

---

石灰化不全を伴う先天性遺伝疾患の分子病理学的解析

---

研究課題番号 16591854

平成16年度～平成17年度科学研究費補助金  
[基盤研究(C)(2)] 研究成果報告書

平成18年3月

新潟大学附属図書館



2060005590

研究代表者 織田公光  
(新潟大学医歯学系 教授)

NSU  
No. 3  
2002-05

## はしがき

低ホスファターゼ症は稀な先天性骨代謝異常症で、生化学的には血中のアルカリホスファターゼ活性の低下が特徴であり、その原因は組織非特異型アルカリホスファターゼ (tissue-nonspecific alkaline phosphatase, TNSALP) 遺伝子上の突然変異に起因することが知られている。症状は広範囲にわたっているが重症例では著しい硬組織の低石灰が原因でしばしば致死性であり、軽症例では偽骨折や乳歯の早期脱落などが報告されている。従って、このような臨床症状は TNSALP が骨や歯の石灰化やその維持に関与することを物語っている。2005年11月現在178の突然変異が TNSALP 遺伝子上に報告されている。しかしながら、突然変異が TNSALP タンパク分子にどのような影響を与えるかに関して詳細に解析した例は限られており、さらには分子レベルの変化がどのようにして様々な臨床症状を引き起こすのか、その分子病態機序の研究は緒に就いたばかりである。当研究室ではこの数年、患者で報告された変異酵素のタンパク分子としての異常性 (分子欠陥) について細胞生物学的手法を用いて研究を行って成果を挙げてきており、本研究はその研究の一環として行われた。

## 研究組織

- 研究代表者：織田 公光 (新潟大学医歯学系教授)
- 研究分担者：天谷 吉宏 (新潟大学医歯学系助教授)
- 網塚 憲生 (新潟大学超域研究機構教授)

- (研究協力者)：石田 陽子 (新潟大学医歯学系助手)
- 小丸 圭一 (新潟大学大学院医歯学総合研究科)
- 沼 奈津子 (新潟大学大学院医歯学総合研究科)
- 那須 真紀子 (新潟大学大学院医歯学総合研究)

## 交付決定額 (配分額)

(金額単位：千円)

	直接経費	間接経費	合計
平成16年度	2,100	0	2,100
平成17年度	1,200	0	1,200
総計	3,300	0	3,300

## 研究発表

### 学会誌

- 1) Komaru K, Ishida Y, Amaya Y, Goseki-Sone M., Orimo H, **Oda K**: Novel aggregate formation of a frame-shift mutant protein of tissue-nonspecific alkaline phosphatase is ascribed to three cysteine residues in the C-terminal extension. Retarded secretion and proteasomal degradation.  
FEBS J. (formerly Eur. J. Biochem.), 272: 1704-1717, 2005.
  
- 2) Nakano Y, Beertsen W, VanDenBos T, Kawamoto T, **Oda K**, Takano Y :Site-specific localization of two distinct phosphatases along the osteoblast plasma membrane tissue non-specific alkaline phosphatase and plasma membrane calcium ATPase.  
Bone, 35:1077-1085, 2004.
  
- 3) Asawa Y, Amizuka N, Hara K, Kobayashi M, Aita M, Li M, Kenmotsu S, **Oda K**, Akiyama Y, Ozawa H:  
Histochemical evaluation for the biological effect of menatetrenone on metaphyseal trabeculae of ovariectomized rats.  
Bone, 35: 870-880, 2004.
  
- 4) Li M, Amizuka N, **Oda K**, Tokunaga K, Ito T, Takeuchi, K, Takagi R, Maeda T: Histochemical evidence of the initial chondrogenesis and osteogenesis in the periosteum of a rib fractured model Implication of osteocyte involvement in periosteal chondrogenesis. Micros. Res. Tech. 64:330-342, 2004
  
- 5) Taguchi Y, Amizuka, N., Nakadate M, Ohnishi H, Fujii N, **Oda K**, Nomura S, Maeda, T: A histological evaluation for guided bone regeneration induced by collagenous membrane. Biomaterials, 26 (31):6158-6166, 2005.
  
- 6) Hossain KS, Amizuka N, Ikeda N, Nozawa-Inoue K, Suzuki A, Li M, Takeuchi K, Aita M, Kawano Y, Hoshino M, **Oda K**, Takagi R, Maeda T.: Histochemical evidences on the chronological alterations of the hypertrophic zone of mandibular condylar cartilage.  
Microsc. Res. Tech., 67(6):325-335, 2005.
  
- 7) Li M, Amizuka N, Takeuchi, K, Freitas PH, Kawano Y, Hoshino M, **Oda K**, Nozawa-Inoue K, Maeda T:

Histochemical evidence of osteoclastic degradation of extracellular matrix in osteolytic metastasis originating from human lung small carcinoma (SBC-5) cells.

Micros. Res. Tech. 69 (2):73-83, 2006

8) Suzuki H., Amizuka N., Oda K, Li M, Yoshie H, Ohshima H, Noda M, Maeda T:

Histological evidence of the altered distribution of osteocytes and bone matrix synthesis in klotho-deficient mice.

Arch. Histol. Cytol. 68 (5): 371-381, 2005

### 学会報告

- 1) 天谷吉宏, 三浦 恵, 中井俊樹, 織田公光: レポータータンパク質が副甲状腺ホルモン関連ペプチド融合タンパク質の小胞体膜透過制御に及ぼす影響. 横浜, 2004年10月15日, 第77回日本生化学会大会プログラム号, 76(8), 237頁, 2004年.
- 2) 石田陽子, 天谷吉宏, 織田公光: 優性遺伝性低ホスファターゼ症を引き起こす変異型組織非特異型アルカリホスファターゼ 99Ala->Thr の解析. 横浜, 2004年10月16日, 第77回日本生化学会大会プログラム号, 76(8), 319頁, 2004年.
- 3) 石田陽子, 河野正司, 織田公光: 低ホスファターゼ症によって石灰化不全はなぜ起こるか. 横浜, 2004年10月31日, 日本歯科医師会雑誌, 57(4), 415頁, 2004年.
- 4) Hocchi K, Ohashi T, Sato T, **Oda K**: An ELISA system for semi-quantitative detection of tissue non-specific alkaline phosphatase and IgG complexes. 新潟, 2004年11月13日, 新潟歯学会雑誌, 34(2), 125頁, 2004年
- 5) Hossain KS, Ikeda N, Nozawa-Inoue K, Amizuka N, **Oda K**, Takagi R, Maeda T: A histochemical study in the developing mouse condylar cartilage. 第17回日本顎関節学会総会・学術大会, 新潟, 2004年7月3-5日, 日本顎関節学会雑誌(抄録集): 126, 2004.
- 6) Hossain KS, Ikeda N, Nozawa-Inoue K, Amizuka N, **Oda K**, Takagi R, Maeda T: A histochemical study in the developing mouse mandibular condylar cartilage. 平成16年度新潟歯学会第1回例会, 新潟, 2004

年7月10日, 新潟歯学会雑誌, 34(2):132頁, 2004.

- 7) 李 敏啓, 網塚憲生, 織田公光, 河野芳朗, 竹内亀一, 高木律男, 前田健康: 肺癌骨転移モデルマウスにおいて破骨細胞が産生する基質分解酵素の組織化学的検討. 第22回日本骨代謝学会, 大阪, 2004年8月5-7日, 日本骨代謝学会誌(プログラム抄録集): 201頁, 2004.
- 8) 鈴木啓展, 網塚憲生, 織田公光, 野田政樹, 吉江弘正, 前田健康: klotho欠損マウスの象牙芽細胞と骨細胞における組織学的異常について. 第22回日本骨代謝学会, 大阪, 2004年8月5-7日, 日本骨代謝学会誌(プログラム抄録集): 202頁, 2004.
- 9) Hossain KS, Ikeda N, Nozawa-Inoue K, Amizuka N, Oda K, Takagi R, Maeda, T.: A histochemical investigation in the mandibular condylar cartilage of postnatal mice. 第22回日本骨代謝学会, 大阪, 2004年8月5-7日, 日本骨代謝学会誌(プログラム抄録集): 204頁, 2004.
- 10) Hossain KS, 池田順行, 野澤-井上佳世子, 網塚憲生, 織田公光, 高木律男, 前田健康: Histochemical changes of the hypertrophic zone in developing mouse mandibular condyle. 第46回歯科基礎医学会学術大会・総会, 広島, 2004年9月23-25日, 歯科基礎医学会雑誌, 46(5): 396頁, 2004.
- 11) 李 敏啓, 網塚憲生, 織田公光, 河野芳朗, 竹内亀一, 那須真樹子, 小島 拓, 高木律男, 前田健康: 破骨細胞が産生する cathepsin K と MMP-9 の局在について—肺癌骨転移モデルを用いた検討—. 第46回歯科基礎医学会学術大会・総会, 広島, 2004年9月23-25日, 歯科基礎医学会雑誌, 46(5): 405頁, 2004.
- 12) 鈴木啓展, 網塚憲生, 織田公光, 野田政樹, 大島勇人, 前田健康: klotho欠損マウスの骨細胞における組織学的異常について. 第46回歯科基礎医学会学術大会・総会, 広島, 2004年9月23-25日, 歯科基礎医学会雑誌, 46(5): 405頁, 2004.
- 13) 李 敏啓, 網塚憲生, 織田公光, 河野芳朗, 竹内亀一, 前田健康: 肺癌骨転移病巣において破骨細胞が産生する cathepsin K と MMP-9 の局在. 平成16年度新潟歯学会第2回例会, 新潟, 2004年11月13日, 新潟歯学会雑誌, 34(2): 123頁, 2004.
- 14) 沼 奈津子, 石田陽子, 那須真樹子, 野田 忠, 織田公光: 突然変異型アルカリホスファターゼ (Val406Ala)の細胞生物学的解析. 仙台, 2005年9月30日, 第47回歯科基礎医学会学術大会ならび

に総会, 47(Suppl), 160 頁, 2005 年.

- 15) 石田陽子, 天谷吉宏, 織田公光: 常染色体優性遺伝される組織非特異型アルカリホスファターゼ 99Ala->Thr の解析. 神戸, 2005 年 10 月 22 日, 第 78 回日本生化学会大会プログラム号, 77(8), 283 頁, 2005 年.
- 16) 沼 奈津子, 石田陽子, 那須真樹子, 野田 忠, 織田公光: 突然変異型アルカリホスファターゼ(Val406Ala)の細胞生物学的解析. 新潟, 2005 年 11 月 5 日, 新潟歯学会第 2 回例会, 2005 年.
- 17) Li M, Amizuka N, Oda K, Kawano Y, Takeuchi K, Maeda T: Osteoclastic migration and matrix-degradation in osteolytic metastasis. 2<sup>nd</sup> Joint Meeting of the International Bone and Mineral Society and the European Society for Calcified Tissue. Geneva, Switzerland, 2005. 6. 25-29. Bone, 36 (Suppl 2): S206, 2005.

#### 研究会発表

- 1) 石田陽子, 織田公光: Characterization of tissue-nonspecific alkaline phosphatase with a substitution of 99Ala->Thr, which is transmitted dominantly. 東京, 2005 年 7 月 30 日, 第 6 回 ALPS 研究会抄録 11 頁, 2005 年.
- 2) 発地和夫, 織田公光, 佐藤豊二他: ELISA system for semi-quantitative detection of tissue non-specific alkaline phosphatase and IgG complexes 東京, 2005 年 7 月 30 日, 第 6 回 ALPS 研究会抄録 18 頁, 2005 年.

#### 研究成果による工業所有権の出願・取得状況

該当無し.

## 研究成果の要約

### 1. TNSALP(1559delT)の解析

1559番目のチミンの欠失によるフレームシフト変異をウサギの網状赤血球ライゼーの転写/翻訳系で検討し、変異型は野生型酵素 (57 kDa) に比べてサイズが12 kDa大きいことを示した。1559番目のチミンの欠失はフレームシフトにより503番目のロイシン残基がアルギニン残基に変換されるとともに、508番目の停止コドンを見失わせることから野生型酵素に比べてC末端側に80残基長い変異酵素の合成の可能性が予測されていたが、その予想分子サイズと一致した。また、COS-1細胞での発現において、野生型がGlycosylphosphatidylinositolによる修飾のために膜結合性であるのに対して、1559delTは可溶性の分泌酵素となり、しかもごく一部は培地中へ分泌されることを見出した。また、ジスルフィド結合による高分子量の凝集物を形成しているにもかかわらず活性を保持していることから、触媒活性に関与する立体構造はおおよそ保持されているが、延長ペプチド領域にある3つのシステイン残基間でのランダムな架橋が示唆された。また、生合成された大部分のタンパク質はポリユビキチン化を受けた後にプロテアソームで分解されることも明らかにしている (業績 1)。さらに、上述の一過性の発現系に加えて、1559delTを発現するTet-On CHO細胞の樹立に成功し、特に透過性の還元剤であるジチオスレイトールの存在下に生合成実験を行ったところ細胞外への分泌がほとんど起こらず、逆に細胞内での分解の促進が見られた。

### 2. ミスセンス突然変異(A99T)の解析

低ホスファターゼ症は常染色体 (1 番) に存在する TNSALP 遺伝子の変異に起因しその多くは劣性形式で遺伝するが、ごく一部の軽症例においては優性遺伝することが知られている。本研究においては患者の家系の詳しい調査に基づき優性遺伝することが知られている 99 番目のアラニンがトレオニンに置換されたミスセンス点突然変異について研究を遂行した。本研究では COS-1 での一過性の発現系に加えて、上述した樹立した Tet-On CHO 細胞でより正常に近い条件での解析が可能となった。まず、A99T はいずれの系での発現によっても活性を全く失っていることがわかった。しかも、合成された多くの分子が細胞表面に 80 kD の成熟型分子として GPI を介して発現していることから考えて、99 番目のアラニン残基が酵素の触媒活性に重要な役割を果たしていることが示唆された。ただし、詳細に解析すると 80 kD のサブユニットからなる 2 量体のほかにもジスルフィド結合で会合した高分子量の凝集物も細胞表面に観察されることから、これまで当研究室で解析を終えた重症例の多くで観察されたと同じく、アミノ酸の置換は酵素のフォールディング/会合の過程にも一部影響を及ぼすことがわかった。次に、

それぞれ異なったタグ配列 (His6, FLAG) を C 末端に有する分泌型の野生型酵素と A99T を COS-1 細胞に発現し、培地中に回収した酵素をイムノブロッティングで解析したところ、野生型、変異型のサブユニットからなるヘテロ酵素の形成を認めた。このことは A99T が優性遺伝することを分子レベルで説明するものであり、対象として発現させた劣性遺伝することが知られている D289V と野生型ではヘテロマーの形成は認められなかった。

### 3. その他研究

学内（研究発表：4－8）および学外（研究発表：2，3）の研究グループと共同研究をおこない、TNSALP 分子を指標に様々な実験条件下で骨芽細胞の出現、増殖を主に形態学的に観察した。

### 謝辞

本研究の遂行にあたっては、研究協力者として石田陽子助手並びに新潟大学大学院総合研究科の大学院生諸氏、さらには水野 尚<sup>敬</sup>先生にご協力をいただき、ここに感謝申し上げます。