

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：82611

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500472

研究課題名(和文)変異型WWP1ユビキチンリガーゼによる筋線維変性の分子機構解析

研究課題名(英文)Molecular characterization of a HECT-type E3 ubiquitin ligase that is encoded in the WWP1 gene responsible for chicken muscular dystrophy.

研究代表者

今村 道博 (Imamura, Michihiro)

独立行政法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所 遺伝子疾患治療研究部・室長

研究者番号：80221787

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：筋ジストロフィーニワトリの筋線維変性はWWP1 E3 ユビキチンリガーゼ遺伝子のミスセンス変異により、441番目のアルギニンがグルタミンに変換するためと考えられている。我々はin vivo及びin vitroでの解析から、この1アミノ酸変異がWWP1の分解を誘導しE3ユビキチンリガーゼとしての酵素機能を失活させると同時に、その局在を変化させることを明らかにした。これらの変化は筋変性に先行して生じることから、筋ジストロフィーの原因となる可能性が強く示唆された。

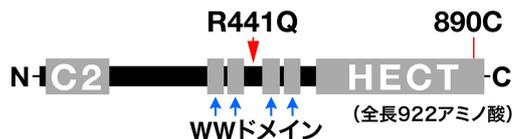
研究成果の概要(英文)：The R441Q missense mutation in the WWP1 protein was reported as the most promising candidate responsible for chicken muscular dystrophy (MD). We generated an antibody against WWP1, and characterized WWP1 protein expression in skeletal muscles in vivo and in vitro. In wild-type skeletal muscle, WWP1 was detected as an approximately 130-kDa protein and localized to the sarcolemma, sarcoplasmic reticulum, mitochondria, as well as in a part of the nucleus, whereas it was markedly degraded and absent from the sarcolemma in MD muscle. These changes were already observed in MD chickens in the pre-pathological stage. In vitro expression analysis demonstrated significant degradation of mutant but not wild-type WWP1, specifically in myogenic cells. Our study revealed that the R441Q missense mutation in the WWP1 protein causes its degradation as well as loss of its sarcolemmal localization, which are hence implicated in the pathogenesis of chicken MD.

研究分野：総合領域

キーワード：筋ジストロフィー 実験動物 遺伝子疾患 WWP1 E3 ユビキチンリガーゼ タンパク質分解

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 筋ジストロフィーは筋細胞そのものが変性することにより生命活動に困難をもたらす遺伝子疾患群である。この筋疾患はヒトに限らず様々な動物種においても認められており、古くから筋ジストロフィー研究の重要な動物モデルとなってきた。これまでに発見された筋ジストロフィー動物の遺伝子解析の結果、そのほとんどがヒトの筋ジストロフィーに対応することが示され、ヒト疾患の病態研究や診断法及び治療法開発に重要な役割を果たしている。一方、鳥類という特殊性のためか、家鶏の中に発見された筋ジストロフィーニワトリの原因遺伝子だけは長い間不明のままであったが、近年になり、神戸大学のグループから WWP1 と呼ばれる E3 ユビキチンリガーゼ (転移酵素) 遺伝子中に生じたミスセンス変異がその原因であると報告された。この遺伝子にコードされる WWP1 タンパク質はアミノ基端 (N 端) とカルボキシル基端 (C 端) にそれぞれ、リン脂質との結合に関与する C2 ドメインと、ユビキチン転移酵素機能を持つ HECT ドメインを配し、それに挟まれる形で基質との結合に関わる 4 つの WW ドメインを有する 922 アミノ酸から成る分子である (下図)。



発見されたミスセンス変異は 441 番目のアルギニンをグルタミンへと変換する (R441Q) が、これがちょうど WW ドメイン群の中央に位置することから、WWP1 の基質特異性を変化させ、ユビキチンの転移機能に影響を及ぼす結果、筋変性を生じるのではないかと考えられている。WWP1 は生体内に広く発現しており、細胞増殖や細胞死、骨の形成や老化、神経疾患など様々な事象に関わっているばかりか、mRNA レベルでは骨格筋や心筋に発現が強い。そのためその機能が注目されていたが、タンパク質分子としての発現や存在様式に関する情報は皆無であった。

(2) 我々は、筋ジストロフィーニワトリは常染色体・共優性の遺伝形式をとることから正常筋細胞に R441Q 変異型 WWP1 を発現させれば哺乳類でも同様の筋病態を再現できると考え、この変異型 WWP1 を発現するトランスジェニックマウス (Tg マウス) を作製した。これと同時に WWP1 に対する特異抗体を新たに作製して Tg マウスを解析したところ、変

異型 WWP1 は横紋筋組織特異的に分解・断片化され、約 90 kDa の小さな sWWP1 になること、そしてこの sWWP1 は細胞膜へ限定的に局在するという明瞭な分子レベルの変化が示された。しかしその一方、マウス個体としての筋肉の異常は軽微なもので、老化マウス骨格筋に空胞変性が認められるというものであった。

## 2. 研究の目的

(1) WWP1 は E3 ユビキチン転移酵素であるため、その酵素機能と筋細胞の維持機構との関連を明らかにする必要がある。そこで R441Q 変異型 Tg マウスの骨格筋で生成される sWWP1 が E3 ユビキチン転移酵素として、その機能を維持できるのか否かを明らかにする。

(2) 筋ジストロフィーニワトリの遺伝形式より、変異型 WWP1 の発現が優性阻害的に働き、筋変性を生じさせるという仮説を立てて解析を行って来たが、R441Q-WWP1 Tg マウスの筋症状は予測以上に軽微なものであり、筋変性そのものがほとんど認められない。そのため変異型 WWP1 が優性阻害的に働くという仮説について検証する。

## 3. 研究の方法

(1) WWP1 が E3 ユビキチン転移酵素として機能するためには E2 ユビキチン結合酵素からユビキチンを一旦 HECT ドメインへ移す過程を経るが、そのためには末端付近に位置する 890 番目のシステイン (890C) が必要となる (左図参照)。このため、このシステインに隣接した N 端側領域を認識する新たな WWP1 抗体を作製し、R441Q 変異型 WWP1 Tg マウスで生成された sWWP1 にこのアミノ酸残基が存在するか否かを解析し、E3 ユビキチン転移酵素としての機能を明らかにした。

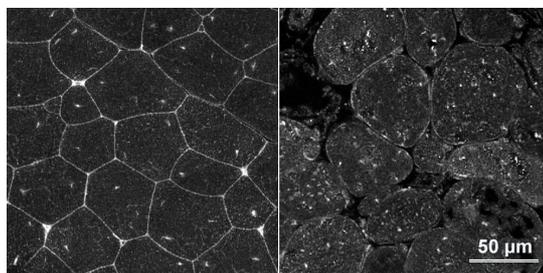
(2) 孵化後 1 週、2 週、3 週、1 ヶ月、2 ヶ月、3 ヶ月までの筋ジストロフィーニワトリ (NH-413 ニワトリ) とその対照群 (正常ニワトリ) の骨格筋を入手し、生化学的および組織化学的解析から WWP1 タンパク質分子の同定と変異型分子の分解パターン、また、筋細胞における局在について解析した。尚、入手した全ての筋ジストロフィーニワトリについてゲノム DNA を解析したところ、WWP1 遺伝子変異はホモ接合体であり、正常型 WWP1 は存在しなかった。

## 4. 研究成果

(1) WWP1 がユビキチン転移酵素として働いた

めには 890 番目の活性化システイン残基 (890C) に E2 ユビキチン結合酵素のユビキチンをチオエステル結合させることが必須となる。R441Q-WWP1 Tg マウスの骨格筋において、変異型 WWP1 は 130 kDa から 90 kDa の sWWP1 へと分解されるが、これは分子全体の 30% に及ぶ領域を N 端か C 端、或いは両方から失うことであり、C 末端からわずか 32 残基目に位置する 890C は sWWP1 では欠失している可能性が高い。そこで、我々は 890C に隣接する N 末側 10 残基のアミノ酸配列を認識する抗体 (890C 抗体) を作製してイムノプロットを行ったところ、sWWP1 との反応は全く認められなかった。これとは異なり C2 ドメインの終りから WW ドメインの始まりまでの領域を抗原として作製した抗 WWP1 抗体 (FF15K 抗体) で免疫沈降してきた WWP1 を調べたところ、分解されない 130 kDa の WWP1 (正常型) とは明瞭に反応すること、また、変異アミノ酸のみを認識する抗体を用いると正常型分子 (130 kDa) には反応せずに sWWP1 のみと反応するのが確認された。このことは WWP1 遺伝子のミスセンス変異により 441 番目のアルギニンがグルタミンに置き換わると、WWP1 の分解が誘起され、C 末端が大きく欠失するため E3 転移酵素としての機能を果たせなくなることを示していた。更に、C2C12 培養筋細胞を用いた *in vitro* での発現解析からはプロテアソーム阻害剤存在下では変異型 WWP1 の分解がある程度抑えられるのが認められたため、WWP1 消化による機能喪失とプロテアソームとの関連が注目された。

(2) 我々が作製した抗 WWP1 抗体 (FF15K 抗体) でニワトリ胸筋のホモジネートを解析したところ、マウスの骨格筋と同様に、正常なニワトリの WWP1 は約 130 kDa のタンパク質として検出されたが、NH-413 筋ジストロフィーニワトリではこれが著しく減少し、代わりに 90 kDa の sWWP1 が増える傾向にあった。但し、マウスの場合とは異なり、この sWWP1 の安定性は低く、分解が進む過程で現れる中間体的存在と考えられた。また、同じ抗体を用いて胸筋の免疫組織化学染色を行ったところ、ニワトリ胸筋においては正常 WWP1 筋線維の筋形質膜と筋小胞体、そしてミトコンドリアと核の一部にシグナルが認められた。これに対して、NH-413 ニワトリの胸筋では筋形質膜の染色性のみが著しく弱まり、細胞質内のシグナルがわずかに増強されていたが、オルガネラマーカールとの二重染色によりこの増強はミトコンドリアが増加したためであると考えられた (右図を参照)。  
NH-413 ニワトリにおける WWP1 の分解と筋形質膜からの消失は、筋症状が認められない若齢個体でも認められることから、筋変性によ



る二次的影響によるものではなく、ミスセンス変異により生じた WWP1 分子中の 1 アミノ酸置換によると結論された。実際に、C2C12 培養筋細胞に WWP1 cDNA をトランスフェクションすると正常型は安定して発現するのに対し、R441Q 変異型は分解するのが確認された。更に、培養細胞でも筋肉以外のものでは変異型 WWP1 に分解が生じないことから、変異型 WWP1 の分解には筋肉に特異的な細胞環境が関与するものと考えられた。

NH-413 ニワトリで興味深いのは筋変性が白筋特異的に生じるという点であり、赤筋である前広背筋 (ALD) は正常を保つことである。そこで、我々はこの ALD における WWP1 の発現を解析したが、NH-413 では WWP1 の分解が認められるものの、正常ニワトリにおいても著しく発現量が少なく、それは NH-413 ニワトリの胸筋に残存する WWP1 と比べてもより低いレベルであった。更に WWP1 の局在について調べたところ、NH-413 だけではなく、正常ニワトリの ALD 筋線維においても筋細胞膜への局在はほとんど認められなかった。一方で、細胞質内の染色に変化はなく、筋小胞体とミトコンドリア、そして核の一部に局在が認められたが、胸筋のようなミトコンドリアの増加はなかった。正常ニワトリ ALD の WWP1 の発現量は NH-413 の胸筋よりも少なく、筋細胞膜にも存在していないことから、ALD (赤筋) に果たす WWP1 の機能は胸筋 (白筋) とは異なるものと推察された。

WWP1 はニワトリ筋ジストロフィーの最も有力な責任タンパク質候補として同定され、また、WWP1 については様々な研究が成されてきたが、筋肉における WWP1 タンパク質の発現を初めて明らかにしたのが本研究である。また、NH-413 で発見された WWP1 遺伝子のミスセンス変異が WWP1 分子の安定性と局在を大きく変化させることも明らかにした。筋ジストロフィーニワトリの遺伝形式から、変異型 WWP1 を発現する Tg マウスを作製し筋ジストロフィーニワトリのマウスモデル化を試みたが、これにより、変異型 WWP1 が筋特異的に分解されユビキチン転換酵素としての機能を失うことが示された。実際に NH-413 でも同様な結果が示された。しかしながら筋線維での分子局在については筋ジストロフィーニワトリと R441Q-WWP1 Tg マウスとは異なる結果を示した。即ち、NH-413 では、WWP1

が分解と同時に筋形質膜より消失して行くのに対してTg マウスにおいてはWWP1の分解はむしろ筋形質膜への局在をより強固にするものであった。NH-413 とTg マウスとでは分解により生成されたsWWP1の安定性が異なり、これが局在の違いとして現れている可能性がある。本来、sWWP1は筋形質膜に存在するターゲット分子に結合できるが、ニワトリのsWWP1は速やかにより小さな分子へと消化されるため、細胞膜に留まり難いという可能性が考えられた。我々が明らかにしたWWP1分子の挙動から筋ジストロフィーニワトリの遺伝形式を考えると、WWP1遺伝子のミスセンス変異はWWP1タンパク質の機能亢進による優性阻害的効果を誘導するのではなく、タンパク質の用量依存的な機能発現を表していると考えられる。これは筋ジストロフィーニワトリが当初、常染色体劣性の遺伝形式を示すものとして報告されていたことと矛盾しない。そのような仮定の下ではWWP1の筋形質膜への局在は機能的に重要であり、ニワトリとマウスにおける変異型WWP1の局在の差異が筋症状へ反映された可能性がある。

#### 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8件)

Hyzewicz J, Tanihata J, Kuraoka M, Ito N, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 82, 2015, pp12-136, 査読有, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2015.01.023

Ohtsuka Y1, Kanagawa M1, Yu CC1, Ito C1, Chiyo T, Kobayashi K, Okada T, Takeda S, Toda T, *Scientific Reports*, vol. 5, 2015, p8316, 査読有, doi:10.1038/srep08316

Yokota T, Miyagoe-Suzuki Y, Ikemoto T., Matsuda R, Takeda S, *Muscle & Nerve*, vol. 49, 2014, pp728-735, 査読有, DOI: 10.1002/mus.23990

Nakamura A, Kobayashi M, Kuraoka M, Yuasa K, Yugeta N, Okada T, Takeda S, *Scientific Reports*, vol. 3, 2013, p2183, 査読有, doi:10.1038/srep02183

Aoki Y, Nagata T, Yokota T, Nakamura A, Wood MJ, Partridge T, Takeda S, *Human Molecular Genetics*, vol. 22, 2013, pp4914-4928, 査読有, doi:10.1093/hmg/ddt341

Takeuchi F, Yonemoto N, Nakamura H, Shimizu R, Komaki H, Mori-Yoshimura M, Hayashi YK, Nishino I, Kawai M, Kimura E, Takeda S, *Journal of Neurology*, vol. 260, 2013, pp3023-3029, 査読有, doi:10.1007/s00415-013-7104-y

Aoki Y, Yokota T, Nagata T, Nakamura A, Tanihata J, Saito T, Duguez SM, Nagaraju K, Hoffman EP, Partridge T, Takeda S, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 109, 2012, pp13763-13768, 査読有, doi:10.1073/pnas.1204638109

Yokota T, Nakamura A, Nagata T, Saito T, Kobayashi M, Aoki Y, Echigoya Y, Partridge T, Hoffman EP, Takeda S, *Nucleic Acid Therapeutics*, vol. 22, 2012, pp306-315, 査読有, doi:10.1089/nat.2012.0368.

[学会発表](計3件)

Imamura M, Takeda S, 52<sup>nd</sup> Annual Meeting American Society for Cell Biology. 2012, San Francisco (U.S.A.)

Imamura M, Takeda S, 53<sup>rd</sup> Annual Meeting American Society for Cell Biology. 2013, New Orleans (U.S.A.)

Imamura M, Takeda S, 54<sup>th</sup> Annual Meeting American Society for Cell Biology. 2014, Philadelphia (U.S.A.)

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

今村 道博 (IMAMURA, Michihiro)  
独立行政法人国立精神・神経医療研究センター神経研究所 遺伝子疾患治療研究部・室長  
研究者番号: 80221787

##### (2)研究分担者

武田 伸一 (TAKEDA, Shin'ichi)  
独立行政法人国立精神・神経医療研究センター神経研究所 遺伝子疾患治療研究部・部長  
研究者番号: 90171644