

学 位 論 文 の 要 旨

学 位 の 種 類	博 士	氏 名	宮 内 勇 貴
学 位 論 文 題 目			
Comprehensive analysis of expression and function of 51 sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase mutants associated with Darier disease. (ダリエ病に関連する51種の Ca^{2+} -ATPase変異体における発現と機能の包括的解析) に関する研究			
共 著 者 名			
宮内勇貴、大保貴嗣、山崎和生、高橋英俊、山本明美、 Danko Stefania、鈴木裕、飯塚一			
(2006) Journal of Biological Chemistry 281(32), 22882-22895.			
研 究 目 的			
<p>SERCA (sarco(endo)plasmic reticulum calcium ATPase)は、ATPの加水分解に共役したカルシウムポンプであり、Ca^{2+}を細胞質から細胞内Ca^{2+}貯蔵部位である小胞体に汲み上げることにより、細胞質および小胞体内腔のCa^{2+}濃度を調節する。Ca^{2+}輸送サイクルでは、先ず細胞質Ca^{2+}が輸送部位に結合して酵素は活性化され ($\text{E2} + 2\text{Ca}^{2+} \rightarrow \text{E1Ca}_2$)、ATPにより自己リン酸化反応中間体 ($\text{EP} \cdot \text{Ca}_2$) を形成し、その異性化反応 ($\text{E1P} \cdot \text{Ca}_2 \rightarrow \text{E2P} + 2\text{Ca}^{2+}$) により$\text{Ca}^{2+}$を小胞体内腔に放出し、最後に加水分解する ($\text{E2P} \rightarrow \text{E2} + \text{Pi}$)。SERCAは3種の異なる遺伝子群によりコードされ、それらの異常は細胞間接着異常による角化異常、扁平上皮癌、筋弛緩障害、感覚器官異常など様々の重篤な病態を引き起こす。常染色体優性遺伝性角化異常症ダリエ病の原因遺伝子はSERCA2b isoformをコードするATP2A2であることが明らかとなっている^{1,2,3,4)}。また、日本人ダリエ病患者についての遺伝子解析により初めて我々が発見したI274V、L321F、M719Iの3種のミスセンス変異⁵⁾それぞれを導入したSERCA2b蛋白をCOS-1細胞で発現させ、発現量、細胞内局在、及び機能について解析したところ、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呈し、従って異なる内容のCa^{2+}ホメオスタシスの異常を誘起することが示唆される。I274Vでは正常なCa^{2+}親和性だがCa^{2+}輸送活性が若干低下し、M719ではCa^{2+}親和性、輸送活性とも若干低下していた。</p>			

従ってI274VとM719Iは、角化細胞のCa²⁺ホメオスタシスにおける（わずかな）haploinsufficiencyによりダリエ病を発症させると示唆された。L321F変異体はM719Iと同様に細胞質Ca²⁺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、すなわち内腔Ca²⁺によるFeedback inhibitionに対する不感受性を有する。単純なhaploinsufficiencyではなく、小胞体内腔の異常に高いCa²⁺レベルが特徴的な病態発症要因であると示唆された。

上記検討により、SERCA2b蛋白の発現・局在・機能・反応速度論の分子レベル観点からダリエ病の発症を解明する初の報告となったことから、我々は更にダリエ病患者において報告されたミスセンス変異SERCA2b蛋白51種における発現ならびに機能解析を行い、それぞれの変異によりどのような異常がSERCA2b蛋白に起こりダリエ病が発症するか、分子レベルからの解明を目的とした。

材 料 ・ 方 法

Human SERCA2b cDNAをpMT2発現ベクターのEcoRI siteに組み込み、overlap extension PCR法を用いてSERCA2b cDNAへの変異導入を行った。Liposome-mediated DNA transfection法を用いてSERCA2b cDNAをCOS-1細胞に導入し、マイクロソーム画分を回収し解析に供した。SERCA2b蛋白の発現はSERCA2特異的モノクロナル抗体を用いELISA法で定量した。機能解析として、ATPase活性、Ca²⁺輸送活性、自己リン酸化反応中間体（EP）定量、を実施した。

成 績

- 1) 作成した51種変異体のうち、36種類は野生型蛋白とほぼ同程度に発現したが、他の15種類では野生型の30%以下の極めて低い発現であった。なお、点変異部位の存在領域と発現量低下の間に明確な相関はなかった。
- 2) 高レベルに発現した36種の変異体のうち、21種はATP分解活性をほぼ完全に失い、他方15種では、活性が認められた。このうち特に7種は野生型に近い（50%以上）の活性を有していた。
- 3) 更に、ATP分解活性を有する計15種の変異体について、Ca²⁺輸送活性を測定した結果、3種を除く12種の変異体はCa²⁺輸送活性をほぼ完全に喪失した“uncoupling mutants”であった。
- 4) 発現した36種の変異体について、ATP分解反応の詳細な速度論的解析を行なった結果、次の4種の異常（あるいはそれらの複合的異常）が存在することが明らかとなった。1)ATPから自己リン酸化反応中間体（EP）を形成しない（ATPを分解できない）。2)EPを形成するがその分解が阻害されている（ATP分解が遅い、あるいはできない）。3)Ca²⁺親和性が低い。4)ATP分解が起こってもCa²⁺の輸送ができない（上記uncoupling mutants）。

考 案

ダリエ病患者において報告されたミスセンス変異SERCA2b蛋白51種における発現ならびに機能解析を行った結果、蛋白機能の面からみて、その破綻型は多岐に渡っており、ただ単にSERCA2b機能喪失だけがダリエ病発症の原因ではないことが明らかとなった。SERCA2b変異体の発現程度は、ほとんど発現しないものからほぼ野生型SERCA2bと同等程度のものまで様々であった。その発現とATP分解活性の関係には、1)発現の程度に関わらず、活性が失活している 2)ある程度の発現は見込まれるものの、その活性は、正常より低い 3)発現が高く、活性も高い、すなわち一見正常な機能が保持されている の3型に分けられる。1)については、細胞質内から小胞へのCa²⁺の取り込みが阻害されている事は明らかであり、ダリエ病におけるCa²⁺ホメオスタシスに明らかな異常がみられる変異体であることが予測される。3)については、正常蛋白が発現しているにも関わらず、病態に陥るということを示しており、これにはATP分解反応の速度論的解析により既に解が見出されている ((2004) *J. Biol. Chem.* **279**(34), 35595-35603.)。

また、発現には異常が見られなかった36種の変異体について、ATP分解反応の詳細な速度論的解析を行なった結果、4種の異常(あるいはそれらの複合的異常)が存在することが明らかとなったことから、Ca²⁺ポンプの構造機能連関、そしてカチオン能動輸送におけるエネルギー共役機構の解明という基礎生命科学研究の観点からも、極めて重要かつ膨大な情報を与えていると考えている。

結 論

ダリエ病患者において報告されたミスセンス変異SERCA2b蛋白51種における発現ならびに機能解析を行い、それぞれの変異によりどのような異常がSERCA2b蛋白に起こりダリエ病が発症するか、分子レベルから解析し、SERCA2b変異体の極度の発現低下や機能喪失によるhaploinsufficiencyにより発症することを明らかにした。さらに、表皮細胞におけるCa²⁺代謝制御の破綻と病態が関連し、かつその制御が極めて厳密となっていることを示した。

引 用 文 献

- 1) Sakuntabhai, A., Ruiz-Perez, V., Carter, S., Jacobsen, N., Burge, S., Monk, S., Smith, M., Munro, C. S., O'Donovan, M., Craddock, N., Kucherlapati, R., Rees, J. L., Owen, M., Lathrop, G. M., Monaco, A. P., Strachan, T., andHovnanian, A.
(1999) *Nat. Genet.* **21(3)**, 271-276.
- 2) Sakuntabhai A., Burge S., Monk S., Hovnanian A.
(1999) *Hum Mol Genet.* **8(9)**, 1611-1619.
- 3) Ruiz-Perez VL., Carter SA., Healy E., Todd C., Rees JL., Steijlen PM., Carmichael AJ., Lewis HM., Hohl D., Itin P., Vahlquist A., Gobello T., Mazzanti C., Reggazini R., Nagy G., Munro CS., Strachan T.
(1999) *Hum Mol Genet.* **8(9)**, 1621-1630.
- 4) Jacobsen NJ., Lyons I., Hoogendoorn B., Burge S., Kwok PY., O'Donovan MC., Craddock N., Owen MJ.
(1999) *Hum Mol Genet.* **8(9)**, 1631-1636.
- 5) Takahashi H., Atsuta Y., Sato K., Ishida-Yamamoto A., Suzuki H., Iizuka H.
(2001) *J Dermatol Sci.* **26(3)**, 169-172.

参 考 论 文

- 1) Daiho T., Yamasaki K., Saino T., Kamidochi M., Satoh K., Iizuka H., Suzuki H.
(2001) *J Biol Chem.* **276(35)**, 32771-32778.
- 2) Sato K., Yamasaki K., Daiho T., Miyauchi Y., Takahashi H., Ishida-Yamamoto A., Nakamura S., Iizuka H., Suzuki H.
(2004) *J Biol Chem.* **279(34)**, 35595-35603.

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士 (医学)	氏 名	宮内 勇貴
<p>審査委員長 谷口隆信 ㊞</p> <p>審査委員 飯塚 一 ㊞</p> <p>審査委員 鈴木 裕 ㊞</p>			
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p>Comprehensive analysis of expression and function of 51 sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase mutants associated with Darier disease. (ダリエ病に関連する 51 種の Ca²⁺-ATPase 変異体における発現と機能の包括的解析)</p> <p style="text-align: center;">共 著 者 名</p> <p style="text-align: center;">宮内勇貴、大保貴嗣、山崎和生、高橋英俊、山本明美、 Danko Stefania、鈴木裕、飯塚一</p> <p>(2006) Journal of Biological Chemistry 281(32), 22882-22895.</p>			
<p>SERCA (sarco(endo)plasmic reticulum calcium ATPase)は、ATPの加水分解に共役したカルシウムポンプであり、Ca²⁺を細胞質から小胞体に汲み上げることにより、細胞内Ca²⁺濃度の制御を担っている。SERCAは3種の異なる遺伝子群によりコードされ、それぞれからさらに複数のisoformが形成される。このうち、皮膚角化細胞を含む非筋肉組織の主要なisoformであるSERCA2bの変異により、常染色体優性遺伝性角化異常症“ダリエ病”が引き起こされ、現在までに約100のダリエ病家系の報告がある。しかしながら蛋白質の変異とカルシウムポンプ機能異常との関連についてはこれまで報告がなかった。本研究では、報告された51種のミスセンス変異がSERCA2bにどのような機能異常を生じるのかにつき、詳細な生化学的解析をおこなっている。</p>			

51種の変異それぞれをSERCA2b cDNAに導入、変異cDNAを培養COS-1細胞にtransfectし、ミクロソーム画分を回収してカルシウムポンプ蛋白質の発現と機能の解析を行った。

- 1) 51種の変異蛋白質のうち、15種は野生型の30%以下の低発現であった。いずれもmRNAレベルは野生型と差がなかったので、発現の減少は翻訳以降のプロセスに起因すると考えられた。生体でも変異による発現低下とダリエ病の病態との関連を示唆する結果と言える。残る36種は野生型と同程度に発現していた。
- 2) 十分に発現した36種の変異体のうち、21種はATP分解活性が認められず、結果としてCa²⁺輸送を駆動できない変異体であった。残る15種ではかなりの活性が認められた。
- 3) ATP分解活性を有する15種のうち、12種の変異体ではCa²⁺輸送活性をほぼ完全に喪失し、この分解と輸送の“uncoupling”によるCa²⁺輸送不全が、ダリエ病の病態に関連すると考えられた。
- 4) 残る3種は十分に発現し正常なATP分解活性/Ca²⁺輸送活性を有していたが、Ca²⁺に対する親和性が低下していた。このことが細胞内Ca²⁺のホメオスタシスに異常をきたし、ダリエ病の病態に関連すると考えられた。

さらに詳細なATP分解反応の反応速度論的解析により、発現が十分なダリエ病関連変異体においては、アミノ酸変異はSERCA2b蛋白質自体あるいは蛋白質と小胞体膜との関係に影響を与え、SERCA2bのCa²⁺輸送機能を障害している事を考察している。

SERCA2bのhaploinsufficiencyからどのようにダリエ病の病態が生じるのかについては今後の課題であるが、SERCA2b機能の喪失がその出発点であることを示したことは、この分野に於いて極めて意義のある研究成果と考えられる。更に、本研究は、カルシウムポンプの構造活性相関の理解という観点からも基本的で重要な成果と言える。なお本論文の内容は2006年のJournal of Biological Chemistry誌281巻に掲載されています。

申請者に対して査問を行い、当該分野に関する申請者の知識／経験／見識は博士に相応しいものであり、論文審査の結果と合わせて、合格と判定したことを御報告致します。

平成19年8月17日