

疾患原因ヌクレオチドの生成経路を解明

難病のメカニズム理解につながる

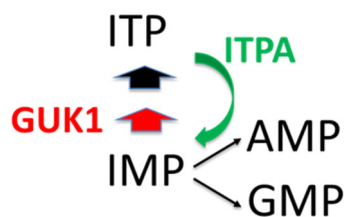
ポイント

- ① イノシン三リン酸(ITP)^{*1}は通常細胞内にほとんど存在しない非正規ヌクレオチドであり、ほぼ全ての生物は各々ITP 分解酵素を有し、積極的に分解していることが知られていた。この ITP 分解酵素の欠損はヒトでは発達性およびてんかん性脳症 35 (DEE35) の原因となる。
- ② 今回世界で初めてこの ITP が生体内で生じるメカニズムを解明した。
- ③ 難病の治療法開発へつながることが期待される。

概要

難病である発達性およびてんかん性脳症(DEE^{*2})の一種に DEE35 という疾患があります。その発症の原因となる非正規ヌクレオチドであるイノシン三リン酸 (ITP) については生体内でどうやって生成されるのかわかっていませんでした。九州大学生体防御医学研究所の土本大介助教らのグループは、この ITP の生成経路を解明しました。

ITP およびデオキシイノシン三リン酸 (dITP) は大腸菌からヒト細胞まで広く生物に毒性を示す非正規ヌクレオチドであり、各生物は特異的分解酵素を持ちこれらの細胞内濃度をごく低いレベルに保っています。ヒトではイノシン三リン酸分解酵素 (ITPA) がその機能を担っており、ITPA 遺伝子欠損は ITP 蓄積により上述の疾患 DEE35 を引き起こします。土本大介助教らのグループは正常ヌクレオチドであるイノシン一リン酸 (IMP)^{*3}が細胞内の酵素によって二段階リン酸化を受けて ITP が生じるとの仮説に基づき、ITPA 遺伝子欠損培養細胞を用いて ITP 生成に必須の遺伝子としてグアニル酸キナーゼ 1 (GUK1)^{*4}遺伝子を同定しました。この GUK1 遺伝子の働きを抑制すると ITPA 欠損細胞と ITPA 欠損マウス (ヒト DEE35 モデル動物) における ITP 蓄積が抑制されました。また ITPA 欠損マウスの短い寿命が GUK1 遺伝子抑制により延長されました。このことから細胞内で IMP が GUK1 によってリン酸化されてイノシン二リン酸 (IDP) となり、IDP は更にリン酸化されて ITP が生成されると考えられました。今回の発見は DEE35 の理解と治療法開発につながることを期待されます。本成果は 2026 年 7 月 30 日 (現地時間) に米国科学誌「Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (米国科学アカデミー紀要)」に掲載されました。



(参考図) IMP (本来は生体に必要な AMP や GMP 合成の中間体) が GUK1 により間違っリン酸化され、更に他の酵素でリン酸化されて ITP が生成される。この ITP が疾患の原因となる。

研究者からひとこと：

難病の一つである DEE35 の治療につなげることを目的として、原因分子 ITP の未解明だった生成経路解明を試み、成功しました。今回見つけた GUK1 は強く抑制すると別の疾患の原因になってしまうためすぐに治療に結びつけるのは難しそうですが、今後も難治疾患のメカニズムの解明を続け、治療に結び付けたいと思います。(土本大介)

【研究の背景と経緯】

発達性およびてんかん性脳症 (DEE)は乳児期に発症する重篤な脳症であり、様々な遺伝子の変異が発症に関わっており原因遺伝子の種類によって分類されます。その中でも DEE35 は、2015 年に初めて報告され、脳症以外にしばしば拡張型心筋症も併発し予後が悪い疾患です。原因は ITPA 遺伝子の変異による ITPA の活性低下または欠損であり、基質である ITP の蓄積が確認されています。ITP はヒト疾患の原因となることが知られていますが、ITP がどうやって生体内で生成されるのか不明でした。生体内での ITP 生成経路は学術的に興味を持たれていたと同時に、その阻害剤が開発できれば DEE35 の治療につながると期待されていました。

【研究の内容と成果】

研究グループは、ITP が IMP から 2 回のリン酸化によって生じるとの仮説に基づき、これを証明しました。この仮説は以前から提唱されていましたが、実際にこの仮説通りに細胞内で ITP が IMP から作られているのかは不明でした。また、その際にどのような酵素が関わっているかもわかっていませんでした。この仮説を検証するためにまず ITPA 欠損培養細胞を作成しました。次にこの細胞で IMP から ITP への合成が促進されるように IMP 量を増やすための処置として HMGA 処理⁵を考案しました。この処理は IMP 合成を増やし、IMP の消費を減らすことで IMP 量を増やすと考えられます。この HMGA 処理により ITPA 欠損細胞の RNA 中イノシン⁶（細胞内 ITP 量を示す代替マーカー）が増加すると同時に細胞の増殖が著しく低下しました。次に ITP 生成に関わる遺伝子を探すことを目的に HMGA 処理による ITPA 欠損細胞の増殖低下に関わる遺伝子を探索し、GUK1 遺伝子を発見しました。GUK1 遺伝子産物は GMP リン酸化酵素であり、GMP とよく似た構造の IMP のリン酸化を行う可能性が考えられました。そこで実際に GUK1 遺伝子産物タンパク質を調製して調べたところ IMP リン酸化活性が確認されました。次に ITPA 欠損細胞において GUK1 遺伝子を抑制すると ITPA 欠損細胞の RNA 中に蓄積するイノシンが減少することが分かりました。全部で 11 クローンの GUK1 抑制細胞株を樹立しましたが、これらの細胞の GUK1 発現レベルと RNA 中イノシン量は強い正相関（一方が高いともう一方も高くなる関係）を示しました。続いて GUK1 抑制細胞に組換え GUK1 遺伝子を強制発現すると顕著な RNA 中イノシンの増加が観察されました。このことから培養細胞レベルでは GUK1 は ITP 生成に必須の役割を果たしていることが示されました。

最後にほ乳動物個体で GUK1 の機能を調べる目的で、研究グループが以前に樹立した脳神経系特異的 ITPA 欠損マウスと新規に導入した GUK1 欠損マウスを交配させたところ、脳神経系特異的 ITPA 欠損マウスが生後約 3 週間で死亡するのに対し、GUK1 を半分欠損すると寿命が延長することが観察されました。さらにこれらのマウス的大脑皮質の RNA 中のイノシンを定量したところ ITPA 欠損マウスで蓄積したイノシン量が GUK1 半分欠損により 6 割程度まで減少していることが確認されました。以上の結果より、ほ乳動物において GUK1 が IMP をリン酸化することで IDP を産生し、この IDP が細胞内に複数種類あり基質特異性が低いとされているヌクレオシド二リン酸キナーゼによりリン酸化を受けて ITP が生成されていると考えられました。

今回は検討しませんでした。ITPA 欠損細胞では RNA 中のイノシンに比べると量は少ないですが DNA 中にもデオキシイノシンが蓄積しゲノムが不安定化することがわかっています。これは dITP が DNA 合成時に取り込まれたものと考えられます。dITP 生成経路としては IMP が IDP になった後、デオキシイノシン二リン酸 (dIDP) を経由して dITP になるか、DNA 分解物のデオキシイノシン二リン酸 (dIMP) が二段階リン酸化を受ける経路が考えられます。いずれも (d)IMP が (d)IDP になるステップで GUK1 に依存すると考えられます。

本研究の過程で当初予想していなかった次のような発見もありました。新規導入した GUK1 半分欠損マウス、(Guk1(+/-)) 同士を交配しても予想される完全欠損マウス (Guk1(-/-)) が生まれて来

ないことがわかりました。また生後 14 日後の Guk1(+/-)マウスの体重は正常マウスと比べてわずかに低下していることがわかりました。2024 年に GUK1 の活性が半分未満に減少した患者さんが初めて報告され、ミトコンドリア DNA が減少して筋肉が萎縮し疲れやすいといったような様々な症状を示すことがわかっています。本研究のマウスの結果からは GUK1 を完全に欠損すると死んでしまうことと半分の欠損でも体重低下などのマイルドな症状が出るということが明らかとなりました。

【今後の展開】

本研究は未解明だった ITP の生体内での生成経路を解明したという点で学術的な意義があります。更に DEE35 の分子病態を解明することにより治療につながることを期待しています。一方、今回マウスで確認された Guk1 遺伝子ヘテロ欠損による体重低下はヒトで同様に GUK1 遺伝子片アレル欠損^{*7}による症状が存在する可能性を示しており興味深いです。他の遺伝子の片アレル欠損によるヒト疾患のケースから考えると、GUK1 遺伝子の片アレルを欠損する日本人が 1 万人前後存在する可能性があります。既に報告された GUK1 欠損症ほどの重篤な疾患ではないでしょうが、他の人より筋肉が疲れやすいなどの症状を持つ可能性が考えられます。今後 Guk1 遺伝子ヘテロ欠損マウスについても詳しく解析したいと考えています。

【用語解説】

(※1) イノシン三リン酸 (ITP)：通常はイノシン三リン酸分解酵素 (ITPA) により分解されるため生体内にほとんど存在しないが、ITPA が欠損すると蓄積する。その構造は ATP (アデノシン三リン酸)や GTP (グアノシン三リン酸)といった重要な正常プリンヌクレオチド分子と非常に似ている。そのため、ATP や GTP の邪魔をする可能性がある。

(※2) DEE：発達性およびてんかん性脳症 (Developmental and Epileptic Encephalopathy)。生後数週間以内の乳児早期に発症する難治性のてんかん。多くの原因遺伝子が判明しており ITPA 遺伝子は DEE35 の原因遺伝子。発症機構が未解明なものが多い。

(※3) イノシンーリン酸 (IMP)：ITP と異なり、通常細胞内に存在する正規ヌクレオチドの一つ。生体に必要なアデノシン三リン酸 (ATP) やグアノシン三リン酸 (GTP) を細胞内で合成するための中間体として機能している。

(※4) グアニル酸キナーゼ 1 (GUK1)：グアノシンーリン酸 (GMP) をリン酸化してグアノシン二リン酸に変換する酵素。今回の研究の中で、GMP とよく似た IMP もリン酸化することが確認された。

(※5) HMGA 処理：ヒポキサンチン (H) により IMP 産生を高め、ミコフェノール酸 (M) により IMP 消費を抑制、グアノシン (G) によりミコフェノール酸の毒性を阻止、アデノシン (A) によりもう一つの IMP 消費経路を抑制、結果として IMP 蓄積を誘導する。今回新しく考案された細胞処理方法。

(※6) RNA 中イノシン：細胞中にイノシン三リン酸 (ITP) が蓄積すると、RNA 合成時に間違っ材料として取り込まれて RNA 中にイノシンとして蓄積する。ITPA 欠損細胞で RNA 中イノシンが大きく増加することがこれまでにわかっており細胞内 ITP 蓄積確認のための代替マーカーとなる。

(※7) 片アレル欠損：多くのほ乳動物細胞では母親由来と父親由来の二つの GUK1 遺伝子を持つが、そのうちの片方の遺伝子だけ欠損する状態。両方が欠損するより高頻度に起こり得る。ヘテロ欠損もほぼ同じ意味。

【謝辞】

本研究の一部は、JSPS 科研費 (JP18K06960, JP21K06869 [土本大介]、ならびに JP17H01391 [中別府雄作]) の支援を受けて行われました。

【論文情報】

掲載誌：Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (米国科学アカデミー紀要)

タイトル：Guanylate kinase 1 is an enzyme responsible for inosine accumulation in RNA of mammalian cells deficient in inosine triphosphatase

著者名：Daisuke Tsuchimoto*, Yuka Takiguchi, Yusaku Nakabeppu

(*: correspondence)

D O I : 10.1073/pnas.2606968123

【お問合せ先】

<研究に関すること>

九州大学 生体防御医学研究所 助教 土本大介 (ツチモト ダイスケ)

TEL : 092-642-6797 FAX : 092-642-6798

Mail : tsuchimoto.daisuke.295@m.kyushu-u.ac.jp

<報道に関すること>

九州大学 広報課

TEL : 092-802-2130 FAX : 092-802-2139

Mail : koho@jimu.kyushu-u.ac.jp