., Hayes, J. & Clarke, J.T. Substrate reduction therapy in juvenile GM2 gangliosidosis. *Mol. Genet. Metab.* 2009; **98**(1–2), 215–224.
15. Clarke, J.T., Mahuran, D.J., Sathe, S., Kolodny, E.H., Rigat, B.A., Raiman, J.A. & Tropak, M.B. An open-label Phase I/II clinical trial of pyrimethamine for the treatment of patients affected with chronic GM2 gangliosidosis (Tay-Sachs or Sandhoff variants). *Mol. Genet. Metab.* 2011; **102**(1), 6–12.
16. Sango, K., Yamanaka, S., Hoffmann, A., Okuda, Y., Grinberg, A., Westphal, H., McDonald, M.P., Crawley, J.N., Sandhoff, K., Suzuki, K. & Proia, R.L. Mouse models of Tay-Sachs and Sandhoff diseases differ in neurologic phenotype and ganglioside metabolism. *Nat. Genet.* 1995; **11**(2), 170–176.
17. Sango, K., McDonald, M.P., Crawley, J.N., Mack, M.L., Tiffit, C.J., Skop, E., Starr, C.M., Hoffmann, A., Sandhoff, K., Suzuki, K. & Proia, R.L. Mice lacking both subunits of lysosomal β -hexosaminidase display gangliosidosis and mucopolysaccharidosis. *Nat. Genet.* 1996; **14**(3), 348–352.
18. Hawkes, C. & Kar, S. Insulin-like growth factor-II/mannose-6-phosphate receptor: widespread distribution in neurons of the central nervous system including those expressing cholinergic phenotype. *J. Comp. Neurol.* 2003; **458**(2), 113–127.
19. Barton, N.W., Brady, R.O., Dambrosia, J.M., Di Bisceglie, A.M., Doppelt, S.H., Hill, S.C., Mankin, H.J., Murray, G.J., Parker, R.I., Argoff, C.E., Grewal, R.P. & Yu, K.T. Replacement therapy for inherited enzyme deficiency—macrophage-targeted glucocerebrosidase for Gaucher’s disease. *N. Engl. J. Med.* 1991; **324**(21), 1464–1470.

20. Eng, C.M., Guffon, N., Wilcox, W.R., Germain, D.P., Lee, P., Waldek, S., Caplan, L., Linthorst, G.E. & Desnick, R.J.; International Collaborative Fabry Disease Study Group. Safety and efficacy of recombinant human α -galactosidase A replacement therapy in Fabry's disease. *N. Engl. J. Med.* 2001; **345**, 9–16.
21. Lemieux, M.J., Mark, B.L., Cherney, M.M., Withers, S.G., Mahuran, D.J. & James, M.N. Crystallographic structure of human β -hexosaminidase A: interpretation of Tay-Sachs mutations and loss of G_{M2} ganglioside hydrolysis. *J. Mol. Biol.* 2006; **359**(4), 913–929.
22. Mark, B.L., Mahuran, D.J., Cherney, M.M., Zhao, D., Knapp, S. & James, M.N. Crystal structure of human β -hexosaminidase B: understanding the molecular basis of Sandhoff and Tay-Sachs disease. *J. Mol. Biol.* 2003; **327**(5), 1093–1109.
23. Weitz, G. & Proia, R.L. Analysis of the glycosylation and phosphorylation of the α -subunit of the lysosomal enzyme, β -hexosaminidase A, by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 1992; **267**(14), 10039–10044.
24. Hasilik, A. & Neufeld, E.F. Biosynthesis of lysosomal enzymes in fibroblasts. Synthesis as precursors of higher molecular weight. *J. Biol. Chem.* 1980; **255**(10), 4937–4945.
25. Matsuoka, K., Tsuji, D., Aikawa, S., Matsuzawa, F., Sakuraba, H. & Itoh, K. Introduction of an *N*-glycan sequon into *HEXA* enhances human β -hexosaminidase cellular uptake in a model of Sandhoff disease. *Mol. Ther.* 2010; **18**(8), 1519–1526.
26. Kotani, M., Ozawa, H., Kawashima, I., Ando, S. & Tai, T. Generation of one set of monoclonal antibodies specific for a-pathway ganglio-series gangliosides. *Biochim. Biophys. Acta* 1992; **1117**(1), 97–103.
27. Ozawa, H., Yamashita, K., Sakuraba, H., Itoh, K., Kase, R. & Tai, T. Generation and characterization of mouse monoclonal antibodies specific for N-linked neutral oligosaccharides of glycoproteins. *Arch. Biochem. Biophys.* 1997; **342**(1), 48–57.
28. Izumi, T., Fukuyama, Y., Tsuji, A., Yamanaka, T., Hirabayashi, Y. & Suzuki, Y. G_{M2}-Gangliosidosis: B1 variant with thermostable β -hexosaminidase A and molecular analysis of the mutant enzyme. *Lipid Storage Disorders* 1988; New York: Plenum, 237–245.
29. Suzuki, K. Enzymatic diagnosis of sphingolipidoses. *Methods Enzymol.* 1987; **138**, 727–762.
30. Niwa, H., Yamamura, K. & Miyazaki, J. Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene* 1991; **108**(2), 193–199.

31. Kinoshita, E., Yamada, A., Takeda, H., Kinoshita-Kikuta, E. & Koike, T. Novel immobilized zinc(II) affinity chromatography for phosphopeptides and phosphorylated proteins. *J. Sep. Sci.* 2005; **28**(2), 155–162.
32. Winn, M.D., Ballard, C.C., Cowtan, K.D., Dodson, E.J., Emsley, P., Evans, P.R., Keegan, R.M., Krissinel, E.B., Leslie, A.G., McCoy, A., McNicholas, S.J., Murshudov, G.N., Pannu, N.S., Potterton, E.A., Powell, H.R., Read, R.J., Vagin, A. & Wilson, K.S. Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 2011; **67**(Pt 4), 235–242.
33. Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W.G. & Cowtan, K. Features and development of *Coot*. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 2010; **66**(Pt 4), 486–501.
34. Bowers, K.J., Chow, E., Xu, H., Dror, R.O., Eastwood, M.P., Gregersen, B.A., Klepeis, J.L., Kolossvary, I., Moraes, M.A., Sacerdoti, F.D., Salmon, J.K., Shan, Y. & Shaw, D.E. Scalable algorithms for molecular dynamics simulations on commodity clusters. SC 2006 Conference, Proceedings of the ACM/IEEE conference on Supercomputing, 2006; 43.
35. Togawa, T., Takada, M., Aizawa, Y., Tsukimura, T., Chiba, Y. & Sakuraba, H. Comparative study on mannose 6-phosphate residue contents of recombinant lysosomal enzymes. *Mol. Genet. Metab.* 2014; **111**(3), 369–373.
36. Sato, K., Kitakaze, K., Nakamura, T., Naruse, N., Aihara, K., Shigenaga, A., Inokuma, T., Tsuji, D., Itoh, K. & Otaka, A. Total chemical synthesis of monoglycosylated GM2 ganglioside activator using a novel cysteine surrogate. *Chem. Commun.* 2015; **51**(49), 9946–9948.
37. Tsuji, D., Higashine, Y., Matsuoka, K., Sakuraba, H. & Itoh, K. Therapeutic evaluation of GM2 gangliosidoses by ELISA using anti-GM2 ganglioside antibodies. *Clin. Chim. Acta* 2007; **378**(1–2), 38–41.
38. Kamiya, M., Asanuma, D., Kuranaga, E., Takeishi, A., Sakabe, M., Miura, M., Nagano, T. & Urano, Y. β -Galactosidase fluorescence probe with improved cellular accumulation based on a spirocyclized rhodol scaffold. *J. Am. Chem. Soc.* 2011; **133**(33), 12960–12963.
39. Asanuma, D., Takaoka, Y., Namiki, S., Takikawa, K., Kamiya, M., Nagano, T., Urano, Y. & Hirose, K. Acidic-pH-activatable fluorescence probes for visualizing exocytosis dynamics. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2014; **53**(24), 6085–6089.
40. Schneider, C.A., Rasband, W.S. & Eliceiri, K.W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* 2012; **9**(7), 671–675.
41. Vladutiu, G.D. & Rattazzi, M.C. Excretion-reuptake route of β -hexosaminidase in normal and I-cell disease cultured fibroblasts. *J. Clin. Invest.* 1979; **63**(4), 595–601.

42. Halley, D.J., de Wit-Verbeek, H.A., Reuser, A.J. & Galjaard, H. The distribution of hydrolytic enzyme activities in human fibroblast cultures and their intercellular transfer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1978; **82**(4), 1176–1182.
43. Tsuji, D., Kuroki, A., Ishibashi, Y., Itakura, T., Kuwahara, J., Yamanaka, S. & Itoh, K. Specific induction of macrophage inflammatory protein 1- α in glial cells of Sandhoff disease model mice associated with accumulation of *N*-acetylhexosaminyl glycoconjugates. *J. Neurochem.* 2005; **92**(6), 1497–1507.
44. Utz, J.R., Crutcher, T., Schneider, J., Sorgen, P. & Whitley, C.B. Biomarkers of central nervous system inflammation in infantile and juvenile gangliosidoses. *Mol. Genet. Metab.* 2015; **114**(2), 274–280.
45. Chen, Y., Allegood, J., Liu, Y., Wang, E., Cachón-Gonzalez, B., Cox, T.M., Merrill, A.H. Jr. & Sullards, M.C. Imaging MALDI mass spectrometry using an oscillating capillary nebulizer matrix coating system and its application to analysis of lipids in brain from a mouse model of Tay-Sachs/Sandhoff disease. *Anal. Chem.* 2008; **80**(8), 2780–2788.
46. Whitfield, P., Johnson, A.W., Dunn, K.A., Delauche, A.J., Winchester, B.G. & Franklin, R.J. GM1-gangliosidosis in a cross-bred dog confirmed by detection of GM1-ganglioside using electrospray ionisation-tandem mass spectrometry. *Acta Neuropathol.* 2000; **100**(4), 409–414.
47. Beard, H., Luck, A.J., Hassiotis, S., King, B., Trim, P.J., Snel, M.F., Hopwood, J.J. & Hemsley, K.M.. Determination of the role of injection site on the efficacy of intra-CSF enzyme replacement therapy in MPS IIIA mice. *Mol. Genet. Metab.* 2015; **115**(1), 33–40.
48. Vuillemenot, B.R., Kennedy, D., Reed, R.P., Boyd, R.B., Butt, M.T., Musson, D.G., Keve, S., Cahayag, R., Tsuruda, L.S. & O'Neill, C.A. Recombinant human tripeptidyl peptidase-1 infusion to the monkey CNS: safety, pharmacokinetics, and distribution. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2014; **277**(1), 49–57.
49. Vera, M., Le, S., Kan, S.H., Garban, H., Naylor, D., Mlikotic, A., Kaitila, I., Harmatz, P., Chen, A. & Dickson, P. Immune response to intrathecal enzyme replacement therapy in mucopolysaccharidosis I patients. *Pediatr. Res.* 2013; **74**(6), 712–720.
50. Muenzer, J., Hendriksz, C.J., Fan, Z., Vijayaraghavan, S., Perry, V., Santra, S., Solanki, G.A., Mascelli, M.A., Pan, L., Wang, N., Sciarappa, K. & Barbier, A.J. A phase I/II study of intrathecal idursulfase-IT in children with severe mucopolysaccharidosis II. *Genet. Med.* 2016; **18**(1), 73–81.

51. Meng, Y., Sohar, I., Sleat, D.E., Richardson, J.R., Reuhl, K.R., Jenkins, R.B., Sarkar, G. & Lobel, P. Effective intravenous therapy for neurodegenerative disease with a therapeutic enzyme and a peptide that mediates delivery to the brain. *Mol. Ther.* 2014; **22**(3), 547–553.
52. Böckenhoff, A., Cramer, S., Wölte, P., Knieling, S., Wohlenberg, C., Gieselmann, V., Galla, H.J. & Matzner, U. Comparison of five peptide vectors for improved brain delivery of the lysosomal enzyme arylsulfatase A. *J. Neurosci.* 2014; **34**, 3122–3129.
53. Tardieu, M., Zérah, M., Husson, B., de Bournonville, S., Deiva, K., Adamsbaum, C., Vincent, F., Hocquemiller, M., Broissand, C., Furlan, V., Ballabio, A., Fraldi, A., Crystal, R.G., Baugnon, T., Roujeau, T., Heard, J.M. & Danos, O. Intracerebral administration of adeno-associated viral vector serotype rh.10 carrying human *SGSH* and *SUMF1* cDNAs in children with mucopolysaccharidosis type IIIA disease: results of a phase I/II trial. *Hum. Gene Ther.* 2014; **25**(6), 506–516.
54. Tsuji, D., Kuroki, A., Ishibashi, Y., Itakura, T. & Itoh, K. Metabolic correction in microglia derived from Sandhoff disease model mice. *J. Neurochem.* 2005; **94**(6), 1631–1638.
55. Wang, J., Lozier, J., Johnson, G., Kirshner, S., Verthelyi, D., Pariser, A., Shores, E. & Rosenberg, A. Neutralizing antibodies to therapeutic enzymes: considerations for testing, prevention and treatment. *Nat. Biotechnol.* 2008; **26**(8), 901–908.
56. Nielsen, M., Lundegaard, C., Worning, P., Lauemøller, S.L., Lamberth, K., Buus, S., Brunak, S. & Lund, O. Reliable prediction of T-cell epitopes using neural networks with novel sequence representations. *Protein Sci.* 2003; **12**(5), 1007–1017.
57. Rammensee, H., Bachmann, J., Emmerich, N.P., Bachor, O.A. & Stevanović, S. SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics* 1999; **50**(3–4), 213–219.
58. Tajima, Y., Kawashima, I., Tsukimura, T., Sugawara, K., Kuroda, M., Suzuki, T., Togawa, T., Chiba, Y., Jigami, Y., Ohno, K., Fukushige, T., Kanekura, T., Itoh, K., Ohashi, T. & Sakuraba, H. Use of a modified α -N-acetylgalactosaminidase in the development of enzyme replacement therapy for Fabry disease. *Am. J. Hum. Genet.* 2009; **85**(5), 569–580.
59. Sinici, I., Yonekawa, S., Tkachyova, I., Gray, S.J., Samulski, R.J., Wakarchuk, W., Mark, B.L. & Mahuran, D.J. In cellulo examination of a beta-alpha hybrid construct of beta-hexosaminidase A subunits, reported to interact with the GM2 activator protein and hydrolyze GM2 ganglioside. *PLOS ONE* 2013; **8**(3): e57908.

60. Urano, Y., Asanuma, D., Hama, Y., Koyama, Y., Barrett, T., Kamiya, M., Nagano, T., Watanabe, T., Hasegawa, A., Choyke, P.L. & Kobayashi, H. Selective molecular imaging of viable cancer cells with pH-activatable fluorescence probes. *Nat. Med.* 2009; **15**(1), 104–109.
61. Asanuma, D., Sakabe, M., Kamiya, M., Yamamoto, K., Hiratake, J., Ogawa, M., Kosaka, N., Choyke, P.L., Nagano, T., Kobayashi, H. & Urano, Y. Sensitive β -galactosidase-targeting fluorescence probe for visualizing small peritoneal metastatic tumours *in vivo*. *Nat. Commun.* 2015; **6**, 6463.
62. Zhang, X., Tian, Y., Zhang, C., Tian, X., Ross, A.W., Moir, R.D., Sun, H., Tanzi, R.E., Moore, A. & Ran, C. Near-infrared fluorescence molecular imaging of amyloid beta species and monitoring therapy in animal models of Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2015; **112**(31), 9734–9739.
63. Yuki, D., Sugiura, Y., Zaima, N., Akatsu, H., Takei, S., Yao, I., Maesako, M., Kinoshita, A., Yamamoto, T., Kon, R., Sugiyama, K. & Setou, M. DHA-PC and PSD-95 decrease after loss of synaptophysin and before neuronal loss in patients with Alzheimer's disease. *Sci. Rep.* 2014; **4**, 7130.
64. Eriksson, C., Masaki, N., Yao, I., Hayasaka, T. & Setou, M. MALDI Imaging Mass Spectrometry-A Mini Review of Methods and Recent Developments. *Mass Spectrom. (Tokyo)* 2013; **2**, S0022.
65. Kobayashi, T., Beuchat, M.H., Lindsay, M., Frias, S., Palmiter, R.D., Sakuraba, H., Parton, R.G. & Gruenberg, J. Late endosomal membranes rich in lysobisphosphatidic acid regulate cholesterol transport. *Nat. Cell Biol.* 1999; **1**(2), 113–118.
66. Akgoc, Z., Sena-Esteves, M., Martin, D.R., Han, X., d'Azzo, A. & Seyfried, T.N. Bis(monoacylglycero)phosphate: A secondary storage lipid in the gangliosidoses. *J. Lipid Res.* 2015; **56**(5), 1006–1013.
67. Hayakawa, T., Makino, A., Murate, M., Sugimoto, I., Hashimoto, Y., Takahashi, H., Ito, K., Fujisawa, T., Matsuo, H. & Kobayashi, T. pH-dependent formation of membranous cytoplasmic body-like structure of ganglioside G_{M1}/bis(monoacylglycero)phosphate mixed membranes. *Biophys. J.* 2007; **92**(1), L13–16.
68. Hu, L., Sun, Y., Villasana, L.E., Paylor, R., Klann, E. & Pautler, R.G. Early changes in the apparent diffusion coefficient (ADC) in a mouse model of Sandhoff's disease occur prior to disease symptoms and behavioral deficits. *Magn. Reson. Med.* 2009; **62**(5), 1175–1184.

69. Gulinello, M., Chen, F. & Dobrenis, K. Early deficits in motor coordination and cognitive dysfunction in a mouse model of the neurodegenerative lysosomal storage disorder, Sandhoff disease. *Behav. Brain Res.* 2008; **193**(2), 315–319.
70. Neuenhofer, S., Conzelmann, E., Schwarzmann, G., Egge, H. & Sandhoff, K. Occurrence of lysoganglioside lyso-GM2 (II3-Neu5Ac-gangliotriaosylsphingosine) in GM2 gangliosidosis brain. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 1986; **367**(3), 241–244.
71. Buccoliero, R., Bodennec, J., Van Echten-Deckert, G., Sandhoff, K. & Futerman, A. H. Phospholipid synthesis is decreased in neuronal tissue in a mouse model of Sandhoff disease. *J. Neurochem.* 2004; **90**(1), 80–88.
72. Baek, R.C., Martin, D.R., Cox, N.R. & Seyfried, T.N. Comparative analysis of brain lipids in mice, cats and humans with Sandhoff disease. *Lipids* 2009; **44**(3), 197–205.

謝辞

本研究の遂行にあたり、終始懇切丁寧にご指導、ご鞭撻下さいました徳島大学大学院医歯薬学研究部 薬科学教育部附属医薬創製教育研究センター 創薬生命工学分野 伊藤孝司 教授、辻大輔 助教、医歯薬学研究部総合薬学センター 総合薬学研究推進室 幾尾真理子 特任助教に心より感謝致します。

HMDER- β GlcNAc を御分与下さり、蛍光イメージング実験について様々な助言を頂きました東京大学大学院 医学系研究科 生体情報学 浦野泰照 教授、神谷真子 講師、神経生物学教室 浅沼大祐 助教に深く感謝致します。

イメージング質量分析について実験に協力して頂きました浜松医科大学 解剖学講座 細胞生物学分野 瀬藤光利 教授、杉山栄二 学士に深く感謝致します。また、イメージング質量分析は文部科学省 先端研究基盤共用・プラットフォーム形成事業 (Grant No.25801)の支援を受けました。

改変型 HexB の結晶構造解析をして頂きました徳島大学 疾患酵素学研究センター 酵素タンパク質結晶構造解析室 真板宣夫 准教授に深く感謝致します。また、結晶構造解析は、大学共同利用機関法人 高エネルギー加速器研究機構 物質構造科学研究所の放射光科学研究施設 Photon Factory のスタッフの皆様に協力して頂きました (No. 2013G075)。

各改変型 HexB の構造予測をして頂きました国立研究開発法人 産業技術総合研究所 創薬分子プロファイリング研究センター 広川貴次 博士に深く感謝致します。また、タンパク質の構造予測は、文部科学省及び国立研究開発法人 日本医療研究開発機構 創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業 (創薬等支援技術基盤プラットフォーム事業)の支援を受けました。

化学合成 GM2AP を御分与下さいました徳島大学大学院医歯薬学研究部 機能分子合成薬学分野 大高章 教授、佐藤浩平 博士に深く感謝致します。

マンノース6リン酸の定量をして頂きました明治薬科大学 生体機能分析学教室 兎川忠靖 教授に深く感謝致します。

抗ヒトHexA pAbを御分与下さいました明治薬科大学 臨床遺伝学講座 櫻庭均 教授に深く感謝致します。

抗 GM2 mAb (GMB28)および抗末端 GlcNAc 含有糖鎖 mAb (OMB4)を御分与下さいました公益財団法人 東京都医学総合研究所 川島育夫 博士に深く感謝致します。

メタノール資化酵母株 *Ogataea minuta* 由来 hHexA および組換え CI-M6PR domain9 を御分与下さいました国立研究開発法人 産業技術総合研究所 糖鎖創薬技術研究センター 千葉靖典 博士に深く感謝致します。

Sandhoff 病モデルマウスを御分与下さいました横浜市立大学医学部附属病院病理部 山中正二 准教授に深く感謝致します。

DNA シークエンシングは、徳島大学大学院医歯薬学研究部 総合研究支援センター 先端医療研究部門に協力して頂きました。

本研究は独立行政法人 医薬基盤研究所 (NIBIO)「保健医療分野における基礎研究推進事業」課題 ID: 09-15 および MEXT/JSPS 科研費 24659262, 25110722, 25116712, 25293044 の助成を受けました。

本研究は、徳島大学大学院医歯薬学研究部 薬科学教育部附属医薬創製教育研究センター 創薬生命工学分野にて行われたものであり、研究に際してご協力下さいました研究室の諸氏に御礼申し上げます。

最後に、精神的・経済的支えとなり、始終暖かく見守って下さいました家族に心より感謝致します。

2016 年 7 月
北風 圭介