研 究 者：金城奈津子（所属：新潟大学医歯学総合病院小児歯科）

研究題目：歯限局型低フォスファターゼ症を引き起こす病態の酵素学的解析

目　的：

低フォスファターゼ症は歯や骨などの硬組織の低石灰化や，血清並びに組織中のアルカリフォスファターゼ活性の低下によって特徴付けられる先天性代謝異常疾患である。その原因は組織非特異型アルカリフォスファターゼ遺伝子の変異によることが既に知られている。低フォスファターゼ症の重篤度は血清中のアルカリフォスファターゼ活性レベルに密接な関係があり，血清中の酵素レベルが低いほど発症時期が早く症状もより重篤となる。発症の時期により周産期型，乳幼児型，小児型，成人型，歯限局型に分類され，歯科学的には乳歯の早期脱落を特徴としており，比較的軽症例の場合はこれが主たる現症となっている。

本症における乳歯の早期脱落はかなり高い頻度で発現し，患児の 75％以上にみられるという報告もある。低フォスファターゼ症の中でも比較的軽症で骨疾患の顕著でないものでは，この歯科的所見が唯一の特徴的な症状となるため，歯科医が本疾患を最初に発見することも稀ではない[1)]。本研究では歯限局型症例（軽症例）で報告された変異で，91 番目のプロリン（P）がロイシン（L）に置換された突然変異 TNSALP（P91L）（以下 P91L と略す）に注目し[2)]，これまでほとんど報告のない歯限局型低フォスファターゼ症の発症メカニズムの解析を最終目的とした。

対象および方法：

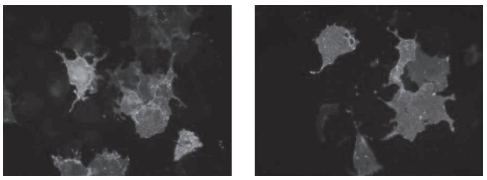
野生型の酵素の cDNA を鋳型に部位特異的な突然変異法を用いて変異を導入し（酵素の 91 番目のプロリンをロイシンへ変換），その後培養細胞に遺伝子導入して，発現されてくる変異型酵素について細胞生物学的及び酵素学的に多角的な解析を行うこととする。具体的には，野生型酵素と変異型酵素の細胞内動態の比較を行う。また酵素活性の比較を細胞染色や酵素反応速度論的解析によって行うこととする。

野生型，及び変異酵素 P91L をコードする cDNA を作成し，COS-1 細胞を用いた一過性の発現の実験系において解析を行った。実際の手法は以下の通り。

・蛍光抗体染色（1 次抗体：抗 TNSALP 抗体，2 次抗体：ローダミン標識ヤギ由来抗ウサギ IgG 抗体）
・アゾ色素による活性染色
・合成基質として p-ニトロフェニルリン酸を用いたアルカリフォスファターゼ活性測定

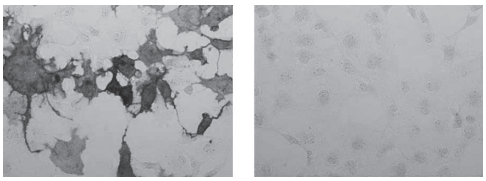
結果および考察：

蛍光抗体染色により，P91L は野生型と同様に細胞膜表面に局在することが観察された（図 1）。一方で，活性染色及びアルカリフォスファターゼの活性を測定し比較したところ，P91L を発現する COS-1 細胞では活性を検出できなかった（図 2, 3）。



野生型　　P91L

図 1　蛍光抗体染色



野生型　　P91L

図 2　活性染色

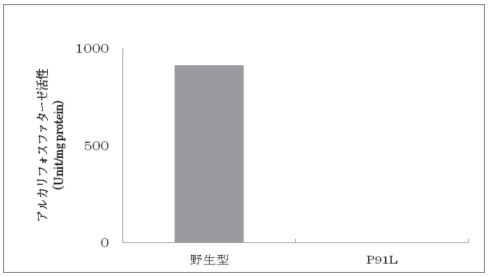


図 3　活性測定

本ミスセンス変異は軽症例で報告されているが，他の重症例の低フォスファターゼ症で報告された変異と同様に酵素活性を著しく低下していた[3)]。しかし，細胞表面に発現されることから，変異の影響は活性部位に限局され，その生合成自体には変異の影響はないと推測される。

参考文献：

1）井上美津子他：低フォスファターゼ症の 1 症例の歯科的所見 , 小児歯誌 , 15：62-69, 1997.

2）Herasse M, et al.：Molecular study of three cases of odontohypophosphatasia resulting from heterozygosity for mutations in the tissue non-specific alkaline phosphatase gene, J Med Genet, 40：605-609, 2003.

3）Numa N, et al.：Molecular basis of a perinatal hypophosphatasia with tissue-nonspecific alkaline phosphatase bearing a valine-to-alanine change at position of 406：Implication for structural importance of the crown domain, FEBS J, 275：2727-2737, 2008.

成果発表：

平成 22 年度日本小児歯科学会秋季大会にてポスター発表を行った。

今後 J Biochem（Tokyo）に投稿する予定である。