

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860238

研究課題名(和文)ペルオキシソーム病の病態メカニズム解明：GPIアンカーの構造からのアプローチ

研究課題名(英文)Analysis of peroxisomal disorders from the structure of GPI anchors

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(常勤)

研究者番号：40452461

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ペルオキシソーム病患者はアルキルアシル型であるはずのグリコシルホスファチジルイノシトール(GPI)アンカーがジアシル型であり、そのこともペルオキシソーム病の病因の1つと考えられる。本研究課題は、アルキルアシル型GPIアンカーの生理的意義を明らかにし、その発症メカニズムを解明することを目的とした。GPIアンカーは、その生合成の初期段階でジアシル型からアルキルアシル型に酵素的に変換されると推測されるが、我々はジアシル型しか生合成できない遺伝子を見出し、その遺伝子を欠損する細胞株の作出を行った。さらにGPIアンカーのジアシル型からアルキルアシル型への変換で用いられるアルキル供与体の同定を試みた。

研究成果の概要(英文)：Many proteins are anchored by a glycosylphosphatidylinositol (GPI) to the cell surface. GPI is synthesized from phosphatidylinositol (PI). Most PIs are diacyl form, whereas majority of mammalian GPI-anchored proteins (GPI-APs) have alkyl-acyl PIs. I determined that peroxisomal pathway is essential for production of alkyl-acyl form GPIs. I predicted that peroxisomal pathway generate alkyl donor of lipid remodeling, and I tried to identify the remodelase and analyze mechanisms.

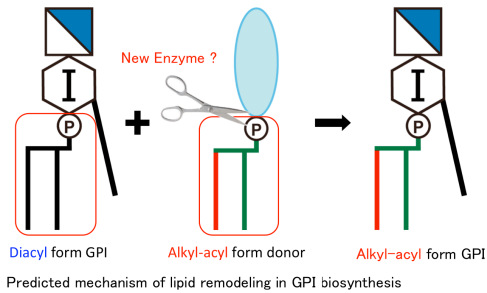
A defect in the alkyl-phospholipid biosynthesis causes peroxisomal disorders, and these are lethal genetic diseases. These patients are defective in alkyl-acyl form GPIs, and absence of the alkyl-acyl form of GPI-APs might account for some of the complex phenotypes of peroxisomal disorders. Although functional importance of the alkyl-acyl form of GPI-APs is yet to be determined, I am currently testing the possibility that the lack of alkyl-acyl form GPI-APs contributes to some of the symptoms.

研究分野：分子病態学

キーワード：ペルオキシソーム病 グリコシルホスファチジルアンカー アルキル脂質 脂質リモデリング

1. 研究開始当初の背景

膜タンパク質の翻訳後修飾のひとつに、グリコシルホスファチジルイノシトール (GPI) アンカーと呼ばれる糖脂質による修飾がある。GPIアンカーは、マンノース・グルコサミン・エタノールアミンリン酸および2本の脂肪鎖を持つホスファチジルイノシトール (PI) が結合した構造である。GPIアンカー型の膜タンパク質は、タンパク質のC末端にGPIアンカーが付加、PIの2本の脂肪鎖が細胞膜に挿さった状態でアンカーされ、ラフトと呼ばれるマイクロドメインに局在している。GPIアンカーは小胞体でジアシル型のPIから生合成されるが、我々の共同研究者は、GPIアンカー生合成の初期のステップでジアシル型からアルキルアシル型へ脂質リモデリングが起こることを報告した。しかし、GPIアンカーの脂質部分を変換する酵素はまだ知られていない。我々はその変換酵素を“リモデレーズ”としてスクリーニングを行った。



我々は、リモデレーズ遺伝子を破壊することで、ジアシル型のGPIアンカーしか生合成できなくなると考えた。その利点としては、ペルオキシソームにおけるアルキルリン脂質生合成系の欠損細胞では、細胞膜を構成するプラズマローゲンも欠損することから、アルキルアシル型GPIアンカーのみの役割を検討することは難しかったが、リモデレーズ遺伝子の破壊株を用いると、細胞膜の環境は正常細胞と同じであるため、純粋にアルキルアシル型GPIアンカーの役割のみを解明できると考えている。我々はこれまでの研究で、データベースから機能が未知のホスファターゼを検索、siRNAでノックダウンすることで、ジアシル型のGPIアンカーしか生合成できなくなる遺伝子を見出し、今回、その遺伝子から発現するタンパク質の諸性質の解明を目指した。

さらに、我々はGPIアンカーの生合成とペルオキシソームに密接な関連があることを報告している。ペルオキシソームの形成障害や機能異常によって、肢根型点状軟骨異形成症やZellweger症候群などのペルオキシソーム病を発症するが、我々はペルオキシソーム病の患者細胞において、健常人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を明らかにした。現在までにペルオキシソーム病の発

症メカニズムの詳細は明らかになっておらず、その有効な治療法も見付かっていない。これまでペルオキシソーム病は、プラズマローゲンを欠損することが主な病因とされてきたが、我々はアルキルアシル型GPIアンカーの欠損もまた、ペルオキシソーム病の病因のひとつではでないかと考えている。GPIアンカーがアルキルアシル型の脂肪鎖を持つことの意義は解明されていないが、これまでに我々はアルキル脂質生合成系を欠損する細胞で、細胞膜に発現する多くのGPIアンカー型タンパク質のうちでも一部のタンパク質において、その発現量が増加することを見出し、タンパク質のソーティングに影響が出て、その機能自体に影響が出ているものと予想している。ペルオキシソーム病患者においても、GPIアンカー型タンパク質に何らかの異常が生じているものと考えている。本研究課題は、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ことで、ペルオキシソーム病の症状の理解および発症メカニズムの解明に役立つと考えている。

2. 研究の目的

本研究課題の目的は、GPIアンカーの構造と機能を明らかにすることで、ペルオキシソーム病の発症メカニズムおよびその病態を理解することである。ペルオキシソーム病の有効な治療方法はまだ見出されておらず、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考えている。

3. 研究の方法

我々はこれまでの研究で、データベース上で機能未知のホスファターゼを検索し、siRNAによってそれらをノックダウン、ジアシル型のGPIアンカーしか生合成できない遺伝子を見出していた。本研究課題では、この候補遺伝子のノックアウト細胞を作出、ノックアウトマウスの作出へと発展させ、その諸性質を解明することで、ペルオキシソーム病との関連を見出す。

本研究課題の共通の方法としては、放射性同位元素で標識されたマンノースを用いてGPI中間体をラベルし、GPIアンカーの構造の比較を行った。その原理としては、アシル鎖がアルカリに対して感受性を示し、アルキル鎖はアルカリに対して耐性を示すという特性を用いる。放射性同位元素であるトリチウムで標識されたGPIアンカーをアルカリで処理、その後薄層クロマトグラフィーで展開すると、残された脂肪鎖の本数によって疎水性に差が生じ、現れるスポットの移動度にも差が出る。我々はノックダウンによるスクリーニングで、ジアシル型のGPIアンカーしか生合成できなくなる遺伝子を見出し、この遺伝子をGPIアンカーの脂肪鎖変換酵素“リモデレーズ”の候補遺伝子としていた。GPIアンカーの構造は、リモデ

レースをノックアウトすることで、変換前のジアシル型のままで、細胞膜は全く影響を受けずに正常であると考えた。

本研究課題では、まずこのリモデレースの候補遺伝子のノックアウト細胞の作出を試みた。細胞はヒト胎児腎臓由来のHEK 293 T細胞を用いて、遺伝子編集にはCRISPR/Cas9のシステムを用いた。ターゲットとなるシーケンスの配列をCRISPR/Cas9の発現ベクターに挿入、HEK 293 T細胞にリポフェクションによって遺伝子を導入後、シングルセルに単離、得られた細胞のゲノムDNAおよびcDNAの遺伝子配列を解析することでノックアウト細胞であることを確認した。続いて、本細胞の諸性質を明らかにするために、GPIアンカー型タンパク質であるCD59にタグを付けたタンパク質を高レベルで恒常的に発現する細胞株を作出した。本細胞をライゼートにし、アフィニティークロマトグラフィーでタグ付きのCD59を精製、SDS-PAGEで分離、続いてPVDF膜に転写した。さらに転写した膜からCD59を切り抜いた。PI部分を精密質量分析法で解析するために、得られた膜を亜硝酸ナトリウムで処理、PIを遊離させ、ブタノールでPIを回収した。

さらに、我々はGPIアンカーのリモデリングで用いられるアルキル供与体の特定を試みることにした。これまでの我々の研究で、GPIアンカー生合成のアルキル供与体として用いられる脂質は、ペルオキシソームのアルキル脂質生合成経路を由来とする脂質であることが明らかになっている。

本研究課題では、予想されたアルキル供与体となるアルキル脂質の生合成に関わる酵素を、前述のCRISPR/Cas9のシステムを用いてノックアウトを試みた。アルキル供与体の生合成を止めることで、ジアシル型のGPIアンカーしか生合成できなくなると考えられ、その影響が細胞膜の組成やGPIアンカー型タンパク質の局在に影響しない場合、ジアシル型とアルキルアシル型GPIアンカーの機能を比較できると考えている。

4. 研究成果

(1) 本研究課題では、まずGPIアンカーのリモデレース候補遺伝子のノックアウト細胞の作出に成功した (Figure 1)。本細胞はゲノムDNAのシーケンスからも、目的遺伝子を欠損するノックアウト細胞であることを確認している。

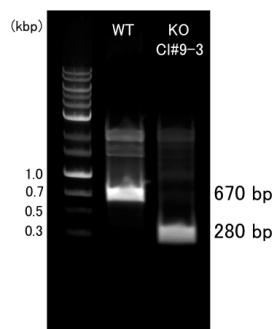


Figure 1. RT-PCR to confirm KO cell lines

(2) 続いて、本ノックアウト細胞の諸性質を明らかにするために、GPIアンカー型タンパク質であるCD59にタグを付けて発現させ、アフィニティークロマトグラフィーで精製、亜硝酸ナトリウム処理することでGPIアンカーのPI部分を遊離、有機溶媒でPIを抽出し、精密質量分析法にて分析した (Figure 2-a)。

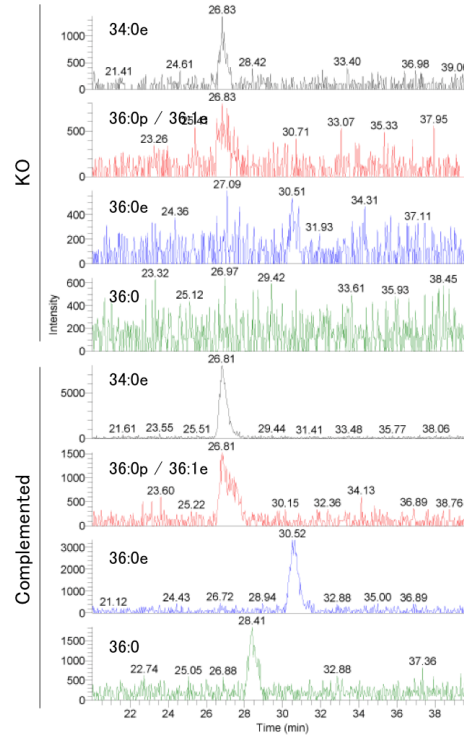
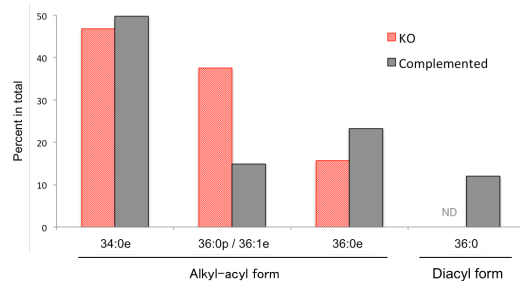


Figure 2-a. Fatty chain profiles of PI moiety in GPI-APs



Lipid structure	KO	Complemented
Alkyl-acyl form	100 %	88 %
Diacyl form	ND	12 %

Fatty chain profiles in PI moiety of GPI-APs in KO

さらに細胞から総脂質を抽出し、精密質量分析法で分析し、ノックアウトと野生株との間で比較したところ、ノックアウト細胞で34:1pのPE型のプラスローゲンが顕著に増加していた (Figure 2-b)。

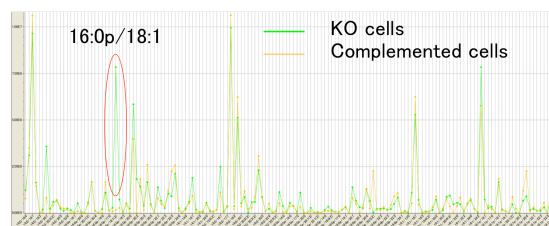


Figure 2-b. PE(16:0p/18:1) increased in KO cells

(3) また同時に、GPIアンカー中間体をアルカリ処理し、その脂肪鎖の構造を検討した。GPI中間体を蓄積させて検出するため、前述のノックアウト細胞に、さらにGPIアンカー生合成の酵素遺伝子を破壊し、ダブルノックアウト細胞を得た。そのダブルノックアウト細胞に、ツニカマイシンと10%透析済FCS存在下でトリチウム標識されたマンノースを添加し、GPIアンカーの生合成中間体を標識、ブタノールで脂質抽出した。得られた脂質を乾固、1NのKOHでアルカリ処理し、薄層クロマトグラフィー(TLC)で展開、得られたスポットの移動度からGPIアンカーの脂質部分の構造を検討した(Figure 3)。

このTLCの結果より、ノックアウト細胞由来のGPIアンカー中間体をアルカリ処理すると、リゾ体由来のバンドが検出された。ジアシル型では2本の脂肪鎖が両方も除かれ、スポットは検出されないため、アルキルアシル型のGPIアンカーを生合成していると考えられた。

見出したリモデレース候補遺伝子をノックアウトすると、恒常的にGPIアンカーの脂肪鎖構造がジアシル型になると予想していた。しかしながら、これらの結果から考えるとノックアウト細胞のGPIアンカーの構造はアルキルアシル型であった。これまでのsiRNAを用いたシステムは、短期間で遺伝子を抑制して、アッセイを行っていた。ノックアウト細胞を構築するには長時間掛かるため、その間に細胞内の代替パスウェイが活性化された可能性も考えられた。

また、候補遺伝子のノックアウト細胞で特異的に生合成量が上昇している分子種があり、その分子種もまたGPIアンカーのリモデリングのアルキル供与体になり得るため、ターゲットとした遺伝子はアルキル供与体の生合成に関与している可能性も考えられた。

(4) さらにGPIアンカーのリモデリングにおけるアルキル供与体を特定する実験においては、これまでと同様のCRISPR/Cas9の方法を用いて、アルキル供与体になり得ると考えた脂質の生合成系のノック

アウト細胞の作出を試みた。しかしながら、実験中に細胞が死滅するなどの影響が出て、ノックアウト細胞の作出はできなかった。従来から考えられている脂質生合成のパスウェイで、関連する各酵素がより精密に発現および生合成の制御を受けている可能性が示唆された。

(総括) 本研究期間内にリモデレースと考えていた酵素遺伝子のノックアウト細胞の作出に成功した。しかし、リモデレース候補遺伝子のノックアウト細胞は、ジアシル型のGPIアンカーのみ発現すると考えていたが、アルキルアシル型のGPIアンカーの増加が見られた。同一遺伝子のノックダウンのシステムではジアシル型のGPIアンカーのみ生合成していたが、両者の違いとしては、ノックアウト作出に掛かった時間が長く、その間に代替パスウェイが活性化したことが示唆された。またノックアウト細胞では、プラズマローゲンの生合成量の増加が見られた。プラズマローゲンは生体内での役割が分かっておらず、その欠損がペルオキシソーム病の病因であるとされてきた。今回ターゲットとした遺伝子の機能を詳細に検討することで、ペルオキシソーム病との関連を見いだせる可能性がある。

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)

[学会発表] (計2件)

1) 神澤 範行, Glycolipid biosynthesis and GPI anchor biosynthesis, 第10回 国際メタボロミクスシンポジウム (2014年6月23-26日 山形県鶴岡 東京第一ホテル鶴岡)

2) イ ゴンヒ 1, 藤田 盛久 2, 村上 良子 1, 神澤 範行 1, 前田 裕輔 1, 木下 タロウ 1

(1 大阪大学免疫学フロンティア研究センター・微生物病研究所, 2 江南大学・生命工学), GPIアンカー型タンパク質の細胞膜遊離に関わるGPI切断酵素PGAP6, 第87回 日本生化学会大会 (2014年10月15-18日 京都府京都市 国立京都国際会議場)

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(常勤)

研究者番号: 40452461

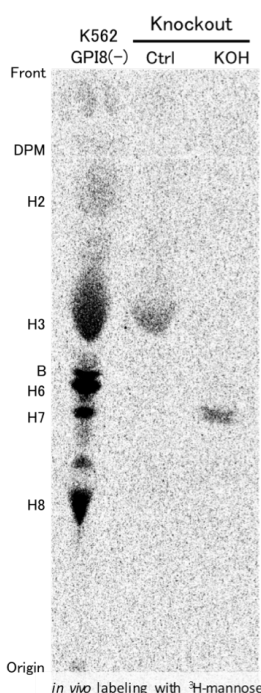


Figure 3. Alkaline treatment of GPI intermediates derived from KO cells