

学位研究紹介

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
Aberrant interchain disulfide bridge of tissue-nonspecific alkaline phosphatase with an Arg433 Cys substitution associated with severe hypophosphatasia

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 加齢歯科補綴学分野
那須 真樹子

Division of Oral Health in Aging and Fixed Prosthodontics,
Department of Oral Biological Science, Course for Oral Life
Science, Niigata University Graduate School of Medical and
Dental Sciences
Makiko Nasu

【背景】

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した遺伝性疾患で、組織非特異型アルカリホスファターゼ (tissue-nonspecific alkaline phosphatase, TNSALP) がその原因遺伝子であることがすでに知られている。低ホスファターゼ症はその重症度と発症時期により周産期型、乳幼児型、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 191 の TNSALP の変異が報告されており、このうちの約 80% がミスセンス変異である。アルカリホスファターゼは至適 pH がアルカリ性で、リン酸モノエステルをリン酸とアルコールに分解する基質特異性の低い酵素である。一般に細胞膜表面に膜アンカー型酵素として局在するエクトザイムであり、通常 dimer として酵素活性を發揮する。アルカリホスファターゼの活性低下が低石灰化を引き起こす機序については完全には理解されていないが、アルカリホスファターゼの活性低下にともない蓄積する inorganic

pyrophosphate が石灰化を障害することや、局所のリン酸濃度の低下が低石灰化の原因と考えられている。

【目的】

TNSALP の 433 番目のアミノ酸であるアルギニン (R) がシステイン (C) に変異し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) に変異し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。本研究では低ホスファターゼ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、分子生物学的手法を用いて解析を行った。

【方法】

部位特異的突然変異法を用いて、TNSALP (R433C, R433H) をコードする cDNA を作成し、COS-1 細胞にて野生型および本変異型タンパク質を一過性に発現させた。またより生理的な状態で比較・検討するため、野生型と R433C に関しては条件発現細胞株である CHO-K1 Tet-On 細胞を樹立して観察した。さらに野生型 TNSALP のなかで唯一遊離の状態である 102 番目のシステイン残基の R433C への影響を調べるため、C102S と R433C の double mutant cDNA を作成し COS-1 細胞に発現させた。具体的な方法としては放射性アミノ酸標識 / 免疫沈降法 (SDS/PAGE), *p*-ニトロフェニルリン酸を基質としたアルカリホスファターゼ活性測定、ウェスタンブロッティング、蛍光抗体染色を用いた。

【結果と考察】

COS-1 細胞において細胞内で合成された TNSALP の存在を免疫沈降法にて確認したところ、還元状態では野生型 (Wild) と 2 つの変異型はともに 66kDa (未熟型) と 80kDa (成熟型) を示したが、非還元状態において変異型 R433C では 130kDa (未熟型) や 160kDa (成熟型) も発現していた。これより R433C では一部がジスルフィド結合でダイマー化していることが推測される。(図 1) また PI-PLC 処理により GPI アンカーを切断し TNSALP を細胞膜から遊離させると、Wild, R433H は培地中に 80kDa の成熟型が遊離した。一方 R433C は 80kDa および 160kDa の成熟型がともに遊離するのが確

認できたことより, R433C はダイマー化していても細胞膜表面に発現していることがわかる。(図2) 一方, 酵素活性は R433C が Wild に比べ約 1 / 3 の活性しか示さないのに対し, R433H は Wild に比べて高い触媒活性を示した。(図3)

CHO-K1 Tet-On 細胞は抗生物質 Dox (doxycyclin) により遺伝子の発現を調節でき, Dox を添加することではじめて遺伝子を発現させることができる。この条件発現では R433C は非還元においてほとんどが 130kDa または 160kDa で存在しており, その比活性は Wild の約 1 / 20 にまで低下していた。また蛍光抗体染色より R433C は CHO-K1 Tet-On 細胞においても細胞膜上に発現していることがわかった。さらにパルスチェイス実験および EndoH 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ダイマーの形成を阻害させるため, 還元剤 dithiothreitol (DTT) を用い, その効果をウェスタンブロットング(図4(A))と酵素活性(図4(B))により検討した。DTT を加えることで 80kDa の分子種が出現し, 同時に酵素活性も上昇したことより, R433C はジスルフィド結合を形成することでその触媒活性が低下すると考えられた。また

R433C は Wild に比べプロテアーゼに対する感受性がより高いことより, ジスルフィド結合は TNSALP の 3 次元的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すでにわかっている。その 102 番目のシステイン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とともに活性が極度に減少するため, 細胞表面に発現するにもかかわらず, 重症の低ホスファターゼ症を引き起こすと考えられる。

【文 献】

Makiko Nasu, Masahiro Ito, Yoko Ishida, Natsuko Numa, Keiichi Komaru, Shuichi Nomura and Kimimitsu Oda : Aberrant interchain disulfide bridge of tissue-nonspecific alkaline phosphatase with an Arg433 Cys substitution associated with severe hypophosphatasia. FEBS Journal, 273 : 5612-5624, 2006.

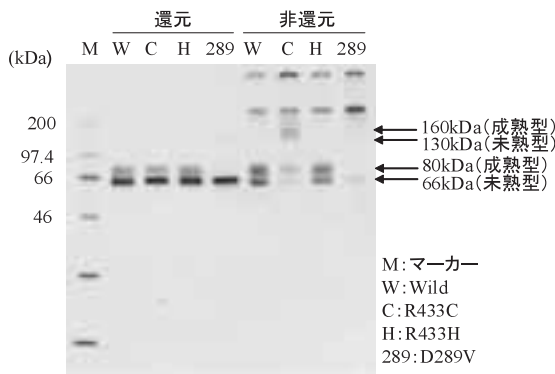


図1 COS-1 細胞における TNSALP の生合成

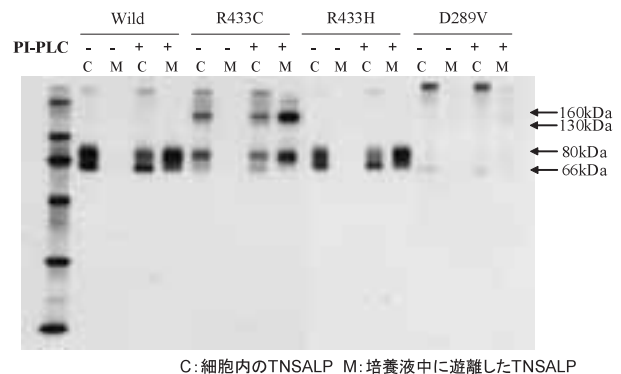


図2 TNSALP の細胞表面への発現 (PI-PLC の処理)

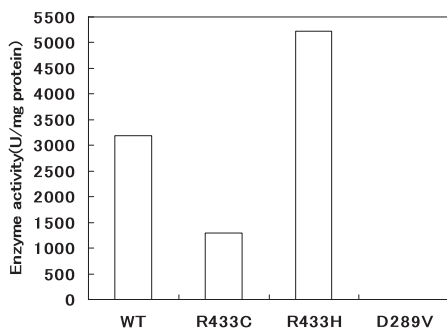


図3 酵素活性

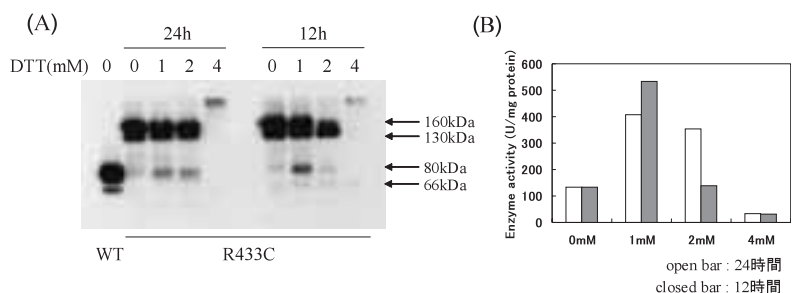


図4 変異型 TNSALP (R433C) の合成時における還元剤 DTT の効果