

学位研究紹介

変異型組織非特異型アルカリホスファターゼ (Asp²⁸⁹ Val) は細胞表面に到達せずプロテアソームで分解を受ける
Tissue-nonspecific alkaline phosphatase with an Asp289->Val mutation fails to reach the cell surface and undergoes proteasome-mediated degradation

新潟大学 大学院医歯学総合研究科
口腔生化学・摂食機能再建学

石田 陽子

Division of Oral Biochemistry, Removable Prosthodontics,
Niigata University Graduate School of
Medical and Dental Sciences
Yoko ISHIDA

背景

組織非特異型アルカリホスファターゼ (tissue-nonspecific alkaline phosphatase; TNSALP) は、グリコシルホスファチジルイノシトール (GPI) を介して細胞膜にアンカーされている酵素である。本酵素の生理的な役割として、硬組織石灰化、つまり歯や骨の形成と維持に関わるという仮説が *in vitro* の実験系により古くから唱えられてきた。さらに、TNSALP 遺伝子の突然変異により骨代謝に先天性異常をもつ「低ホスファターゼ症」が知られたことから、疾患レベルにおいても硬組織における TNSALP の重要性が裏付けられている。

最近、ヒト胎盤型 ALP の X 線解析による立体構造を基に、ヒト ALP の他の 3 種のアイソザイム (組織非特異型、小腸型、生殖細胞型) の 3 次元立体構造モデルが提出された。その著しい特徴は、大腸菌から哺乳類への進化の過程で、ALP が 4 個目の金属イオンであるカルシウムイオンの結合部位を獲得したことが挙げられる。大腸菌、哺乳類の ALP に共通してみられる 2 個の亜鉛イオンと 1 個のマグネシウムイオンは触媒活性に必須な金属イオンであり、進化的に保存されているが、カルシウムイオンの生理的意義はまだ明らかではない。

目的

低ホスファターゼ症は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、odonto 型の 5 つに分類される疾患である。1999 年に、Asp289 Val 変異 (D289V) を有し、周産期致死型低ホスファターゼ症と診断されたホモ接合体患者が報告された。289 番目のアスパラギン酸側鎖におけるカルボキシル基はカルシウムイオンの結合に直接的に関わっていると推定されるため、アスパラギン酸残基からバリン残基への置換は TNSALP がカルシウムイオンに結合するのを妨げる可能性が考えられる。本研究では、Asp289 Val 変異酵素の分子の欠陥を分子生物学的手法で明らかにすることを目的とした。

方法

野生型酵素の cDNA を鋳型に、変異酵素 D289V を部位特異的突然変異法を用いて作製し、COS-1 細胞に発現させた。これらの細胞に対し、野生型と変異型について、酵素活性・細胞内局在・分子への糖鎖修飾の差異を比較検討した。方法として、p-ニトロフェニルリン酸を基質とした活性測定、アゾ色素法による活性染色、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、変異タンパク質の分解経路については、ユビキチン-プロテアソーム系の関与を検討するため、抗 TNSALP 抗体で免疫沈降した変異酵素をユビキチン抗体によるウエスタンブロッティングで検出を試みた。また、同じくカルシウムイオンの配位に関係する 218 番目のグルタミン酸がグリシンに置換した Glu218 Gly 変異酵素 (E218G) についても解析を行った。

結果と考察

変異酵素 D289V は、野生型のような分子量 80kDa の成熟型タンパク質がみられず、66kDa の未熟型タンパク質のみを発現していた。未熟型タンパク質は、高分子凝集体を形成しており、酵素活性をまったく示さなかった (図 1A,B)。蛍光抗体染色では、野生型が細胞表面に発現するのに対して、大部分が小胞体に局在していた (図 2)。さらに、パルス/チェイス実験により、変異酵素はチェイス中を通して酵素エンド H (エンド-N-ア

セチルグルコサミニダーゼH)に感受性であることから、中間ゴルジ囊に到達できないことが示唆された。

また、変異酵素 D289V は、3 時間以上経過すると、半分以上が分解されていた。その分解経路を知るためにプロテアソーム阻害剤である LLnL を添加すると、分解が顕著に阻害された(図3)。さらに、プロテアソームでの分解に先んじて起こるとされている、ユビキチン化を免疫沈降 / ウェスタンブロットング法にて解析したところ、変異酵素 D289V には多数のユビキチンが結合していることが明らかとなった(図4)。

これらのことより、変異酵素 D289V は、生合成後、適切な成熟化を受けず、次々とユビキチン / プロテアソーム分解系へと送られることが示された。組織非特異型アルカリホスファターゼ遺伝子に本変異を有すると、骨芽細胞に発現されないことから、硬組織石灰化に対し酵素の正しい機能が発揮されないと考えられる。

また変異酵素 E218G についても、やはりポリユビキチン化を受けプロテアソームで分解されることを示した。これらの結果から、本酵素分子のフォールディングや会合においてカルシウムイオン結合が必須であり、結合能を喪失した変異酵素は正常な立体構造の構築による触媒能の獲得ができずに異常タンパク質として細胞内で分解されるために(図5)、低ホスファターゼ症を引き起こすものと考察された。

文献

- 1) Taillandier A et al. : Twelve novel mutations in the tissue-nonspecific alkaline phosphatase gene (ALPL) in patients with various forms of hypophosphatasia. Hum Mutat, 13:171-172, 1999
- 2) Ishida Y et al. : Tissue-nonspecific alkaline phosphatase with an Asp289->Val mutation fails to reach the cell surface and undergoes proteasome-mediated degradation. J Biochem (Tokyo), 134: 63-70, 2003

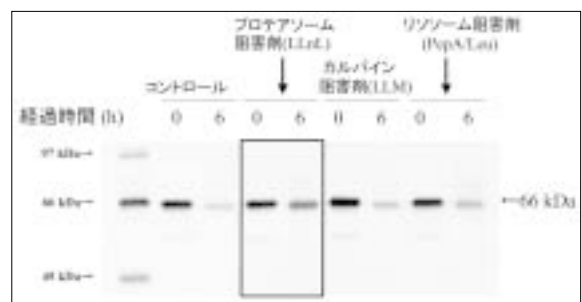


図3 . 変異酵素 D289V はプロテアソーム阻害剤により分解が抑制される

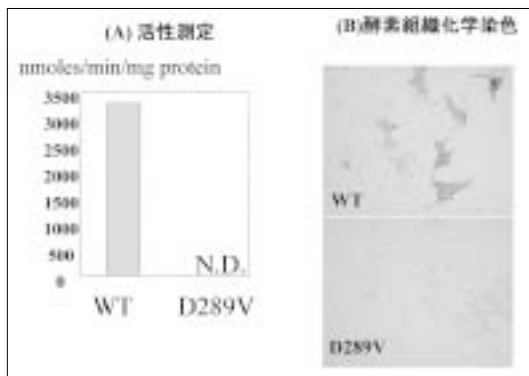


図1 . 野生型酵素と変異酵素 D289V におけるアルカリホスファターゼ活性

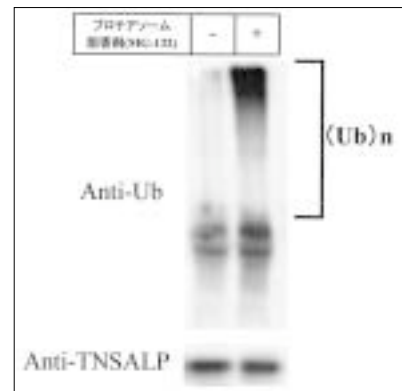


図4 . 変異酵素 D289V はポリユビキチン化を受ける

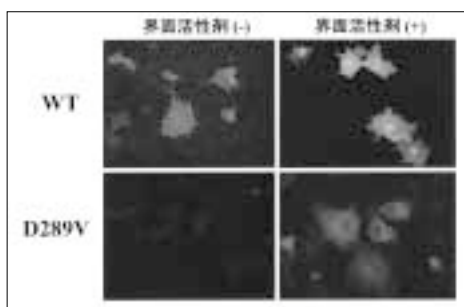


図2 . 蛍光抗体染色法による酵素の細胞内局在
細胞表面(界面活性剤(-)),細胞内(界面活性剤(+))

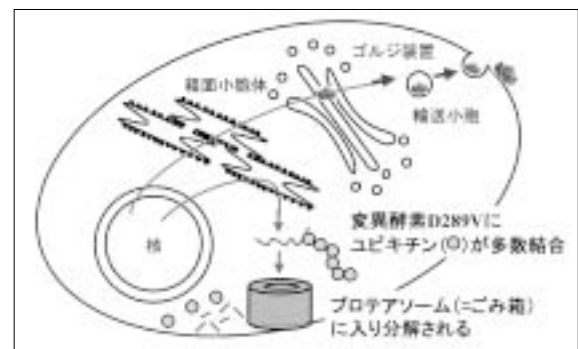


図5 . 野生型酵素と変異酵素 D289V の細胞内輸送の違いを示した模式図