

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19580338

研究課題名 (和文) ニワトリ筋ジストロフィー遺伝子の同定と発症機構の解明

研究課題名 (英文) Identification of responsible gene for chicken muscular dystrophy and the onset mechanism

研究代表者

万年 英之 (MANNEN HIDEYUKI)

神戸大学・大学院農学研究科・准教授

研究者番号：20263395

研究成果の概要：本研究はニワトリ筋ジストロフィーの原因遺伝子を同定し、この疾患の発症機構を明らかにすることが目的である。候補領域内に存在する 7 遺伝子に対して、翻訳領域の塩基配列を疾患個体と正常個体で比較検討した結果、WWP1 遺伝子に観察された G1321A 置換はアミノ酸をアルギニンからグルタミンに置換するものであった。これらの結果から、WWP1 遺伝子がニワトリ筋ジストロフィーの最有力原因候補遺伝子であることが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2007 年度 | 1,700,000 | 510,000 | 2,210,000 |
| 2008 年度 | 1,600,000 | 480,000 | 2,080,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,300,000 | 990,000 | 4,290,000 |

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：遺伝

1. 研究開始当初の背景

(1)筋ジストロフィーは筋萎縮を引き起こす死亡率が高い遺伝疾患である。(財)日本生物科学研究所では、カリフォルニア大学に由来するニワトリ筋ジストロフィー遺伝子をファイオミ種に導入したコンジェニック近交系統が作成、維持されている。この筋ジストロフィーは、ヒトで高頻度に見られ性染色体に由来する進行性筋ジストロフィー (Duchenne 型、Becker 型) とは異なり、他種類の筋ジストロフィーとしての実験動物として期待されている。しかし、このニワトリ筋ジストロフィーはヒトのどの型に相当

するのかは不明であり、また原因遺伝子も明らかにされていない。

(2) 申請者は、この筋ジストロフィー原因遺伝子を同定するために、世界で第 4 番目となる遺伝連鎖地図を構築し、その原因遺伝子をニワトリ第 2 染色体の q 腕に位置づけ、ハプロタイプ分析によりその領域を 1.2Mb までに限定し、7 つの機能遺伝子の一つが原因遺伝子であることを示唆した (図 1)。また近年、この疾患は細胞骨格を形成するタンパク質の一つである α -dystroglycan の糖鎖に異常があることを報告した。しかしながら、7 つの候補遺伝子には糖鎖修飾に関する遺伝

子は含まれていなかった。

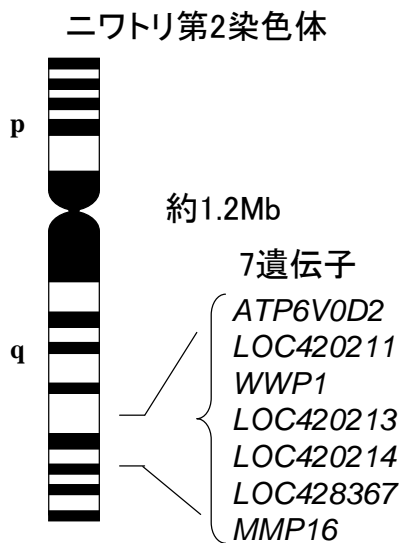


図1 鶏筋ジストロフィーの原因候補遺伝子

2. 研究の目的

(1)筋ジストロフィーは発症原因によって大きく2つに分類することが出来る。一つ目は、進行性筋ジストロフィー (Duchenne 型、Becker 型) に代表される細胞骨格を構成するジストロフィン関連タンパク質群の異常であり、二つ目はその他の異常である。これまでの研究は、進行性筋ジストロフィーに対する研究が国内外共に主流であり、マウスを始めとする種々の実験動物もこの型の筋ジストロフィーに属する。しかしながら、これらのそれ以外の筋ジストロフィー型に対する実験動物の開発は進んでいない。

(2)近年になって、進行性筋ジストロフィー以外の解析が始まり、福山型筋ジストロフィーを始めとする糖鎖修飾異常による筋ジストロフィーの解明が進んできた。本研究対象であるニワトリ筋ジストロフィーは、 α -dystroglycan の糖鎖異常が示唆されていることから、この疾患の原因遺伝子と発症機構を解明すれば、世界で最初となる糖鎖修飾異常による筋ジストロフィーの実験動物として極めて有用なものとなる。また、これまで解明されている糖鎖修飾異常筋ジストロフィーは、糖鎖修飾酵素の異常が原因であるが、ニワトリ筋ジストロフィーでは糖鎖修飾酵素の異常は認められていない。よって、この疾患の発症機構の解明は、筋ジストロフィーの新しい発症機構を提唱することになり、そのインパクトは極めて大きい。このことは、これまで原因が不明であるヒトにおける筋ジストロフィーの解明にも大きく貢献する。

(3)本研究では、この7つの候補遺伝子のいずれがニワトリ筋ジストロフィーの原因遺伝子突き止め、その原因遺伝子の機能から、この遺伝疾患の発症機構を明らかにすることを目的とした。そのために、7候補遺伝子の全塩基配列を決定し、正常・疾患個体間の塩基配列を比較する、7候補遺伝子の mRNA 発現解析を行い、そのサイズや発現量の差異から候補遺伝子を推定する2つの実験から、最有力候補遺伝子と原因突然変異を絞込む。また、関連タンパク質群を明らかにすることにより、同定した原因遺伝子の機能を推定し、発症機構を明らかにする。

3. 研究の方法

(1)候補領域内に存在する7遺伝子、ATP6V0D2、LOC420211、WWP1、MMP16、LOC420213、LOC420214、LOC428367に対して、翻訳領域の塩基配列を疾患個体と正常個体で比較検討した。

(2)WWP1 遺伝子に対しては、各組織に対するノーザン解析を行った。また、WWP1 抗体を用いた組織免疫染色を浅胸筋、後背筋、心筋に対して行った。

(3)caveolin-3、PTRF、Akt に対してウエスタンブロッティングを行い、浅胸筋、後背筋、心筋における発現量を疾患個体と正常個体で比較検討した。caveolin-3 に対しては、浅胸筋 cDNA を用い RT-PCR 解析を行った。Akt 及び PDK1 のリン酸化部位特異的抗体を用いて Akt シグナルの活性化を調べた。

(4)また、二種類の WWP1 抗体を用いた免疫沈降を浅胸筋に対して行い、caveolin-3・WWP1 間の相互作用を評価した。

4. 研究成果

7 候補遺伝子の翻訳領域の塩基配列比較の結果、突然変異は4ヶ所確認されたが、3箇所は同義置換であった。WWP1 遺伝子に観察された G1321A 置換はアミノ酸をアルギニンからグルタミンに置換するものであった (図2)。

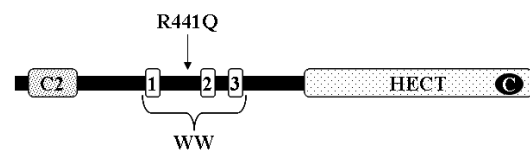


図2 ニワトリ WWP1 遺伝子の構造と突然変異箇所

またこの突然変異領域は、脊椎動物の生物種間で高度に保存されており、ニワトリ筋ジストロフィー個体にのみこの突然変異が認められた (図 3)。

| | Chicken A | Chicken B | Human | Chimpanzee | Monkey | Mouse | Rat | Dog | Cattle | Pigeon | Snake | Alligator | Lizard | Turtle | Frog |
|--|-----------|-----------|-------|------------|--------|-------|-----|-----|--------|--------|-------|-----------|--------|--------|------|
| | RN | Q | A | A | A | A | A | A | A | A | T | T | T | T | T |
| | LOG | | V | V | V | V | V | V | V | V | | | | | |
| | AM | | K | K | K | K | K | K | K | K | | | | | |
| | Q | | T | T | T | T | T | T | T | T | | | | | |
| | Q | | | | | | | | | | | | | | |
| | W | | | | | | | | | | | | | | |
| | H | | | | | | | | | | | | | | |
| | T | | | | | | | | | | | | | | |
| | K | | | | | | | | | | | | | | |
| | T | | | | | | | | | | | | | | |
| | Q | | | | | | | | | | | | | | |
| | W | | | | | | | | | | | | | | |
| | H | | | | | | | | | | | | | | |
| | T | | | | | | | | | | | | | | |
| | T | | | | | | | | | | | | | | |
| | T | | | | | | | | | | | | | | |

図 3 脊椎動物種間における WWP1 アミノ酸配列の比較

WWP1 遺伝子に対するノーザン解析を各筋組織、心臓、脳、肝臓、腎臓、胚試みたところ、各組織によって多少の発現量差が認められたものの、mRNA サイズの違いや無発現などの動向は認められなかった。

WWP1 抗体を用いた浅胸筋、後背筋、心筋に対する組織免疫染色解析では、疾患個体・正常個体共に、後背筋と心筋では血管周辺領域を除いて WWP1 発現は認められなかった。浅胸筋では正常個体において細胞膜上に WWP1 発現が認められたが、疾患個体では発現は認められなかった (図 3)。

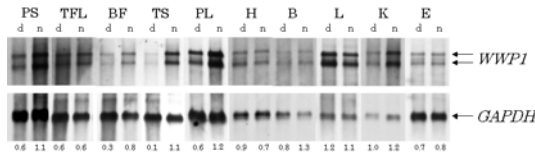


図 3 ニワトリ WWP1 遺伝子のノーザン解析

塩基配列比較の結果から、WWP1 遺伝子がニワトリ筋ジストロフィーの最有力原因候補遺伝子であることが示唆された。ノーザン解析において正常個体と疾患個体間で顕著な違いが認められなかったことは、アミノ酸置換変異を伴う変異を本疾患の原因とすることに矛盾しないと考えられた。特にこの変異はアルギニン (塩基性側鎖) からグルタミン (中性側鎖) に置換するものであることから原因となる可能性が高いことが示唆された。

WWP1 抗体を用いた組織免疫染色解析では、赤筋を主体とする後背筋と心筋では発現がほとんど認められないこと、白筋を主体とする浅胸筋では正常個体において発現が認められたにもかかわらず疾患個体では発現は認められない、ことから病変の主体となる浅胸筋で発現の違いが認められ、WWP1 が原因遺

伝子であることを強く示唆していた。

caveolin-3 タンパク質の発現は、正常個体に較べ疾患個体で上昇していた (図 4)。この発現上昇は、ニワトリ筋ジストロフィーにおいて選択的に侵される浅胸筋に限定されていた。BIN1 や Akt、リン酸化 PDK1 も caveolin-3 と同様の発現様式を示した。一方 caveolin-3 mRNA の発現は、正常個体と疾患個体で大きな差は認められなかった。また Akt の活性化型であるリン酸化 Akt は疾患個体の浅胸筋でのみ発現が観察された。

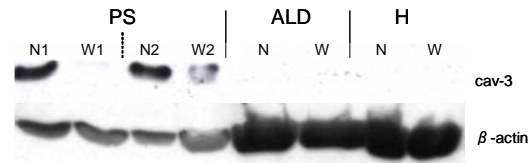


図 4 caveolin-3 のタンパク質発現

WWP1 抗体を用いた免疫沈降サンプルに対し、caveolin-3 抗体を用いたウエスタンブロッティングを行ったところ、疾患個体・正常個体の両群で 26kDa の泳動度を示すバンドが検出された。同一のバンドは ubiquitin 抗体によるウエスタンブロッティングにおいても検出された。

本研究の結果から、caveolin-3 の発現異常はニワトリ筋ジストロフィーの発症に大きく関与していることが示唆された。

caveolin-3 の発現異常は罹患筋に限定されており、また caveolae の増加は病変の現れる以前に認められるので 5)、caveolin-3 の発現異常は発症による二次的な変化ではなく、発症を導く一次的な変化であると考えられる。

疾患個体において caveolin-3 はタンパク質レベルでは発現が上昇しているが、mRNA レベルでは発現上昇は認められないことから、caveolin-3 が翻訳後修飾によりそのタンパク質量を調節されている事が示唆された。ニワトリ筋ジストロフィーの原因遺伝子として ubiquitin ligase の一種である WWP1 遺伝子が同定されており、変異型 WWP1 は caveolin-3 の調節が不可能になっている可能性がある。WWP1 の免疫沈降サンプルから caveolin-3 が検出可能であり、この caveolin-3 がユビキチン化されたものであるというデータは、この仮説を支持するものであった。

これらの結果から、WWP1 遺伝子がニワトリ筋ジストロフィーの最有力原因候補遺伝子であることが示唆され、その発症機構として WWP1 突然変異による機能欠損のため、caveolin-3 発現調節の異常が考えられた。

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)

- ①Matsumoto, H, H. Maruse, S. Sasazaki, A. Fujiwara, S. Takeda, N. Ichihara, T. Kikuchi, F. Mukai, H. Mannen. Expression pattern of WWP1 in muscular dystrophic and normal chickens. J. Poult. Sci. (印刷中). 査読有
- ②Matsumoto, H., H. Maruse, Y. Inaba, K. Yoshizawa, S. Sasazaki, A. Fujiwara, M. Nishibori, A. Nakamura, S. Takeda, N. Ichihara, T. Kikuchi, F. Mukai and H. Mannen. The ubiquitin ligase gene (WWP1) is responsible for the chicken muscular dystrophy. FEBS letters. 582: 2212-2218. 2008. 査読有
- ③Matsumoto, Y., H. Maruse, K., Yoshizawa, S. Sasazaki, A. Fujiwara, T. Kikuchi, N. Ichihara, F. Mukai and H. Mannen. Pinpointing the candidate region of muscular dystrophy in chickens with an abnormal muscle gene. Anim. Sci. J. 78: 476-483. 2007. 査読有

[学会発表] (計 1 件)

- ①Matsumoto, H., H. Maruse, Y. Inaba, K. Yoshizawa, S. Sasazaki, A. Fujiwara, M. Nishibori, A. Nakamura, S. Takeda, N. Ichihara, T. Kikuchi, F. Mukai, H. Mannen. The ubiquitin ligase gene (WWP1) is responsible for the chicken muscular dystrophy. 31th International Conference on Animal Genetics. Amsterdam, 2008 年 7 月 20-24 日. The Netherlands.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

万年 英之 (MANNEN HIDEYUKI)
神戸大学・大学院農学研究科・准教授
研究者番号：20263395

(2) 研究分担者

向井 文雄 (MUKAI FUMIO)
(社)全国和牛登録協会・会長
研究者番号：50093323

(3) 連携研究者

該当なし