

令和元年6月21日現在

機関番号：82643

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K10774

研究課題名(和文) ペンドレッド症候群の原因となるSLC26A4の高頻出変異による構造障害機序の解明

研究課題名(英文) A study of structural impairments of STAS domain caused by common p.H723R mutation of SLC26A4 in patients with Pendred syndrome

研究代表者

難波 一徳 (Namba, Kazunori)

独立行政法人国立病院機構(東京医療センター臨床研究センター)・その他部局等・研究員

研究者番号：60425684

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)：ペンドレッド症候群の主な原因遺伝子であるSLC26A4の変異は先天性難聴の10%を占め、特にp.H723Rは、SLC26A4変異を持つ患者の約50%の頻度占める。本研究ではp.H723R変異があるSLC26A4の機能領域であるSTASドメイン(SLC26A4-STAS)のX線結晶解析を試み、構造障害機序の解明を目的とした。SLC26A4-STASの遺伝子配列を導入したコムギ胚芽無細胞発現系、また安定化目的のEGFP、GST、SUMO、T4リゾチームを目的蛋白のN末端に修飾するそれぞれの発現ベクターを導入した大腸菌発現系の構築を行った。いずれも目的蛋白の発現量が少なく、顕著な変性が確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

使用可能な発現系が作成困難である故、SLC26A4-STASの結晶構造解析は、世界でまだ成功していない。本研究では、現在目的蛋白質の発現を安定させるための種々のTag蛋白質を修飾し改善を試みたが発現の改善が観られなかった。

多様な発現系構築のための実験データが蓄積され、今後の広い研究に応用できる情報が得られたことは学術的意義として重要である。本研究では、社会問題となっているp.H723Rに起因するペンドレッド症候群の治療を目的としたX線結晶解析を試み、SLC26A4-STASの発現系構築のための足掛かりとなるデータを出した点に社会的意義がある。

研究成果の概要(英文)：The 10% of congenital hearing loss is caused by SLC26A4 mutations which are responsible for Pendred syndrome (PS), and p.H723R mutation accounts for 53% of PS patient. In this study, we aimed at structural impairment of functional region "STAS domain" of SLC26A4 (SLC26A4-STAS) caused by the p.H723R. We constructed E.coli expression pET28a vector of EGFP, GST, SUMO, and T4-lysozyme tagged on N-terminal and wheat germ expression vectors carrying cDNA encoding both SLC26A4-STAS and its p.H723R mutant, respectively. Expression level of each vectors were too low to crystallization, and expressed protein is almost denatured.

研究分野：生化学

キーワード：ペンドレッド症候群 ペンドリン SLC26A4 STASドメイン p.H723R 構造解析 大量発現系 大腸菌

## 1. 研究開始当初の背景

ペンドレッド症候群は、高度両側性感音性難聴および甲状腺水腫を伴う常染色体劣勢遺伝形式を取る遺伝性疾患である。前庭水管拡大および蝸牛低形成を呈し、臨床的に診断される。原因遺伝子は主に陰イオントランスポーターであるペンドリンをコードする SLC26A4 が知られて SLC26A4 は内耳の外らせん溝、前庭の感覚斑外縁、内リンパ嚢の細胞に発現しており、SLC26A4 ノックアウトマウスでは内リンパ嚢の拡大、内リンパ液の酸性化、血管条の発達遅延、甲状腺ホルモンの低下、蝸牛低形成が生じる(Kim et al. PloSOne.2011,6:e17949)。SLC26A4 の変異を原因とする難聴は幼児期より見られ、両側性、進行性であり、高度の感音性難聴となる。全ての先天性難聴の約 10%を占め、先天性難聴のうちでは GJB2 に次いでもっとも頻度が高く深刻な問題となっている。特に p.H723R は、SLC26A4 変異を原因とする患者の約 50%の頻度占める。

SLC26A4 遺伝子産物であるペンドリンの機能ドメインは主に、塩化物およびヨウ化物の陰イオンのトランスポーターとしての膜貫通領域と、シグマ因子アンタゴニスト(STAS)ドメインに分ける事ができる。STAS ドメインは細胞内側の C 末端領域に存在し、プロテインキナーゼ、脱リン酸化酵素、RNA ポリメラーゼ $\sigma$  因子と結合する(Sharma Cell Physiol Biochem 2011, 28 407-422)。

しかし、SLC26A4 の STAS ドメイン(SLC26A4-STAS)の結晶構造はまだ解析されておらず、p.H723R の障害メカニズムはおろか、STAS ドメイン構造の基本メカニズムさえ解っていない。この p.H723R により破壊された STAS ドメインの構造を正常な構造に戻し、分子治療薬の創生に繋がるような、結晶構造情報が切望されている。

## 2. 研究の目的

本研究では、この p.H723R が存在する未知構造である SLC26A4-STAS の正常型および p.H723R 変異型蛋白質のそれぞれの X 線結晶解析を行い、この p.H723R による構造障害メカニズムを明らかにし、将来的に高頻度のペンドレッド症候群の患者に有効な分子治療薬の開発に結びつけることを最終的な目的とした。X 線結晶構造を得るには幾つかの壁が存在し、最初に多くの安定した目的蛋白質を発現できる大量発現系を構築することがある。そこで結晶化に繋がる SLC26A4-STAS の大腸菌大量発現系を構築することを最初の目的として本研究に着手した。

## 3. 研究の方法

本研究では、SLC26A4-STAS の正常型および p.H723R 変異型のそれぞれの SLC26A4-STAS 遺伝子配列を、N 末端側に EGFP、SUMO(pETDuet-1\_SUMO; コピキチナーゼにより発現時フォールディングを安定化する)、T4 リゾチームをそれぞれ修飾できるように設計された大腸菌大量発現系ベクター-pET28a 導入し、そして同様に N 末端側に GST 蛋白質(Glutathione S-transferase)を修飾するためのベクター-pGEX-6P-3 に導入した。また、SLC26A4-STAS を pEU-E01-MCS ベクターに導入することによりコムギ胚芽無細胞発現系の作成を行った。ベクターは愛媛大学の澤崎教授より譲渡頂き、東京医療センター臨床研究センター-SLC26A4-STAS の pEU-E01-MCS ベクターへの導入を行った。発現実験は、愛媛大学無細胞生命科学工学センターにお願いした。

作成したそれぞれの大腸菌大量発現系では、通常の 37 温度下での大腸菌の培養、および

25 温度下でのそれぞれの培養を行い、IPTG 誘導による目的蛋白質の発現実験を行った。大腸菌ペレットの超音波破碎をプロテアーゼ阻害剤カクテル下で行い、遠心分離により、可溶性、不溶性のそれぞれの分画に分け、それぞれをアクリルアミドゲルを用いた電気泳動により泳動分離を行った。電気泳動時に分子量マーカーを用いて、CBB 染色による発現蛋白質の視覚化および位置の確認、および SLC26A4 一次抗体を用いたウェスタンブロッティングにより目的蛋白質の発現確認を行った。

#### 4 . 研究成果

結晶化には 1mg 単位の大量の精製蛋白質が必要であるため、SLC26A4-STAS の遺伝子配列を大腸菌大量発現系ベクターに導入し、大腸菌大量発現系の構築を行った。その中で蛍光蛋白質 EGFP が SLC26A4-STAS の N 末端に修飾された pET28a ベクターによる発現を試みたが、発現量が少ないことに加え、SLC26A4-STAS の顕著な変性が確認された。また、本大腸発現系では大腸菌の発育が悪いため、細胞毒性の可能性を考慮し、SLC26A4-STAS を pEU-E01-MCS ベクターに構築することによりコムギ胚芽無細胞発現を試みたが、ほぼ発現を確認できなかった。さらに N 末端に EGFP、SUMO(pETDuet-1\_SUMO; ユビキチナーゼにより発現時フォールディングを安定化する)、T4 リゾチームを N 末端側に修飾した SLC26A4-STAS 発現を試みたが十分な量の発現蛋白質を得ることができなかった。本 STAS ドメインの結晶構造解析はペンドレド症候群の分子病態を知る重要な手がかりとなる研究であるが、世界でまだ成功していない。本研究では主に大腸菌による大量発現系を用いて SLC26A4-STAS の発現実験を一通り試みたが、この手法では好ましくないという結論に至った。

今後は、培養細胞系などを用いた発現系で発現を試みる余地があるが、カイコを用いた *in vivo* 発現系を用いる方法が単一コロニーの細胞培養系より安定した発現が得られる可能性があり、検討の余地がある。将来の研究において SLC26A4-STAS の発現のブレイクスルーがあり、結晶構造解析に繋がることを期待する。

#### 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1, GFP を融合した SLC26A4 STAS ドメイン の発現系の構築. 近藤萌香, 茨城工業高等専門学校物質工学科研究論文, 2019

2, T4 フェージ由来 Lysozyme を融合した SLC26A4 (Pendrin) STAS ドメインの発現系の構築. 和田瑞希, 茨城工業高等専門学校物質工学科研究論文, 2019

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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：  
国内外の別：

○取得状況（計 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：鈴木喜大

ローマ字氏名：Nobuhiro Suzuki

所属研究機関名：茨城工業高等専門学校

部局名：物質工学科

職名：特命准教授

研究者番号（8桁）：40712659

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：澤崎達也

ローマ字氏名：Tatsuya Sawasaki

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。