

ピリミジン-5'-ヌクレオチダーゼ(P5N)異常症の
病因解明とP5Nの機能解析

(14571001)

平成14年度～平成15年度科学研究費補助金(基盤研究(C)(2))研究成果報告書



平成16年度3月

研究代表者 藤井寿一
(東京女子医科大学医学部教授)



ピリミジン-5'-ヌクレオチダーゼ(P5N)異常症の
病因解明と P5N の機能解析

(14571001)

平成 14 年度～平成 15 年度科学研究費補助金（基盤研究(C)(2)）研究成果報告書

平成 16 年 3 月

研究代表者 藤井寿一

(東京女子医科大学医学部教授)

はしがき

われわれは平成 14 年度、平成 15 年度の 2 年間に「ピリミジン-5'-ヌクレオチダーゼ (P5N) 異常症の病因解明と P5N の機能解析」の課題で、国内の諸施設より依頼された原因不明の遺伝性非球状性溶血性貧血 73 症例を検索し、ピルビン酸キナーゼ異常症 5 例、グルコース-6-リン酸脱水素酵素異常症 10 例、アデニル酸キナーゼ異常症 1 例、ピリミジン-5'-ヌクレオチダーゼ (P5N) 異常症 1 例と 4 種 17 例の赤血球酵素異常症を診断した。

日本人 P5N 異常症 9 家系について遺伝子解析を行い、2 種のミスセンス変異、エクソンスキッピングによる 30 アミノ酸欠失、1 塩基挿入によるフレームシフト変異、並びに 9 塩基欠失による 3 アミノ酸欠失の 5 種の新規の変異を同定した。ミスセンス変異の一種 5 家系は全て九州地方で同定され、ハプロタイプは全て一致していることより、ファウンダー変異であることが強く示唆された。

2 種のミスセンス変異を有する P5N-I を Cos 細胞に発現し、細胞内での安定性について検討したところ、一種の変異 P5N-I は発現した Cos 細胞における P5N-I 活性および発現タンパク量は共に対照の約 20% 程度に低下しており、タンパクの不安定性によることを明らかにした。キネティクス異常を有する他のミスセンス変異は Cos 細胞内では正常対照と同様に安定であり、病因は酵素の質的異常によると考えられた。赤血球以外の組織での P5N-I の生理的意義について検討する目的で pCX-EGFP にヒト P5N-I cDNA を挿入し、P5N-I を ubiquitous に過剰発現するトランスジェニックマウスを作製した。現在までに 1 ライン

のファウンダーが得られ、その F1 を用いてトランスジーンの発現を検討した結果、ヒト P5N-ImRNA を検出するイムノブロット解析でトランスジーン発現量は肝、腎共に endogenous な遺伝子産物の 2 倍以下であった。現在、発現レベルが比較的高い肝や腎について、トランスジーン発現の影響を検討中である。

P5N-I は α -インターフェロンにより誘導され、また HIV や SLE などの患者のリンパ球で発現が増加していることから、免疫応答において何らかの役割を果たしていると予想される。しかしながら、培養細胞を用いたインフルエンザウイルス感染に対する影響は顕著には認められなかった。今後、慢性のウイルス感染に対する影響を検討する予定である。

研究成果を報告するにあたり、研究遂行に協力頂いた濱田貴子並びに岡田真一氏に感謝します。

研究組織

研究代表者：藤井寿一（東京女子医科大学医学部教授）
研究分担者：菅野 仁（東京女子医科大学医学部助教授）
小泉 勤（福井医科大学医学部助教授）
滝澤剛則（愛知県心身障害者コロニー研究所室長）

研究経費

平成 14 年度	2, 1 0 0 千円
平成 15 年度	1, 3 0 0 千円
計	3, 4 0 0 千円

研究発表

(1) 学会誌等

Hirono, A., Kawate, K., Honda, A., Fujii, H., Miwa, S.: A single mutation 202G→A in human glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) gene can cause acute hemolysis by itself. Blood 99: 1498, 2002.

Kanno, H., Murakami, K., Hariyama, Y., Ishikawa, K., Miwa, S., and Fujii, H.: Homozygous intragenic deletion of type-I hexokinase gene causes lethal hemolytic anemia of the affected fetus. Blood 100: 1930, 2002.

Murakami, K., Kanno, H., Tancabelic, J., and Fujii, H.: Gene expression and biological significance of hexokinase in erythroid cells. Acta Haematol. 108: 204-209, 2002.

Kanno, H., Fujii, H., and Miwa, S.: Physiological significance and molecular genetics of red cell enzymes involved in the ribonucleotide metabolism. Proc. Japan Acad. 78: 287-292, 2002.

Aizawa, S., Kohdera, U., Hiramoto, M., Kawakami, Y., Aisaki, K., Kobayashi, Y., Miwa, S., Kanno, H., Fujii, H.: Ineffective erythropoiesis in the spleen of a patient with pyruvate kinase deficiency. Am. J. Hematol. 74: 68-73, 2003.

Morimoto, A., Ueda, I., Hirashima, Y., Sawai, Y., Usuku, T., Kano, G., Kuriyama, K., Toda, S., Sugimoto, T., Kanno, H., Fujii, H., Imashuku, S.: A novel missense mutation

(1060G→C) in the phosphoglycerate kinase gene in a Japanese boy with chronic hemolytic anemia, developmental delay and rhabdomyolysis. *Brit. J. Haematol.* 122: 1009-1013, 2003.

(2) 口頭発表

Park-Hah, J.O., Kanno, H., Kim, W.D., and Fujii, H.: A novel homozygous mutation of PKLR gene in pyruvate kinase deficient Korean family. The 29th World Congress of the International Society of Hematology (Seoul, '02 8), *Int. J. Hemat.* 76(Suppl. 1): 37a, 2002.

Fujii, H.: Recent advances of red cell biochemistry. The 18th International Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. (Kyoto, '02 10), Program 72, 2002.

Kanno, H., Takizawa, T., Hamada, T., and Fujii, H.: Proteasomal degradation of the mutant enzyme accounts for hereditary hemolytic anemia due to pyrimidine 5'-nucleotidase deficiency. The 44th Congress of the American Society of Hematology (Philadelphia, '02 12), *Blood* 100(11): 222a, 2002.

相沢信、平本正樹、相崎健一、藤井寿一、菅野仁：ピルビン酸キナーゼ異常症における無効造血. 第 64 回日本血液学会総会・第 44 回日本臨床血液学会総会（横浜市, '02 9）, *臨床血液* 43(8): 122a, 2002

上田育代、森本哲、平嶋良章、澤井康子、加納原、栗山貴久子、東道伸二郎、杉本徹、
今宿晋作、菅野仁、藤井寿一：新しい遺伝子変異を認めたホスホグリセリン酸キナーゼ(PGK)
異常症の一例. 第 64 回日本血液学会総会・第 44 回日本臨床血液学会総会（横浜市, '02 9）,
臨床血液 43(8): 340a, 2002

菅野仁、滝澤剛則、藤井寿一：ピリミジン 5'-ヌクレオチダーゼの発現と変異酵素の生化学的
検討. 第 47 回日本人類遺伝学会（名古屋市, '02 11）, プログラム・抄録集:127a,2002.

Kanno, H., Aisaki, K., Kanno, J., Hamada, T, and Fujii, H.: cDNA microarray analysis
for searching candidate genes responsible for apoptosis of pyruvate kinase deficient
erythroid cells. The 45th Congress of the American Society of Hematology (San Diego,
'03 12), Blood 102(11): 258a, 2003.

相崎健一、相沢信、濱田貴子、岡田真一、藤井寿一、菅野 仁：赤血球型ピルビン酸キナー
ゼ(R-PK)過剰発現による R-PK 欠損フレンド細胞のアポトーシス抑制効果. 第 65 回日本血
液学会総会・第 45 回日本臨床血液学会総会（大阪市, '02 8）, プログラム・抄録集: 713a,
2003.

菅野 仁、今泉益栄、新妻秀剛、佐藤篤、相沢信、三輪史朗、濱田貴子、岡田真一、
藤井寿一：赤血球アデニル酸キナーゼ(AK)異常症の遺伝子解析と溶血のメカニズム.
第 65 回日本血液学会総会・第 45 回日本臨床血液学会総会（大阪市, '02 8）, プログラム・
抄録集: 818a, 2003.

菅野仁、小泉勤、滝澤剛則、濱田貴子、藤井寿一：ピリミジン 5'-ヌクレオチダーゼ(P5N-I) トランスジェニックマウスを用いた P5N-I の生理的意義に関する研究. 第 48 回日本人類遺伝学会（長崎市, '03 10）, プログラム・抄録集: 129a, 2003.

濱田貴子、菅野仁、岡田真一、藤井寿一：九州地方のピリミジン 5'-ヌクレオチダーゼ異常症に同定したファウンダー変異. 第 48 回日本人類遺伝学会（長崎市, '03 10）, プログラム・抄録集: 183a, 2003.

(3) 出版物

藤井寿一：溶血性貧血. 内科学書 第 6 版（島田馨責任編集）, pp. 793-803, 中山書店, 2002.

藤井寿一：ヘモグロビン異常症. 新臨床内科学 第 8 版（高久史麿・尾形悦郎編集）, pp. 1209-1217, 医学書院, 2002.

藤井寿一：赤血球の代謝とその疾患. 小児科臨床 55(1): 7-18, 2002.

岡田真一、藤井寿一：赤血球酵素の測定ーピルビン酸キナーゼ、グルコース・6・リン酸脱水素酵素を中心としてー. 検査と技術 30(3): 255-259, 2002.

藤井寿一：ヘモグロビン異常症. 新臨床内科学 [コンパクト版] 第 3 版（高久史麿、他監修）, pp. 455-457, 医学書院, 2003.

藤井寿一：ヘモグロビンの構造・機能・産生. 内科学 第2版(黒川清、松澤佑次編集主幹), pp. 1326-1328, 文光堂, 2003.

藤井寿一：ヘモグロビン異常. 内科学 第2版(黒川清、松澤佑次編集主幹), pp.,1408-1411, 文光堂, 2003.

藤井寿一：ビルビン酸キナーゼ. 臨床検査ガイド 2003～2004 (和田攻 他編), pp.,133-135, 文光堂, 2003.

藤井寿一：ヘモグロビン異常症. 小児疾患診療のための病態生理2 第2版, pp.1133-1137, 東京医学社, 2003.

藤井寿一：溶血性貧血. ダイナミックメディシン 3 (下条文武、齋藤康監修), pp. 1247-1257, 西村書店, 2003.

藤井寿一：赤血球酵素異常症. 小児内科 35: 1133-1137, 2003.

研究成果

1. 遺伝性非球状性溶血性貧血の診断

国内の諸施設から検索依頼された赤血球に著明な形態異常が無く、赤血球浸透圧抵抗試験正常、直接抗グロブリン試験陰性、Ham 試験陰性ならびに蔗糖水試験陰性である、いわゆる遺伝性非球状性溶血性貧血症例 73 症例について赤血球代謝を司る 19 種の赤血球酵素活性の測定、解糖中間体とアデニンヌクレオチドの定量、ならびにわが国で遺伝性非球状性溶血性貧血の病因として赤血球酵素異常症と共に頻度が高い不安定ヘモグロビン症の除外診断としてイソプロパノール試験を行った。結果として、平成 14 年度～平成 15 年度はピルビン酸キナーゼ異常症 5 例、グルコース-6-リン酸脱水素酵素異常症 10 例、アデニル酸キナーゼ異常症 1 例、ピリミジン-5'-ヌクレオチダーゼ異常症 1 例と 4 種 17 例の赤血球酵素異常症を診断した。

2. ピリミジン-5'-ヌクレオチダーゼ異常症の遺伝子解析

ピリミジン-5'-ヌクレオチダーゼ (P5N) 異常症はグルコース-6-リン酸脱水素酵素異常症、ピルビン酸キナーゼ異常症に次いで 3 番目に頻度が高い赤血球酵素異常症である。P5N は赤芽球脱核後細胞質に残る RNA の分解に重要な役割を担っており、赤血球中には基質特異性が異なる 2 種のアイソザイム (P5N-I, II) が存在する。われわれは日本人 P5N 異常症 9 家系について遺伝子解析を行い、2 種のミスセンス変異

(425T→C; L142P と 721G→C; G241R)、エクソン 8 の最初の塩基のトランスバージョン (339G→C) によりエクソン 7 のスキッピングを来することによる 30 アミノ酸欠失、エクソン 6 の 1 塩基挿入 (251-insA-252) によるフレームシフト変異、並びに 192~200 の 9 塩基欠失による 3 アミノ酸欠失の 5 種の新規の変異を同定した (表 1)。

721G→C のミスセンス変異の 5 家系は全て九州地方で同定された (図 1)。この変異がファウンダー変異か否かを明らかにする目的でハプロタイプ解析を行なった。ヒト P5N-I 遺伝子 (NT5C3) の既知の SNPs (NCBI SNP Cluster ID: rs3750117, 3750119, 2893457) について検討をおこなった所、721C 変異を有する 5 家系 5 症例のハプロタイプは T-A-C-G-A と全て一致しており (表 2)、ファウンダー変異であることが強く示唆された。しかし、このハプロタイプは今回対照とした 60 検体において最も頻度の高いハプロタイプであり、721C 変異はホットスポット変異である可能性も否定できない。今回、正常対照は九州西岸地域出身者に限定しなかったため、今後は九州地域における健常者を対象にした SNPs 解析や SNPs の数を増やすと共に、マイクロサテライトマーカールを検索することにより対照のハプロタイプをより細分化する予定である。

3. 変異ピリミジン-5'-ヌクレオチダーゼ-I の機能解析

日本人 P5N 異常症の遺伝子解析で同定した 2 種のミスセンス変異を有する P5N-I を Cos 細胞に発現し、細胞内での安定性について検討した。変異 P5N-I (425T→C; L142P) を発現した Cos 細胞の P5N-I 活性お

よび発現タンパク量は共に対照の約20%程度に低下していた(図2, 3)。L142P および野生型 P5N-IcDNA をトランスフェクションし、24 時間培養後にシクロヘキシミド(CHX)添加し P5N-I 活性とタンパク量を経時的に測定したところ、野生型 P5N-I は8 時間後もほとんど活性・タンパク量の変化を認めなかったが、L142P は有意の活性・タンパク量の低下を認めた(図4)。タンパク量の低下はプロテアソーム阻害剤である MG132 およびラクタシスチンにより回復したことから(図5)、変異 P5N-I は、その高次構造変化からユビキチン-プロテアソーム経路により分解されやすくなることが示唆された。他のミスセンス変異(721G→C、G241R)をもつ変異 P5N-I は、赤血球から部分精製した酵素を用いた検索により至適 pH の偏位、基質親和性の低下などのキネティクス異常は既に明らかにしているが(図6)、Cos 細胞内では正常対照と同様に安定であった。以上、ミスセンス変異 L142P はタンパクの不安定性、G241R は酵素の質的異常の原因となることを明らかにした。

4. トランスジェニックマウスの作製

P5N-I 過剰発現により細胞内ピリミジンヌクレオチド濃度低下による転写への影響、INF- α 応答遺伝子の恒常的発現による免疫系への影響やピリミジンヌクレオチドアナログの細胞毒性に対する耐性獲得を来すか否かなど、赤血球以外の組織での P5N-I の生理的意義について検討する目的で pCX-EGFP にヒト P5N-IcDNA を挿入し、P5N-I を ubiquitous に過剰発現するトランスジェニックマウスを作製した。

トランスジーンの発現は RT-PCR、イムノブロット、酵素活性測定によ

り検討した。現在までにファウンダー1 ラインが得られ、その F1 を用いてトランスジーンの発現を検討した結果、マウス肝、腎にヒト P5N-ImRNA を検出したイムノブロット解析で、トランスジーンの発現量は肝、腎共に endogenous な遺伝子産物の 2 倍以下であった（表 3, 図 7）。現在、発現レベルが比較的高い肝や腎について、トランスジーン発現の影響を検討中である

5. ピリミジン-5'-ヌクレオチダーゼ-I の免疫応答における機能の検討

P5N はインターフェロンにより誘導されることから、感染防御に対して何らかの役割を果たしている可能性が推察される。そこで、インターフェロンにより増殖が抑制されることが知られているインフルエンザウイルスを用いて、P5N へのウイルス感染に対する影響を検討した。インフルエンザウイルス（A 型、H1N1、WSN 株）を HeLa 細胞、あるいは MDCK 細胞に感染し、感染後の P5N 活性の変化を検討した。また、ウイルス感染と同様強いインターフェロン誘導能がある poly(I)-poly(C) を用いて、同様の検討を行った。さらに、MDCK 細胞、あるいは HEK293 細胞に P5N を過剰に発現し、インフルエンザウイルス感染への影響を検討した。その結果、MDCK 細胞では、インフルエンザウイルスを感染した直後に一過性に P5N 活性が上昇した。同様に poly(I)-poly(C) 処理でも一過性に P5N 活性が増加した。活性増加が一過性になるのは、ウイルス感染や poly(I)-poly(C) 処理をすると、細胞内での蛋白合成が全体的に抑制される可能性も考えられる。HeLa 細

胞では P5N 活性の変化は認められなかった。次に、P5N を過剰に発現した MDCK 細胞、および HEK293 細胞を作成した。これらの細胞では、P5N の活性が数倍から 10 倍以上に増加していた。しかし、コントロールの細胞ではインターフェロンを培地に添加することにより P5N 活性が上昇するのに対して、過剰発現細胞ではインターフェロンに対する反応が認められなかった。これは、外部からの P5N 活性により内在性の P5N 活性がマスクされているか、あるいは何らかのフィードバック機構などがある可能性も残る。P5N を過剰に発現した MDCK 細胞を用いて、インフルエンザウイルス感染による細胞死を経時的に検討したところ、P5N 発現レベルと細胞死の割合に有意な相関は認められなかった。また、ウイルス蛋白質の合成に対する影響を検討したところ、これもコントロールと有意な差は認められなかった。従って、P5N の活性がウイルスの増殖や宿主細胞死を抑制する効果は顕著ではないと考えられた。

表1. 日本人P5N異常症家系の遺伝子解析結果とその表現型

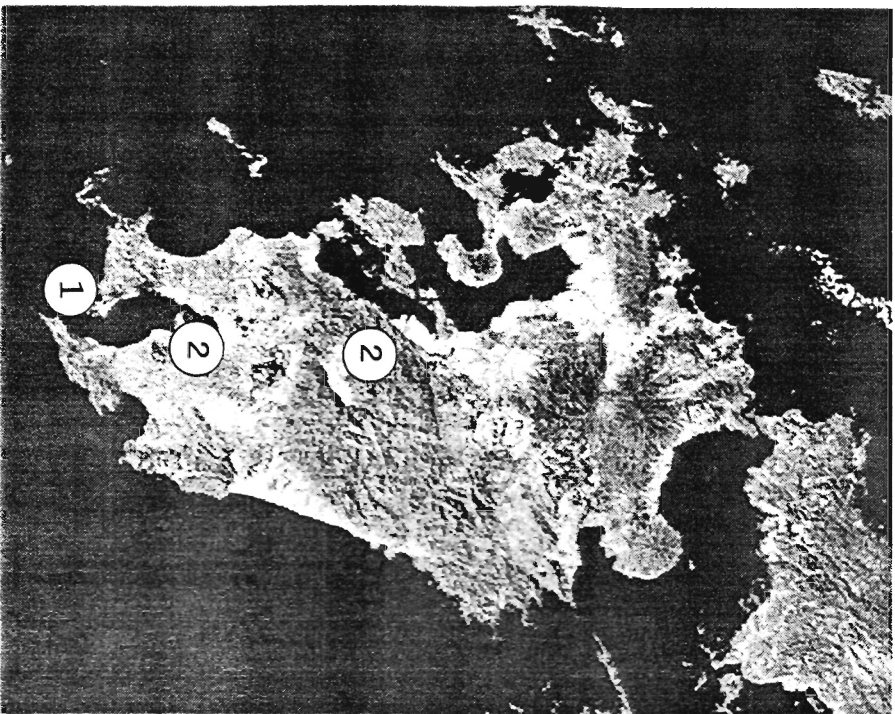
		Hb (g/dl)	Retics (%)	P5N (%, CMP)	Mutation
Case 1	24 y/o male	10.6	8.0	9.7	Gly241Arg
Case 2	25 y/o male	15.2	4.4	63.8	Gly241Arg
Case 3	3 y/o male	11.3	ND	42.3	Gly241Arg
Case 4	22 y/o female	10.1	6.0	23.6	Gly241Arg
Case 5	7 y/o female	10.4	9.4	32.5	Gly241Arg
Case 6	12 y/o male	10.8	23.1	10.8	30 aa deletion
Case 7	55y/o male	9.0	3.9	26.8	Frameshift
Case 8	53y/o female	11.1	5.6	52.3	Leu142Pro
Case 9	48y/o male	9.6	14.2	45.8	3 aa deletion

表2. デイプロタイプの結果

Ivs3 rs2392210	Ivs3 rs2392211	Ivs6 rs3750119	Ex7 rs3750117	Ivs10 rs2893457	実測値(%)	推定値(%)
P5N異常症5症例						
T/T	A/A	C/C	G/G	A/A		
T/T	A/A	C/C	G/G	A/A	30	26
C/C	T/T	T/T	A/A	G/G	5.0	4.0
T/T	T/T	T/T	A/A	G/G	1.7	1.4
T/C	T/T	T/T	A/A	G/G	5.0	4.7
T/C	A/T	T/T	A/A	G/G	1.7	3.3
T/T	A/T	T/T	A/A	G/A	3.3	2.7
T/C	A/T	T/T	A/A	G/A	1.7	4.7
T/T	A/A	T/C	G/A	A/A	18	12
T/T	A/T	T/C	G/A	G/G	3.3	1.2
T/C	A/T	T/C	G/A	G/G	6.7	2.0
T/T	A/T	T/C	G/A	G/A	8.3	1.9
T/C	A/T	T/C	G/A	G/A	15	20
対照 60検体						

表3. トランスジーンの発現 : P5N-I活性

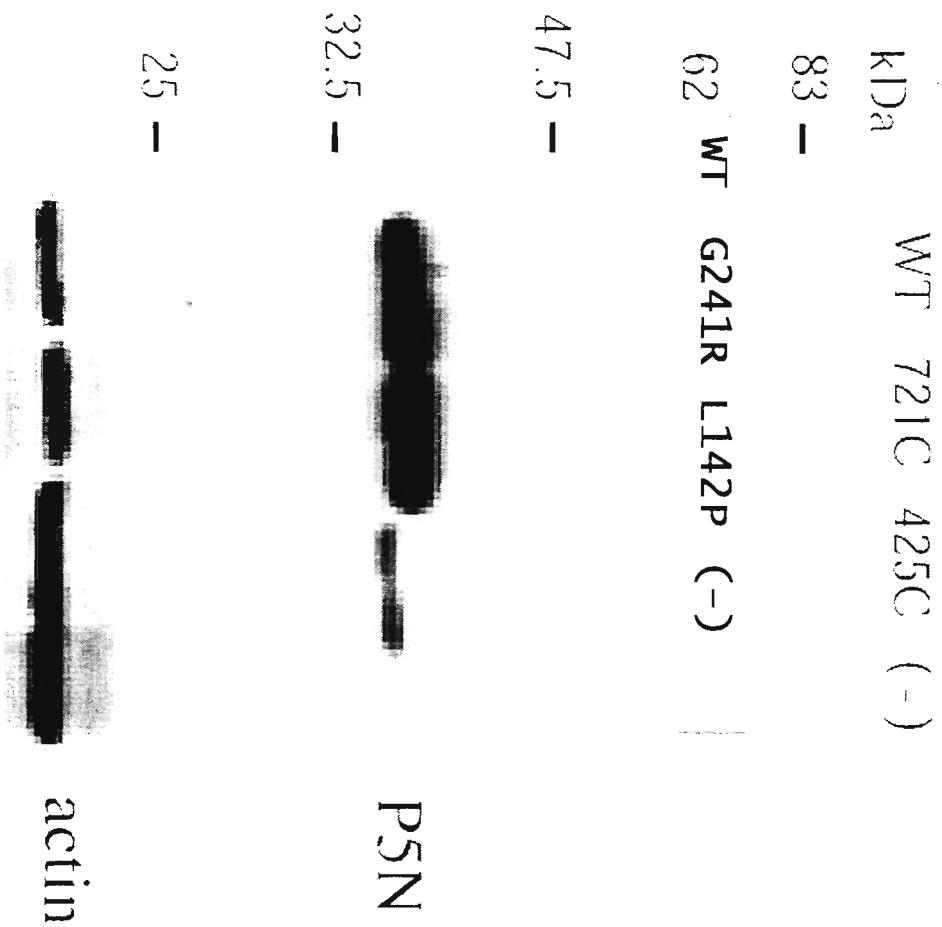
		P5N activity (mM/mg protein)	Tg/Cont
Liver	Cont	2.53	1.75
	Tg	4.43	
Kidney	Cont	17.4	1.20
	Tg	20.9	



数字は家系数を示す。

	年齢、性	Hb (g/dl)	Retics (%)	P5N (%)
Case 1	24 M	10.6	8.0	9.7
Case 2	25 M	15.2	4.4	63.8
Case 3	3 M	11.3	ND	42.3
Case 4	22 M	10.1	6.0	23.6
Case 5	7 F	10.4	9.4	32.5

図1. 九州地方のP5N異常症に同定した共通の 721G→C変異 (Gly241Arg)



FLAG: Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys

図2. COS-7細胞における P5N-1の発現

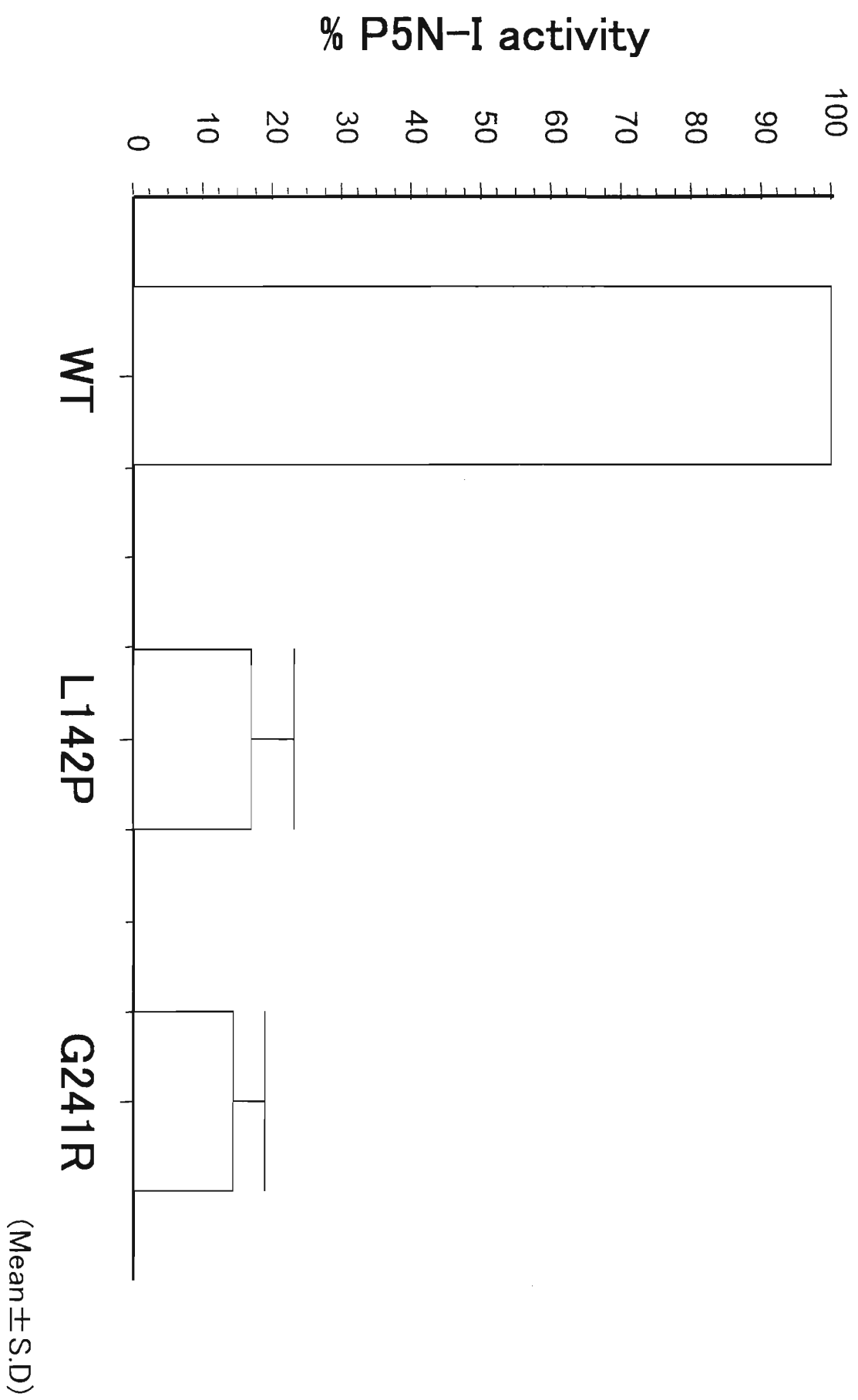


図3. 単一アミノ酸置換がP5N-I活性に与える影響

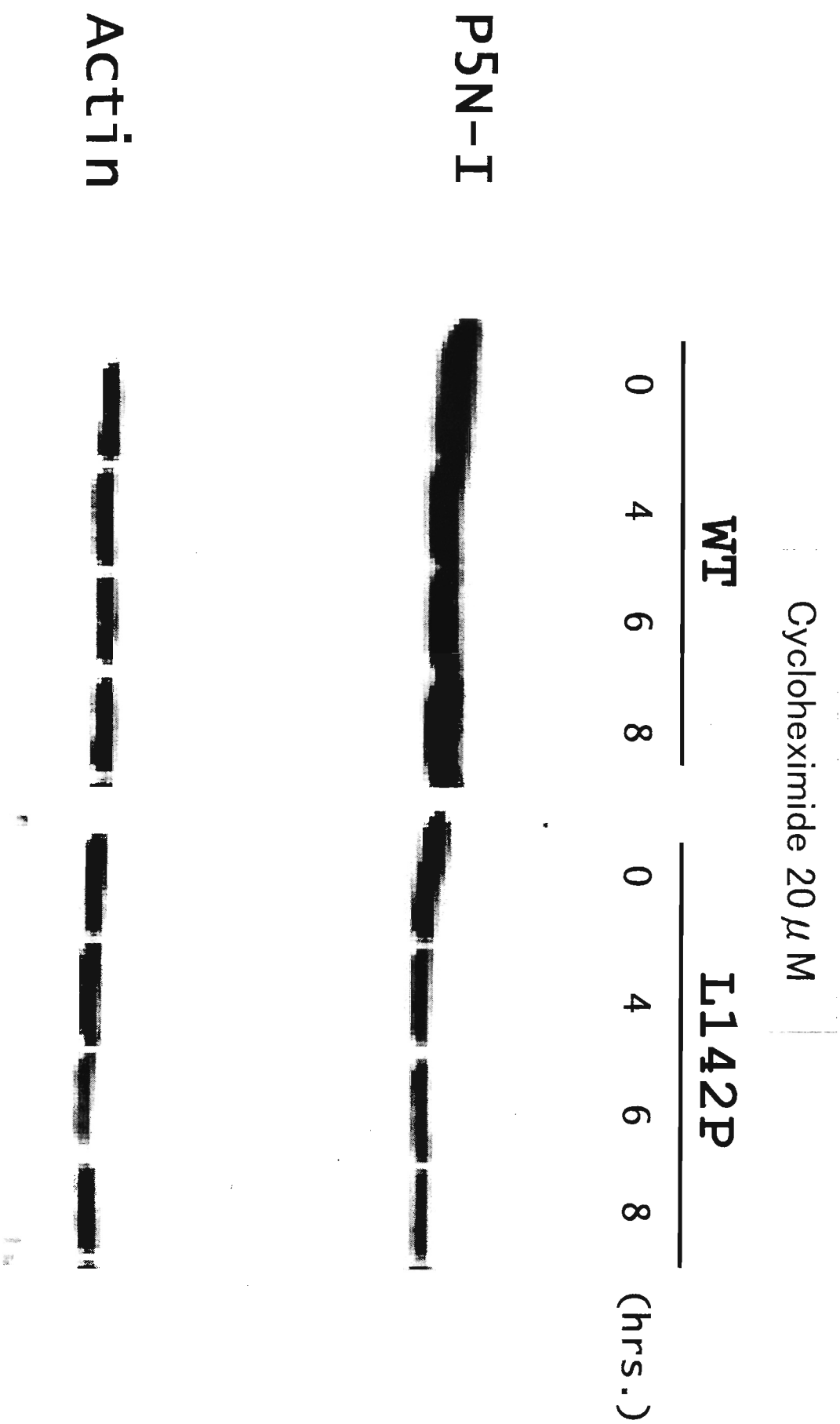


図4. 変異P5N-I (L142P) の細胞内安定性 (1)

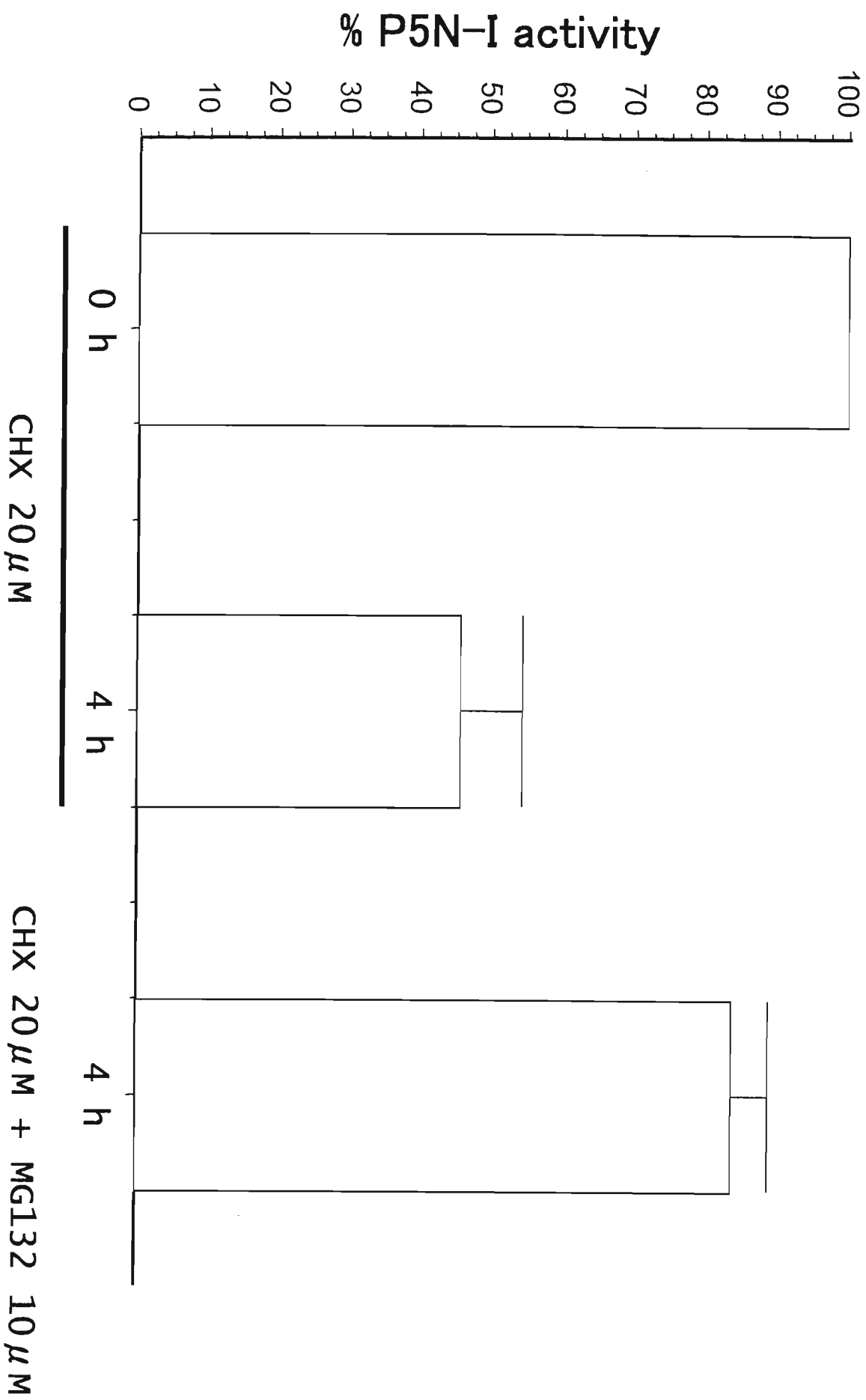
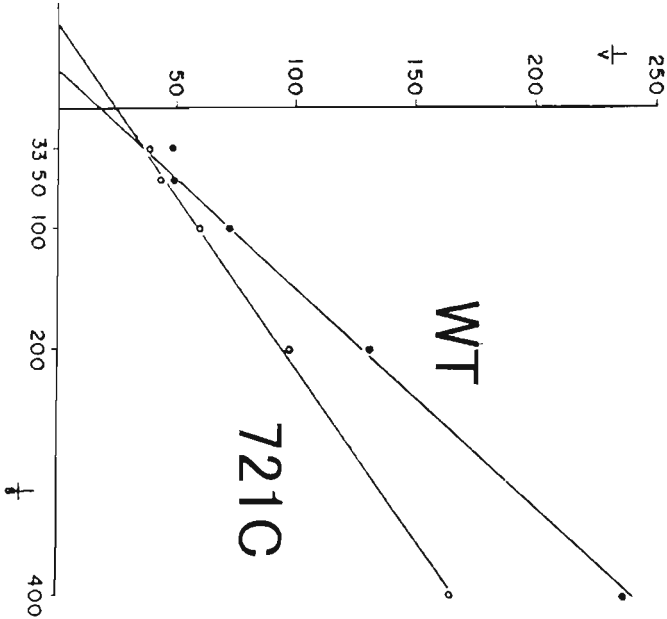
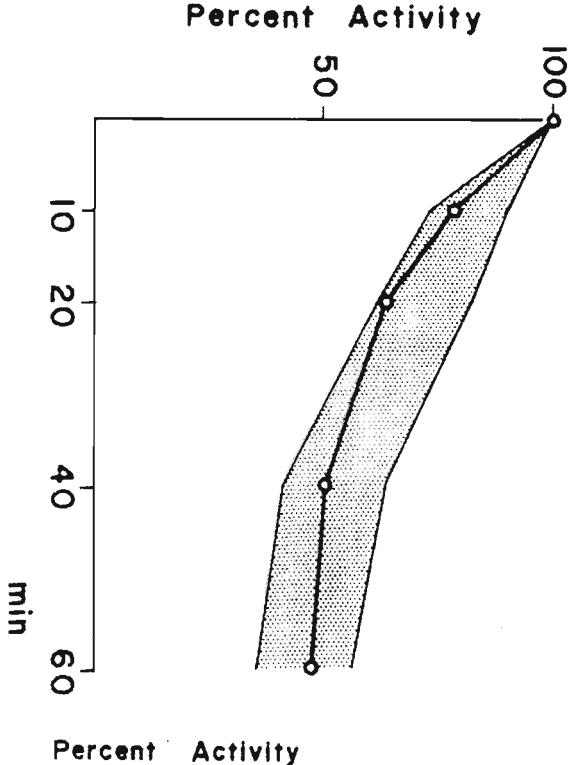


図5. 変異P5N-I (L142P) の細胞内安定性 (2)

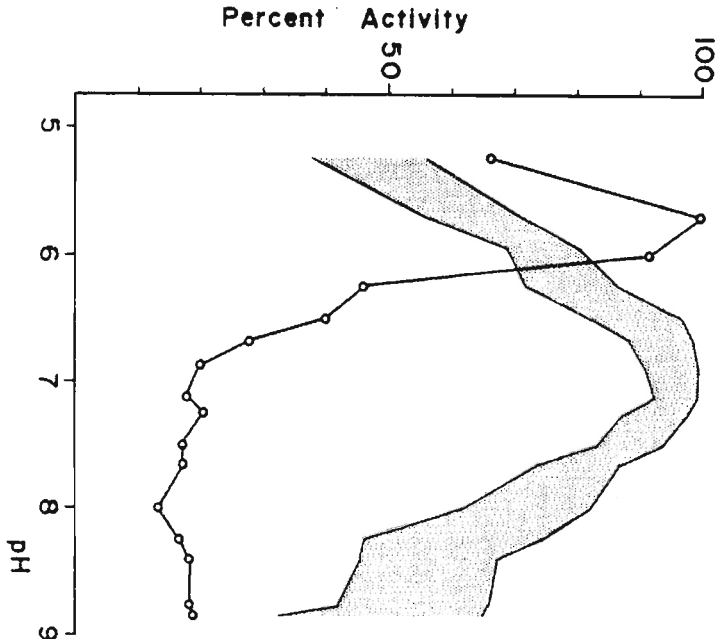
(1) 基質親和性 K_m [CMP]



(2) 熱安定性



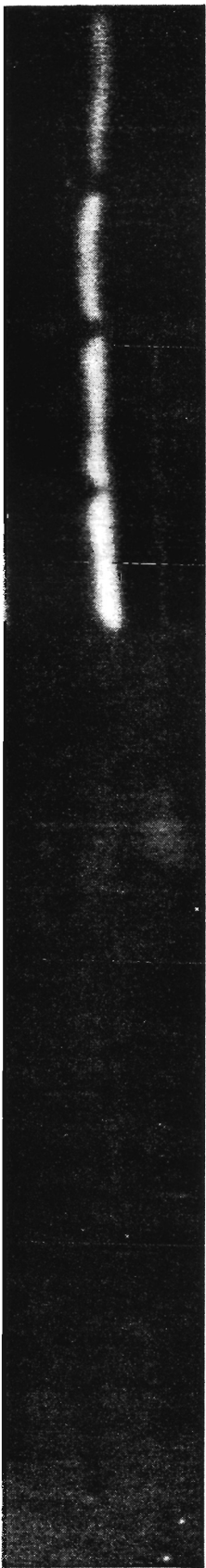
(3) 至適pH



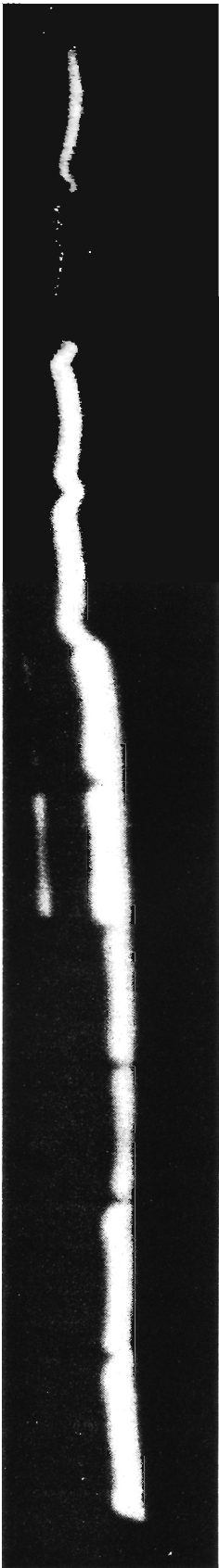
Fuji H et al. CCA 95:89, 1979

図6. 変異P5N-I (G241R) の酵素学的諸性質

<u>Liver</u>		<u>Kidney</u>		<u>Spleen</u>		<u>Bone marrow</u>		<u>Lymph node</u>	
C	Tg	C	Tg	C	Tg	C	Tg	C	Tg



Anti-P5N-I



Anti-actin

Antibody raised against peptide from the active site of both human and murine P5N-I (DNSNIIILGDSQGD, 14 amino residues)

図7.トランスジーンの発現：イムノブロット解析