

氏名 ぬま なつこ
沼 奈津子
学位 博士 (歯学)
学位記番号 新大院博 (歯) 第 49 号
学位授与の日付 平成 18 年 3 月 23 日
学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当
博士論文名

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

論文審査委員 主査 教授 織田 公光
副査 教授 野田 忠
教授 朔 敬

博士論文の要旨

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。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) の突然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。現在まで 178 もの変異が同定されているが、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。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。

まず、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った。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。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

ロッキ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。

COS-1 細胞を用いた過剰発現の系では、GPI アンカーの前駆体が不足するために野生型の酵素においても GPI アンカーで修飾されない酵素分子が生じることが最近明らかになり、これらの分子は高分子の凝集物を形成することがすでに分かっている。また、一過性の過剰発現系では細胞内輸送が野生型酵素を含めて全般的に遅延することが大きな問題となるため、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）を樹立して解析を行った。樹立した細胞では V406A の発現は培地へのドキシサイクリン（テトラサイクリンの誘導体）の添加に依存しており、一過性の発現と同じく V406A は細胞表面に GPI アンカーを介して結合していることが確認された。ドキシサイクリン添加により誘導された Tet-On 細胞での詳細なパルス・チェイス実験/低温下での TX-100 を用いた抽出操作からゴルジ装置での脂質ラフトへの挿入のタイミングに関して野生型と変異酵素で差は認められなかった。一方、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。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ィ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。

次に、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。その結果、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、Kcat/Km を比較すると V406A の触媒作用の効率は野生型と比較して 10 分の 1 以下であることが判明した。

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。

審査結果の要旨

本論文は、周産期型の低ホスファターゼ症の患者で報告された組織非特異型アルカリホスファターゼ (TNSALP) 遺伝子の点突然変異 (1268T>C) に起因するミスセンス突然変異 (V406A) が本酵素の

性質に及ぼす影響を検討したものである。申請者はまず野生型の TNSALP の cDNA を鋳型にして部位特異的な突然変異法を用いて変異型酵素をコードする cDNA を作製し、次に哺乳動物由来の細胞系にトランスフェクトすることで発現した変異酵素と野生型酵素との比較検討を行っている。特に COS-1 細胞での一過性の発現系に加えて、Tet-ON CHO-K1 細胞を使った条件発現細胞系を樹立し、前者の過剰発現に伴うデメリットを克服してより詳細な解析を行った点が評価できる。その結果、組織化学染色、酵素活性の測定、放射性メチオニンを使った生合成実験、免疫ブロッティング法やホスファチジルイノシトール特異的ホスホリパーゼ C 処理など多角的なアプローチにより、変異型酵素は野生型酵素と同じく成熟型の 80 kDa の分子とし glycosylphosphatidylinositol (GPI) を介して細胞表面にアンカーされることを示した。また、細胞内の移行の速度もパルス・チェイス実験とエンドグルコサミニダーゼ H 処理（アスパラギン結合糖鎖の修飾）や低温でのトリトン X-100 による抽出実験（ラフトへの酵素の会合）との組み合わせから野生型と変異型酵素ではほとんど差がないことを明らかにした上で、変異型酵素を発現する細胞のアルカリホスファターゼ活性が野生型のその 10 分の 1 に低下していることを見いだした。これらのことは、本変異型酵素の触媒活性がアミノ酸の置換により強く影響されることを示しており、変異酵素の細胞内輸送が著しく阻害される他の重症例のミスセンス変異と際立った違いが明らかになった。また、特筆すべき点は野生型と変異型の酵素を精製した上で酵素学的に解析した点である。一般に膜タンパク酵素はその精製が困難であることが知られているが、本実験では TNSALP を遺伝子操作でその C 末端側に His-tag を有する分泌性の酵素として培地から回収し、ニッケル・アフィニティーカラムで精製後、その解析を行っている。細胞のホモジネートを用いた実験結果に一致して変異酵素の触媒効率(Kcat/ Km)は野生型の 10 分の 1 にまで低下していることが確認された。

以上、本変異酵素を発現する患者ではその骨芽細胞や肥大軟骨細胞の表面に酵素が発現するにも係らずその触媒活性の低下による無機ピロリン酸・リン酸の濃度バランスの変化が原因で骨基質の石灰化の不全を引き起こされると推測された。本研究は低ホスファターゼ症の分子病態機序を解明する上で基礎的な知見であり、その博士論文としての価値を認める。