

2011 年学会賞受賞者論文 総説

先天性グリコシル化異常症 CDG の分子診断

和田 芳直*

*E-mail: waday@mch.pref.osaka.jp

大阪府立病院機構大阪母子医療センター：594-1101 大阪府和泉市室堂町 840

(受付 2016 年 12 月 21 日, 改訂 2017 年 1 月 26 日, 受理 2017 年 1 月 30 日)

先天性グリコシル化異常症 (CDG) は糖タンパク質の糖鎖の欠失あるいはグリコフォームプロファイルの異常 (特定糖鎖の増加や減少) を来す疾患の総称である。30 年あまり前に CDG が登場して以来, 50 を超える病型 (責任遺伝子) が同定され, その数は増加しつつある。CDG は糖鎖の重要性を端的に示すとともに, それぞれの病型がもつ疾患としての表現型や病理は糖鎖の生物機能の多様性を表している。CDG は多彩な症状ゆえに診断が困難であり, 最近では全エクソーム解析が行われることが多くなったが, 糖タンパク質の糖鎖異常を MS によって同定する分子診断は迅速・簡便なスクリーニング法として有用である。CDG の歴史と MS による分子診断法について, グリコフォームプロファイルの数値化あるいは相対定量など技術的な側面に触れつつ解説する。

1 歴史

先天性グリコシル化異常症 Congenital Disorder(s) of Glycosylation (CDG) は疾患グリコプロテオミクスを代表する疾患 (群) であり, 生体での糖鎖付加 glycosylation の重要性を端的に示す好例である。ベルギーの Jaeken らによって CDG の症例が報告されたのは 1979 年の European Society for Paediatric Research の年会 (Leuven, Belgium, September 3–6, 1979) とされ, その抄録が引用される¹⁾。しかし, これはチロキシン結合蛋白やアシルスルファターゼ A の血中濃度異常に加えて卵胞刺激ホルモンや成長ホルモンの変動がある家族性精神運動発達遅滞の双生児姉妹について「新しい病気かもしれない」程度の症例報告で, 糖タンパク質や糖鎖に関する記載はない。この患者のトランスフェリンに特異な電気泳動パターンが報告されたのは 1984 年である²⁾。症状から糖タンパク質糖鎖異常を示唆するものは何もないが, 疾患と関連する血清トランスフェリンの電気泳動パターンを調べていたオランダの van Eijk らに患者血清が持ち込まれたと思われる。その後, トランスフェリンの電気泳動パターンの異常 (等電点の高い分子の存在) から, N 結合型糖鎖末端のシアル酸 (N-アセチルノイラミン酸 NeuAc) および, それを含む糖鎖が部分的に欠損した構造が推定されたが構造の詳細は不明であった³⁾。著者は 1991 年から, 本症に特徴的なトランスフェリンの電気泳動像を示す発達遅滞の 3 症例 (うち 2 症例は同胞) についてトランスフェリンから切り出した糖鎖の構造解析を行っていたが異常を見出せずに行き詰っていた。

これとは別に, それまでの約 10 年間, 質量分析 (MS) に関わってきた著者は, わが国には未だ導入されていなかったエレクトロスプレーイオン化法 (ESI) を 1990 年に米国で見学し, タンパク質分析を飛躍的に発展させるであろう ESI の能力を知った。翌年初頭にはテスト試料として標品および自らの血清から精製分離したトランスフェリンを持って再び渡米して ESI-MS の知識を深めたが, その時点では CDG 症例の分析に使用することは念頭になかった。1991 年末には自らの所属施設に米国で見学したと同じ質量分析計が設置されたが, それから 1 年近く経った 1992 年 10 月の日本生化学会の 1 週間前に, たいした期待もせず患者から精製したトランスフェリンの ESI-MS 測定を行った。当時としては, MS にとってトランスフェリンは大分子で, 測定は高難度であったが, 運よく, 患者のトランスフェリンには N 結合型糖鎖をタンパクへの結合部から欠失した分子が含まれていることを発見し, 生化学会で報告するとともに速報論文を発表した⁴⁾。分析結果から, タンパク質から切り出した糖鎖を試料とする分析では結論を得る可能性はなかったことがわかった。未知の構造を解析するにあたって分子全体の情報としての質量あるいは質量プロファイルをつかむことの重要性を示している。トランスフェリンに限らず CDG 患者では血中の多くの糖タンパク質に電気泳動上の異常が見られることはほぼ同時期に報告された⁵⁾。

著者が分析したのは, ホスホマンノムターゼ 2 (PMM2) の遺伝子異常によって N 結合型糖鎖を構成するマンノース 1 リン酸が供給不足に陥り, その結果としてリボソ-

ムで合成されたタンパク質に対して小胞体で一括転移されるべき糖鎖（ドリコール結合糖鎖）が供給不足となり、糖鎖欠損のトランスフェリンが生成する病型で、CDGの中では最も頻度が高い（Fig. 1）。このような小胞体での糖鎖生合成異常によるドリコール結合糖鎖の供給不足による病型はすべて同じ分子表現型を呈する。しかし、欠損酵素の活性は低いレベルで残っており、正常に糖鎖が付加した分子は存在する。糖鎖が全く付加しない場合は胎生致死となる⁶⁾。一方、糖鎖が転移した後で起こるゴルジ体における糖鎖プロセッシングに障害のあるCDGでは糖鎖欠損は起こらず特定構造の糖鎖が増加あるいは減少し、障害のある生合成段階に特異的な分子表現型（あるいはグリコフォームプロファイル）を呈することが多い。

CDGはもともと Carbohydrate-Deficient Glycoprotein

syndrome の略であったが、1999年から Congenital Disorder(s) of Glycosylation の略となった⁷⁾。CDGは糖タンパク質のグリコシル化異常疾患の総称であるが、狭義にはN結合型糖鎖の合成障害疾患をさし、広義にはO結合型糖鎖（ムチン型やグリコサミノグリカン、ジストログリカンなど）や糖脂質、GPI (glycosylphosphatidylinositol) アンカーなどのグリコシル化異常全般を含む。以前はN結合型CDGを分子表現型によってIとIIに分け、発見順にアルファベットを付して疾患名（サブタイプ）としていたが、現在はPMM2-CDGのように「原因遺伝子-CDG」と記述する⁸⁾。

2 N結合型CDGの分子診断

タンパク質の約半数は糖タンパク質であることから、症

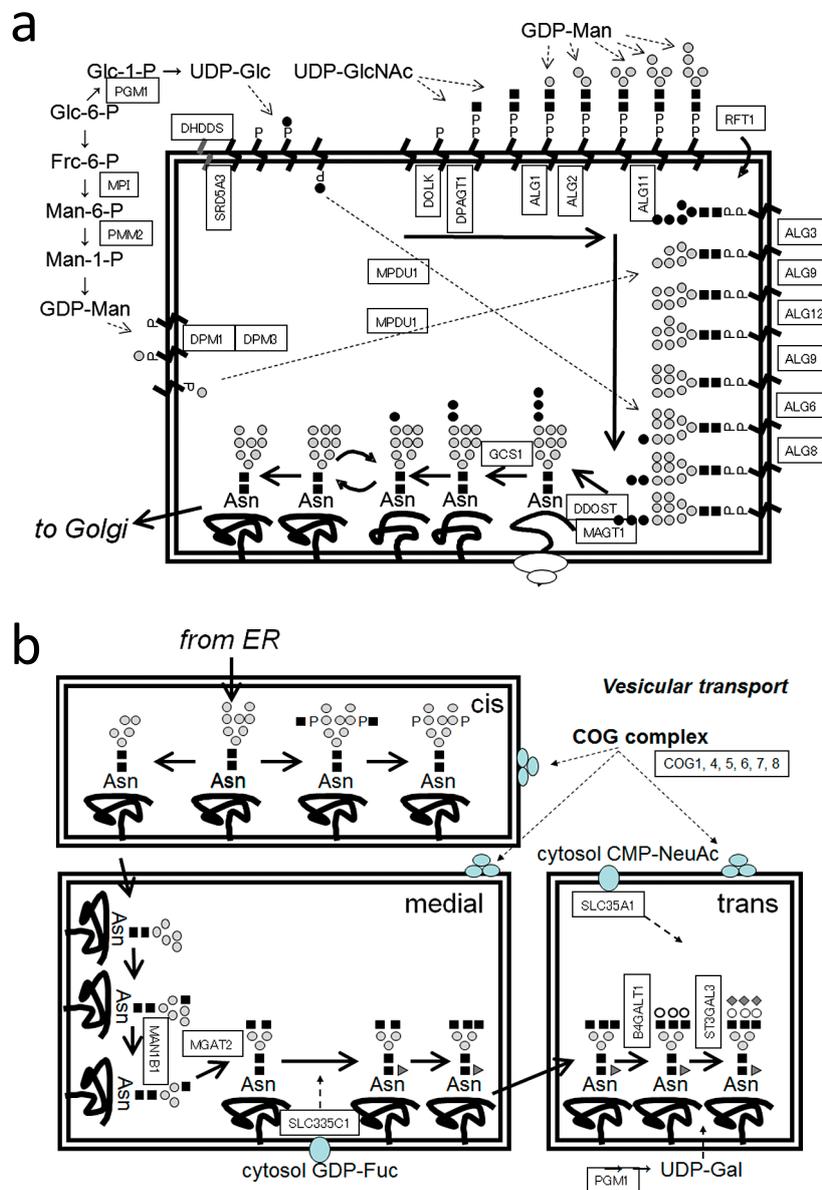


Fig. 1 Biosynthetic pathway of N-glycosylation. a. ER, b. Golgi apparatus

The responsible genes identified to cause CDG are indicated in frame.

状は多臓器・器官の障害に由来し多岐にわたるが、病型（原因遺伝子）によって症状が異なる。PMM2-CDGは、新生児期から乳幼児期に小頭症、乳頭陥没、臀部脂肪沈着などの形態異常、ほ乳不良、体重増加不良、心嚢液貯留、非免疫性胎児水腫、成長障害、内斜視、眼振、てんかん、筋緊張低下、小脳・橋低形成、頭蓋内出血あるいは凝固異常による脳血管障害がみられ、感染症あるいは多臓器不全のために死亡することもある。成長に伴い、網膜色素変性、末梢神経障害、側彎、後彎など骨格変形がみられる。マンノース6リン酸イソメラーゼ(MPI)-CDGは例外的に神経症状を欠き、難治性下痢、蛋白喪失型胃腸症など消化器機能異常を特徴とする。小胞体での初期糖鎖合成過程の異常によるCDGでは分子表現型が同じであるにもかかわらず症状が異なることは、糖鎖遺伝子ごとに糖鎖合成に関わる貢献度が時間的・空間的（発生時期や臓器）に異なることを示唆しており興味深い。ゴルジ体での生合成経路異常によるSLC35C1-CDGではGDP-フコーストランスポーター欠損によってフコシル化糖鎖が減少するため白血球機能異常や血液型異常（Bombay型）を合併する^{9),10)}。また、糖原病glycogen storage diseaseとして知られていたホスホグルコムターゼ1(PGM1)-CDGでは小胞体での糖鎖合成に必要なUDP(uridine diphosphate)-グルコースとゴルジ体に必要なUDP-ガラクトースがともに欠乏するため糖鎖欠損とグリコフォームプロファイルの変化という2つの分子表現型が混在する¹¹⁾。

CDGは症状から疾患を強く疑うことは困難なため、原因不明の稀少疾患に対する全エクソーム解析によって診断される例が増えているが、診断の網を広げるには簡便な分析法が必要である。実際、CDGの研究が電気泳動から始まった経緯から、等電点電気泳動によるスクリーニングが中心であった。N結合型糖鎖をもつ糖タンパク質の等電点を規定するのは糖鎖末端に付加するNアセチルノイラミン酸(NeuAc)であり、電気泳動ではそれ以上の構造異常について情報を与えない。そのことから、MSによってさらに踏み込んだ分子表現型を提示する分子診断やスクリーニングの価値は高い。CDGのトランスフェリンマスペクトルをFig.2に示す。

3 O結合型(ムチン型)CDGの分子診断

NeuAcはムチン型糖鎖末端にも付加することから、ムチン型糖鎖の変化についてもタンパク質の等電点電気泳動により分析する試みがあった。しかし、ムチン型糖鎖はN結合型糖鎖よりも付加部位が多い上に、健常人においても付加率がまちまちで、さらにN結合型糖鎖の付加もあるといった理由から、N型糖鎖CDGに対するトランスフェリンのような判別容易な電気泳動パターンを示す分子の選定は難しかった。ようやく2003年にアポリポ蛋

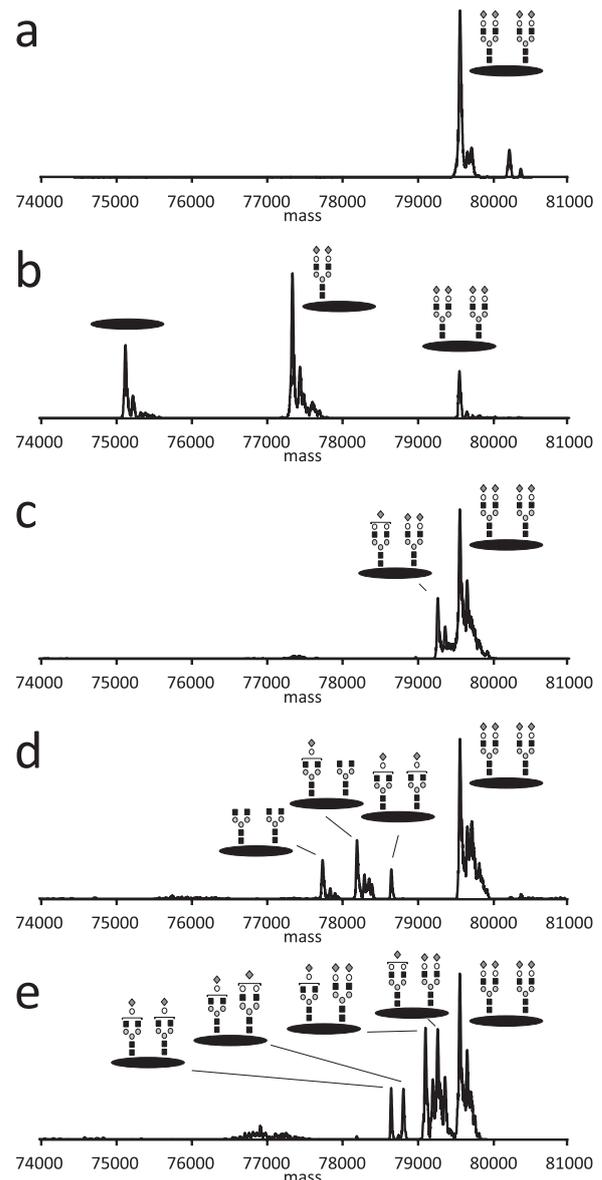


Fig. 2 Deconvoluted ESI mass spectra of transferrin from various CDG types

a. healthy control. b. PMM2-CDG, c. COG2-CDG lacking NeuAc. d. SLC35A2-CDG lacking Gal-NeuAc. e. B4GALT1-CDG lacking Gal-NeuAc or NeuAc.

白CIII(apoC-III)を用いる分析が報告された¹²⁾。apoC-IIIは79残基からなる小タンパク質でThr74にムチン型糖鎖が付加する。著者はトランスフェリンの場合と同様に抗体によって精製したapoC-IIIのMSによる検出を試みたが、apoC-IIIは他のリポタンパク質や脂質と複合体を形成しているなどの理由で実用的でなかった。たまたまSELDI-MSによる癌バイオマーカー探索に関する情報を参考に、血清を有機溶媒存在下で脱塩してMALDI-MSを行ったところ、質量域 m/z 8,700-10,000に付加を持たないapoC-IIIと、最大でGal-GalNAcに2個のNeuAcをもつムチン型糖鎖の付加したapoC-IIIのグリコフォームプロファイルを描出で

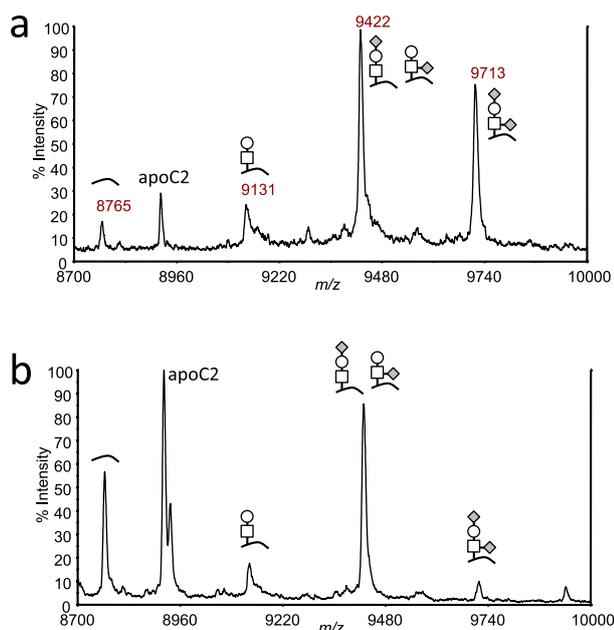


Fig. 3 MALDI mass spectra of apoC-III with different mucin-type O-glycoforms

a healthy control. b. ARCL2 showing decreased NeuAc and increased unglycosylated molecule.

きることを見出した (Fig. 3). この方法の利点は抗体による精製が不要で、前処理が極めて簡単であることと、電気泳動では糖鎖修飾を受けていない apoC-III と NeuAc 付加のない Gal-GalNAc (T 抗原) をもつ apoC-III を区別できないという問題を解決したことにある。この分析法は、その有用性を *ATP6V0A2* 遺伝子異常に伴うムチン型グリコフォームプロファイル異常の CDG である ARCL2 (autosomal recessive cutis laxa, type 2) の分析など¹³⁾、現在広く使われている¹⁴⁾。

4 わが国における CDG 分子診断支援活動

症状から CDG を推測することは難しい。しかし、原因不明の発達遅滞があり、凝固因子 (活性や定量値) をはじめ複数の検査値異常がある場合に CDG を疑うことは小児科医 (特に小児神経科医) の知識として広まっている。全エクソーム解析には費用と時間がかかることもあって、診断には糖タンパク質の糖鎖異常の検出が必要である。鳥取大学の湯浅らのグループは 1990 年代の前半から電気泳動による分析すなわち診断支援を先駆的に行ってきた¹⁵⁾。著者は上に述べた MS による分子診断支援活動を 2005 年から開始し、これまで (2016 年 12 月時点) に約 1,200 名の原因不明精神発達遅滞患者を分析し、12 名に CDG を診断した。選択バイアスを考慮しなければわが国の原因不明発達遅滞患者の 1% が CDG ということになる¹⁶⁾。

このような分子診断でトランスフェリンや apoC-III に糖鎖異常が見つかれば CDG が疑われるが、原因遺伝子を特

定しなければ確定診断とはならない。病型によってある程度の特徴があるので、そのことと照合することで原因遺伝子を絞った遺伝子解析を行って確定診断できる場合がある。

5 グリコフォームプロファイルの定量

一般に、臨床検査の測定値には正常域が設定され、その範囲からの逸脱を異常値と判定する。グリコフォームプロファイルを「異常」と判定するには数値化が必要であり、グリコフォームプロファイル (あるいはパターン) の数値化も「定量 (正しくは相対定量)」と呼ぶ。本来、MS による定量は安定同位体化合物を内部標準に用いて行う。しかし、多様な構造の糖鎖のそれぞれについて安定同位体化合物を作製することは現実的でない。そこでマススペクトルにおけるピークの高さ (正しくは「相対強度 relative intensity」) を使って定量する。MS には、イオン化法、イオン分離法 (飛行時間型, 四重極, イオントラップなど)、検出するイオン極性 (正か負か)、イオン検出器の特性、さらには質量分析装置の違いなど多数の要因があるため、MS による糖鎖定量の信頼性についてはコンセンサスが得られてなかった。HUPO-HGPI (Human Disease Glycomics/Proteome Initiative) では N 結合型糖鎖と O 結合型糖鎖について国際共同研究を行い、試料調製の違いが結果に影響するものの、分析そのものについては、MS の特性を踏まえて行えば信頼性の高い定量を行えることを報告した^{17)~19)}。この活動を基点としてグリコフォームプロファイルの数値化・定量の方法論は、糖ペプチドを試料とする糖鎖の「非ラベル化定量 label-free quantitation」というキーワードのもとで構成糖の組成や糖鎖付加率の算出法についても考案されている^{20)~22)}。

6 おわりに

CDG は糖鎖がタンパク質機能に重要であることを端的に示す好例である。生合成過程において隣接する酵素反応を担う遺伝子であってもその異常が異なる病変 pathology を呈することは、糖鎖や糖鎖遺伝子の生物機能が時間的・空間的に複雑に制御されていることを示しており、未解明領域の大きさを垣間見る思いがする。疾患群としての CDG が登場して以来の 30 年間に N 結合型糖鎖の生合成異常症はかなり出そろった感があるが、例えば小胞輸送の障害が糖鎖生合成に影響するなど、今後も CDG に分類される疾患は増えるであろう。エクソーム解析が普及しつつある現状においても、MS による CDG の分子診断や糖鎖表現型の確認はグリコミクスやプロテオミクスの発展に資すると思われる。

謝辞

引用文献において共著者の共同研究者各位に感謝します。

著者に開示すべき利益相反状態は無い。

文 献

- 1) Jaeken J, Vanderschueren-Lodeweyckx M, Casaer P, *et al.* Familial psychomotor retardation with markedly fluctuating serum prolactin, FSH and GH levels, partial TBG-deficiency, increased serum arylsulphatase A and increased CSF protein: a new syndrome: 90. *Pediatr Res.* 1980;14(2):179–179.
- 2) Jaeken J, van Eijk HG, van der Heul C, *et al.* Sialic acid-deficient serum and cerebrospinal fluid transferrin in a newly recognized genetic syndrome. *Clin Chim Acta.* 1984;144(2-3):245–247.
- 3) Jaeken J, Eggermont E, Stibler H. An apparent homozygous X-linked disorder with carbohydrate-deficient serum glycoproteins. *Lancet.* 1987;2(8572):1398.
- 4) Wada Y, Nishikawa A, Okamoto N, *et al.* Structure of serum transferrin in carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome. *Biochemical and biophysical research communications.* 1992;189(2):832–836.
- 5) Harrison HH, Miller KL, Harbison MD, *et al.* Multiple serum protein abnormalities in carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome: pathognomonic finding of two-dimensional electrophoresis? *Clin Chem.* 1992;38(7):1390–1392.
- 6) Thiel C, Lubke T, Matthijs G, *et al.* Targeted disruption of the mouse phosphomannomutase 2 gene causes early embryonic lethality. *Mol Cell Biol.* 2006;26(15):5615–5620.
- 7) Aebi M, Helenius A, Schenk B, *et al.* Carbohydrate-deficient glycoprotein syndromes become congenital disorders of glycosylation: an updated nomenclature for CDG. First International Workshop on CDGS. *Glycoconj J.* 1999;16(11):669–671.
- 8) Jaeken J, Hennes T, Matthijs G, *et al.* CDG nomenclature: time for a change! *Biochim Biophys Acta.* 2009;1792(9):825–826.
- 9) Lubke T, Marquardt T, Etzioni A, *et al.* Complementation cloning identifies CDG-IIc, a new type of congenital disorders of glycosylation, as a GDP-fucose transporter deficiency. *Nat Genet.* 2001;28(1):73–76.
- 10) Lubke T, Marquardt T, von Figura K, *et al.* A new type of carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome due to a decreased import of GDP-fucose into the golgi. *J Biol Chem.* 1999;274(37):25986–25989.
- 11) Tegtmeyer LC, Rust S, van Scherpenzeel M, *et al.* Multiple phenotypes in phosphoglucomutase 1 deficiency. *N Engl J Med.* 2014;370(6):533–542.
- 12) Wopereis S, Grunewald S, Morava E, *et al.* Apolipoprotein C-III isofocusing in the diagnosis of genetic defects in O-glycan biosynthesis. *Clin Chem.* 2003;49(11):1839–1845.
- 13) Wada Y, Kadoya M, Okamoto N. Mass spectrometry of apolipoprotein C-III, a simple analytical method for mucin-type O-glycosylation and its application to an autosomal recessive cutis laxa type-2 (ARCL2) patient. *Glycobiology.* 2012;22(8):1140–1144.
- 14) Yen-Nicolay S, Boursier C, Rio M, *et al.* MALDI-TOF MS applied to apoC-III glycoforms of patients with congenital disorders affecting O-glycosylation. Comparison with two-dimensional electrophoresis. *Proteomics Clin Appl.* 2015;9(7-8):787–793.
- 15) Yuasa I, Ohno K, Hashimoto K, *et al.* Carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome: electrophoretic study of multiple serum glycoproteins. *Brain Dev.* 1995;17(1):13–19.
- 16) Wada Y. Mass spectrometry of transferrin and apolipoprotein C-III for diagnosis and screening of congenital disorder of glycosylation. *Glycoconj J.* 2016;33(3):297–307.
- 17) Ito H, Kaji H, Togayachi A, *et al.* Comparison of analytical methods for profiling N- and O-linked glycans from cultured cell lines: HUPO Human Disease Glycomics/Proteome Initiative multi-institutional study. *Glycoconj J.* 2016;33(3):405–415.
- 18) Wada Y, Azadi P, Costello CE, *et al.* Comparison of the methods for profiling glycoprotein glycans—HUPO Human Disease Glycomics/Proteome Initiative multi-institutional study. *Glycobiology.* 2007;17(4):411–422.
- 19) Wada Y, Dell A, Haslam SM, *et al.* Comparison of methods for profiling O-glycosylation: Human Proteome Organisation Human Disease Glycomics/Proteome Initiative multi-institutional study of IgA1. *Mol Cell Proteomics.* 2010;9(4):719–727.
- 20) Rebecchi KR, Wenke JL, Go EP, *et al.* Label-free quantitation: a new glycoproteomics approach. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2009;20(6):1048–1059.
- 21) Wada Y. Label-free analysis of o-glycosylation site-occupancy based on the signal intensity of glycopeptide/peptide ions. *Mass Spectrom (Tokyo).* 2012;1(2):A0008.
- 22) Wada Y, Tajiri M, Ohshima S. Quantitation of saccharide compositions of O-glycans by mass spectrometry of glycopeptides and its application to rheumatoid arthritis. *J Proteome Res.* 2010;9(3):1367–1373.

Molecular Diagnosis of Congenital Disorders of Glycosylation

Yoshinao Wada*

*E-mail: waday@mch.pref.osaka.jp

Osaka Women's and Children's Hospital, 840 Murodo-cho, Izumi, Osaka 594-1101, Japan

(Received: December 21, 2016; Revised: January 26, 2017; Accepted: January 30, 2017)

Congenital disorder(s) of glycosylation (CDG) covers a wide range of disorders affecting glycoconjugates. A number of cases due to defects in the biosynthetic pathway of N-glycosylation have been identified in the last 30 years. MS has considerably helped to promote our knowledge of this emerging disease, by characterizing the molecular abnormalities of glycoproteins from the patients. ESI MS of transferrin detects a lack of N-glycans due to defects in the early glycosylation pathway in ER or allows profiling of glycoforms including immature structures derived from defects in the Golgi apparatus. MALDI MS of apolipoprotein C-III is a simple method of elucidating the profiles of mucin-type core 1 O-glycans including site occupancy and glycoforms. A preliminary result of CDG screening in Japan suggested an incidence of approximately one percent in 1,200 Japanese patients with developmental delay of unknown cause.

Keywords: developmental delay; glycogene; glycoproteomics; mass spectrometry.