学 位 研 究 紹 介

突然変異型組織非特異型アルカリホスファターゼ（V406A）の解析
Analysis of a Tissue-Nonspecific Alkaline Phosphatase Mutation Associated with a Lethal Hypophosphatasia Patient

新潟大学大学院医歯学総合研究科 口腔生命科学専攻
口腔健康科学講座 小児歯科学分野
沼 奈津子
Division of Pediatric Dentistry
Department of Oral Health Science
Niigata University Graduate School of
Medical and Dental Sciences
Natsuko Numa

Ⅰ. 背　　景

低ホスファターゼ症は硬組織の低石灰化や，血清並びに組織中の alkaline phosphatase 活性の低下によって特徴付けられる稀な先天性代謝異常疾患である。Rathban によって 1948 年に初めて報告され，常染色体劣性遺伝あるいはまれに優性により遺伝し，その原因は組織非特異型アルカリホスファターゼ遺伝子（tissue-nonspecific alkaline phosphatase, TNSALP）の変異によることが既に知られている。低ホスファターゼ症の重篤度は血清中のアルカリホスファターゼ活性レベルに密接な関係があり，血清中の酵素レベルが低いほど発症時期が早く，しかも重篤な症状となりしばしば致死性である。発症の時期により周産期型，乳幼児型，小児型，成人型，歯限局型に分類され，歯科学的には乳歯の早期脱落を特徴としており，時折これが主たる現症となっている。本症における乳歯の早期脱落はかなり高い頻度で発現し，幼児型の患児の 75％以上にみられるという報告もある。骨疾患の顕著でないものでは，この歯科的所見が唯一の特徴的な症状となるため，歯科医が本疾患を最初に発見することも稀ではない[1]。しかし，歯科では一般的に血液検査は行わないので，TNSALP の変異による歯牙に限局した症例は見過ごされている可能性がある。

組織非特異型アルカリホスファターゼ（TNSALP）は骨の形成に重要な役割を果たしていることが以前から推測されていたが，1988 年に骨の石灰化不全を主症状とする低ホスファターゼ症の原因遺伝子が TNSALP 遺伝子であることが明らかとなり，石灰化におけるその重要性が確立した。また，患者や TNSALP ノックアウトマウスの体液中でホスホエタノールアミン，無機ピロリン酸，ピリドキサールリン酸が著しく増加することが報告され，それらは TNSALP の天然での基質である可能性が高い。3 種のリン酸化合物の中でもハイドロキシアパタイト形成の結晶毒として知られる無機ピロリン酸を TNSALP が分解することで石灰化を促進しているという説が本酵素の生理的な機能として有力になってきている。

Ⅱ. 目　　的

ヒト TNSALP は名前の通り他の組織特異型アイソザイム（小腸型，胎盤型，生殖細胞型）とは異なり，肝臓，骨，腎臓，精巣，線維芽細胞，マクロファージなどの細胞に広く発現しており，別名肝／骨／腎型酵素とも呼ばれる。現在まで 184 もの変異が同定されているが，その突然変異の 80％はミスセンス変異であり，その他ナンセンス変異，フレームシフト変異なども知られている。その中でも 406 番目のバリン（V）がアラニン（A）に置換された突然変異は複合ヘテロ接合体（V406A/A99T）として，2001 年に周産期型症例で報告された症例の変異である。406 番目のアミノ酸は TNSALP 構造のクラウン領域に位置するが，このクラウン領域は哺乳類以外のアルカリホスファターゼには存在しない領域であり，コラーゲンと相互作用する部位であると考えられている。また基質小胞から抽出された TNSALP はこのコラーゲン分子との結合によって有機性基質に対する親和性が増加することも報告されている。従って，本変異は TNSALP 分子構造と機能に何らかの影響を引き起こすと想定される。本研究では低ホスファターゼ症の分子病態機序の解明を目的として，この変異酵素 TNSALP（V406A）（以下 V406A と略す）に注目し，細胞及び酵素レベルでの検討を行った。

Ⅲ. 方　　法

野生型酵素の cDNA を鋳型に，変異酵素 V406A を部位特異的突然変異法を用いて作製した[2]。始めに COS-1 細胞を用いた一過性の過剰発現の実験系において解析を行い，さらに，より正常に近い発現系である条件発現細胞株（以下 Tet-On 細胞と略す）を樹立した。方法とし

て，*p*-ニトロフェノールを基質として用いた酵素の定量，アゾ色素法による定性的な組織化学的染色，蛍光抗体染色，放射性アミノ酸標識 - 免疫沈降法，ウエスタンブロッティング法を用いた。また，野生型と変異酵素を酵素学的に厳密に比較検討する目的で野生型酵素と V406A の両酵素を分泌型の酵素として COS-1 細胞に大量に発現させた後，精製してその酵素学的な性格付けを行った。

Ⅳ. 結果と考察

アルカリホスファターゼ活性の定性的な組織化学的染色により V406A は野生型と同様に細胞膜表面に局在することが観察されたが，但し，その染色は野生型に比べて弱かった（図 1A）。さらに放射性のアミノ酸を用いた生合成実験（免疫沈降 /SDS-PAGE）および PI-PLC（ホスファチジルイノシトール特異的ホスホリパーゼ C）消化実験によって，V406A は 80 kDa の成熟型酵素として細胞表面に GPI（グリコシルホスファチジルイノシトール）アンカーを介して結合していることが明らかになった。一方，*p*-ニトロフェノールを基質として用いた酵素の定量，ウエスタンブロッティングによる発現される分子種の量比の検討から，野生型を発現する細胞に比べて変異酵素を発現する細胞はアルカリホスファターゼ活性が低いことが明らかになった（図 1B）。

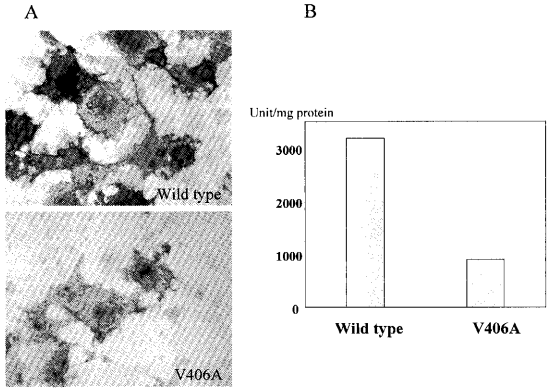


図 1　野生型酵素と変異酵素 V406A におけるアルカリホスファターゼ活性

培地中のドキシサイクリンに依存して TNSALP（V406A）を発現する CHO-K1 細胞を樹立し，ドキシサイクリンの存在，非存在下の条件で培養した際の発現の比較を蛍光抗体染色及びアルカリホスファターゼ活性染色にて行った。ドキシサイクリンを添加した細胞では TNSALP（V406A）は細胞膜表面に局在が認められた（図 2，左上）。同様に，アルカリホスファターゼ活性染色においても，蛍光抗体染色の結果と一致して，細胞膜表面に活性が発現していた（図 2，左下）。一方，ドキシサイクリンを添加しないで培養した細胞はどちらの染色法によっても染まらなかった（図 2，右上下）。この樹立細胞でのパルス - チェイス実験 /Endo H 処理により，新生分子の大半は野生型とほぼ同じ速度で細胞内を移動することが判明したが，そのごく一部は小胞体からゴルジ装置への移行が野生型に比べて遅延していることが明らかになった（図 3）。これらの分子はチェイス 2 時間が経過しても未熟型の分子種として存在することから，適正な立体構造を保持していないために小胞体からゴルジ装置へ運ばれない可能性があり，アミノ酸の置換がわずかではあるがフォールデイングに影響することを示唆している。さらに，アルカリホスファターゼの比活性を比較したところ，V406A を発現する Tet-On 細胞の比活性は野生型のそれの約 7 % にすぎなかった。従って，406 番目のバリンからアラニンへの置換が酵素の触媒活性に強く影響している可能性が大きいと考えられた。

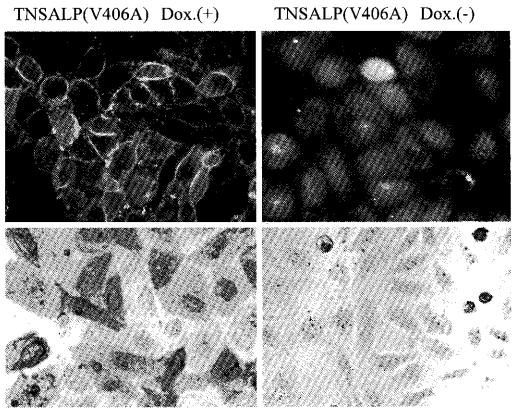


図 2　Tet-On 樹立細胞での V406A の発現

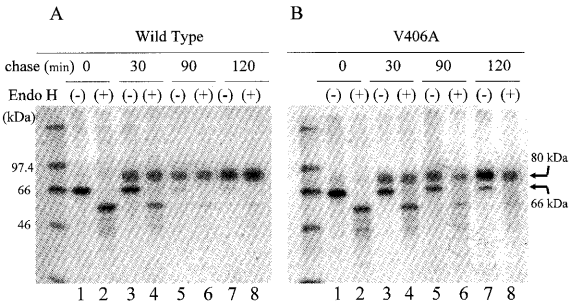
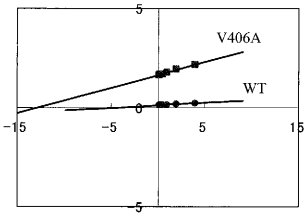


図 3　EndoH 酵素消化実験

酵素学的な比較検討では，Km 値に大きな差は認められなかったが，Kcat 値は野生型に比べて著しく低い値をとり，また Kcat/Km 値からも V406A の触媒作用の効率は 10 分の 1 以下に低下していることが判明した（図 4）。

以上のことから，本ミスセンス変異では他の重症例の低ホスファターゼ症で報告された変異（R54C, N153D,

A162T, E218G, D289V）に比較してその生合成への影響は軽微であり，むしろ触媒活性を強く低下させることが明らかになった。従って，この患者の骨芽細胞や軟骨細胞では細胞の表面に酵素分子は存在するもののその触媒活性は著しく低下しているために，ハイドロキシアパタイト形成の阻害物質である無機のピロリン酸を分解できずに石灰化が抑制されると推測される。



	WT	V406A
Km	0.21	0.08
Kcat	9.7×10^2	32.1
Kcat/Km	4.6×10^3	4.1×10^2

図4　酵素反応速度の解析

V. 文　献

1．井上 美津子，鈴木 駿介，中田 稔：低ホスファターゼ症の1症例の歯科的所見 小児歯科学雑誌 1997; 15（1）：62-69.

2．Ishida Y, Komaru K, Ito M, Amaya Y, Kohno S, Oda K.: Tissue-nonspecific alkaline phosphatase with an Asp（289）→ Val mutation fails to reach the cell surface and undergoes proteasome-mediated degradation. J. Biochem. 2003; 134: 67-70.