

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26870831

研究課題名(和文) 脱パルミトイル化酵素PPT1変異による神経セロイドリポフスチン症の発症機構の解明

研究課題名(英文) The pathological analysis of infantile neuronal ceroid lipofuscinosis caused by mutations of palmitoyl-protein thioesterase 1 gene

研究代表者

高村 歩美 (TAKAMURA, Ayumi)

鳥取大学・医学部・講師

研究者番号：90508368

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ライソゾーム酵素であるpalmitoyl-protein thioesterase 1(PPT1)遺伝子変異により発症する乳児型NCL(CLN1)は、神経変性を伴う常染色体劣性遺伝病である。発症機構は未解明であり、根本治療薬はない。本研究は、疾患モデル細胞を用いた網羅的なパルミトイル化タンパク質の解析を目的とした。ABE assayとLC/MS/MSの結果より、疾患特異的にパルミトイル化が亢進している2種類のタンパク質を同定した。これらは、記憶障害や運動障害をきたす直接的な因子であり、治療標的として有力であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Infantile neuronal ceroid lipofuscinosis (CLN1) is caused by mutations of palmitoyl-protein thioesterase 1 gene (PPT1). The molecular mechanisms have not been elucidated. There is no an effective therapeutic approach. I developed CLN1 cell lines expressing mutated PPT1. ABE assay and LC/MS/MS identified two highly palmitoylated proteins in CLN1 cells. Their functions are related with dementia and mortar neuron degeneration. It was suggested that they would be new therapeutic targets.

研究分野：神経科学

キーワード：ライソゾーム病 神経セロイドリポフスチン症 パルミトイル化

1. 研究開始当初の背景

ライソゾーム病は、ライソゾームで働く加水分解酵素の遺伝的欠損により、これらの基質がライソゾーム内に蓄積し発症する稀少疾患である。ライソゾーム病の1つである神経セロイドリポフスチノーシス (NCL) は、常染色体劣性遺伝病であり、CLN9 を除く 13 種類の遺伝子が同定されている。しかし、各々が遺伝学上異種である事が病態解明を非常に困難にしている。遺伝学上は異種であっても、神経細胞や繊維芽細胞、その他全身の細胞内に自家蛍光を発するリポフスチン (老化色素) が蓄積するという共通点を有している。最も重症な NCL (CLN1) は、PPT1 (palmitoyl-protein thioesterase 1) 遺伝子変異により発症する。民族間で差はあるが、発症頻度は 10 万人に 1 人程度と考えられている。大脳、小脳の神経細胞変性や脳の萎縮が生じ、記憶障害・知的障害・視力障害・てんかん・運動障害など、臨床経過は多様性に富んでいる。現在のところ、神経症状に対する有効な治療法はない。

2. 研究の目的

CLN1 の原因遺伝子である PPT1 は、S-アシル化タンパクからパルミチン酸残基を取り除く脱パルミトイル化酵素である。翻訳後のタンパク質脂質修飾の1つであるパルミトイル化は、タンパク質の疎水性を上昇させて細胞膜との親和性を高める役割をしている。その後、PPT1 によりタンパク質が脱パルミトイル化されると、タンパク質は別の細胞内小器官の膜へ移動し、再びパルミトイル化によって膜に留まる。このパルミトイル化 - 脱パルミトイル化のサイクルによって制御を受けているシグナル分子は、神経系のみを挙げても数十種類に及ぶ。イオンチャネル、神経栄養因子受容体、G タンパク質共役受容体、scaffold タンパク質等、多岐にわたるシグナル因子が含まれる。この複雑性が CLN1 の病態解明と根本的治療法の確立を困難にしている。そこで、本研究では主に日本とヨーロッパで同定された遺伝子変異を発現する細胞株を用いた網羅的な解析によって、原因遺伝子と病態を直接的に結び付ける神経変性メカニズムの解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1)CLN1 疾患モデル細胞の樹立

現在までに約 60 種類の PPT1 遺伝子変異が報告されている。日本人における common mutation の存在は明らかではないため、我々が日本人患者で同定した新規 1 カ所を含む計 2 変異について、変異を保持する疾患モデル細胞の樹立を行った。フィンランド、イギリス、トルコで比較的 CLN1 の発症率が高く、それらの国々で common mutation として挙げ

られている 3 変異についても同様に疾患モデル細胞の樹立を行った。pCMV6 に導入されたヒト PPT1 を、pCMV-Script に組み込み、正常型 PPT1 発現ベクターを作成した。変異型 PPT1 発現ベクターは、Site-Directed Mutagenesis により作成した。変異 1 カ所を含むすべての塩基配列の確認は、ダイレクトシーケンスにより実施した。これらのベクターを SH-SY5Y 細胞に transient expression させ、4-methylumbelliferyl-6-thiopalmitoyl- β -glucoside (MUTG) を基質とする PPT1 活性測定とウェスタンブロットによって発現を確認した。その後、薬剤によるセレクションを行い permanent cell line を樹立した。

(2) CLN1 疾患モデル細胞の網羅的パルミトイル化タンパク質の検出と同定

PPT1 遺伝子変異が、タンパク質のパルミトイル化 脱パルミトイル化のバランスを破壊させるのかを明らかにするため、パルミトイル化タンパク質の網羅的な解析を行った。パルミトイル化タンパク質の抽出方法は、Acyl-Biotinyl Exchange (ABE) assay を用いた。パルミチン酸残基の付加 (パルミトイル化) やジスルフィド結合に関与していないフリーの SH 基を N-ethylmaleimide でアルキル化してブロックした後、還元剤 Hydroxylamine (HA) でパルミチン酸を解離させて SH 基を露出させた。その SH 基をビオチン標識し、ストレプトアビジンが付加したアガロースビーズを用いてパルミトイル化されていたタンパク質のみを分離回収した。SDS-PAGE で分画し、疾患モデル細胞で特異的に検出されたバンドを回収し、ゲル内消化の後に質量分析を行った。

4. 研究成果

CLN1 疾患モデル細胞の PPT1 酵素活性を測定し、変異型を導入したいずれのクローンにおいて、正常よりも PPT1 活性が低いことを確認した。(図 1)

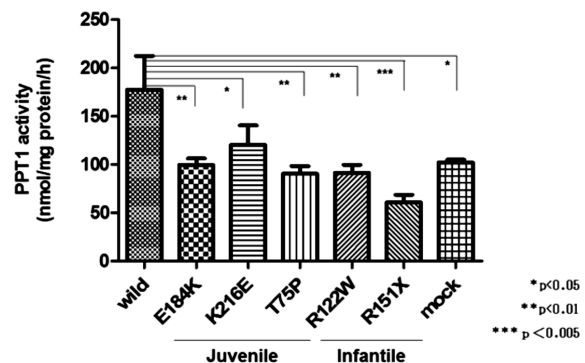


図1 疾患モデル細胞のPPT1活性

これらの細胞を用いて ABE assay を行い、SDS-PAGE によってパルミトイル化タンパク質を分離分画した。(図 2) 図中の矢印で示されるパルミトイル化タンパク質は、疾患モデル細胞で特異的に上昇していた。これらのタンパク質を同定するため、ゲルを切り出し

LC/MS/MS を実施した。

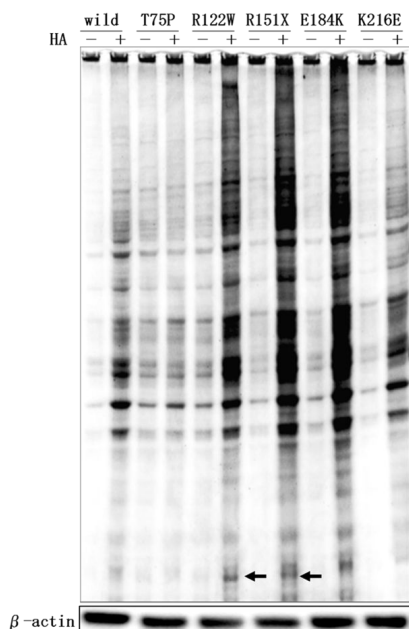


図2 疾患モデル細胞のABE assay及び SDS-PAGEによるパルミトイル化タンパク質の分離分画

53 種類のタンパク質が同定され、信頼値が高い 2 種類のタンパク質に着目した。1 つは、Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A (Cyclophilin A; CyPA) である。CyPA は核に移行後、脳血管内皮細胞の基底膜と密着接合に関与する因子を分解する。過剰な促進は、血液脳関門の破綻を引き起こす。記憶障害が中核症状であるアルツハイマー型認知症のモデルマウスで同様の病態が報告されており、PPT1 遺伝子変異によって核内に留まる CyPA 量の増加が、中枢神経変性のメカニズムの 1 つである事が示唆された。

また、CyPA は、apoptosis-inducing factor (AIF) の核移行を制御する因子でもあり、筋萎縮性側索硬化症や低酸素脳症のモデルマウスの運動ニューロンで CyPA/AIF の核内の発現が上昇しているという報告がある。

同定された 2 つ目のタンパク質は、低分子量 G タンパク質の ADP-ribosylation factor 1 (ARF1) である。ARF1 は細胞膜上で、アクチン細胞骨格と微小管の制御を担っている Rho ファミリー低分子量 G タンパク質の Cdc42 を活性化状態から不活性化状態へ変換する役割をもつ。PPT1 欠損によって、ARF1 の疎水性が異常亢進し、流動的な細胞膜では機能不全を起こしている可能性が示唆された。脳血管内皮細胞のアクチン重合の抑制は、糸状仮足の形成異常や細胞遊走能の低下、ピノサイトーシスの低下を引き起こす。

今後は、疾患モデル細胞や患者皮膚繊維芽細胞で CyPA や AIF の発現量と局在を明らかにし、PPT1 遺伝子変異による活性低下が直接的に引き起こす神経変性機構の解明を行っていききたい。また、これらを標的とした新規治療法の開発を行う予定である。

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)

[雑誌論文] (計 3 件)

The severe clinical phenotype for a heterozygous Fabry female patient correlates to the methylation of non-mutated allele associated with chromosome 10q26 deletion syndrome. Hossain MA, Yanagisawa H, Miyajima T, Wu C, Takamura A, Akiyama K, Itagaki R, Eto K, Iwamoto T, Yokoi T, Kurosawa K, Numabe H, Eto Y. Mol Genet Metab. 2017 Mar;120(3):173-179. doi: 10.1016/j.ymgme.2017.01.002.

Cholesterol ester storage disease with a novel LIPA mutation (L264P) that presented massive hepatomegaly: A case report. Kuranobu N, Murakami J, Okamoto K, Nishimura R, Murayama K, Takamura A, Umeda T, Eto Y, Kanzaki S. Hepatol Res. 2016 Mar;46(5):477-82. doi: 10.1111/hepr.12574. 査読有

Identification of a novel GLA mutation (F69L) in a Japanese patient with late-onset Fabry disease. Umeda T, Hashimoto S, Noriyasu K, Takamura A, Fujisaki M, Eto Y. Hum Genome Var. 2015 Nov 12;2:15044. doi:10.1038/hgv.2015.44. 査読有

[学会発表] (計 8 件)

乾燥濾紙血 (DBS) を用いた神経セロイドリポフスチン症 (NCL) , 型患者ハイリスクスクリーニングに関する研究. 板垣里奈, 柳沼恵子, 遠藤昌弘, 高村歩美, 秋山恵子, 柳沢比呂子, 岩本武夫, 衛藤義勝. 第 58 回日本先天代謝異常学会, 京王プラザホテル (東京都新宿区) , 2016.10.27

Biological Test and Pathological Analysis for Neuronal Ceroid Lipofuscinosis type 1. Ayumi Takamura. 第 1 回神経代謝病研究会, 東京慈恵会医科大学 (東京都港区) , 2016.6.30

Disruption of Protein Quality Control in Neuronal Ceroid Lipofuscinosis, Novel PPT1 Mutated Cases. Ayumi Takamura, Eto Yoshikatsu. 第 57 回日本先天代謝異常学会, 大阪国際会議場 (大阪府大阪市) , 2015.11.13

Examination of the clinical heterogeneity among Fabry's disease

families. Kaoru Eto, Ayumi Takamura, Miwa Fujisaki, Satoru Nagata, Yoshikatsu Eto. 第 57 回日本先天代謝異常学会, 大阪国際会議場(大阪府大阪市), 2015.11.13

ニーマンピック C 病の非侵襲性診断法: オキシステロール並びに lysoSM 測定の有用性. 衛藤義勝, 岩本武夫, 藤崎美和, 梅田稔子, 井田博幸, 高村歩美, 衛藤薫, 酒井規夫. 第 57 回日本先天代謝異常学会, 大阪国際会議場(大阪府大阪市), 2015.11.12

The aberrant Intracellular processing of Neuronal Ceroid Lipofuscinosis, Novel CLN1 Japanese Cases. Ayumi Takamura, Miwa Fujisaki, Hiroyuki Ida, Toya Ohashi, Yoshiyuki Eto. 第 56 回日本先天代謝異常学会, 江陽グランドホテル(宮城県仙台市), 2014.11.14

Toshiko Umeda, Ayumi Takamura, Miwa Fujisaki, Kayoko Tsuji, Reimi Hirayama, Toya Ohashi, Hiroyuki Ida, Yoshikatsu Eto. The clinical features and enzyme diagnosis by DBS in the NCL type 1 and 2 patients. 第 56 回日本先天代謝異常学会, 江陽グランドホテル(宮城県仙台市), 2014.11.14

衛藤義勝, 岩本武夫, 藤崎美和, 高村歩美, 梅田稔子, 辻嘉代子, 大橋十也, 井田博幸, 衛藤薫, 濱田悠介, 新寶理子, 近藤秀仁, 苛原香, 酒井規夫. Niemann Pick C(NPC) 患者での血清オキシステロール測定の診断への有用性に関して. 第 56 回日本先天代謝異常学会, 江陽グランドホテル(宮城県仙台市), 2014.11.13

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)
該当なし

取得状況(計 0 件)
該当なし

〔その他〕
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高村 歩美 (TAKAMURA Ayumi)
鳥取大学・医学部・講師
研究者番号: 90508368

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者
なし

(4) 研究協力者
なし