

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	佐藤克彦
学位論文題目			
<p>Distinct Types of Abnormality in Kinetic Properties of Three Darier Disease SERCA2b Mutants, which Exhibit Almost Normal Expression and High Ca²⁺ Transport Activity.</p> <p>(正常発現と高Ca²⁺輸送活性を示す3種のSERCA2b変異体は、異なるタイプの機能的異常によりダリエー病を発症させる)</p>			
共著者名			
山崎和生、大保貴嗣、宮内勇貴、高橋英俊、山本明美、中村哲史、飯塚一、鈴木裕			
未公表			
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、Ca²⁺を細胞質から細胞内Ca²⁺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Ca²⁺濃度を調節する。Ca²⁺輸送サイクルでは、先ず細胞質Ca²⁺が輸送部位に結合して酵素は活性化され(E2 + 2Ca²⁺ → E1Ca₂)、ATPにより自己リン酸化反応中間体(EP・Ca₂)を形成し、その異性化反応(E1P・Ca₂ → E2P + 2Ca²⁺)によりCa²⁺を小胞体内腔に放出し、最後に加水分解する(E2P → E2 + 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ー病の原因遺伝子はSERCA2b isoformをコードするATP2A2であることが最近明らかとなった^{1,2)}。本研究では、日本人ダリエー病患者についての初めての遺伝子解析により我々が発見したI274V、L321F、M719Iの3種のミスセンス変異³⁾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、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ー病が発症するか、分子レベルからの解明を目的とした。</p>			

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。細胞内局在は抗体染色法により観察した。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、ADP感受型EP (E1P)・非感受型EP (E2P) 定量、EP形成・分解の時間経過追跡を実施した。

成 績

- 1) I274V、L321F、M719Iの各変異体蛋白はCOS-1細胞において野生型と同様に高レベルに発現し、しかも正常に小胞体に局在することが観察された。
- 2) 野生型と比較しATPase活性はL321Fで約120%に上昇し、I274VとM719Iでは約70%に若干減少していた。これらは、ATP分解の律速ステップであるEP異性化とCa²⁺放出 (E1P・Ca₂→E2P+2Ca²⁺) がL321Fでは促進され、I274VとM719Iでは遅くなったことによる。I274VではE2P加水分解も約1/3の速度に遅くなっていた。
- 3) どの変異体もATPaseと共役してCa²⁺を輸送した。
- 4) 定常状態で蓄積したEPは野生型とM719Iでは殆ど全てE1Pであるのに対し、I274VとL321Fでは約50%がE2Pとなった。I274VではE2P分解が遅くなったためで、L321FではE1P→E2Pの促進と両者の平衡のE2P側へのシフトのためである。
- 5) 輸送する細胞質Ca²⁺に対する親和性はI274Vでは野生型と同様であり (Kd=0.16 μM)、L321F (Kd=0.57 μM) とM719I (Kd=0.44 μM) では若干低下していた。
- 6) 小胞体内腔に輸送・蓄積された高濃度 (~mM) Ca²⁺によるfeedback inhibitionに対する感受性はL321Fで著明に低下していることが、ATPaseとEP分解の速度論的解析から明らかになった。一方、I274VとM719Iでは野生型と同様にfeedback inhibitionが認められた。

考 案

今回解析したI274V、L321F、M719Iの3種の変異体は、少なくともCOS-1細胞においては野生型と同様の発現量と局在を示したので、品質管理による分解システムを逃れる正常に折りたたまれた高次構造を持つと推定され、実際高いCa²⁺輸送活性を保持していた。従ってそれぞれの変異によるダリエー病発症はむしろポンプ機能特性の異常によるものであると結論される。

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Ca²⁺ホメオスタシスの異常を誘起することが示唆される。すなわちI274Vでは正常なCa²⁺親和性だがCa²⁺輸送活性が若干低下し、M719ではCa²⁺親和性、輸送活性と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Ca²⁺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Ca²⁺に対する親和性の低下は細胞質Ca²⁺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。これらの異常はまた小胞体内腔へのCa²⁺蓄積が不十分であろうことも意味する。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によりダリエー病を発症させると示唆された。興味深いことに、I274V変異を保持する患者よりも、（Ca²⁺親和性が低い）M719I変異を保持する患者のほうが明らかに強い皮膚症状を呈している。

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。後者の異常は小胞体内腔Ca²⁺レベルを異常な高値に設定してしまうことを意味する。L321FのCa²⁺輸送活性は野生型よりもむしろ高く、従ってこの変異を有する患者では、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る。実際、L321F変異を有する家系の患者（母と娘）は、強い皮膚症状に加え、神経精神症状・行動異常を特徴的的症状として呈している。従って異常に高いレベルの内腔Ca²⁺により、Ca²⁺シグナル形成・調節のためのCa²⁺ストアとしての小胞体機能や、翻訳後蛋白修飾・輸送の小胞体機能調節が乱れ、脳神経系に異常が生じた可能性が示唆される。

結 論

正常に発現・局在化し、しかも高いCa²⁺輸送活性を保持するダリエー病原因SERCA2b変異体3種（I274V, L321F, M719I）は、異なるタイプの速度論的性質の異常により病態を発症させる。ダリエー病はSERCA2b変異体の極度の発現低下や機能喪失によるhaploinsufficiencyにより発症するものと予想されていたが、本研究の結果、わずかな活性低下とCa²⁺親和性低下によってもhaploinsufficiencyが生じることが、（日本人患者の変異の影響を解析することによって）はじめて明らかとなり、従って表皮細胞は極めて厳密なCa²⁺代謝制御を必要とすることが示された。また、小胞体内腔Ca²⁺を異常な高レベルに設定する性質を呈する変異による病態発症の例がはじめて見出され、特に神経細胞における小胞体内腔機能異常と細胞機能異常の関連の重要性がはじめて指摘された。

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.,Hovnanian,A.(1999)*Nat. Genet.*
21,271-277
- 2) Victor L. Ruiz-Perez,Simon A. Carter,Eugene Healy,Carole Todd,Jonathan L. Rees,
Peter M. Steijlen,Andrew J. Carmichael,Helen M. Lewis,D. Hohl,Peter Itin,
Anders Vahlquist,T. Gobello,C. Mazzanti,R. Reggolini,Gyula Nagy,
Colin S. Munro, and Tom Strachan (1999)*Hum.Mol.Genet.* **8**,1611-1139
- 3) Takahashi H.,Atsuta Y.,Sato K.,Ishida-Yamamoto A.,Suzuki H.,Iizuka H.(2001)
J.Dermatol.Sci. **26**,169-172

参 考 论 文

- 1) Daiho T.,Yamasaki K.,Saino T.,Kamidochi M.,Satoh K.,Iizuka H.,and Suzuki H.
(2001)*J.Biol.Chem.* **276**,32771-32778

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	佐 藤 克 彦
審査委員長 立 野 正 敏 ㊟ 審査委員 飯 塚 一 ㊟ 審査委員 鈴 木 裕 ㊟ 審査委員 吉 田 成 孝 ㊟			
学 位 論 文 題 目 Distinct Types of Abnormality in Kinetic Properties of Three Darier Disease SERCA2b Mutants, which Exhibit Almost Normal Expression and High Ca ²⁺ Transport Activity. (正常発現と高 Ca ²⁺ 輸送活性を示す 3 種の SERCA2b 変異体は、異なるタイプの機能的異常によりダリエー病を発症させる)			
SERCA (sarco(endo)plasmic reticulum calcium ATPase) は、ATP 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、細胞質と小胞体内腔の Ca ²⁺ 濃度を制御する。酵素は細胞質 Ca ²⁺ が輸送部位に結合することにより活性化され、ATP から自己リン酸化中間体 EP を形成する。そして EP の構造変化 (E1P → E2P) により Ca ²⁺ は小胞体内腔に放出される。SERCA は 3 種の異なる遺伝子群によりコードされるが、そのうち SERCA2b アイソフォームをコードする <i>ATP2A2</i> の変異により、常染色体優性遺伝性角化異常症ダリエー病（細胞間接着異常による角化異常）が発症することが最近明らかとなった。本論文では、日本人ダリエー病患者についての初めての遺伝子解析により筆者らが発見した I274V、L321F、M719I の 3 家系ミスセンス変異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、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ー病が発症するか、分子レベルから解明すること目的とした。その結果、以下が明らかとなった。

- 1) I274V、L321F、M719I の各変異体蛋白は COS-1 細胞において野生型と同様に高レベルに発現し、正常に小胞体に局在した。
- 2) 野生型と比較し ATPase 活性は L321F で約 120%に上昇し、I274V と M719I では約 70%に若干減少していた。これらは、ATP 分解の律速ステップである EP 構造変化と Ca^{2+} 放出が L321F では促進され、I274V と M719I では遅くなったことによる。I274V では E2P 加水分解も約 1/3 の速度に遅くなっていた。
- 3) どの変異体も ATP 分解と共役して Ca^{2+} を輸送した。
- 4) 輸送する細胞質 Ca^{2+} に対する親和性は I274V では野生型と同様であり ($K_d=0.16 \mu\text{M}$)、L321F ($K_d=0.57 \mu\text{M}$) と M719I ($K_d=0.44 \mu\text{M}$) では若干低下していた。
- 5) 小胞体内腔に輸送・蓄積された高濃度 ($\sim\text{mM}$) Ca^{2+} による feedback inhibition に対する感受性は L321F で著明に低下していた。一方、I274V と M719I では野生型と同様に feedback inhibition が認められた。

以上の結果は、これら 3 家系の変異ではそれぞれ異なるタイプの Ca^{2+} ホメオスタシス異常を引き起こし、ダリエー病を発症させることを示す。すなわち、I274V および M719I では迅速な Ca^{2+} 代謝への対応が不十分であり、M719I では加えて細胞質 Ca^{2+} を正常より若干高いレベルに設定すると予想される。角化細胞は従って極めて厳密な Ca^{2+} ホメオスタシスを必要とし、SERCA2b 変異体の僅かな異常によってもダリエー病が発症すると示唆された。興味深いことに、 Ca^{2+} 親和性が低い M719I 変異を保持する患者のほうが I274V 患者より明らかに強い皮膚症状を呈している。他方、L321F ではその特異的異常、すなわち内腔 Ca^{2+} による feedback inhibition に対する不感受性により小胞体内腔 Ca^{2+} レベルを異常に高いレベルに設定してしまうと予想される。L321F の Ca^{2+} 輸送活性は野生型よりもむしろ高く、従ってこの変異を有する患者では単純な haploinsufficiency ではなく、小胞体内腔の異常に高い Ca^{2+} レベルが特徴的病態の発症要因であると示唆された。実際、L321F 変異を有する家系の患者 (母・娘) は強い皮膚症状に加え、神経精神症状・行動異常を特徴的症状として呈している。従って異常に高いレベルの内腔 Ca^{2+} により、 Ca^{2+} シグナル形成・調節のための Ca^{2+} ストアとしての小胞体機能や、翻訳後蛋白修飾・輸送などの小胞体機能調節が乱れ、脳神経系に異常が生じた可能性が示唆される。

これまでダリエー病は SERCA2b 変異体の極度の発現低下や機能喪失による haploinsufficiency により発症するものと予想されていたが、本論文により、僅かな活性低下と Ca^{2+} 親和性低下によっても haploinsufficiency が生じることが初めて明らかとなり、表皮細胞は極めて厳密な Ca^{2+} 代謝制御を必要とすることが示された。また、小胞体内腔 Ca^{2+} を異常な高レベルに設定する性質を呈する変異による病態発症の例がはじめて見出され、特に脳神経細胞における小胞体機能異常と細胞機能異常の関連性が初めて指摘された。本論文はこのように、緻密な速度論的解析を展開することにより解明した変異体機能異常と病態との関連を厳密に議論している点で特筆すべきものであり、病態の分子レベルからの解明に大きく貢献している。

また、論文内容と関連領域についての各審査委員による試問に対しても適切な回答が得られ、論文提出者はこの領域において十分な知識を有することが示された。

以上の審査結果から、本審査委員会は、本論文が博士（医学）の学位に値するものであると判定した。