

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 24 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590344

研究課題名（和文） Tysnd1 の機能解析とその病態発症ネットワーク

研究課題名（英文） Functional analysis of Tysnd1 and its pathogenic mechanism

研究代表者

岡崎 康司（OKAZAKI YASUSHI）

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号：80280733

研究成果の概要（和文）：

これまでに我々は Tysnd1 がペルオキシソームで働くプロテアーゼであることを証明した。本研究では Tysnd1 の生体内での機能を明らかにするために、Tysnd1 欠損マウスを作製し、その表現型を解析した。Tysnd1 欠損マウスは超長鎖脂肪酸やフィタン酸の代謝活性が低下していた。また、プラスマローゲン合成能の低下が原因と考えられる雄性不妊であった。このような研究結果から、我々は、Tysnd1 によるペルオキシソームタンパク質のプロセッシングがペルオキシソームの脂質代謝機能の維持に重要であることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Tysnd1 (Trypsin domain containing 1) is a peroxisomal protease that directly processes peroxisome targeting signal containing enzymes. To clarify the *in vivo* function and physiological importance of Tysnd1, we analyzed the phenotype of *Tysnd1*^{-/-} mice. The VLCFA -oxidation activity and phytanic acid metabolism of *Tysnd1*^{-/-} mice was reduced compared to wild type mice. Male *Tysnd1*^{-/-} mice are infertile, which is most likely the result of a decreased plasmalogen synthesis. These results suggest that peroxisomal processing protease, Tysnd1, is necessary for proper functioning of peroxisomal fatty acid metabolism.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：Tysnd1, ペルオキシソーム, プロテアーゼ, 脂肪酸 酸化, 超長鎖脂肪酸, プラスマローゲン, フィタン酸, 雄性不妊

1. 研究開始当初の背景

ペルオキシソームは真核細胞に広くみられる細胞内小器官の一つで、脂肪酸の β -酸化、特に超長鎖脂肪酸の β -酸化やコレステロールの酸化、胆汁酸合成など重要な機能を持っている。しかし、ペルオキシソームに存在するタンパク質及びその機能については不明な点が多い。このため、大規模 Mass spectrometry システムやバイオインフォマティクスの手法によりペルオキシソームで働く酵素を特定しようという世界的な動きがある。応募者らはバイオインフォマティクスの手法によって、大規模シーケンスプロジェクトで公開された遺伝子配列の中からペルオキシソーム局在化シグナルや膜結合ドメインの有無などの情報をもとにペルオキシソームに存在する可能性の高いタンパク質の予測を行った。その結果、我々は Tysnd1 がペルオキシソームに局在していることを証明し、さらに Tysnd1 は、長年研究者が追い求めてきたペルオキシソームプロセッシングプロテアーゼであることを突き止めた

2. 研究の目的

Tysnd1 (Trypsin domain containing 1) はペルオキシソームにおいて、超長鎖脂肪酸酸化に関わる代謝酵素を切断するプロセッシングプロテアーゼである。しかし、この Tysnd1 の詳細な機能については分かっていない。そこで Tysnd1 の生体内での機能を解明するために、Tysnd1 遺伝子改変マウスの表現型を観察する。

3. 研究の方法

(1) Tysnd1 欠損マウス及び Tysnd1 過剰発現マウスの作製

Tysnd1 欠損マウスは Cre-LoxP システムにより Tysnd1 のエキソン 2・4 を削除した、全身で Tysnd1 が欠損しているものを解析に使用した。ホモの Tysnd1 欠損マウスはヘテロマウス同士の交配により得た。

Tysnd1 過剰発現マウスは CAGGS promoter と polyA シグナルを含む Tysnd1 cDNA を Rosa26 に挿入したヘテロマウスを解析に使用した。

(2) Tysnd1 欠損マウスの超長鎖脂肪酸酸化活性の測定

測定は、末端を標識した超長鎖脂肪酸である [1-¹⁴C] リグノセリン酸 (C24) を加えた緩衝液と肝臓ホモジネートを用いて β -酸化反応を行い、切断により遊離する水性代謝物をシンチレーションカウンターで測定し、1 時間あたりに代謝されるリグノセリン酸の量を測定した。

(3) Tysnd1 欠損マウスの妊孕性及び精巣、精巣上体、精子の解析

妊孕性の確認は Tysnd1 欠損オスマウスと妊娠経験のある C57BL/6J メスマウスを交配する事で行った。精巣と精巣上体は HE 染色や免疫染色で観察した。精巣は光学顕微鏡での観察と、電子顕微鏡による形態の詳細な観察を行った。

(4) 生化学的解析

精巣及び精巣上体中のプラスマローゲンはコリン方及びエタノールアミン型のプラスマローゲンの各分子種を LC-MS/MS により解析した。血中の超長鎖脂肪酸とフィタン酸の測定は GC/MS にて解析を行った。

(5) Tysnd1 の新規基質の同定

COS7 細胞に Tysnd1 を発現するベクターをトランスフェクションし、Tysnd1 の量依存的に基質の切断型が増えるかどうかを確認した。

(6) Tysnd1 欠損マウス由来細胞を用いた Tysnd1 基質タンパク質の細胞内局在解析
肝臓より Tysnd1 欠損マウス及び、野生型の初代培養細胞を採取し、GFP を融合した Tysnd1 基質タンパク質を発現させたのち、共焦点顕微鏡で細胞内局在を観察した。

4. 研究成果

(1) Tysnd1 遺伝子改変マウスの作製

Tysnd1 欠損マウスは体長、体重等の外見的には異常はなかった。mRNA レベルとタンパクレベルの両方で確かに Tysnd1 は欠損している事を確認した。また、Tysnd1 欠損マウスでは Tysnd1 の基質である酵素群が確かに切断されず、非切断型のみが存在する事を確認した。Tysnd1 過剰発現マウスではヘテロでも mRNA レベル及びタンパクレベルで Tysnd1 が野生型に比べて過剰に発現している事を確かめた。

(2) Tysnd1 欠損マウスは超長鎖脂肪酸の β -酸化活性が低下している。

[1-¹⁴C] リグノセリン酸を基質として β -酸化活性を測定した結果、Tysnd1 欠損マウスの酸化活性は野生型の活性の約 60% に低下していた。

(3) Tysnd1 欠損マウスは雄性不妊である。Tysnd1 欠損マウスのオスは不妊であった。メスの Tysnd1 欠損マウスは正常に妊娠出産した。精巣、精巣上体、精子の病理解析及び、プラスマローゲン量の測定結果から、Tysnd1 欠損マウスはプラスマローゲンの合成能の低下による精子奇形が不妊の原因である事が明らかになった。

(4) Tysnd1 欠損マウスのフィタン酸代謝機能は低下している。

Tysnd1 欠損マウスは長期飼育により血中フィタン酸が野生型マウスと比べて有意に上昇していた。

(5) Tysnd1 の新規基質の同定

Tysnd1 の新たな基質として、プラスマローゲン合成経路で働く Agps とフィタン酸の代謝

経路で働く Phyh を同定した。

(6) Tysnd1 は PTS2 タンパク質のペルオキシソームへの局在に重要である。

PTS2 をもつペルオキシソームタンパク質である、Acaa1, Agpa, Phyh は Tysnd1 が欠損した細胞ではペルオキシソームへの局在の異常が観察された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計0件)

[学会発表](計8件)

1. 岡崎康司、東京工業大学・東京工業大学大学院 GP「情報学と生命医学の発展的融合教育の新展開」シンポジウム 「エキソソーム配列解析を用いたミトコンドリア呼吸鎖複合体異常症 (MRCD) の原因遺伝子の系統的探索」(2012/3/23) 東京
2. 岡崎康司、GDNSS「専門医育成と医師不足解消を目指して」公開フォーラム 大学病院における人材育成の未来像～「臨床研究・リサーチマインド・地域医療への貢献」の視点から～(2012/2/10) 群馬
3. Yumi Mizuno, Yuichi Ninomiya, Mioko Iseki, Hiroyasu Iwasa, Yutaka Nakachi, Masumi Akita, Toru Tsukui, Chizuru Ito, Kiyotaka Toshimori, Nobuyuki Shimozawa, Megumi Nishimukai, Hiroshi Hara, Ryota Maeba, Tomoki Okazaki, Yasushi Horai, Mitsuhiro Watanabe, Hiromi Motegi, Shigeharu, Wakana, Tetsuo Noda, Igor V. Kurochkin, Yosuke Mizuno, Christian Schoenbach, Yasushi Okazaki. 「Tysnd1 deficiency interferes with mouse peroxisomal functions」第34回日本分子生物学会年会, 4T18p11-4, 横浜市, 2011/12/16
4. 岡崎康司、第53回日本先天代謝異常学会総会 「核にコードされた遺伝子異常

によるミトコンドリア呼吸鎖複合体異常症 (MRCD) の系統的探索」

(2011/11/25) 千葉

5. 水野由美, 伊関美緒子, 穂田真澄, 水野洋介, 岡崎康司. 「Tysnd1 欠損細胞を用いたペルオキシソームタンパク質の細胞内局在解析」第9回 RCGM フロンティアシンポジウム, P30, 埼玉県, 2011/11/03
 6. 水野由美 「Tysnd1 欠損マウスを使ったペルオキシソームプロセッシングプロテアーゼの機能解析」第6回 Bone Forum in Hanno, 2011/1/13, 埼玉県,
 7. 水野由美, 二宮裕一, 伊関美緒子, 穂田真澄, 津久井通, 伊藤千鶴, 年森清隆, 下澤伸行, 茂木浩未, 若菜茂晴, 野田哲生, 西向めぐみ, 原博, 前場良太, 岡崎具樹, Kurochkin Igor V., 岩佐泰靖, 水野洋介, Schoenbach Christian, 岡崎康司. 「Tysnd1 欠損マウスの機能解析」BMB2010 第33回日本分子生物学会年会第83回日本生化学会大会合同大会, 4P-1142, 神戸市, 2010/12/10,
 8. Yumi Mizuno, Yuichi Ninomiya, Mioko Iseki, Masumi Akita, Toru Tsukui, Yosuke Mizuno, Yasushi Okazaki. 「Functional analysis of Peroxisomal Processing Protease using Tysnd1 deficient Mice」8th RCGM International Symposium of Academic Frontier, P32, 埼玉県, 2010/11/3,
- [図書](計2件)
1. 岡崎康司: バイオテクノロジーの温故知新「DNA マイクロアレイ ゲノムワイド

解析の道を開いた技術革新」 実験医学
30(1): 119-23 (2012) 5 ページ

2. 徳澤佳美, 岡崎康司: 骨粗鬆症の遺伝
子ネットワーク 医学のあゆみ 237(6)
701-6 医歯薬 (2011) 6 ページ

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 2 件)

名称: Method of screening for agents that
modulate Tysnd1 level or activity in a cell
発明者: Igor Kurochkin, Christian
Schoenbsch, Yasushi Okazaki
権利者: 埼玉医科大学、理化学研究所
種類: 米国登録
番号: 7,605,005
取得年月日: 2009/10/20
国内外の別: 国外

名称: ペルオキシソーム生合成および機能に
関連する障害を治療および診断するための
医薬組成物
発明者: Yasushi Okazaki
権利者: 埼玉医科大学
種類: 特許
番号: 4964151
出願年月日: 012/04/06
国内外の別: 国内

〔その他〕
ホームページ等

[http://www.saitama-med.ac.jp/genome/Div
05_FGSM/index.html](http://www.saitama-med.ac.jp/genome/Div05_FGSM/index.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡崎 康司 (OKAZAKI YASUSHI)
埼玉医科大学・医学部・教授
研究者番号: 80280733

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

水野 洋介 (MIZUNO YOSUKE)
埼玉医科大学・医学部・助教
研究者番号: 30406532

二宮 裕一 (YUICHI NINOMIYA)
埼玉医科大学・医学部・助教
研究者番号: 70334175
(H22 年度まで)

水野 由美 (MIZUNO YUMI)
埼玉医科大学・医学部・研究員
研究者番号: 20584014