総説

プリン代謝の新たな役割： ヒト AMPD2 欠損症の発見とそのマウスモデル

森崎 裕子^{1,2)} 森崎 隆幸^{1,2)}

要 旨

プリン代謝とくにアデニンヌクレオチド代謝は細胞内におけるATPの維持に重要な役割を果たしている。AMPデアミナーゼ (AMPD) は細胞内AMPを減少させることによりATPレベルを維持していると考えられている。ヒトなどではAMPDには3つのアイソフォーム, (AMPD1, AMPD2, AMPD3) が存在し, このうちAMPD1とAMPD3についてはヒトにおける酵素異常症の存在が知られており, AMPD1 筋AMPD欠損症 (AMPD1変異) はミオパシーの原因として, 赤血球AMPD欠損症 (AMPD3変異) では細胞内ATPの増加を生じると報告されている。一方, AMPD2の変異 (AMPD2欠損症) はヒトでは報告されていなかったが, 最近, AMPD2のホモ欠損はヒトにおいて橋小脳低形成を引き起こすことが明らかになった。マウスモデルでは, AMPD2単独欠損では神経系の変化はないが, AMPD2/AMPD3複合欠損マウスは出生後3週までに行動異常を示してすべて死亡し, 海馬・小脳などの神経細胞の変性を認めた。またAMPD2/AMPD3複合欠損マウス脳組織では, 細胞内ATPの増加とGTPの減少を認めた。酵母のAMPD変異株はアデニン添加の特殊条件でその増殖が阻害されるが, この変異株はヒトAMPD2発現により増殖能は改善する。AMPD2欠損患者由来線維芽細胞で

も, アデノシン添加により生存率が低下した。また, この条件で細胞内ATPの増加とGTPの減少を認め, 同時にタンパク質合成能の低下が示された。AMPD2欠損患者由来神経細胞でのアデノシン添加培養後の細胞生存率の低下はAICAR (AICARibonucleotide) の添加により改善し, 細胞内GTPの増加とタンパク質合成能の改善が示唆された。以上より, アデニンヌクレオチド代謝の重要酵素のひとつであるAMPDは, 細胞内ATPレベルの維持のみならず, アデニンヌクレオチドからグアニンヌクレオチドへの変換を通して細胞内GTPの維持とそれによるタンパク質合成調節にも重要な役割を果たしていることが示された。

はじめに

プリン代謝とくにアデニンヌクレオチド代謝は細胞内におけるATPの維持に重要な役割を果たしていると考えられ, AMPを脱アミノ化しIMPに変換させる酵素AMPデアミナーゼ (AMPD) は細胞内AMPを減少させてATPレベルを維持すると考えられてきた¹⁾ (Fig.1)。AMPDはマウス, ヒトでは3種の遺伝子 (AMPD1, AMPD2, AMPD3) にコードされ, 3種のアイソザイムを発現し, 組織細胞により発現が制御されている¹⁾ (Fig.2)。ヒトでは, これまでに2種のAMPDの先天的欠損症

1) 国立循環器病研究センター研究所分子生物学部

Hiroko Morisaki, Takayuki Morisaki

2) 大阪大学大学院薬学研究科分子生理病態学

Hiroko Morisaki, Takayuki Morisaki

Key words: Purine nucleotide metabolism, AMPD2 deficiency, AMPD-deficient mice,

Pontocerebellar hypoplasia

連絡先: 森崎裕子 〒565-8565 大阪府吹田市藤白台5-7-1 国立循環器病研究センター 研究所分子生物学部

TEL 06-6833-5012 (ex2926, PHS8137) FAX 06-6872-5597

E-mail hirokom@ri.ncvc.go.jp

では、筋機能変化は観察されなかった。

AMPD2欠損マウス

これまで、ヒト AMPD2欠損症の報告はなく、AMPD2は骨格筋以外で広く発現することから、生体において欠くことのできない重要な役割を果たしている可能性があると考えられた。そこで、マウスモデルを用いて AMPD2欠損マウスを作製してその機能にせまることとし、AMPD2遺伝子ノックアウトマウスを作製した⁸⁾。AMPD2欠損マウスは、特に肝臓、腎臓において AMPD酵素活性の著明な低下を認め、確かに AMPD2欠損となっていることが確認されたが、事前の予想に反して、作製したホモ接合体であっても致死的ではなく産仔数も野生型とかわらなかった。AMPD2欠損マウスは、生後の経過も一見正常で妊孕性もあったが、特徴として生後6週から蛋白尿を呈することが明らかとなり⁸⁾、腎組織ではAMPの増加、ATPの減少、GTPの減少を認め、AMPD1欠損症の骨格筋でみられたプリンヌクレオチド量の変化と類似の変化が AMPD2欠損マウスでは腎臓で認められることが確認された⁸⁾ (Table 1)。興味深いことに、腎組織の変化は光学顕微鏡では尿管でのタンパク質円柱の存在はあるが、糸球体の変化はほとんどなく、電子顕微鏡での検討で糸球体上皮足突起の融合はみられたが、生後1年半のマウスでも糸球体の組織学的変化は著明でなく、

他のタンパク尿を呈するモデルマウスが次第に腎機能低下をきたし、腎硬化症を呈するのとは対照的であった。アデニンヌクレオチド代謝の変化がいかなる機序によりタンパク尿を呈するようになるかについてはさらに検討を要する課題である。

ヒト AMPD2欠損症の発見

最近、既知の原因遺伝子変異の同定されていない橋小脳低形成症 (Pontocerebellar hypoplasia: PCH) の原因遺伝子として AMPD2が同定された⁹⁾。PCHは、乳児期より認める嚥下障害、痙性麻痺、小頭症、精神運動発達遅滞を主症状とする疾患で、MRI検査で小脳および橋の容積縮小を認める¹⁰⁾。患者の多くが小児期までに死亡する重篤な遺伝性の神経疾患であり、常染色体劣性遺伝形式をとる単一遺伝子病であると考えられている。PCHには複数の遺伝子座があることが知られているが、これまでに原因遺伝子として判明しているのは、tRNAのスプライシングエンドヌクレアーゼ複合体を構成する TSEN54, TSEN34, TSEN2¹¹⁾、アルギニン-tRNAリガーゼ遺伝子である RARS2¹²⁾、リボゾームRNAプロセシングタンパク質遺伝子である EXOSC3¹³⁾ である。これらは、いずれもタンパク質合成障害を引き起こしているとされている。しかし、これら既知の遺伝子では説明できない症例もあり、未知の遺伝子の

AMPD1 KO mice

Murine model for AMPD1 deficiency

AMPD1 deficiency did not cause muscle dysfunction, but showed changes in nucleotide levels similar to human AMPD deficiency

AMPD3 KO mice

Murine model for AMPD3 Deficiency

**AMPD3 deficiency did not cause apparent abnormality, but showed elevated ATP in RBC
Though, it did not correct dysfunction by glycolytic metabolism change (PK deficiency)**

Fig. 3. AMPD mutant model mice

Mutant model mice for AMPD1 or AMPD3 deficiency were established and showed changes in nucleotide metabolism resembling human AMPD deficiency

Table 1. Nucleotide levels in kidney of AMPD mutant mice.

Nucleotide levels in kidney (modified from the previous report⁸⁾)

WT: wild-type, A2(-/-): AMPD2 deficient homozygote

	WT	A2(-/-)
AMP	0.55±0.06	0.96±0.10*
ADP	1.50±0.06	1.46±0.08
ATP	4.01±0.15	3.12±0.22*
GTP	0.21±0.05	0.05±0.02*
IMP	0.13±0.02	0.12±0.03

n=15, ♂ nmol/mg, *p<0.05

存在も示唆されていた。

ヒト AMPD2 変異は、30 例の PCH 発端者とその家族についての遺伝子解析により同定された⁹⁾。30 例のうち 23 例は近親婚家系例で、21 例には複数の同胞患者がいることから、常染色体劣性遺伝形式をとる遺伝性疾患であることが再確認された。そこで、これらの患者及び家族につき、患者ペアあるいは両親と患者のトリオのエクソーム解析を行なったところ、既報の EXOSC3 遺伝子、TSEN2 遺伝子、TSEN54 遺伝子の変異が同定されたが、他に病因候補遺伝子の変異も同定され、その一つが AMPD2 であった (Fig.4)。結果として、PCH 5 家系 8 症例で、5 種類の AMPD2 遺伝子変異がホモ接合体として同定され、このうち、2 つは早期停止型変異、3 つは高度に保存されたアミノ酸残基が変化するミスセンス変異であったことより、以下に述べるマウスおよび酵母の実験結果も加えて PCH の原因遺伝子として結論づけられるにいたった⁹⁾。

ヒト AMPD と酵母 AMPD :

アデニンヌクレオチドと細胞増殖・細胞死

始めに述べたように AMPD はヌクレオチド代謝に関係する酵素で、ヒトやマウスでは AMPD は 3 つの遺伝子にコードされ、AMPD2 はその一つであるが、酵母の AMPD は唯一の遺伝子 AMD1 にコードされ、酵素としてはヒトやマウスと類似の機

能を果たしていると考えられている。配列比較では、AMPD2 は遺伝進化的に最も古く AMD1 との相同性が高い。これまでに、酵母 AMPD について酵素欠損株の検討が行われ、AMD1 変異株 (*amd1*) は通常の状態では機能異常は認めないが、Adenine 添加により増殖障害を認めることが報告されている¹⁴⁾。一方、*amd1* 変異株にヒト AMPD2 を発現させると増殖障害は改善するが、ヒトで同定された変異 AMPD2 の発現では増殖障害は改善しないこと、また、PCH 患者線維芽細胞での AMPD2 のタンパク質発現と酵素活性についての検討ではタンパク質はほとんど検出されず、酵素活性もきわめて低値であることが明らかになった⁹⁾。

さらに、ヒト細胞でアデニンヌクレオチドを増加させる環境、すなわちアデノシン添加下の細胞増殖についての検討を線維芽細胞と患者由来 iPS 細胞より分化させた神経前駆細胞を用いて行ったところ、線維芽細胞、神経前駆細胞とも濃度依存性に細胞死の増加が観察され、神経前駆細胞ではより低濃度のアデノシン添加により細胞死の増加を認めた⁹⁾。また、患者線維芽細胞と患者由来 iPS 細胞より分化させた神経前駆細胞について各種ヌクレオチドレベルをアデノシン添加前後に検討したところ、患者線維芽細胞ではアデノシン添加により ATP レベルの増加と GTP、GDP の減少を、神経前駆細胞も同様で、アデノシン添加により GTP はおよそ半減することを認めた⁹⁾ (Fig.5)。

ヒト AMPD2 欠損とマウス AMPD2 欠損

ところで、ヒトでは初めて同定された AMPD2 欠損に対して、マウスホモログ遺伝子である AMPD2 については、すでに遺伝子ノックアウトにより欠損マウスの検討が行われていた。前述のごとく、AMPD2 欠損マウスは蛋白尿を呈するが神経症状は示さない。そこで我々は、ヒトとマウスの AMPD 遺伝子の発現様式の違いを勘案し、AMPD2 だけでなく AMPD3 も欠損した複合欠損マウスの作製を行い検討した。ダブルヘテロ欠損マウスの相互交配では F2 マウスはメンデルの法則の比率で遺伝型が観察され、AMPD2/3 ダブルホモ欠損マウスは胎生致死ではないものの、生後

Fig. 4. AMPD2 mutation found in patients with ponto cerebellar hypoplasia (PCH) (modified from the previous report⁹⁾)

Fig. 5. Changes in nucleotide metabolism in yeast AMD1 deficiency (*amd1*) and AMPD2 deficient cells. Increase of adenine nucleotide and decrease of guanine nucleotide were observed after adenine/adenosine addition.

Fig. 6. Survivals of AMPD2/AMPD3 double deficient mice

WT: wild type, A2 (-/-) :AMPD2 deficiency homozygote, A3 (-/-) :AMPD3 deficiency homozygote, A2,3 (-/-, -/-) :AMPD2/AMPD3 double deficiency homozygote (modified from the previous report⁹⁾)

2週過ぎから生存率が低下し、3週までにすべて死亡した (Fig.6)⁹⁾。また、生後2週過ぎのAMPD2/3ダブルホモ欠損マウスでは失調症様の歩行が見られ、小脳サイズが小さいなど、ヒトAMPD2欠損症と同様に小脳に異常を認めた。その他、死亡直前のマウスでの組織学的検討では、海馬でのニューロンの減少が観察され、海馬および小脳でのニューロン変性像も認めている⁹⁾。AMPD2/3ダブルホモ欠損マウスの各臓器のAMPD活性は、骨格筋を除くすべての組織で検出限界以下であり、生後2週齢のマウス脳のヌクレオチド量の比較検討では、AMPD2/3ダブルホモ欠損マウスはATPの増加、GTPとIMPの減少が顕著であった⁹⁾ (Fig.7)。

GTP減少と神経系の変化

こうしたヌクレオチド量の変化は、AMPD欠損がATPを増加させ、結果的にプリン体生合成を抑制してGTP量の変化を引き起こすという二次的变化による可能性が想定され、プリン体生合成経路の賦活化による効果の検討が行われた。酵母での検討、すなわち、アデニン投与による増殖

障害について、AICAR投与によるプリン体生合成経路の賦活化にて変化するかを検討したところ、増殖障害はプリン体生合成賦活化により改善することが確認され、患者由来iPS細胞由来の神経前駆細胞についても、アデノシン負荷による細胞生存率の低下はAICAR附加により改善し、これらの改善は細胞内GTP量の増加と相関することが確認された⁹⁾。一方、AMPD欠損細胞がタンパク質合成にどのように影響し、AICAR添加によって変化するか否かの検討を行ったところ、酵母*amd1*株はアデニン存在下でタンパク質合成低下を認め、この変化がAICAR添加により回復することが示された。同様に、AMPD2患者由来の神経前駆細胞でもアデノシン存在下ではタンパク質合成低下を認めた⁹⁾。酵母でのポリゾームプロファイルの検討にて、*amd1*株ではポリゾーム分画の減少が観察され、タンパク質翻訳過程での変化が示された。以上より、ヒトAMPD2欠損症では神経細胞のアデニンヌクレオチド量が変化してGTPを始めとするグアニンヌクレオチドが減少し、タンパク質合成障害をきたし、橋小脳低形成並びに神経症状を生ずると考えられた。

Fig. 7. Nucleotide levels in brain of AMPD deficiency

WT: wild type, A2 (-/-) :AMPD2 deficiency homozygote, A3 (-/-) :AMPD3 deficiency homozygote, A2,3 (-/-,-/-) :AMPD2/AMPD3 double deficiency homozygote (modified from the previous report⁹⁾)

Fig. 8. From the pathophysiology to the new therapeutic approach on human AMPD2 deficiency

まとめ

以上の一連の検討により、酵母あるいは神経細胞ではAICAR添加による増殖障害や生存率低下の改善を認めたことから、マウスやヒトでの神経細胞脱落を防止できるか否かについてはさらなる検討が必要であるが、橋小脳低形成症の少なくとも一部は原因除去による治療の可能性のあることが期待される、という重要な知見が得られた。以

上の検討により、これまでその存在が明らかでなかったヒトAMPD2欠損症と疾患（橋小脳低形成症）の関係が明らかになるとともに、プリン代謝が生体で果たす新たな役割が明らかとなった（Fig.8）。

【著者のCOI開示】：

開示すべき利益相反状態はない。

文 献

- 1) Sabina RL, Holmes EW: Myoadenylate deaminase deficiency. *The Online Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease*, Valle D, Beaudet AL, Vogelstein B, et al (eds). McGraw-Hill, 2010. (<http://ommbid.mhmedical.com/content.aspx?bookid=474§ionid=45374104>)
- 2) Fishbein WN, Armbrustmacher VW, Griffin JL: Myoadenylate deaminase deficiency: a new disease of muscle. *Science* 200: 545-548, 1978.
- 3) Morisaki T, Gross M, Morisaki H et al: Molecular basis of AMP deaminase deficiency in skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 6457-6461, 1992.
- 4) Ogasawara N, Goto H, Yamada Y et al: Deficiency of AMP deaminase in erythrocytes. *Hum Genet* 75: 15-18, 1987.
- 5) Yamada Y, Goto H, Murase T et al: Molecular basis for human erythrocyte AMP deaminase deficiency: screening for the major point mutation and identification of other mutations. *Hum Mol Genet* 3: 2243-2245, 1994.
- 6) Cheng J, Morisaki H, N. S et al: Effect of isolated AMP deaminase deficiency on skeletal muscle function. *Mol Genet Metab Reports* 1: 51-59, 2014.
- 7) Cheng J, Morisaki H, Toyama K et al: AMPD3-deficient mice exhibit increased erythrocyte ATP levels but anemia not improved due to PK deficiency. *Genes Cells* 17: 913-922, 2012.
- 8) Toyama K, Morisaki H, Cheng J et al: Proteinuria in AMPD2-deficient mice. *Genes Cells* 17: 28-38, 2012.
- 9) Akizu N, Cantagrel V, Schroth J et al: AMPD2 regulates GTP synthesis and is mutated in a potentially treatable neurodegenerative brainstem disorder. *Cell* 154: 505-517, 2013.
- 10) Barth PG: Pontocerebellar hypoplasias. An overview of a group of inherited neurodegenerative disorders with fetal onset. *Brain Dev* 15: 411-422, 1993.
- 11) Budde BS, Namavar Y, Barth PG et al: tRNA splicing endonuclease mutations cause pontocerebellar hypoplasia. *Nat Genet* 40: 1113-1118, 2008.
- 12) Edvardson S, Shaag A, Kolesnikova O et al: Deleterious mutation in the mitochondrial arginyl-transfer RNA synthetase gene is associated with pontocerebellar hypoplasia. *Am J Hum Genet* 81: 857-862, 2007.
- 13) Wan J, Yourshaw M, Mamsa H et al: Mutations in the RNA exosome component gene EXOSC3 cause pontocerebellar hypoplasia and spinal motor neuron degeneration. *Nat Genet* 44: 704-708, 2012.
- 14) Saint-Marc C, Pinson B, Couplier F et al: Phenotypic consequences of purine nucleotide imbalance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 183: 529-538, 521si-527si, 2009.