

小胞体カルシウムポンプの異常にともなうダリエー病発症機構の研究

(研究課題番号：14370256)

平成14年度～平成16年度研究補助金(基盤研究(B))

-研究報告書-

平成17年5月

研究代表者 飯塚 一

(旭川医科大学皮膚科)

はしがき

ダリエー病は常染色体優性遺伝の角化異常症で、原因遺伝子は染色体 12q24.1 領域の小胞体カルシウムポンプ (SERCA2b(sarcoendoplasmic reticulum calcium-ATPase type 2b))である(Nature Genetics 21: 271-277, 1999)。多くのダリエー病患者の解析により、われわれの発見したもの (Takahashi, Iizuka et al: J Dermatol Sci 26: 167-175, 2001) も含めて、現在までに 80 以上の遺伝子変異が同定されている。一方、変異に伴う小胞体カルシウムポンプの機能面の解析はわれわれの報告 (Daiho, Iizuka, et al: J Biol Chem 276:32771-8, 2001) を除いては事実上なされていなかった。特に変異遺伝子を培養細胞に導入し、機能を調べる研究については、われわれの知る限り全く手がつけられておらず、未知の領域であった。本研究は、現時点で報告されている SERCA2b の変異遺伝子を系統的に作成し、SERCA2b を持たない Cos1 細胞に導入し、小胞体カルシウムポンプの詳細な機能解析を行ったものである。

研究組織

研究代表者： 飯塚 一 (旭川医科大学皮膚科)

研究分担者： 山本 明美 (旭川医科大学皮膚科)
高橋 英俊 (旭川医科大学皮膚科)
中村 哲史 (旭川医科大学皮膚科)

研究経費

	直接経費	間接経費	合計 (千円)
平成 14 年度	3 9 0 0	0	3 9 0 0
平成 15 年度	2 3 0 0	0	2 3 0 0
平成 16 年度	2 3 0 0	0	2 3 0 0
総計	8 5 0 0	0	8 5 0 0

結果および考案

ダリエー病は小胞体カルシウムポンプ遺伝子 ATP2A2 の変異により発症する角化異常症である。ATP2A2 の転写産物である SERCA2b(sarcoendoplasmic reticulum calcium-ATPase type 2b)は ATP を加水分解し、カルシウムを細胞質から小胞体内腔へ輸送する。われわれは現時点で報告のある変異のうち、ナンセンス変異以外の点突然変異を有する SERCA2b を 51 種類全て作成した。さらにこれらを内因性 SERCA2b 活性のない Cos1 細胞に導入し機能解析を行うシステムを確立した。

その結果、51 種類中、15 種類は SERCA2b の発現そのものが低下しており、これはおそらく異常な SERCA2b 蛋白が品質管理の過程でユビキチン化され、分解されてしまい、発現しなくなったものと推定された。これらのグループは SERCA2b については stop codon によるナンセンス変異のようにふるまっていることが予想される。

残りの 31 種類のうち 21 種類はカルシウムポンプ機能と共役する ATPase 活性が完全に消失していることが明らかとなった。SERCA2b は ATPase 活性と連動して濃度勾配に逆らいカルシウムを細胞質内から小胞体に組み入れるため、ATPase 活性の消失は輸送に必要なエネルギーの消失につながり、ポンプ機能が発揮できないことが予想された。

さらに残りの 8 種類は ATPase 活性はあるもののカルシウムポンプとの間の機能的 uncoupling がおきている mutant であることが明らかとなった。したがって前述の mutant と同様にポンプ機能は遂行できず、エネルギーの無駄な消費のみがおこっていることになる。興味深いことにこのタイプの mutant は ATPase 活性消失型 mutant と比べ全体的に症状が強い傾向がみられた。おそらく ATP の無駄な消費が、他の細胞機能にも影響を及ぼしているものと推定している。

最後に残った 3 種類(I274V, L321F, M719I)は、全てわれわれが新規に発見したミスセンス変異であるが、これらの変異 SERCA2b はほぼ正常に発現、局在化し、しかも高いカルシウム輸送活性を有していた。さらなる解析の結果、これら 3 種の変異体は速度論的性質において、それぞれ異なるタイプの異常を示し、I274V では正常なカルシウム親和性だが、輸送活性は若干低下し、M719I ではいずれも若干低下していた。輸送活性の低下は、細胞質および小胞体内腔におけるカルシウム代謝に対する迅速な対応が不十分であることを意味し、細胞質カルシウムに対する親和性の低下は、細胞質カルシウムレベルが異常な高値に設定されてしまうことを意味する。さらに L321F 変異体は M719I と同様に細胞質カルシウムに対する親和性が低下していることに加え、顕著な特異的異常、

すなわち小胞体内腔カルシウムによる **feedback inhibition** に対する非感受性を有し、その結果、小胞体内腔カルシウムレベルの異常高値での設定を引き起こすことが明らかとなった。ダリエー病は従来、SERCA2b 変異体の極度の発現低下や機能喪失による **haproinsufficiency** により発症するものと予測されてきたが、われわれの結果は、ミスセンス変異によっては異なるタイプの速度論的性質の異常により、細胞内カルシウム恒常性の変動が引き起こされることを初めて示したものである。

またこれらの変異の検索の過程で SERCA2b の異常の部位には、いわゆる **hot spot** に相当するものはなく、SERCA2b は機能的にあらゆる部位が重要な、いかえると機能的に進化の究極にある、極めて分子進化の遅い蛋白であることが明らかとなった。

研究発表

1. Ishida-Yamamoto A, Deraison C, Bonnart C, Bitoun E, Robinson R, O'Brien TJ, Wakamatsu K, Ohtsubo S, Takahashi H, Hashimoto Y, Dopping-Hepenstal PJ, McGrath JA, Iizuka H, Richard G, Hovnanian A. LEKT1 is localized in lamellar granules, separated from KLK5 and KLK7, and is secreted in the extracellular spaces of the superficial stratum granulosum. *J Invest Dermatol*;124:360-6. 2005*
2. Senshu T, Ishida-Yamamoto A, Takahashi H, Iizuka H. Prediction of a coding sequence for a novel type II keratin from N-terminal sequences of mouse epidermal proteins site-specifically deiminated in embryonic development. *J Dermatol Sci*;37(1):41-8. 2005*
3. Takahashi H, Honma M, Miyauchi Y, Nakamura S, Ishida-Yamamoto A, Iizuka H. Cyclic AMP differentially regulates cell proliferation of normal human keratinocytes through ERK activation depending on the expression pattern of B-Raf. *Arch Dermatol Res*;296:74-82. 2004*
4. Iizuka H, Takahashi H, Ishida-Yamamoto A. Psoriatic architecture constructed by epidermal remodeling. *J Dermatol Sci*;35:93-9. 2004*
5. Sato K, Yamasaki K, Daiho T, Miyauchi Y, Takahashi H, Ishida-Yamamoto A, Nakamura S, Iizuka H, Suzuki H. Distinct types of abnormality in kinetic properties of three Darier disease-causing sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase mutants that exhibit normal expression and high Ca²⁺ transport activity. *J Biol Chem*;279:35595-603. 2004*
6. Iizuka H, Takahashi H, Honma M, Ishida-Yamamoto A. Unique keratinization process in psoriasis: late differentiation markers are abolished because of the premature cell death. *J Dermatol*;31:271-6. 2004*
7. Ishida-Yamamoto A, Simon M, Kishibe M, Miyauchi Y, Takahashi H, Yoshida S, O'Brien TJ, Serre G, Iizuka H. Epidermal lamellar granules transport different cargoes as distinct aggregates. *J Invest Dermatol*;122:1137-44. 2004*
8. Takahashi H, Suzuki Y, Miyauchi Y, Hashimoto Y, Ishida-Yamamoto A, Iizuka H. Roxithromycin decreases ultraviolet B irradiation-induced reactive oxygen intermediates production and apoptosis of keratinocytes. *J Dermatol Sci*;34:25-33. 2004

9. Tsuji H, Okamoto K, Matsuzaka Y, Iizuka H, Tamiya G, Inoko H: SLURP-2, a novel member of the human Ly-6 superfamily that is upregulated in psoriasis vulgaris. *Genomics* 81; 26-33, 2003 (3.488)
10. Takahashi H, Ibe M, Honma M, Ishida-Yamamoto A, Hashimoto Y, Iizuka H. 1,25-dihydroxyvitamin D(3) increases human cystatin A expression by inhibiting the Raf-1/MEK1/ERK signaling pathway of keratinocytes. *Arch Dermatol Res*;295:80-7. 2003*
11. Takahashi H, Ibe M, Kinouchi M, Ishida-Yamamoto A, Hashimoto Y, Iizuka H. Similarly potent action of 1,25-dihydroxyvitamin D3 and its analogues, tacalcitol, calcipotriol, and maxacalcitol on normal human keratinocyte proliferation and differentiation. *J Dermatol Sci.* 2003;31:21-8.
12. Wada T, Shirakata Y, Takahashi H, Murakami S, Iizuka H, Suzuki H, Hashimoto K: A Japanese case of segmental Darier's disease caused by mosaicism for the ATP2A2 mutation. *Br J Dermatol* 149: 185-188, 2003
13. Ishida-Yamamoto A, Richard G, Takahashi H, Iizuka H. In vivo studies of mutant keratin 1 in ichthyosis hystrix Curth-Macklin. *J Invest Dermatol*;120:498-500. 2003*
14. Takahashi H, Ibe M, Nakamura S, Ishida-Yamamoto A, Hashimoto Y, Iizuka H. Extracellular regulated kinase and c-Jun N-terminal kinase are activated in psoriatic involved epidermis. *J Dermatol Sci*;30:94-9. 2002*
15. Nakane H, Ishida-Yamamoto A, Takahashi H, Iizuka H. Elafin, a secretory protein, is cross-linked into the cornified cell envelopes from the inside of psoriatic keratinocytes. *J Invest Dermatol*;119:50-5. 2002*
16. Takahashi H, Manabe A, Ishida-Yamamoto A, Hashimoto Y, Iizuka H. Aberrant expression of apoptosis-related molecules in psoriatic epidermis. *J Dermatol Sci*;28:187-97. 2002*
17. Kinouchi M, Takahashi H, Itoh Y, Ishida-Yamamoto A, Iizuka H. Ultraviolet B irradiation increases keratin 5 and keratin 14 expression through epidermal growth factor receptor of SV40-transformed human keratinocytes. *Arch Dermatol Res.*;293:634-41. 2002*
18. Ishida-Yamamoto A, Senshu T, Eady RA, Takahashi H, Shimizu H, Akiyama M, Iizuka H. Sequential reorganization of cornified cell keratin filaments involving filaggrin-mediated compaction and keratin 1 deimination. *J Invest Dermatol*;118:282-7. 2002