

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 12 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24592794

研究課題名(和文)低フォスファターゼ症の分子基盤

研究課題名(英文)Molecular basis of hypophosphatasia

研究代表者

織田 公光(Oda, Kimimitsu)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：10122681

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：低フォスファターゼ症(HPP)は組織非特異型アルカリフォスファターゼ(TNSALP)遺伝子上の様々な突然変異に起因する先天性の代謝異常症で、骨や歯の広範囲な低石灰化を伴う。申請者は突然変異がTNSALP分子に及ぼす影響を分子レベルや細胞レベルで解析を行った。検討したミスセンス突然変異：TNSALP(C201Y)、TNSALP(C489S)、TNSALP(G420S)、TNSALP(N417S)、TNSALP(P108L)、TNSALP(N430S)。その結果、それぞれの変異による劣性あるいは優性遺伝するHPPの発症メカニズムを明らかにするとともに、本酵素の生理学的な重要性を示した。

研究成果の概要(英文)：Hypophosphatasia (HPP) is an inborn error of metabolism, characterized by hypomineralization of bone and teeth and a deficiency of tissue-nonspecific alkaline phosphatase (TNSALP). To date more than 300 mutations have been reported in the TNSALP gene worldwide. We investigated the effects of 6 independent missense mutations, which were found to be transmitted in a recessive or dominant way, on TNSALP in a molecular level. Our studies have revealed not only the molecular basis of HPP caused by each missense mutation, but also the physiological significance of TNSALP regarding to mineralization.

研究分野：生化学

キーワード：低フォスファターゼ症 先天性遺伝疾患 アルカリフォスファターゼ 発症メカニズム 石灰化不全  
N結合糖鎖

#### 1. 研究開始当初の背景

低フォスファターゼ症 (HPP) は組織非特異型アルカリフォスファターゼ (TNSALP) 遺伝子上の突然変異が原因で起こる先天性の遺伝疾患で、骨や歯の低石灰が主な症状である。平成 28 年 3 月現在、世界中で 305 例の変異が報告されている稀な代謝異常疾患である。ただし、原因遺伝子が特定されているにも関わらず突然変異により TNSALP 分子がどのように影響を受けるのか、そして発症メカニズムは多くの場合不明であった。

#### 2. 研究の目的

長年筆者の研究室においては各突然変異に関して野生型酵素と変異酵素を比較検討することで TNSALP に及ぼす変異の影響を解析してきたが、本研究課題では劣性ないしは優性遺伝する個別の HPP のうち、6 つの遺伝子変異に着目しその分子基盤を明らかにする目的で一連の実験を行った: TNSALP (C201Y)、TNSALP (C289S)、TNSALP (G420S)、TNSALP (N417S)、TNSALP (P108L)、TNSALP (N430S)

#### 3. 研究の方法

(1) 野生型 TNSALP の cDNA を鋳型にオリゴヌクレオチドを用いた部位特異的な突然変異法を用いて該当する変異酵素の cDNA をコードするプラスミドを調製した。

(2) 野生型と変異型の酵素を一過性に COS1 細胞に発現した。次に変異酵素の細胞内局在については蛍光抗体を用いた形態学的な手法で、酵素の性状に関しては酵素活性の定量や SDS-電気泳動法を用いた生化学的解析を併せて行った。

(3) 必要に応じて、変異酵素を誘導できる Tet-On CHO 細胞を樹立してより詳細な細胞生物学的な検討を行った。

#### 4. 研究成果

(1) TNSALP (C201Y)、TNSALP (C289S) : 201 番目と 289 番目のシステインは単量体内で他の 2 つのシステインといわゆる分子内ジスルフィド結合を形成していることが知られている。いずれのミスセンス変異 (アミノ酸の置換) においても 2 か所のジスルフィド結合の一方が阻害されることが推定されていた。2 つの変異酵素は発現したが、いずれも非常に低い活性を呈するのみであり、また大部分が小胞体に貯留することが判明した。この結果はジスルフィド結合が TNSALP 分子の正常な立体構造の獲得に関与し、それに伴い変異酵素が本来の局在部位の細胞膜まで輸送されないことを示している。実際、小胞体内に貯留した変異酵素はユビキチンで修飾された後、プロテアソームで分解されることも明らかにした。

(2) TNSALP (G420S) : 本変異酵素は活性を全く失っていた。しかし、細胞膜表面に単量体として存在することが判った。活性には 2 量体形成が必須であるので、このアミノ酸の置換により単量体どうしが会合できなくなることが判った。また、野生型酵素と共発現することにより野生型酵素の活性を抑制するドミナントネガティブな性質を有することから優性遺伝と関係づけられた。

(3) TNSALP (N417S) : 上記の変異酵素と類似した性質を示した。細胞表面に到達したが活性のない単量体として存在し、またドミナントネガティブな性質を示した。N (アスパラギン) と構造的に類似したアスパラギン酸、グルタミン酸やグルタミンに置換しても活性は回復しないことから 417 番目の N は他のアミノ酸に置き換えられない、サブユニット会合に必須なアミノ酸であることが判った。

(4) TNSALP (P108L) : 上記 2 例と同じく優

性遺伝する HPP で報告された変異であるが、TNSALP の活性部位 (100 番目のセリン) の近傍に位置することが知られていた。変異部位がサブユニットの会合部位とは離れているにも係わらず、会合ができずに単量体としてのみ細胞膜に局在していた。やはりドミナントネガティブな性質を持つことから野生型酵素の単量体と会合することでその活性を阻害することが推定された。

(5) TNSALP (N430S) : 野生型は 430 番目の N が糖鎖により修飾されていることを明らかにしたうえで、本変異酵素は酵素活性を全く失っていることを明らかにした。より詳しい解析により、糖鎖の欠損自体により活性が失われるのではなく、430 番目の S がサブユニットの会合を完全に抑制する結果を得た。野生型酵素との共発現においてもドミナントネガティブな作用は確認されず、劣性遺伝すると推定された。また、TNSALP の 5 か所の N 結合糖鎖のコンセンサス配列のいずれもが糖鎖で修飾されていること、そのいずれかを単独で欠失させても TNSALP 分子の活性や局在に影響を与えないことも併せて明らかにした。さらに、包括的な糖鎖欠損実験を行って、5 か所のうちの 3 か所 (N230、N271、N303) で糖鎖を同時に欠失する TNSALP 分子は活性を全く失い、また小胞体に蓄積した結果、細胞膜には出現しないことも明らかにした。従って 3 つの N 結合糖鎖は TNSALP の構造と機能に密接に関係していると考えられた。

#### 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 7 件)

Komaru K, Satou Y, Al-Shawafi HA, Numa-Kinjoh N, Sohda M, Oda K,

Glycosylation-deficient mutations in tissue-nonspecific alkaline phosphatase impair its structure and function and are linked to infantile hypophosphatasia, FEBS J, 査読有、283、2016、1168-1179  
doi: 10.1111/febs.13663

Numa-Kinjoh N, Komaru K, Ishida Y, Sohda M, Oda K, Molecular phenotype of tissue-nonspecific alkaline phosphatase with a proline (108) to leucine substitution associated with dominant odonto - hypophosphatasia, Mol Genet Metab, 査読有、115、2015、180-185  
doi: 10.1016/j.ymgme

Sultana S, Al-Shawafi HA, Makita S, Sohda M, Amizuka N, Takagi R, Oda K, An asparagine at position 417 of tissue-nonspecific alkaline phosphatase is essential for its structure and function as revealed by analysis of the N417S mutation associated with severe hypophosphatasia, Mol Genet Metab, 査読有、109、2013、282-288  
doi: 10.1016/j.ymgme.2013.04.016.

Makita S, Al-Shawafi HA, Sultana S, Sohda M, Nomura S, Oda K, A dimerization defect caused by a glycine substitution at position 420 by serine in tissue-nonspecific alkaline phosphatase associated with perinatal hypophosphatasia, FEBS J, 査読有、279、2012、4327-37  
doi: 10.1111/febs.12022.

Satou Y, Al-Shawafi, HA, Sultana S,

Makita S, Sohda M, Oda K, Disulfide bonds are critical for tissue-non-specific alkaline phosphatase function revealed by analysis of mutant proteins bearing a C(201)-Y or C(489)-S substitution associated with severe hypophosphatasia. Biochim Biophys Acta、査読有、1822、2012、581-588  
doi: 10.1016/j.bbadis.

[ 学会発表 ] (計5件)

松村智裕、齋藤志保、木山明子、織田公光、折茂英生、低ホスファターゼ症例で見つかった変異型アルカリホスファターゼの解析、第87回日本生化学会大会、2014年10月15日、国立京都国際会館(京都府京都市)

Makita S, Al-Shawafi AH, Sultan S, Sohda M, Oda K, Nomura S, Molecular basis of hypophosphatasia, PER/IADR 2012 Sep 12 Helsinki (Finland)

Numa-Kinjoh N, Makita S, Oda K, Hayasaki H, Analysis of tissue-nonspecific alkaline phosphatase with a Pro108Leu mutation, PER/IADR 2012 Sep 14 Helsinki(Finland)

[ 図書 ] 該当なし

[ 産業財産権 ] 該当なし

[ その他 ]

[http://mds.niigata-u.ac.jp/organization/ols/trr/bio/index\\_j.html](http://mds.niigata-u.ac.jp/organization/ols/trr/bio/index_j.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

織田 公光 ( ODA Kimimitsu )  
新潟大学・医歯学系・教授