



Title	Analysis of Localization of Mutated Tissue-Nonspecific Alkaline Phosphatase Proteins Associated with Neonatal Hypophosphatasia using Green Fluorescent Protein Chimeras
Author(s)	蔡, 桂明
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41690
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について ご参照ください 。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	さい 桂 明 蔡 桂 明
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 4 5 0 0 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 11 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科内科系専攻
学 位 論 文 名	Analysis of Localization of Mutated Tissue-Nonspecific Alkaline Phosphatase Proteins Associated with Neonatal Hypophosphatasia using Green Fluorescent Protein Chimeras (GFP を用いた新生児型低ホスファターゼ症における組織非特異型アルカリホスファターゼ変異蛋白の局在解析)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 岡田伸太郎 (副査) 教 授 青 笹 克 之 教 授 越 智 隆 弘

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

低ホスファターゼ症は組織非特異型アルカリホスファターゼ (tissue-nonspecific alkaline phosphatase, TNSALP) の活性低下により、全身骨の石灰化障害、骨変形をきたす常染色体劣性遺伝疾患である。本症は一般的に発症時期により分類される周産期型、乳児型、小児型、成人型の 4 型と、歯限局型に分けられる。臨床的には発症時期の早いほど重症であり、周産期型は通常致死性である。本症の責任遺伝子である組織非特異型アルカリホスファターゼ遺伝子は 12 のエクソンからなり、その内、エクソン 2 からエクソン 12 までは蛋白質コード領域である。本症に伴う遺伝子異常として、今まで 19 カ所の変異が報告されている。今回、私たちは本症の TNSALP 遺伝子解析を行い、検出した遺伝子異常に由来する変異蛋白の酵素活性と細胞内局在を検討した。

【方法】

研究対象：

症例：1 歳 5 カ月の男児。胎児期より超音波検査で四肢変形を指摘されたが、満期出生時、呼吸障害は認めなかった。患児の血清 ALP 値が 56 IU/L、父と母の血清 ALP 値がそれぞれ 32 IU/L、68 IU/L といずれも低値であった。患児の生後 1 カ月のレントゲンでは大腿骨および腓骨の著明な変形が見られたが、明らかな石灰化の低下は認められなかった。上記のレントゲン所見と ALP 値が低いこと及び発症時期により、従来の類型と異なる新生児型低ホスファターゼ症と診断した。

研究方法：

まず患者と両親の末梢血単核球より genomic DNA と total RNA を抽出し、coding exon を増幅する数種類のプライマーセットを用いて、PCR (polymerase chain reaction) あるいは reverse transcription - PCR を行った。次にその PCR 産物を TA クローニングし、塩基配列を決定した。

同定された変異を有する ALP 発現ベクターを構築し、COS7 細胞に導入して 48 時間後、ALP 活性を測定した。また、ALP 蛋白の細胞内局在を検討するため、Green Fluorescent Protein (GFP) と ALP との融合発現ベクターを構築し、ヒト骨肉腫由来の Saos-2 細胞に導入して、G418 selection にて stable transfectant を作製した後、蛍光顕微鏡で観察を行った。また融合蛋白を発現する stable transfectant より、抗 GFP 抗体を用いた免疫沈降にて

GFP-ALP 融合蛋白を回収し、ALP 酵素活性測定と抗 GFP 抗体を用いたウェスタンブロットを行った。

【成績】

患者はエクソン 9 に TTC (Phe) → CTC (Leu) (F310L) の点変異、及びエクソン 12 にヌクレオチド 1735 番の T 欠失 (delT1735) が見られる複合ヘテロ接合体であった。F310L は母由来で、delT1735 は父由来であると判明し、本症が常染色体劣性遺伝であると確認した。

上記の変異が ALP 活性に及ぼす影響について、COS7 細胞を用いて発現実験を行い、検討した。その結果、野生型の活性を 100% とした時、F310L の活性は 70% 程度保持されたのに対し、delT1735 の活性は殆ど消失した。

GFP を用いて、ALP 蛋白の細胞内局在及び変異による影響を検討した。GFP 単独では細胞質と核に同程度に存在するが、野生型及び F310L の ALP-GFP 融合蛋白は ALP の局在性を反映して、細胞質と細胞膜に存在した。これに対し、delT1735 変異 ALP-GFP 融合蛋白は細胞質の中にとどまり、細胞膜への局在が見られなかった。ウェスタンブロットにより、予測した分子量の融合蛋白の発現が確認された。融合蛋白の ALP 活性は COS7 細胞での前述の検討結果と一致した。

【総括】

1. 低ホスファターゼ症における TNSALP 遺伝子の変異は今まで 19 カ所が報告されている。本症例に認められた F310L と delT1735 は他の日本人症例においても見られ、これらの変異は日本人に多い変異である可能性があると考えられた。

2. 周産期型低ホスファターゼ症は通常致死的と言われているが、私たちは上記の症例に加えて、周産期より発症したものの生存している低ホスファターゼ症をもう 1 例経験した (J Clin Endocrinol Metab 81: 4458-4461, 1996)。これら 2 例はいずれも呼吸障害がないこと、レントゲン所見上も低石灰化を認めないことより、古典的な周産期型より軽症で長期生存が可能であるので、従来の臨床分類のほかに、新しい病型 (新生児型) が存在すると考えている。また、2 例とも F310L という変異が認められた。F310L 変異蛋白は野生型の 70% の ALP 活性を有するので、この変異を有する症例は軽症な臨床経過を呈すると考えられた。

3. delT1735 変異によりフレームシフトを起こし、80 個のアミノ酸がカルボキシル (C) 末端に付加される。ALP 蛋白は C 末端の数十個アミノ酸が切り取られ、GPI (glycosyl phosphatidyl inositol) アンカーを介して細胞膜に結合すると言われているので、delT1735 変異 ALP 蛋白においては、C 末端のアミノ酸疎水性が変わって、細胞内でのこのプロセッシングが障害されたことにより、細胞膜に付着できなくなったと予測された。

論文審査の結果の要旨

本研究は低ホスファターゼ症 (Hypophosphatasia) における臨床的重症度と責任遺伝子 TNSALP (Tissue-Nonspecific Alkaline Phosphatase) 変異の型との相関及び細胞レベルでの変異蛋白の局在を明らかにしたものである。上記は低ホスファターゼ症の病態、石灰化における TNSALP の役割解明に貢献するものであり、学位に値するものと考えられる。