

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 4 日現在

機関番号：14401
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23790365
 研究課題名（和文）ペルオキシソーム病における GPI アンカー生合成異常の病因的意義の解明
 研究課題名（英文）Abnormality of the involvement of glycosylphosphatidylinositol anchor in a peroxisomal disorder.
 研究代表者
 神澤 範行（KANZAWA NORIYUKI）
 大阪大学・微生物病研究所・特任助教
 研究者番号：40452461

研究成果の概要（和文）：本研究課題では、ペルオキシソーム病と GPI アンカーの脂質部分の構造の関連を明らかにした。これまでペルオキシソーム病患者の GPI アンカーの脂質部分の構造やアルキルアシル型 GPI アンカーの生理学的意義は知られていなかったが、ペルオキシソーム病患者ではアルキルアシル型 GPI アンカーを欠損し、またアルキルリン脂質生合成系を欠損する CHO 変異細胞株においては、細胞表面の内在性 GPI アンカー型タンパク質の発現量の増加が見られるなど、今後のペルオキシソーム病の病態解明に向けた結果が得られた。

研究成果の概要（英文）：Dysfunction of peroxisome cause peroxisomal disorders. I analyzed the structure of glycosylphosphatidylinositol(GPI) anchor in patients of rhizomelic chondrodysplasia punctate(RCDP) and Zellweger syndrome. These patients are defective in alkyl-acyl form GPI anchor and expressing diacyl form GPI only. The expression levels of GPI-anchored protein increased in the mutant cells of responsible gene of RCDP. I found the involvements between peroxisomal disorders and functions of GPI-anchored protein.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：GPI アンカー、アルキルリン脂質、ペルオキシソーム病、肢根型点状軟骨異形成症、Zellweger 症候群

1. 研究開始当初の背景

Glycosylphosphatidylinositol (GPI) アンカーの構造はジアシル型とアルキルアシル型があり、哺乳動物に発現する大部分の GPI アンカー型タンパク質の GPI 部分はアルキルアシル型であることが知られていた。

ペルオキシソームの形成障害や機能異常によって、ペルオキシソーム病と総称される難病を発症する。ペルオキシソーム病のうち肢根型点状軟骨異形成症(RCDP)は、ペルオキシソームのアルキルリン脂質生合成系の異常が原因とされ、アルキルリン脂質の最終産物であるプラスマローゲンの欠損が原因と

されてきた。我々は、先にアルキルリン脂質生合成系を欠損する CHO 変異細胞株を用いた実験で、それらの細胞ではアルキルアシル型 GPI アンカーを欠損し、ジアシル型しか生合成できないことを見出した。これまでペルオキシソーム病患者における GPI アンカーの構造については注目されていなかったが、このことから推測するとペルオキシソーム病患者、特に RCDP においては、アルキルアシル型であるはずの GPI アンカーがジアシル型でしか生合成されない。アルキルアシル型 GPI アンカーの欠損もまた、GPI アンカー型タンパク質の機能にも影響を及ぼすことで RCDP

の諸症状の一部の原因になっている可能性が考えられた。

ペルオキシソーム病の原因遺伝子は数多く証明されてきたが、その症状が発現する機構については現在でも不明な点が多い。また、有効な治療法も開発されておらず医療の確立が求められていた。アルキルアシル型 GPI アンカーの生理学的意義を解明すると共に、GPI アンカーの構造とペルオキシソーム病との関連を見出すことで、ペルオキシソーム病の病態理解や治療に役立つものと考えられた。

2. 研究の目的

我々は、これまでにチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞のアルキルリン脂質生合成系を欠損する変異株において、アルキルアシル型 GPI アンカーを欠損し、ジアシル型の GPI アンカーしか生合成できないことを示したが、実際のペルオキシソーム病患者における GPI アンカーの構造については知られていなかった。さらに GPI アンカーは、その生合成の初期にジアシル型からアルキルアシル型に変換されることが分かっていたが、その生合成メカニズムや GPI アンカーの脂質部分の変換反応に関与する酵素(リモデレース)については全く不明であった。

本研究課題においては、哺乳動物におけるアルキルアシル型 GPI アンカーの生合成メカニズムとその生理学的意義を解明するとともに、ペルオキシソーム病とアルキルアシル型 GPI アンカーの関連を見出すことで、将来的にペルオキシソーム病の病態理解や治療に役立てることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ペルオキシソーム病患者細胞における GPI アンカーの構造の検討：オランダおよび国内の共同研究者より、RCDP と ZS 患者の繊維芽細胞を得て不死化細胞株を作出した。GPI アンカー中間体の構造は、アシル鎖のアルカリに対する感受性を用いて検討した。まず細胞にトリチウム標識されたマンノース添加し、GPI アンカーを標識後、脂質を抽出、得られた脂質をアルカリ処理した。アシル鎖はアルカリに対して不安定であり除去されるが、アルキル鎖は耐性を示すので薄層クロマトグラフィー(TLC)で GPI アンカー中間体由来のリゾ体のスポットが現れて、アルキル鎖の有無を判断できる。アルカリ処理後は、脂質を抽出して TLC によって分離、標識された GPI アンカーを検出して野生株と比較した。さらに詳細な GPI アンカーの構造分析においては、精密質量分析法を用いた。

(2) アルキルアシル型 GPI アンカーの生理学的意義の解明：アルキルリン脂質生合成酵素の Dihydroxyacetone phosphate (DHAP)

acyltransferase あるいは Alkyl-DHAP synthase をそれぞれ欠損する CHO 変異細胞株(それぞれ NRel-4 と NZel-1)を用いて、内在性の GPI アンカー型タンパク質 Urokinase plasminogen activator receptor (uPAR) の発現量を、責任遺伝子を導入する前後でフローサイトメトリー、ウエスタンブロットおよび共焦点顕微鏡を用いて比較した。

(3) リモデレースのスクリーニング：GPI アンカーの脂質部分のジアシル型からアルキルアシル型への変換反応は、Phospholipase D あるいは Phospholipase C 様の活性によってリン酸部分で切断されたアルキル供与体の脂質部分とジアシル型の GPI アンカーの脂質部分とが変換される反応を想定した。そこで、機能が未知の Phosphatase 様遺伝子を候補遺伝子として siRNA でノックダウンし、アルキルアシル型 GPI アンカーの生合成が抑えられる遺伝子をスクリーニングした。GPI アンカーの構造の決定には、前述のアルカリ処理によるスポットの出方の違いにより比較した。ノックダウン後、有意にアルキルアシル型 GPI アンカーの生合成を抑えることができた遺伝子をリモデレースの候補遺伝子とした。その後、この候補タンパク質の細胞内での局在を検討するために、タグ付きのタンパク質を発現させるプラスミドを作成し、ヒト胎児腎細胞 HEK293T に導入、タンパク質を発現させて、その細胞内局在をマーカータンパク質とともに共焦点顕微鏡で観察した。

4. 研究成果

ペルオキシソームの形成障害や機能異常でペルオキシソーム病と総称される難病を発症するが、今回、アルキルリン脂質生合成酵素である Dihydroxyacetone phosphate (DHAP) acyltransferase あるいは Alkyl-DHAP synthase をそれぞれ欠損するペルオキシソーム病患者の肢根型点状軟骨異形成症(RCDP)の2と3型患者細胞において、アルキルアシル型 GPI の生合成能が著しく低下していることと、その酵素をペルオキシソームへ輸送するのに必要な PEX7 を欠損する CHO 変異細胞株と RCDP の1型患者細胞においても、アルキルアシル型 GPI アンカーを欠損していることを明らかにした。さらにペルオキシソーム病で最も深刻である Zellweger 症候群の患者においても、同様の結果を得た。

ペルオキシソーム病の中でも特に RCDP は、ペルオキシソームの重要な機能であるアルキルリン脂質生合成系の異常によってプラスマローゲンを欠損し、症状が引き起こされると考えられている。我々の結果は、ペルオキシソーム病患者はプラスマローゲンだけでなくアルキルアシル型 GPI アンカーも欠損していることを示しており、これらの患者ではアルキルアシル型であるはずの GPI アンカ

ーがジアシル型であることで、GPI アンカー型タンパク質が正常に機能せず、アルキルアシル型 GPI アンカーの欠損もまたペルオキシソーム病の諸症状の病因の一つとなっている可能性が考えられた。

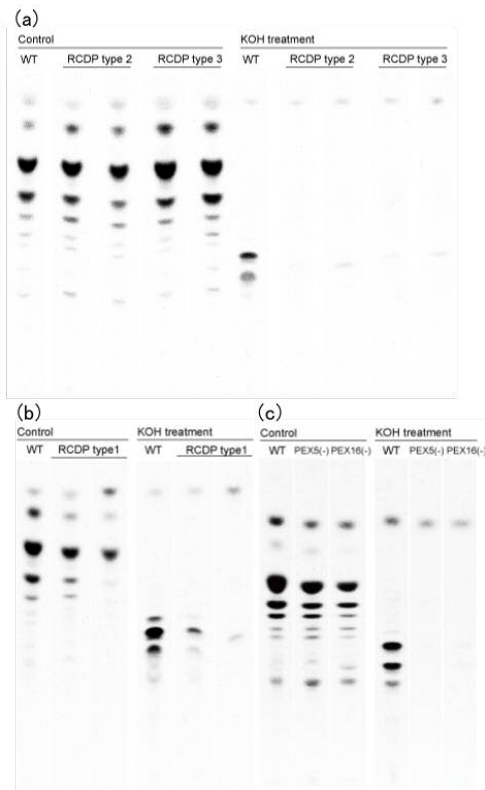


Figure 1. TLC analysis in RCDP1, 2, 3 and ZS. RCDP 2 and 3 (a), RCDP 1(b) and ZS(c) decreased alkyl-acyl form GPI anchor.

これまでアルキルアシル型 GPI アンカーの役割については明らかにされていなかったが、RCDP のモデルとなるアルキルリン脂質合成酵素を欠損する CHO 変異細胞株を用いて、内在性の GPI アンカー型タンパク質である Urokinase plasminogen activator receptor (uPAR) の発現量を検討したところ、欠損細胞においては uPAR の発現量が上昇するが、その責任遺伝子を導入して発現させることで、uPAR の発現量が減少することが明らかになった (Figure

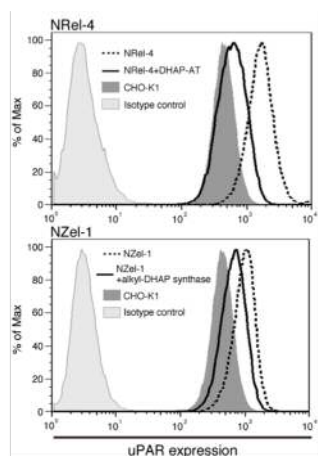


Figure 2. Increased expression of uPAR in NRel4, DHAP-AT deficient CHO cells and NZel1, alkyl-DHAP synthase deficient cells.

2)。これらの結果から、GPI アンカーの脂質部分の構造がタンパク質の輸送や細胞内でのソーティングに影響したことが示唆され、ペルオキシソーム病患者では、GPI アンカーがジアシル型であることで GPI アンカー型タンパク質の細胞内の局在や機能に影響が出ている可能性が考えられた。

さらに GPI アンカーは、ジアシル型の PI から生合成されるが、その過程でジアシル型からアルキルアシル型にリモデリングされることが明らかになっていた。しかし、その変換反応のメカニズムや関与する酵素は不明であった。我々はこのリモデリングが、リン脂質特異的 Phospholipase D あるいは Phospholipase C の様な活性により、ジアシル型の GPI アンカーの脂質部分とアルキルアシル型が主成分である供与体の脂質部分とが入れ替わる反応が起こっていると予想した。そこで、機能が未知の Phosphatase を探索し、それらをノックダウンしたところ、アルキルアシル型 GPI アンカーの生合成能が抑えられる遺伝子を見出し、このタンパク質を目的の脂質リモデリング酵素の候補とした。さらに、このタグ付きの候補タンパク質を HEK293T 細胞に発現させて、細胞内局在を検討したところ、GPI アンカーの生合成が行われている小胞体に局在することが明らかとなった (Figure 3)。

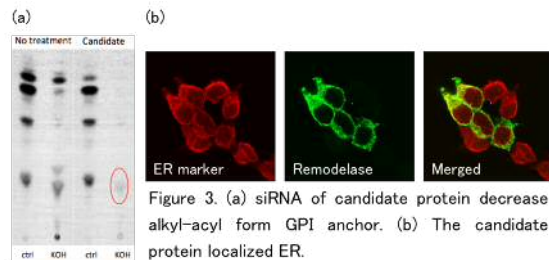


Figure 3. (a) siRNA of candidate protein decrease alkyl-acyl form GPI anchor. (b) The candidate protein localized ER.

これらの結果は、この候補タンパク質がアルキルアシル型 GPI アンカーの生合成に関わっていることを支持するデータであると考えている。

本研究課題においては、ペルオキシソーム病と GPI アンカーの脂質部分の構造の関連を明らかにした。ペルオキシソーム病患者における GPI アンカーの脂質部分の構造や、アルキルアシル型 GPI アンカーの生理学的意義は知られていなかったが、今回ペルオキシソーム病患者でアルキルアシル型 GPI アンカーを欠損していることと、アルキルリン脂質合成系を欠損する CHO 変異細胞株では、アルキルアシル型 GPI アンカーを欠損するとともに、細胞表面の内在性 GPI アンカー型タンパク質の発現量が増加していることが明らかとなり、今後のペルオキシソーム病の病態解明に向けた結果を得ることができた。

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 2 件)

① Murakami Y, Kanzawa N, Saito K, Krawitz PM, Mundlos S, Robinson PN, Karadimitris A, Maeda Y, Kinoshita T., Mechanism for release of alkaline phosphatase caused by glycosylphosphatidylinositol deficiency in patients with hyperphosphatasia mental retardation syndrome., J Biol Chem, 287(9), 2012, 6318-25. (査読あり)

doi : 10.1074/jbc.M111.331090

② Kanzawa N, Shimozawa N, Wanders RJ, Ikeda K, Murakami Y, Waterham HR, Mukai S, Fujita M, Maeda Y, Taguchi R, Fujiki Y, Kinoshita T., Defective lipid remodeling of GPI anchors in peroxisomal disorders, Zellweger syndrome, and rhizomelic chondrodysplasia punctata., J Lipid Res, 53(4), 2012, 653-63. (査読あり)

doi : 10.1194/jlr.M021204

[学会発表] (計 2 件)

① 神澤 範行, 前田 裕輔, 藤田 盛久, 木下 タロウ, GPI アンカー生合成における脂質リモデリングのアルキル供与体の解明, 第 84 回 日本生化学会大会, 2011 年 9 月 21-24 日, 京都

② Kanzawa N, Maeda Y, Ikeda K, Murakami Y, Fujita M, Shimozawa N, Fujiki Y, Taguchi R and Kinoshita T, Biosynthesis of GPI-anchored proteins requires peroxisome., 第 30 回 内藤カンファレンス, 2011 年 6 月 28 日-7 月 1 日, 札幌

[図書] (計 1 件)

① 神澤 範行, 木下タロウ, 生体の科学「細胞の分子構造と機能 -核以外の細胞小器官- GPI アンカーのリモデリングにおけるペルオキシソームの役割とその異常」, Vol. 63, No5, 2012. 456-459.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神澤 範行 (KANZAWA NORIYUKI)
大阪大学・微生物病研究所・特任助教
研究者番号 : 40452461