

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893046

研究課題名(和文) 顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー原因候補遺伝子DUX4の活性調節因子の探索

研究課題名(英文) Screening of a cofactor of DUX4, a candidate causative gene for facioscapulohumeral muscular dystrophy

研究代表者

三橋 弘明 (Mitsuhashi, Hiroaki)

東京大学・生命科学ネットワーク・特任助教

研究者番号：20466220

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー(FSHD)の原因候補遺伝子であるDUX4の活性調節因子を探索するため、DUX4のC末端領域を用い、酵母2-ハイブリッド系によるDUX4C末端結合タンパク質の探索を試みた。しかしながらDUX4C末端領域が酵母細胞内でも強い転写活性化能を示したため、この方法によるスクリーニングは困難であることがわかった。そこで手法を変え、大腸菌を用いてGSTとDUX4C末端の融合タンパク質を発現、精製し、ヒト筋由来細胞破碎液とのGSTプルダウン法をおこなった。その結果、DUX4C末端に結合したと思われる低分子量のバンドを得た。現在、このバンドに含まれるタンパク質の同定を試みている。

研究成果の概要(英文)：To screen the regulatory factor of DUX4, a leading candidate gene for FSHD, we tried yeast two-hybrid screening with DUX4 C-terminal region. However, the DUX4 C-terminal region fused to GAL4 DNA-binding domain showed extremely strong transcriptional activity in yeast cells, we found that it was difficult to identify DUX4 binding protein by this method. Next, we tried GST pull-down screening with GST-DUX4 C-terminus fusion protein and human muscle cell lysate. As the result, a low molecular band was detected in the elute of GST-DUX4 pull-down. We are currently trying to identify this protein.

研究分野：分子生物学

キーワード：遺伝性筋疾患 筋ジストロフィー 転写因子 細胞死

1. 研究開始当初の背景

顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー(FSHD)は最も患者数の多い型の筋ジストロフィーの1つであるが、長らくその原因遺伝子はわかっていなかった。近年、FSHD患者筋でDUX4遺伝子が高頻度に発現していることが明らかとなり、原因遺伝子候補として注目を集めている。DUX4がコードするDUX4-flタンパク質は転写因子であり、標的遺伝子の発現量の増加が病態に関与すると考えられているが、その詳細は明らかになっていない。研究代表者は動物モデルを用い、これまでにDUX4-flがDNA結合ドメイン依存的に細胞毒性を示すこと、細胞毒性にはDUX4-flのC末端領域が不可欠であることを明らかにしてきた。しかし、なぜC末端領域が重要であるのかは不明であった。

2. 研究の目的

研究代表者はDUX4-flのC末端領域には未知の調節タンパク質が結合し、DUX4-flの活性を調節するのではないかと考えた。そこで本研究では、DUX4-flのC末端を欠失した変異体の機能の検討とC末端領域に結合するDUX4-fl結合タンパク質の探索をおこない、DUX4-flの転写活性化機構を調べることを目的とした。

3. 研究の方法

DUX4-flのC末端領域を欠失した変異体を分子生物学的手法により作製した。DUX4-fl、欠失変異体をヒト培養細胞に発現させ、細胞の様子および遺伝子発現について検討した。また、DUX4-flに特異的なC末端領域のみをクローニングし、GAL4-DNA結合ドメインとの融合タンパク質として酵母細胞に発現させ、酵母2-ハイブリッド法による結合タンパク質の同定を試みた。さらに、DUX4C末端領域をGSTとの融合タンパク質として大腸菌に発現させ、精製した後に、ヒト培養細胞破砕液と混合してGSTプルダウン法による結合タンパク質の同定も試みた。

4. 研究成果

DUX4-flをHeLa細胞に発現させ、遺伝子発現を調べた結果、通常ではまったく発現の見られないZSCAN4, TRIM48, MBD3L2, PRAMEF1, TRIM43の発現が数千~約1万倍と顕著に増加することが定量的PCR解析で明らかとなった。したがってDUX4-flの発現は細胞の正常な遺伝子発現を劇的に攪乱することがわかった。そこでC末端欠失変異体を発現させた時のZSCAN4発現量を測定したところ、ほとんど発現量の変化は見られなかった。このことからC末端領域はDUX4-flの転写活性に必須の領域であることが明らかとなった。

次に、上記の実験でDUX4-flの転写活性化に重要であると判明したC末端領域をクローニングし、GAL4-DNA結合ドメインとの融合タンパク質として酵母細胞に発現させた。ウェスタンブロットにより発現の成功を確認したが、Gal4-DUX4C末端融合タンパク質が非常に強い自己活性化を示してしまったため、酵母2-ハイブリッド法の選択培地において、疑陽性の酵母コロニーが多数成育してしまった。このことはDUX4-flのC末端領域は生物種を越えて転写因子を活性化させるドメインであることを示唆している。即ちDUX4-flのC末端領域の結合タンパク質は非常に保存性の高い、転写制御の基本構成因子をなすタンパク質ではないかと推測された。そこで、酵母でのスクリーニングから方針を転換し、大腸菌を用いたGSTプルダウン法によるスクリーニングをおこなうことにした。リコンビナントのGST-DUX4C末端融合タンパク質を合成し、アフィニティカラムを用いて純度良くタンパク質を精製することに成功した。得られたGST-DUX4C末端融合タンパク質とヒト由来培養細胞の破砕液とを混合し、GSTプルダウン法によってDUX4C末端結合タンパク質を探索した。ポリアクリルアミドゲル電気泳動の結果、

DUX4C 末端に結合したと思われる低分子量のタンパク質バンドを得た。現在、このタンパク質の同定を試みている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計3件)

(1) Takagane K, Nojima J, Mitsuhashi H, Suo S, Yanagihara D, Takaiwa F, Urano Y, Noguchi N, Ishiura S. (2015) A β induces oxidative stress in senescence-accelerated (SAMP8) mice. *Biosci Biotechnol Biochem* (in press) DOI:10.1080/09168451.2014.1002449 査読あり

(2) Tei S, Ishii HT, Mitsuhashi H, Ishiura S. (2015) Antisense oligonucleotide-mediated exon skipping of CHRNA1 pre-mRNA as potential therapy for Congenital Myasthenic Syndromes. *Biochem Biophys Res Commun* 461 (3): 481-486 DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.04.035. 査読あり

(3) Ohsawa N, Koebis M, Mitsuhashi H, Nishino I, Ishiura S. (2015) ABLIM1 splicing is abnormal in skeletal muscle of patients with DM1 and regulated by MBNL, CELF and PTBP1. *Genes Cells* 20 (2): 121-134. DOI: 10.1111/gtc.12201. 査読あり

[学会発表](計7件)

(1) 三橋弘明. 筋ジストロフィーの原因となる転写因子 DUX4 の機能解析. 第3回骨格筋生物学研究会、2015年3月8日、東北大学(宮城県仙台市)

(2) 三橋弘明、石浦章一. DUX4 の細胞毒性は転写活性に依存する. 第37回日本分子生物学会 2014年11月25日 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

(3) Mitsuhashi H, Lek A, Mosimann C, Zon LI, and Kunkel LM. Generation of a transgenic zebrafish as a model for Facioscapulohumeral muscular dystrophy. 第20回小型魚類研究会、2014年9月20日 慶応義塾大学(東京都港区)

(4) Rahimov F, King O, Mitsuhashi H, Lek A, and Kunkel LM. Identification of transcriptional targets of human DUX4 during zebrafish development. *2014 New Directions in Biology and Disease of Skeletal Muscle Conference*, 2014年6月30日、Chicago (USA)

(5) Lek A, Mitsuhashi H, Rahimov F, Murphy Q, Gupta V, Mosimann C, Zon L, and Kunkel LM. A transgenic zebrafish model for FSHD. *2014 New Directions in Biology and Disease of Skeletal Muscle Conference*, 2014年6月30日、Chicago (USA)

(6) 三橋弘明. ゼブラフィッシュをモデルとした筋ジストロフィーの研究. 第2回骨格筋生物学研究会、2014年3月8日、北海道医療大学(北海道札幌市)

(7) 三橋弘明、三橋里美, Lynn-Jones T, 川原玄理, Kunkel LM. ゼブラフィッシュ胚におけるDUX4の発現は顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー様の表現型を引き起こす. 第36回日本分子生物学会、2013年12月3日、神戸ポートアイランド(兵

庫県神戸市)

(3)連携研究者

なし

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

三橋 弘明 (MITSUHASHI HIROAKI)

東京大学・生命科学ネットワーク・特任助
教

研究者番号: 20466220

(2)研究分担者

なし