

令和 3 年 5 月 8 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07883

研究課題名（和文）脳型ジストロフィン分子ネットワーク解析を基盤としたてんかん標的分子の同定

研究課題名（英文）Molecular analysis of brain-type dystrophin to understand dystrophinopathy-related neurological disorder

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） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：ジストロフィン遺伝子産物のうち脳に高発現するDp71を研究対象として、ジストロフィンミスセンス変異がもたらす効果を明らかにするために、まずは正常型Dp71と膜貫通蛋白ジストログリカンとの相互作用がもたらす生理的意義を解析した。その結果、ジストログリカンがDp71蛋白の細胞膜直下への局在化に必要であり、Dp71蛋白発現の安定化を促進するだけでなく、翻訳後修飾の一つであるリン酸化状態が変化することを見出した。ミスセンス変異をもつDp71ではこれら膜局在化・安定化・リン酸化といった全ての現象が異常をきたすことが確認でき、ジストロフィノパチー分子病態の一端を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ジストロフィン遺伝子異常が筋壊死や神経発達症を引き起こすことが知られているが、脳で高発現するジストロフィン産物であるDp71の遺伝子変異が及ぼす影響は不明な点が多い。本研究において、膜貫通蛋白ジストログリカンがDp71と物理的に結合することで、Dp71蛋白の安定化・膜局在化・リン酸化状態が促進されることや、ジストロフィノパチー患者において同定された点変異を有するDp71蛋白ではこれら全ての項目で異常になっていることを明らかにした。これらは分子病態の一端を明らかにしたと考えられ、また、蛋白間相互作用領域の詳細に関しても絞り込み、ジストロフィン蛋白の安定化やリン酸化を制御する分子介入点を見出した。

研究成果の概要（英文）：Dp71 is highly expressed in the brain as a dystrophin gene product, however, its physiological function and molecular pathology of mutated Dp71 remain unclear. To clarify the molecular relation between Dp71 and dystroglycan, we coexpressed both proteins and examined the molecular dynamics in cultured cells. Interestingly, we found that dystroglycan enhances submembranous localization, stabilization, and hyperphosphorylated status of Dp71 through physical interaction. As a molecular basis of this phenomena, the EF-hands and ZZ-motif within Dp71 are required for binding to dystroglycan intracellular domain. Importantly, Dp71 with point mutation, C272Y or L170del, demonstrated abnormal subcellular localization, protein instability, and hypophosphorylated status due to the loss of dystroglycan-binding with mutated Dp71. Thus intermolecular interaction of dystroglycan with Dp71 is critical for physiological functions of dystrophin-dystroglycan molecular complex in brain.

研究分野：分子病態学、神経細胞生物学、神経筋疾患

キーワード：ジストロフィン ジストログリカン 点変異 リン酸化 膜局在化 分子病態 蛋白相互作用

1. 研究開始当初の背景

ジストロフィノパチーは進行性の筋線維壊死を主徴とする X 染色体劣性遺伝性疾患であり、高頻度で精神遅滞・自閉症・てんかん・熱性けいれんなどの中枢神経症状を合併する (図 1)。ジストロフィノパチーの原因であるジストロフィン(Dp)遺伝子異常がてんかん発症率を有意に上昇させるとの知見があるものの、てんかん病態における Dp 分子の動態や機能は全くの不明である。Dp は複数のアイソフォームをコードし、時期・組織依存的な発現制御が為されている。筋では全長型 Dp(Dp427)が筋細胞の形態と機能の維持に必須であり、その分子機序の一端として、特にジストログリカン分子複合体を介した細胞内骨格と細胞外マトリックスの架橋の重要性が知られている(図 1)。いっぽう、脳では構成する細胞種の相違と脳構造の複雑性、さらにはそこに発現する複数の Dp アイソフォームの存在が、ジストロフィノパチーで発症する中枢神経症状の病態理解を困難なものにしている。しかし、Dp ゲノム領域内の下流側に位置する変異が精神遅滞の重症度や、てんかんの発症率と相関するとの報告があり、エクソン 63 より下流に相当する Dp71 が、脳で最も高発現する Dp アイソフォームであることからその生理的機能と中枢神経合併症における役割の解明が待たれる(図 1)。さらに近年我々は Dp71 のスプライシングアイソフォームである Dp40 に関する報告をし(Fujimoto T. et al. BBRC, 2014, 452: 79-84)、本研究課題が着目する脳型 Dp(Dp71 と Dp40)の分子機能の理解に基づく脳機能調節機構の解明の重要性が高まった。

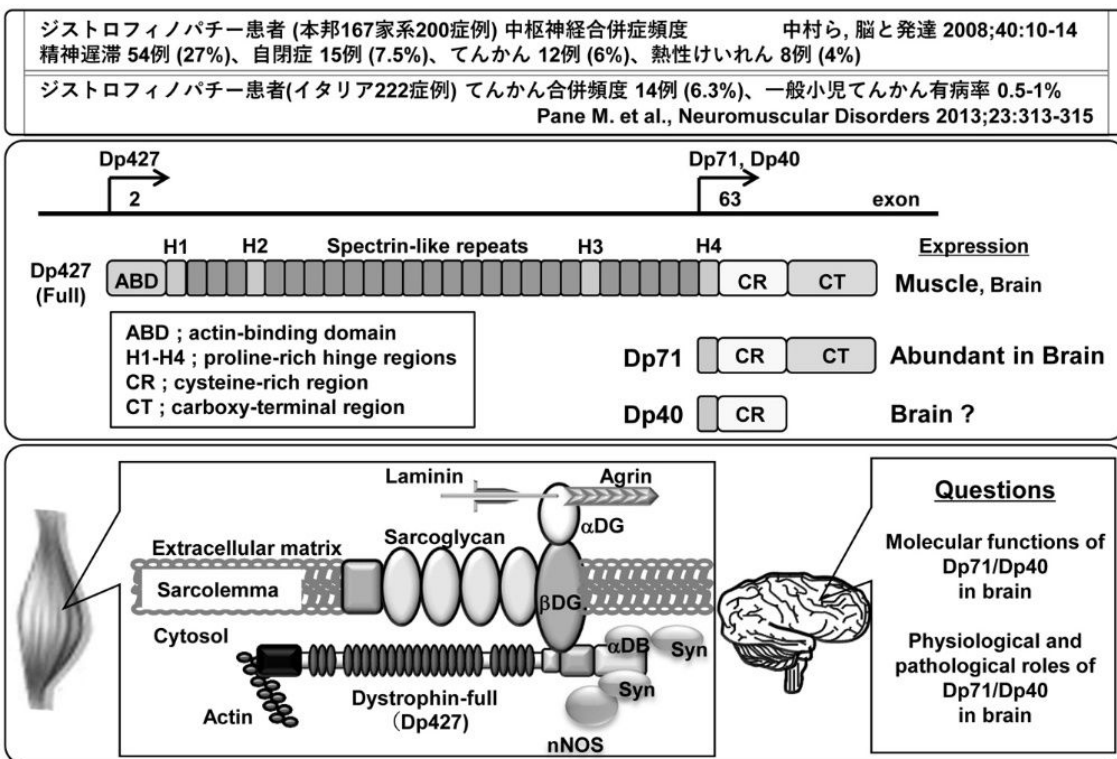


図 1: 学術的背景と未解明の課題。(上段)ジストロフィノパチー患者の中枢神経合併症発症率。(中段)ジストロフィン(Dp)遺伝子から産生される複数のアイソフォーム(Dp427, Dp71, Dp40)の関係。(下段)筋における Dp ジストログリカン(DG)分子複合体の模式図と、明らかにすべき課題。

2. 研究の目的

研究開始当初の目的は、脳型 Dp とその相互作用分子群の機能理解に立脚した、てんかん病態における Dp プロテオスタシスの解明と予防・治療標的分子の同定であった。主に次の四項目を行うことで達成を試みた。

- (1) BioID 法(詳細は下記参照)を駆使して脳型 Dp 分子が in situ で相互作用する分子群を同定し、分子ネットワークを機能的に構築することで、脳型 Dp の生理的役割を明らかにする。
- (2) 我々が近年発表した Dp71 の翻訳後修飾や分解機構に関する知見を発展させるべく、既知の Dp71 相互作用蛋白との関係性やプロテオスタシスに着目した研究を行うことでジストロフィノパチー病態の分子機序を明らかにする。
- (3) マウス in vivo で内在性の脳型 Dp を特異的に捉えることを可能にするモデル動物として Dp71 特異的遺伝子改変マウスを樹立する。
- (4) てんかん動物モデルの脳における脳型 Dp 分子やそれが制御する分子ネットワークの動

態・機能的役割を明らかにすることで、てんかん病態機序の理解とてんかん標的分子の同定に繋げる。

### 3. 研究の方法

#### (1) BioID 法

##### BirA-Dp71 遺伝子発現プラスミドの作製

大腸菌由来 BirA 遺伝子をコドン使用頻度の観点からヒト化し、点変異 (Arg118Gly) を導入した BirA 遺伝子配列 (Humanized Arg118Gly point mutant) のコーディング領域の 5'UTR にコザック配列を付加し、この DNA 両端に EcoRI 認識配列を付加した DNA を人工遺伝子として合成した (GeneScript)。既存の C 末端に HA タグ付加した Dp71 発現プラスミド (pFC-EF1-Dp71-HA) [Biochem Biophys Res Commun. 2017 Oct 21;492(3):349-355.] の EcoRI サイトに人工遺伝子を挿入することで N 末端に BirA 配列が融合した状態で蛋白発現させることができる pFC-EF1-BirA-Dp71-HA 発現プラスミドを構築した。

##### PC12 細胞を宿主とした BirA-Dp71 安定発現細胞の樹立

で作製した pFC-EF1-BirA-Dp71-HA ベクターをインテグラーゼ発現ベクターと共に PC12 細胞に導入し、ピューロマイシン薬剤存在下で培養することで安定発現細胞株を樹立した。この細胞を用いて BioID 法を試行した。ビオチン化標的蛋白をアビジンビーズで回収し、マス解析で網羅的に同定した。

#### (2) Dp71 の翻訳後修飾やプロテオスタシスに関する研究

##### Dp71 とラミニン受容体として知られる膜貫通蛋白ジストログリカン DG との相互作用

ジストロフィン遺伝子産物として筋細胞では全長型の Dp427 が、脳では我々が着目する Dp71 が高発現しており、それぞれ DG と物理的に相互作用することで細胞形態維持やシグナル伝達を発揮することが知られていた。しかし、一般的な免疫沈降法では Dp71 や Dp427 と DG との間の相互作用が生化学的には検出できないという問題を長年抱えていた。本研究において PFA クロスリンクを免疫沈降に適用することで解決するに至り多くの知見を得た。HEK293T 細胞、HeLa 細胞を宿主細胞として内在性 Dp71-DG および各種欠損変異体、点変異体を用いた強制発現系による免疫沈降や免疫細胞染色を行った。さらに、DG を標的とした siRNA 導入による DG 発現抑制がもたらす Dp71 に対する影響を検討した。

#### (3) CRISPR-Cas9 ゲノム編集技術を用いた Dp71 特異的遺伝子改変マウスの樹立

Dp71 はイントロン 62 内に存在する遺伝子発現プロモーターから転写翻訳されるエクソン 3-79 に相当する産物であり、全長型 Dp427 (エクソン 2-79 の産物) の C 末領域と同一であり、アミノ酸一次構造上は区別できない。よって Dp71 を免疫組織学的に特異的に検出することが困難であった。本研究において Dp71 の N 末端に相当するゲノム領域にタグ配列を挿入することで、Dp71 特異的タグ挿入マウスを樹立した。DMD 遺伝子は X 染色体上に存在するのでオスではホモ状態になっているが、メスではヘテロにタグ挿入された状態である。ホモオスマウスとヘテロメスマウスを交配することでホモメスマウスを樹立し、その後は全個体をホモの状態に維持した。これにより内在性の Dp71 蛋白の全てがタグ付加されたマウスを樹立するに至った。

#### (4) ペンチレンテトラゾール誘発てんかんモデル

(3) で樹立した Dp71 遺伝子改変マウスに 35mg/kg 用量でペンチレンテトラゾールを 1 日毎に 3, 6, 10 回投与し、てんかん発症状態下での Dp71 や相互作用蛋白群の発現レベル・組織局在を検討した。

### 4. 研究成果

#### (1) BioID:

BirA-Dp71 を安定発現する PC12 細胞を樹立し BioID を試行した。コントロールとしてピオチン不含培養液での同細胞からの蛋白抽出物を調製し、ビオチン化蛋白を網羅的に同定した。候補蛋白群のリストは未発表データであるため公表を避けるが、有力と考えた蛋白群を対象として免疫沈降法による検証実験を行った。野生型 ICR マウスの脳から蛋白を抽出し、anti-DMD 抗体を用いた免疫沈降にて BioID で挙げた候補蛋白群の真偽を検証した。複数の anti-DMD 抗体を用いることで偽陽性を排除した結果、重要視していたシナプス関連蛋白は特定の DMD 抗体依存的に共沈降するが、他社の DMD 抗体や強制発現系での検証ではネガティブと判定するに至り、PC12 細胞における BioID では本物の Dp71 相互作用蛋白を同定することは難しいと判断した。

#### (2) Dp71 の翻訳後修飾やプロテオスタシスに関する研究

Dp71 は複数のアイソフォームが存在し C 末端の違いにより Dp71d や Dp71f と呼ばれる。それぞれを特異的に認識する抗体を性質決定し、アイソフォームを区別して検出できる状態にした。DG との物理的相互作用に関しては Dp71d, Dp71f の両方で同等起こることが確認されたの

で、それ以降の主な研究対象は Dp71d に設定したが、得られた知見は Dp71f にも適用できるものとする。興味深いことに、DG の細胞内領域のうち膜貫通領域近傍に位置する 19 アミノ酸長の領域が Dp71 の EF-hand と ZZ-motif から成る N 末領域との結合に必須であり、この相互作用を介する Dp71 蛋白の膜局在化や蛋白安定化、さらには高リン酸化といった一連の Dp71 プロテオスタシス制御を顕在化するに至った(図 2)。これらの現象は siRNA を用いた DG 抑制実験でも整合性がとれる結果が得られ、また、ヒト DMD 患者で同定された点変異のうち、EF-hand や ZZ-motif に位置するミスセンス変異は、DG との結合能を消失させることで、Dp71 の細胞内局在異常、不安定化、低リン酸化状態をもたらすことを実験的に証明した(図 3)。この詳細は Human Molecular Genetics 2020 に掲載され、ジストロフィノパチー病態の分子機序の一端を明らかにした点で意義が深い。

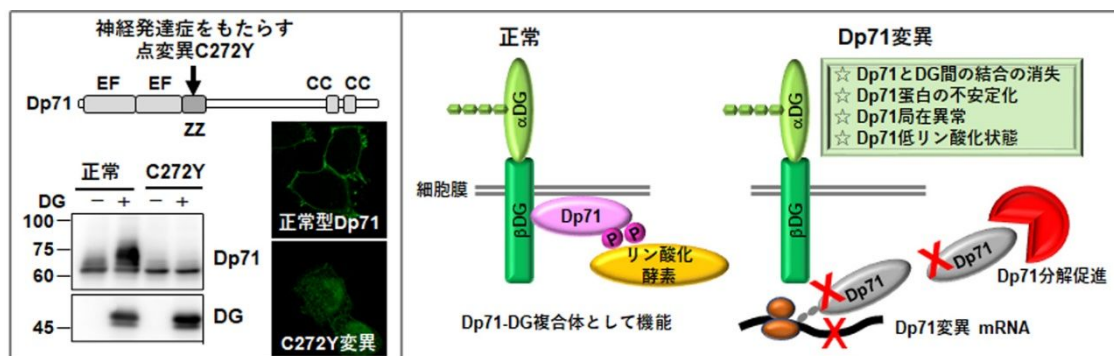


図 2：正常型 Dp71 は DG と結合することにより、安定化・膜局在化・リン酸化が維持され正常な機能を発揮する。しかし、C272Y 点変異をもつ Dp71 は DG との結合が消失し、不安定化・低リン酸化状態になり異所的な局在を示す。

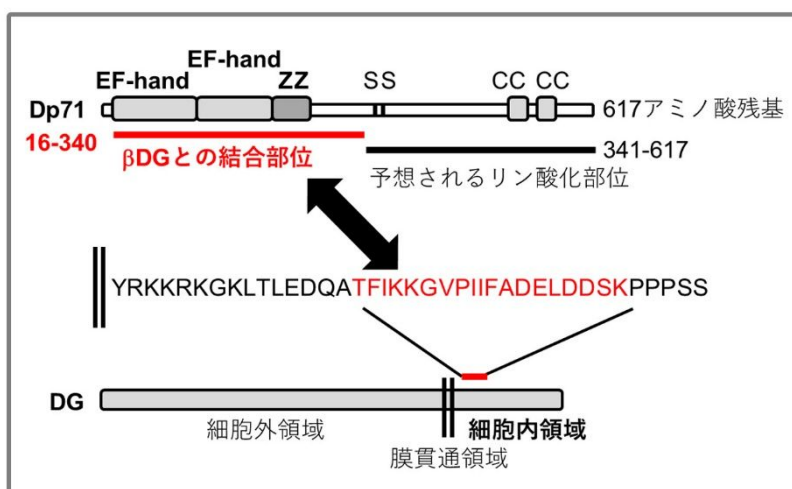


図 3：リコンビナント技術で作製した欠失変異体を用いた研究により、EF-hand と ZZ を含む Dp71 の領域が DG との結合や蛋白安定化に重要であること、そして DG の細胞内領域 19 アミノ酸(赤文字)が Dp71 との結合に必須であることを明らかにしました。

### (3) CRISPR-Cas9 ゲノム編集技術を用いた Dp71 特異的遺伝子改変マウスの樹立

タグ抗体を用いて内在性 Dp71 の脳内分布を検出した結果、過去に DMD の C 末領域に対する抗体でもたらされた知見と整合性のある知見が得られ、本マウスが今後の DMD 研究、とくに Dp71 産物を対象とした研究に利用できることが確認できた。発現分布の詳細に関しては再現性を確認後、論文発表のかたちで報告する。

### (4) ペンチレンテトラゾール誘発てんかんモデル

本項目は(3)で樹立した Dp71 トランスジェニックマウスを用いて行ったため、得られた知見が少ない。しかし、ペンチレンテトラゾール誘発てんかん発症下で明らかなグリオーシスが複数の脳領域で観察され、着目すべき脳領域が絞り込めた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takahiro Fujimoto, Takeshi Yaoi, Hidekazu Tanaka, Kyoko Itoh.	4. 巻 29
2. 論文標題 Dystroglycan regulates proper expression, submembranous localization and subsequent phosphorylation of Dp71 through physical interaction	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Human Molecular Genetics	6. 最初と最後の頁 3312-3326
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/hmg/ddaa217.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hidekazu Tanaka, Toshinori Sawano, Naoko Konishi, Risako Harada, Chiaki Takeuchi, Yuki Shin, Hiroko Sugiura, Jin Nakatani, Takahiro Fujimoto, Kanato Yamagata	4. 巻 721
2. 論文標題 Serotonin Induces Arcadlin in Hippocampal Neurons	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuroscience Letter	6. 最初と最後の頁 134783
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neulet.2020.134783.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 T. Fujimoto, K. Itoh
2. 発表標題 Dystrophin short isoform, Dp71, is regulated by phosphorylation and ubiquitin-proteasome system in neuronal cells
3. 学会等名 11th FENS Forum of Neuroscience（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 T. Fujimoto, T. Yaoi, S. Fushiki, K. Itoh
2. 発表標題 Dystrophin short isoform, Dp71, is regulated by phosphorylation and ubiquitin-proteasome system in neuronal cells
3. 学会等名 22nd Biennial Meeting of the International Society of Developmental Neuroscience（国際学会）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

京都府立医科大学 分子病態病理学  
<http://www.f.kpu-m.ac.jp/k/neurpath/index.html>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	田中 秀和  (Tanaka Hidekazu)  (70273638)	立命館大学・生命科学部・教授    (34315)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------