

ふりがな なす まきこ
氏 名 那須 真樹子
学 位 博士 (歯学)
学位記番号 新大院博 (歯) 甲 第 85 号
学位授与の日付 平成 19 年 3 月 22 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

Aberrant interchain disulfide bridge of tissue-nonspecific alkaline phosphatase with an Arg433→Cys substitution associated with severe hypophosphatasia
(低ホスファターゼ症におけるジスルフィド結合で架橋された組織非特異型アルカリホスファターゼ R433C の解析)

論文審査委員 主査 教授 織田 公光
 副査 教授 野村 修一
 教授 朔 敬

博士論文の要旨

低ホスファターゼ症は、骨や歯といった硬組織の低石灰化を特徴とする常染色体遺伝性疾患である。1948 年に Rothbun によって初めて報告され、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) の突然変異であることが既に知られている。低ホスファターゼ症はその重症度と発症時期によって、周産期型、乳児型、小児型、成人型、歯限局型に分類される。この疾患の生化学的な特徴は血清アルカリホスファターゼ活性の低下であり、低ホスファターゼ症患者における臨床的表現系とその酵素活性は深く関連している。一般的に血清中の酵素レベルが低ければ低いほど発症の時期が早く、しかも重篤な症状となりしばしば致死性である。現在までに世界中で 184 の TNSALP 遺伝子の変異が報告されており、その中で 433 番目のアルギニン (R) がシステイン (C) に置換された突然変異がホモ接合体として 1998 年に乳児致死型症例で、433 番目のアルギニンがヒスチジン (H) に置換された突然変異が複合ヘテロ接合体 (R433H/D389G) として 1999 年に歯限局型症例で報告された。そこで、本研究では低ホスファターゼ症発症機構解明の一助として、特に変異酵素 TNSALP (R433C) (以下 R433C と略す) に注目し、細胞及び酵素レベルでの解析を行った。

まず COS-1 細胞を用いた一過性発現の実験系において検討した。放射性アミノ酸を用いた生合成実験 (免疫沈降/SDS-PAGE) より、還元状態では 2 つの変異型 TNSALP は野生型同様、66kDa (未熟型) と 80kDa (成熟型) の分子種を示したが、非還元状態において

R433Cのみが130kDa（未熟型）や160kDa（成熟型）も発現していた。またホスファチジルイノシトール特異的ホスホリパーゼC (PI-PLC)による消化実験より、R433Hは野生型同様80kDaの成熟型として、R433Cは80kDaのみならず160kDaの成熟型としてもGPI（グリコシルホスファチジルイノシトール）アンカーを介して細胞膜表面に発現していることが確認できた。これらより、R433Cでは一部がジスルフィド結合でダイマー化されることが判明した。一方、p-ニトロフェニルリン酸を基質とした活性測定では、R433Cは野生型に比べ、約1/3の酵素活性しか示さなかったのに対し、R433Hは野生型と同等の触媒活性を示した。

次により生理的に近い状態で比較・検討するために条件発現細胞株であるCHO-K1 Tet-On細胞を樹立して解析を行った。この細胞は抗生物質ドキシサイクリン（テトラサイクリンの誘導体）により遺伝子の発現を調節できる。条件発現では一過性の発現に比べ、R433Cは非還元においてほとんどが130kDaまたは160kDaで存在していることが確認されると同時に、その比活性は野生型酵素を発現する細胞の1/20にまで低下していた。また、蛍光抗体染色、PI-PLC消化実験およびショ糖密度勾配より、R433Cはジスルフィド結合で架橋された2量体を形成して細胞膜上に発現していることが示された。さらにパルスーチェイス実験およびEndo H（エンド-β-N-アセチルグリコサミニダーゼH）処理実験より、ジスルフィド結合は小胞体で形成されるが、その後の細胞内輸送の速度は野生型分子とほとんど差が認められないことも明らかとなった。次にR433Cのジスルフィド結合による2量体の形成を阻害させるため、還元剤dithiothreitol（以下DTTと略す）を用い、その効果をウェスタンブロッティング法と活性測定により検討した。培養液中にDTTを加えることで80kDaの分子種が細胞内で著明に増加し、同時に酵素活性も上昇したことから、R433Cはジスルフィド結合を形成することでその触媒効率が低下すると考えられた。さらにR433Cは野生型に比べ、プロテアーゼに対する感受性がより高いことから、ジスルフィド結合はTNSALPの3次元構造に変化を与えていることが示唆された。

ところで、野生型TNSALPには5つのシステイン残基が存在し、そのうち102番目のシステイン残基だけがジスルフィド結合に関与せずに遊離の状態であることが明らかにされている。そのシステイン残基をセリンに変異させ、R433Cへの影響をCOS-1細胞にて調べた結果、102番目のシステインはR433Cへ影響を及ぼさないことが判明した。

これらの結果より、R433Cはサブユニット間にジスルフィド結合を形成することで立体構造の変化に伴って活性が極度に低下するため、細胞表面に発現するにもかかわらず、

審査結果の要旨

本研究は、組織非特異型アルカリホスファターゼ(tissue-nonspecific alkaline phosphatase, TNSALP) 遺伝子上の点突然変異 (1348C>T) により引き起こされた硬組織の先天性代謝異常疾患である低ホスファターゼ症 (重症例) の発症メカニズムを明らかにしたものである。患者は同一の変異を有するホモ型であった。具体的には、点突然変異の結果、TNSALP の 433 番目のアミノ酸であるアルギニンがシステインに変異するミスセンス変異 (R433C) が推測され、変異型酵素を哺乳動物細胞に発現することで、野生型の酵素との比較検討を種々の細胞生物学的な手法を用いて行っている。特筆すべき点は、従来の一過性の発現系に加えて Tet-On CHO 細胞を用いた発現系の導入で、これにより前者の過剰発現の欠点を補い、生理的な状態により近い発現量での詳細な解析が可能となった。本研究の結果、本来 TNSALP は非共有結合で会合した 2 量体であるのに対して、TNSALP (R433C) は変異によって置換されたシステイン残基間の架橋のためサブユニット間が共有結合していることが判明した。そして、TNSALP (R433C) は立体構造に著明な変化を起こしていることがプロテアーゼ消化に対する変異酵素の感受性の増大から示唆された。しかし、これまで報告された幾つかの重症型で見出されたミスセンス変異 (R54C, A162T, E218G, D289V, G317D) などとは異なり、TNSALP (R433C) は小胞体で合成されたのち細胞表面に野生型酵素とほぼ同じ効率で輸送されることがわかった。一方、酵素の触媒能の比較から TNSALP (R433C) は野生型に比べてその触媒効率が非常に低下していることが明らかになった。現在、骨や歯の主要な無機物であるヒドロキシアパタイトはその主要な構成成分であるリン酸イオンとカルシウムイオンが集まって結晶化されること (石灰化)、そして無機ピロリン酸が阻害物質として石灰化を制御していると考えられている。この図式の中で組織非特異型アルカリホスファターゼは無機のピロリン酸を加水分解し、阻害物質を除くとともにリン酸を供与することで石灰化を促進するというのが最近の定説である。従って、細胞の表面に到達するにも係らず、サブユニット間の異常な架橋のために触媒効率が低下した TNSALP (R433C) は石灰化部位で無機のピロリン酸を分解できないことが推定され、そのことが本遺伝子変異を有する患者の石灰化不全の主原因と考えられた。一方、同じく 433 番目のアルギニンがヒスチジンに変異した例が

酵素分子として野生型とほとんど同じ性質を示したことから、アルギニンからヒスチジンへの変異は酵素分子にほとんど影響しないことも合わせて申請者は見出した。

本研究内容は既に欧米の生化学雑誌 (FEBS Journal 273, 5612-5624, 2006) にも発表されており、学位論文としての価値を認める。