



低ホスファターゼ症の発症メカニズム

1. はじめに

低ホスファターゼ症は先天性の代謝異常疾患で、1948年にカナダ人医師のJ.C. Rathbunによって初めて報告された。血清アルカリホスファターゼ活性の低下と骨や歯の異常（骨の低石灰化、くる病様変化や歯の早期脱落など）を特徴としている。酵素活性が低いほど症状は重く、また早期に発症する。臨床的には1) 周産期型、2) 乳幼児型、3) 小児型、4) 成人型、5) 歯限局型の五つに分類され、周産期型と乳幼児型は重症型でしばしば致死的であり、一方、他の三つは軽症型である。重症型は劣性遺伝形式で、軽症型は劣性または優性遺伝形式で遺伝する。1993年に新潟大学の歯学部へ赴任したのを機会に筆者は本疾患の発症メカニズムの研究に取り組んで来たので概説したい。

2. アルカリホスファターゼについて

ヒトのアルカリホスファターゼには1) 組織非特異型、2) 小腸型、3) 胎盤型、4) 生殖細胞型の4種のアイソザイムが知られており、2-4)は組織特異的に発現している。いずれも約500残基のアミノ酸からなる糖タンパク質で、そのC末端はGPI (glycosylphosphatidylinositol) を介して細胞表面にアンカーされているエクトエンザイムである¹⁾。組織非特異型酵素の遺伝子は1番染色体の短腕 (p34~36.1) に位置するのに対して、3種の組織特異型酵素はいずれも2番染色体の長腕 (q34~37) に近接して存在する。組織特異型酵素間のホモロジーはアミノ酸レベルで87~97%であり、組織非特異型酵素と胎盤型の酵素では74%である^{1,2)}。精製された酵素はいずれもホモダイマーを形成していることが知られているが、細胞表面ではGPIに依存的にテトラマーで存在するという報告もなされている。

さらには、胎盤型の酵素についてその立体構造が明らかになり、従来から知られていたように触媒活性に関与する二つの亜鉛とマグネシムの他にカルシウムが配位している金属酵素であることが確立した²⁾。

組織非特異型酵素は別名、肝臓/骨/腎臓型とも呼ばれ、これらの臓器に強く発現しているが、その他広く体内に発現している。アルカリホスファターゼは、その著しく高い至適pH (p-ニトロフェニルリン酸を基質とした場合、pH 10.5前後) や天然の基質が特定できないことから長らくその生理的な役割がわからない状況が続いた。しかし、1988年になって、骨の低石灰化を主症状とする重症の低ホスファターゼ症が組織非特異型アルカリホスファターゼ (tissue-nonspecific alkaline phosphatase, TNSALP) の遺伝子の変異に起因することが明らかとなり、TNSALPの骨の石灰化への関与が決定的となった³⁾。ただし、同じアイソザイムが発現している肝臓や腎臓でのその生理的な機能は不明なままであり、他の組織特異型の酵素の生理的な役割についても現在も研究の途上にある¹⁾。

3. 石灰化と TNSALP

現在、広く受け入れられている TNSALP の役割を 図 1

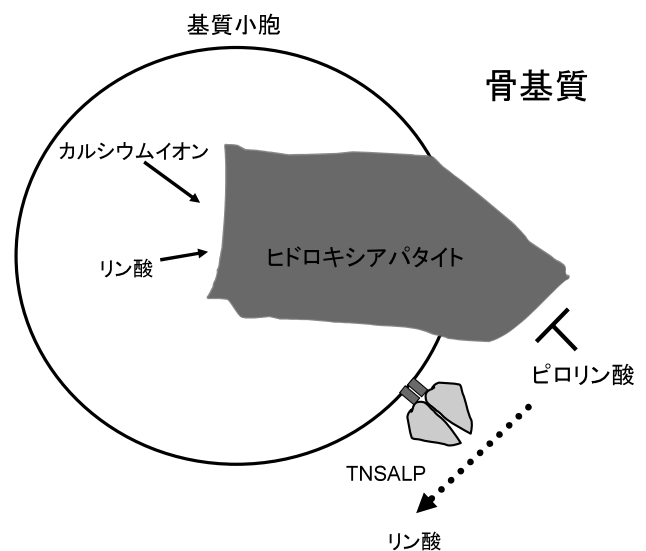


図1 石灰化のモデル

骨の石灰化は骨芽細胞や軟骨細胞の表面から生じた基質小胞内で開始され、次の段階でヒドロキシアパタイトの結晶は小胞の膜を突き破って外側の骨基質へと成長し、最終的に骨基質全体が石灰化される。ピロリン酸は結晶毒としてヒドロキシアパタイトの成長を阻害し、TNSALPはそれを分解することで石灰化を促す。重症の低ホスファターゼ症患者やTNSALPノックアウトマウスでは基質小胞内の石灰化は開始されるが、その後のステップが阻害されるとの形態学的な所見が報告されている^{1,4)}。

に記す。カルシウムイオンとリン酸とから石灰化（ヒドロキシアパタイトの形成）が基質小胞内で開始され、その後基質小胞外の基質へと結晶が成長するとき、ピロリン酸は結晶毒としてはたらく。基質小胞の膜上に存在する TNSALP はピロリン酸を分解することにより石灰化を促進させる。一方、変異のために充分量の TNSALP 活性を持たない低ホスファターゼの患者では基質中のピロリン酸が増加して低石灰化を引き起こすと考えられる¹⁾。低ホスファターゼ患者並びに TNSALP のノックアウトマウスでは尿中のピロリン酸濃度が非常に増加することからもピロリン酸は TNSALP の天然の基質の一つであると考えられている^{1,4)}。

4. 突然変異が TNSALP 分子に及ぼす影響

TNSALP 遺伝子上の変異については E. Mornet 博士によりデータベースが構築されており、2008年11月現在で198例の突然変異が報告されている (http://www.sesep.uvsq.fr/database_hypo/mutation.html)。その80%近くがアミノ酸の置換によるミスセンス変異で、その他少数のナンセンス変異、フレームシフト変異もある。筆者の研究室では、これまで主に重症例の患者で報告された変異に着目して細胞レベルで解析を行い、酵素活性の低下が引き起こされる機序に関連して変異酵素が少なくとも三つのグループに分かれることを明らかにした。

4-1) 細胞内輸送に欠陥があるもの：ミスセンス変異体の R54C (Arg⁵⁴→Cys; 以下省略), N153D, E218G, A162T, D277A, D289V, G317A がこれに相当する⁵⁻⁹⁾。多くの遺伝疾患で、原因となるタンパク質のアミノ酸変異によりその立体構造の形成が阻害されるとともに細胞内輸送が障害されて目的部位まで輸送されなくなる例は数多く知られている。これまでのところ TNSALP の変異でも細胞内輸送が障害される場合が一番多い。重症の低ホスファターゼ患者でホモ型（両親から TNSALP に関して同一の変異を受け継いでいる）、あるいは複合ヘテロ接合体（両親から TNSALP に関して異なる変異を受け継いでいる）として報告された。ただし、詳細に分析すると (a) 全く細胞表面に到達できないものから、(b) かなりの割合で細胞表面に発現して、しかも活性を保持しているものまである。D289V は (a) の代表的な例で、全く活性を失っており、小胞体に蓄積した後ポリユビキチン化を受けて最終的にプロテアソームで分解される⁹⁾ (図2)。この289番目のアスパラギン酸はカルシウムに配位していることが明らかにされており²⁾、カルシウムの結合が TNSALP の立体構造、そして活性の保持に重要な役割を果たすことが推測される。同じく、カルシウムの配位に関係することが知られている E218 の変異の解析でも同様な結果を得ている^{5,9)}。(b) の例では A162T があり、これは1988年に最初に報告された変異である³⁾。論文では単にアミノ酸の置換により活性が低下するとされていたが、詳しく解析してみると A162T は

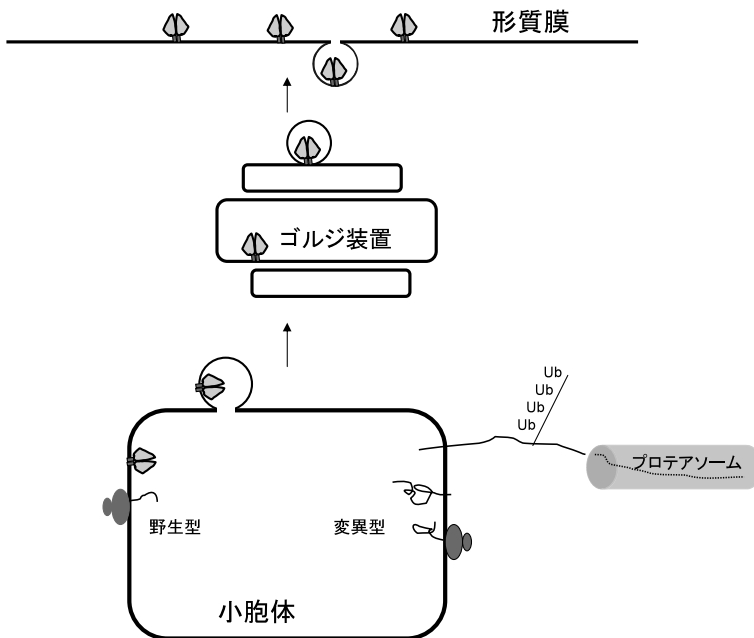


図2 TNSALP の細胞内輸送

野生型の TNSALP 分子は分泌経路を辿って細胞表面へと輸送される。まず、小胞体での生合成の際に糖鎖および GPI で修飾される。次に、二量体を形成した後輸送小胞でゴルジ装置に運ばれて糖鎖のプロセッシングを受ける。GPI を介してラフトに組み込まれた後¹⁴⁾、最終的に細胞表面に運ばれて、形質膜の外層に GPI アンカーで繫留される。一方、適切な立体構造を獲得できずに小胞体から出てゆけなかった変異酵素分子は細胞質へ逆輸送されるとともにポリユビキチン化された後、プロテアソームで分解される^{9,15)}。変異酵素であっても、細胞内輸送能に障害がない場合は細胞表面まで運ばれるが、アミノ酸の置換の触媒作用への影響は変異の場所、置換されるアミノ酸の種類によって大きく異なる。

細胞内輸送に欠陥があることがわかった⁵⁾。変異酵素分子の多くが細胞内に貯留し、少数の分子のみが細胞表面に発現する。しかも細胞表面に発現する A162T は野生型に近い K_m 値を有することがわかった。他にも細胞内輸送への影響が知られる変異としては E174K, G438S, I473F, G232V, I201T および F310L がある^{10,11)}。なお, N153D は小胞体ではなく, ゴルジ装置のシス側に蓄積が見られた点で他の変異体と異なっており, 細胞内での分解速度も遅い⁸⁾。最近, 優性形式で遺伝する変異体 G232V が同じくゴルジ装置に蓄積することが報告された¹⁰⁾。ちなみに, Rathbun が最初に報告した乳幼児型低ホスファターゼ患者は複合ヘテロ接合体 (A97T/D277A) であったことが, 保管されていた病理標本の解析により, 実に発見から 50 年を経て明らかになった¹²⁾。

4-2) 細胞表面に発現するがその酵素活性が著しく低下しているもの: R433C と V406A がこれに該当する。前者では 433 番目のアミノ酸がシステイン残基に置き換わったためにサブユニット間にジスルフィド結合を形成していた¹³⁾。細胞内輸送速度は野生型のそれとほぼ同じであるものの, 酵素活性は著しく低下していた。プロテアーゼによる限定加水分解の結果から, サブユニット間の共有結合が分子にひずみを与えているため, 触媒部位が影響を受けたものと推測された。なお, 培養液中に DTT を加えると, ジスルフィド結合の形成が有意に阻害されるとともに, 活性を保持する分子が増加することから, アルギニンからシステインへの置換自体は触媒活性に影響しないと考えられる。一方, V406A は同じ疎水性のアミノ酸間の置換であるにも係わらず, 野生型に比べて酵素活性が著しく低下していた¹⁴⁾。細胞内輸送の速度やゴルジ装置のラフト構造への取り込み速度に関しては野生型酵素との差は見いだせなかった。しかし, プロテイナーゼ K を用いた限定加水分解で V406A は野生型に比べて容易に分解されることから, その立体構造の違いが示唆された。また, 406 番目のアミノ酸を他の疎水性のアミノ酸で置換したところ, ロイシンやイソロイシンに変えても野生型酵素と大差なかった。一方, フェニルアラニンに置換するとアラニンに似た性質を示したことから, 側鎖の長さ/疎水性度が立体構造の保持に重要である可能性が考えられる。433 番および 406 番目のアミノ酸はクラウン領域と呼ばれる特殊な領域に存在する (図 3)^{2,14)}。前述の変異体 R433C で 433 番目のシステイン間に共有結合が生じることを考えると, クラウン領域を構成する二つのサブユニットは提唱されている 3D モデル

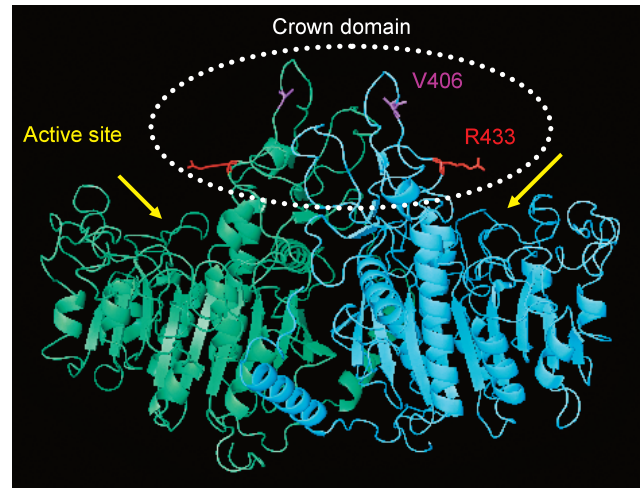


図3 ヒト TNSALP の 3D モデル

ヒト胎盤型のアルカリホスファターゼの結晶構造解析からコンピューターを用いたシミュレーションによって構築された²⁾。クラウン領域は他のタンパク質には見られない特殊な構造で, 酵素の温度感受性, アロステリックな性質, コラーゲンとの結合性などに関与している¹⁾。胎盤型酵素と TNSALP とのクラウン領域全体のホモロジーは 74% だが, そのループ領域 (405–435) に関しては 50% である²⁾。重症の低ホスファターゼ症に関連する V406 と R433 を示した¹⁴⁾。

に比べてより近接している可能性があり, その場合に 406 番目の疎水性の側鎖はサブユニット間の立体構造の保持に関与していると推測される。図 3 はあくまでも胎盤型酵素の 3D に基づいて構築された TNSALP のモデルなのでヒト TNSALP の X 線解析が待たれる。

4-3) GPI で修飾されずに分泌型になったもの: これまでのところ, 1559T-del がこれに相当する¹⁵⁾。日本人にのみ, しかも高頻度の発症が報告された変異で, フレームシフトのために本来の停止コドンがずれて, 野生型に比べて C 末端側に 80 残基長いポリペプチドとして合成される。GPI で修飾されないために細胞表面には発現しない。本来は分泌酵素の性質を持つが細胞レベルでは合成量の極くわずかしかな分泌されない。その原因は 80 残基中の三つのシステイン残基で, 分子間で相互にジスルフィド結合して高分子凝集物を形成し, 細胞内でポリユビキチン化/プロテアソームでの分解を受ける。しかし, 三つのシステインをセリンに変異させると活性を有するホモ二量体として分泌されてくる。

なお, 低ホスファターゼ症の臨床面を含めた石灰化に関連した疾患の詳しい解説は引用文献を参考にされたい¹⁶⁾。

5. おわりに

筆者が研究を開始した当初 20 例あまりだった TNSALP の変異が現在では 200 例に迫りつつある。変異の同定には日本人研究者の寄与も大きい。ただ、臨床例の報告は大多数が北米，ヨーロッパ，日本でなされたものであり，今後アジアやアフリカでの研究が盛んになればさらに様々な変異が報告されてくる可能性がある。個々の変異が TNSALP 分子へ及ぼす影響は実際に細胞に発現してみなければ推測できないのが現状で，立体モデルに基づいたコンピューターシミュレーションで予測できるようになるにはまだ時間がかかりそうである。また，今年からアメリカで酵素補充療法による低ホスファターゼ症の治験も開始されると聞いているので，その発症機序の解明が単に学術上の興味を越えて，治療に役立つことを願っている。

最後に，共同研究者の方々に感謝します。また，校閲をお願いした池原征夫教授（第一薬科大学）にお礼を申します。

- 1) Millán, J.S. (2006) in *Mammalian Alkaline Phosphatases: From Biology to Applications in Medicine and Biotechnology*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- 2) Mornet, E., Stura, E., Lia-Baldin, A.S., Stigbrand, T., Menez, A., & LeDu, M.H. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 31171–31178.
- 3) Weiss, M.J., Cole, D.E., Ray, K., Whyte, M.P., Lafferty, M.A., Mulivor, R.A., & Harris, H. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **85**, 7666–7669.
- 4) Fedde, K.N., Blair, L., Silverstein, J., Coburn, S.P., Ryan, L. M., Weinstein, R.S., Waymire, K., Narisawa, S., Millán, J.L., MacGregor, G.R., & Whyte, M.P. (1999) *J. Bone Miner. Res.*, **14**, 2015–2026.
- 5) Shibata, H., Fukushi, M., Igarashi, A., Misumi, Y., Ikehara, Y., Ohashi, Y., & Oda, K. (1998) *J. Biochem. (Tokyo)*, **123**, 968–977.
- 6) Fukushi, M., Amizuka, N., Hoshi, K., Ozawa, H., Kumagai, H., Omura, S., Misumi, Y., Ikehara, Y., & Oda, K. (1998) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **246**, 613–618.
- 7) Fukushi-Irie, M., Ito, M., Amaya, Y., Amizuka, N., Ozawa, H., Omura, S., Ikehara, Y., & Oda, K. (2000) *Biochem. J.*, **348**, 633–642.
- 8) Ito, M., Amizuka, N., Ozawa, H., & Oda, K. (2002) *Biochem. J.*, **361**, 473–480.
- 9) Ishida, Y., Komaru, K., Ito, M., Amaya, Y., Kohno, S., & Oda, K. (2003) *J. Biochem. (Tokyo)*, **134**, 63–70.
- 10) Brun-Heath, I., Lia-Baldini, A.S., Maillard, S., Taillandier, A., Utsch, B., Nunes, M.E., Serre, J.L., & Mornet, E. (2007) *Eur. J. Med. Genet.*, **50**, 367–378.
- 11) Cai, G., Michigami, T., Yamamoto, T., Yasui, N., Satomura, K., Yamagata, M., Shima, M., Nakajima, S., Mushiake, S.,

- Okada, S., & Ozono, K. (1998) *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **83**, 3936–3942.
- 12) Mumm, S., Jones, J., Finnegan, P., & Whyte, M.P. (2001) *J. Bone Miner. Res.*, **16**, 1724–1727.
- 13) Nasu, M., Ito, M., Ishida, Y., Numa, N., Komaru, K., Nomura, S., & Oda, K. (2006) *FEBS. J.*, **273**, 5612–5624.
- 14) Numa, N., Ishida, Y., Nasu, M., Sohda, M., Misumi, Y., Noda, T., & Oda, K. (2008) *FEBS. J.*, **275**, 2727–2737.
- 15) Komaru, K., Ishida, Y., Amaya, Y., Goseki-Sone, M., Orimo, H., & Oda, K. (2005) *FEBS. J.*, **272**, 1704–1717.
- 16) 大藪恵一 (2007) *Clin. Calcium*, **17**, 128–132.

織田 公光

(新潟大学医歯学系口腔生化学分野)

Molecular basis of hypophosphatasia

Kimimitsu Oda (Division of Oral Biochemistry, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences, 2-5274 Gakkocho-dori, Chuo-Ku, Niigata 951-8514, Japan)
投稿受付：平成 20 年 6 月 3 日

嗅覚神経系の発達過程におけるケモカインシグナルの役割

はじめに

ニューロンは誕生後に適切な場所へ移動して，特定の個性を持った細胞集団（層，神経核，神経節など）を形成する。その後，異なる細胞集団同士が軸索と樹状突起を介して精緻に接続することで，秩序立った機能的神経回路網が形成される。すなわち，脳神経系の成り立ちを理解するには，「ニューロンの移動」と「軸索の投射」という二つの連続したプロセスがどのような分子メカニズムによって制御されているのかを解明することが重要である。嗅覚神経系の発達過程もその例外ではない。匂い分子の受容を司る嗅細胞の前駆細胞は，生誕地から移動，集合して嗅プラコード（後の嗅上皮）と呼ばれる細胞集団を形成する。その後，嗅プラコード内で嗅細胞へと分化し，軸索を脳の嗅球に正確に伸長して，二次ニューロンである僧帽細胞と特異的シナプス結合を形成する。これにより，嗅球における匂い分子受容体地図が構築され，匂いの情報が脳内に表現される。

魚類は嗅覚系が発達しており，古くから嗅覚研究に適したモデル生物として匂い分子の受容機構，匂い情報の脳への伝達，匂い刺激による行動や内分泌系の変化など，嗅覚