

平成 30 年 4 月 16 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09629

研究課題名(和文) 神経型ジストロフィンDp40の分子病態解析に基づく知的障害治療法の探索

研究課題名(英文) Degradation mechanism of dystrophin short isoform, Dp71

研究代表者

藤本 崇宏 (Fujimoto, Takahiro)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：10446114

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：Dp71蛋白分解制御機構を明らかにすべく、Dp71dまたはDp71fアイソフォーム安定発現細胞ならびに、特異酵素や経路特異的阻害剤を用いることで、異なるDp71アイソフォームに着目しつつ、生化学的・薬理的に蛋白分解機序にアプローチした。Dp71蛋白はプロテアソーム経路依存的に分解制御されており、その分解速度はDp71fの方がDp71dよりも速いことが示唆された。脱リン酸化酵素による生化学的検討においてリン酸化がDp71分解制御に深く関与していることが明らかになるとともに、リン酸化だけでなくユビキチン化依存的事であることも再構成実験で明らかになった。

研究成果の概要(英文)：We investigated the posttranslational regulatory mechanisms of Dp71 expression in PC12 cells and found that the constitutive expression levels of Dp71 in PC12 cells were sensitive to proteasomal inhibition. The ectopic expression of FLAG-tagged ubiquitin revealed that Dp71 was ubiquitinated intracellularly. Interestingly, proteasomal inhibition was accompanied by a posttranslational accumulation of modified Dp71, which was restored by lambda protein phosphatase treatment in vitro, indicating that phosphorylation is responsible for the modification and affects the proteasome-dependent degradation of Dp71. Furthermore, proteasomal activity-sensitive phosphorylated Dp71 is closely associated with syntrophin, and syntrophin is also regulated by proteasomal activity in a similar way to Dp71, suggesting that the posttranslational regulatory machinery for Dp71 level is coupled with Dp71-syntrophin molecular complex. Thus, the phosphorylation-UPS regulates Dp71-associated protein complex.

研究分野：神経細胞生物学

キーワード：ジストロフィン Dp71 蛋白分解 プロテアソーム リン酸化

1. 研究開始当初の背景

ジストロフィン(Dp)はデュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)の原因遺伝子であり、複数のアイソフォームをコードする。DMDは進行性の筋線維壊死を主徴とするが、高い頻度で非進行性の知的障害を合併することが知られ、Dp ゲノム領域内の下流側に位置する変異が知的障害の重症度と相関するとの報告がある。筋組織においては、全長型Dp(Dp427)のグリコプロテイン複合体やアクチン骨格との会合を介した筋細胞形態維持や機能的維持での役割が明らかにされている。一方、脳神経系においては、グリア細胞や神経細胞で高発現する Dp71 アイソフォームの機能が病態と関連することが示唆されているが、DMDで発症する知的障害の病態の理解には至っていない。他の Dp アイソフォームの発現分布とそれらの役割の理解は不十分であったが、近年我々のグループは、脳神経系において発現する新規 Dp アイソフォーム(Dp40)の存在を見出した。

2. 研究の目的

開始当初の目的は、初代神経細胞・株化細胞にて Dp40 発現改変や変異導入を施すことでモデル細胞を作製し、分子生物学的・細胞生物学的手法により脳神経系における Dp40 の分子機能および生物学的意義を明らかにすることであり、その理解に基づいて DMD で発症する知的障害の病態機序解明と分子標的治療法の開発の基盤を構築することであった。しかし、本研究を遂行するなかで Dp40 のみならず Dp71 の分子動態やその機能的意義を明らかにすることが、Dp40 の存在意義の理解にも通じるとの考えに至り、本研究期間後半においては Dp71 を研究対象に加えた。

主に行った研究項目は以下の通りである。

- (1)株化細胞にてタグ付加した Dp40 蛋白安定発現細胞の樹立と、それを用いた Dp40 結合蛋白の同定。
- (2)結合蛋白候補を対象として、脳組織、培養細胞を用いた分子間相互作用の検証
- (3)株化細胞にてタグ付加した Dp71 蛋白安定発現細胞の樹立と、それを用いた Dp71 蛋白代謝動態解析。
- (4)再構成実験系を用いたユビキチン化 Dp71 の検出
- (5)Dp71 結合蛋白の探索

3. 研究の方法

(1)Dp40 安定発現 HEK293T 細胞の樹立

HA タグを C 末端に連結した Dp40 全長コーディング領域を pFC -EF1 - MCS- pA- PGK-RFP-T2A-Puro PhiC31 Donor Vector にクローニングすることで安定発現細胞作製のためのベクターを構築した。HEK293T 細胞に同ベクターおよびインテグラーゼ発現ベクター

を Ecotransfect リポフェクション試薬を用いて共導入した後、ピューロマイシンを 2 μ g/ml 添加した培養液中で導入細胞を薬剤選別することで、安定発現細胞を樹立した。

(2)Dp40 結合蛋白探索

Dp40 安定発現 HEK293T 細胞を宿主として得た蛋白抽出物から抗 HA タグ抗体を用いた免疫沈降物を回収し、沈降物を SDS-PAGE 展開後に銀染色で蛋白をバンドとして検出した。Dp40 とともに回収されたと考えられるバンドを対象として質量分析で蛋白同定した。

(3)脳組織を用いた分子間相互作用の検証

Dp40 結合蛋白候補として同定されたユビキチンリガーゼファミリーに属する蛋白と RNA 結合蛋白に対する特異抗体を購入し、マウス脳組織抽出物を材料として内在性蛋白レベルで分子間の会合を検討した。自作の抗 Dp 抗体および市販の Dp 抗体を用いた免疫沈降産物中に候補蛋白が含まれるかをウェスタン法で検討した。

(4) Dp71 安定発現 PC12 細胞の樹立

HA タグを連結した Dp71d および Dp71f 全長コーディング領域を pFC -EF1 - MCS- pA- PGK- RFP-T2A-Puro PhiC31 Donor Vector にクローニングした。PC12 細胞に同ベクターおよびインテグラーゼ発現ベクターを NEPAGENE 遺伝子導入装置を用いて共導入した後、ピューロマイシンを 2 μ g/ml 添加した培養液中で導入細胞を薬剤選別することで、安定発現細胞を樹立した。

(5)経路特異的阻害剤による Dp71 蛋白代謝動態解析

Dp71 安定発現 PC12 細胞に epoxomicin、Lactacystin、bafilomycin A1 を各々 6h 添加した後、Dp71 蛋白レベルの変動やリン酸化の有無を脱リン酸化酵素処理の影響の有無で検討した。

(6)ユビキチン化 Dp71 の検出

Neuro2a 細胞にユビキチン蛋白を FLAG タグ付加したかたちで導入し、抗 FLAG タグ抗体免疫沈降画分に含まれる Dp71 をウェスタン法で検出した。

(7)リン酸化 Dp71 のシントロフィンとの会合

プロテアソーム阻害剤処理した PC12 細胞から蛋白抽出物を得て、抗シントロフィン抗体による免疫沈降産物中に存在する Dp71 を検出することで、リン酸化型 Dp71 が構成する分子複合体を検討した。

(8) Dp71 結合蛋白の探索

Dp71 を安定発現させたヒト神経芽細胞腫を用いて免疫沈降により Dp71 分子複合体を精製し、質量分析で会合蛋白候補を同定した。

4. 研究成果

(1) Dp40 結合蛋白探索

Dp40 安定発現 HEK293T 細胞から蛋白抽出物を得て、抗 HA タグ抗体による免疫沈降産物中に含まれた蛋白 2 種類を質量分析で同定した。1 つはユビキチンリガーゼファミリーに属する蛋白であり、他者は RNA 結合蛋白に属するものであった。

(2) 脳組織を用いた分子間相互作用の検証

マウス脳組織抽出物を材料として自作の抗 Dp 抗体および市販の Dp 抗体を用いた免疫沈降産物中に候補蛋白が含まれるかをウェスタン法で検討した。その結果、2 種類の候補蛋白ともに Dp 蛋白画分に有意な共沈降は検出されなかったことから、内在性蛋白レベルでは分子間相互作用は確認されなかった。

(3) Dp71 蛋白代謝動態解析

PC12 細胞をプロテアソーム阻害剤処理すると内在性 Dp71 蛋白レベルが増加することが見出された。特に高分子量型 Dp71 の増加が顕著であったことから、細胞内で翻訳後修飾された Dp71 がプロテアソーム経路依存的に分解されている可能性が示唆された。PC12 には複数の異なる Dp71 アイソフォームが発現していることが知られていたため、特定の Dp71 アイソフォーム(Dp71d または Dp71f)を区別して特異的に検出するために PC12 において Dp71d または Dp71f を各々安定発現させたラインを樹立した。これら 2 つのラインを用いてプロテアソーム経路依存的な Dp71d および Dp71f 蛋白分解度合いを比較したところ、Dp71f の方が Dp71d より速く代謝されることが分かった。

(4) Dp71 蛋白分解機構の解析

プロテアソーム阻害処理した細胞から Dp71 を免疫沈降で部分精製することで得た高分子量型 Dp71 蛋白は、*in vitro* で脱リン酸化酵素(phosphatase) 処理することで低分子量にシフトすることが確認されたことから、翻訳後修飾の実態はリン酸化であると判明した。

さらに FLAG タグ付きユビキチンを用いた再構成実験でプロテアソーム阻害下の Neuro2a 細胞においてユビキチン化された Dp71 蛋白が検出された。またその SDS-PAGE 上での分子量は高分子量型 Dp71 に相当する位置に検出された。

これらの結果は、生細胞内における Dp71 の蛋白分解制御機序の一つとして、プロテアソーム依存的な代謝が存在し、リン酸化に続くユビキチン化がその前段階に起こることを示すものである。

(5) リン酸化 Dp71 のシントロフィンとの場合

PC12 細胞では定常状態(非刺激状態)下でもリン酸化型 Dp71 が検出でき、シントロフィン結合状態の Dp71 画分にもリン酸化型 Dp71 が含まれていた。さらに興味深いことに、シントロフィンも Dp71 と同様にリン酸化とユビキチン化を介してプロテアソーム経路依存的に代謝されていることがわかり、Dp71-シントロフィン分子複合体が何らかの機能を果たし、その後の分解過程も共通の機序で制御されることが示唆された。

本研究で明らかにした Dp71 およびその場合蛋白の一つであるシントロフィンの分解機序の知見を、脳内での蛋白代謝動態の理解に発展させることは有意義であり、DMD の分子病態理解に通じるものと考えられる。

(6) Dp71 結合蛋白探索

Dp71 安定発現神経芽細胞腫から蛋白抽出物を得て、抗 HA タグ抗体による免疫沈降産物中に含まれた蛋白 1 種類を質量分析で同定したところシグナル制御に関わるとされる膜貫通蛋白であることが判明した。この成果を発展させるかたちで今後の検討課題として取り組み、Dp71 の神経細胞機能の理解に繋げる予定である。

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 2 件)

(1) Fujimoto T, Yaoi T, Fushiki S, Itoh K. Dp71 is regulated by phosphorylation and ubiquitin-proteasome system in neuronal cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 492(3):349-355(2017) DOI:10.1016/j.bbrc.2017.08.108. 査読有

(2) Nishida A, Yasuno S, Takeuchi A, Awano H, Lee T, Niba ET, Fujimoto T, Itoh K, Takeshima Y, Nishio H, Matsuo M. HEK293 cells express dystrophin Dp71 with nucleus-specific localization of Dp71ab. *Histochem Cell Biol.*146(3):301-309(2016) DOI:10.1007/s00418-016-1439-2. 査読有

[学会発表](計 2 件)

(1) 藤本崇宏、伊東恭子 脳型ジストロフィンの分子病態解析に基づく知的障害治療法の探索 第 120 回日本小児科学会学術集会(2017)

(2) 藤本崇宏、矢追毅、伏木信次、伊東恭子 ジストロフィン遺伝子産物である Dp71 はリン酸化とユビキチンプロテアソーム系によって発現制御される

第 40 回日本分子生物学会年会(2017)

〔その他〕

京都府立医科大学 医学研究科 分子病態
病理学ホームページ

<http://www.f.kpu-m.ac.jp/k/neurpath/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

藤本 崇宏 (FUJIMOTO TAKAHIRO)

京都府立医科大学・医学研究科・講師

研究者番号：1 0 4 4 6 1 1 4

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()