

平成 21年 3月 31日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19700328

研究課題名 (和文) CMT-4A 病の原因遺伝子 GDAP-1 の機能解析

研究課題名 (英文) Functional analyses of GDAP-1, involved in CMT-4A disease

研究代表者

高木 淑江 (TAKAKI YOSHIE)

東海大学・糖鎖科学研究所・講師

研究者番号：90312272

研究成果の概要：

GDAP-1 遺伝子は、CMT-4A 病の原因遺伝子とされるが、その生理機能は不明である。本研究は、GDAP-1 の機能を解明し治療法開発の足がかりとすることを目的とした。まず我々は、GDAP-1 遺伝子配列の相同検索を詳細に行ない、膜貫通領域や機能タンパク質との相同性を見いだした。また、機能を解析するための材料として GDAP-1 の全長タンパク質および CMT-4A 発症の報告のある 6 種類の GDAP-1 変異タンパク質の作成、またこれらタンパク質をテトラサイクリン (Tet) 誘導で発現する培養細胞の樹立に成功した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,100,000	0	2,100,000
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	360,000	3,660,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学 ・ 神経解剖学・神経病理学(1102-B)

キーワード：筋・末梢神経疾患、脳・神経、糖鎖、神経科学、シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

Charcot Marie Tooth (CMT) 病は、欧米では 2 千 5 百人に 1 人の割合で発症が認められる遺伝性末梢神経疾患であり、8 番染色体上に位置する “GDAP-1 (Ganglioside-induced differentiation-associated protein-1)” が、原因遺伝子の 1 つとして 2002 年に報告された。その後も、様々な GDAP-1 上の点変異がみつかっており、変異によって髄鞘障害型 (CMT-4A)、もしくは軸索障害型 (CMT-2G, CMT-2K) のいずれかのニューロパシーを呈することがわかってきた。

GDAP-1 は、もともと我々の研究室の辻らによりクローニングされた遺伝子であり、ガングリオシド GD3 を合成する “GD3 合成酵素” を発現させた neuro-2a 細胞が、神経細胞様に分化する過程で新たに発現する (mRNA が増加する) 遺伝子の 1 つとして名付けたものであった。さらに我々は、GDAP-1 は、マウスの発生において、E12 以降、発生が進むにつれて増加すること、またその分布は、脳と脊髄に特異的で、脳の発生に関わる機能タンパク質である可能性を示唆するデータを得ていた。

2. 研究の目的

GDAP-1 は、358 アミノ酸からなり、一次構造上“グルタチオン転移酵素 (GST)”との相同性の高いタンパク質であるものの GST には多くのファミリーが存在し、様々な基質特異性を有するため、これまで活性は報告されておらず、生理機能については全くわかっていない。本研究では、分子細胞生物学的手法を用いた解析により GDAP-1 の生理機能を明らかにする事を目的とした。

3. 研究の方法

GDAP-1 の構造は、図 1 のように 3 つの部位からなると推定される。これら 3 つのうち、1 アミノ酸 (1 塩基) 置換のみで CMT 病の発症が認められるものは、膜貫通領域を除く部位に広くみついているため、なんらかの働きを担う機能部位であることが予想される。



図 1 推定上の GDAP-1 の構造

(1) GDAP-1 のホモロジー検索

遺伝子、タンパク質の情報は、日々新しく更新されているため、Blast サーチを用いて GDAP-1 の遺伝子、タンパク質とホモロジーの高いものについて検索を行なった。

(2) 大腸菌での GDAP-1 の発現

① GDAP-1 全長の発現

マウスの mRNA から cDNA を合成し、これに対して GDAP-1 プライマー (表 2 ア、イ) をもちいて全長の GDAP-1 (GDAP-1 full) を合成した。これを pBAD/Tio-TOPO に組み込みクローニングし、大腸菌 DH5 α にトランスフォーメーションし、ベクターのプライマー (pBAD forward, pBAD reverse) を用いてシーケンスの確認を行なった。確認できたプラスミドを発現用の大腸菌 TOP10 にトランスフォーメーション後、アラビノース (Ara) による発現の誘導を行なった。発現量は、SDS-PAGE により確認した。

② 膜貫通ドメインを欠損した GDAP-1 の発現

マウスの mRNA から cDNA を合成し、GDAP-1 プライマー (表 2 ア、ウ) をもちいて膜貫通ドメイン 1 つを欠損した GDAP-1-d1、およびプライマー (表 2 ア、エ) をもちいて

2 つを欠損した GDAP-1-d2 を合成した。クローニングおよび発現の方法と確認は、GDAP-1 全長と同様に行なった。

③ CMT 病に関与する GDAP-1 1 アミノ酸置換体の作成

GDAP-1 の機能と病気へのメカニズムを調べるため、1 アミノ酸置換のみで疾患に至ると報告のある置換体 (表 1) を同様に作成した。置換変異体の作成には、それぞれの変異に相当する 1 塩基置換をもったプライマー (表 1、2 オ～シ) を使い、PCR によりマウス GDAP-1 の遺伝子に 1 塩基置換を導入した。シーケンサーで配列を確認後、発現用ベクター (pBAD/Tio-TOPO) に挿入した。

アミノ酸置換	プライマー	部位	表現型
M 116 R	オ&カ	GST-N	CMT-4A
R 120 W	キ&ク		CMT-2
R 120 Q	ケ&コ		DSS
R 161 H	サ&シ	GST-C	CMT-4A
H 256 R	ス&セ	GST-C	CMT-4A
R 282 C	ソ&タ	GST-C	CMT-4A

表 1 疾患に関与する GDAP-1 のアミノ酸変異

ア	5'-ATGGCTCGGAGGCAGGACGAGGCG-3'
イ	5'-GAAATAATTTGGTCTGGGTCTAAGTGC-3'
ウ	5'-GGCCACCCGGAATGCTGTTGGCAG-3'
エ	5'-GTTGACATGTCCTAAAACCTTGTT-3'
オ	5'-GCCCGATGAAGGAAGCAGGTATTACCC-3'
カ	5'-GGGTAATACCTGCTTCCTTCATCGGGC-3'
キ	5'-GCATGTATTACCCATGGGTGCAGC-3'
ク	5'-GCTGCACCCATGGGTAATACATGC-3'
ケ	5'-GCATGTATTACCCACAGGTGCAGC-3'
コ	5'-GCTGCACCTGTGGGTAATACATGC-3'
サ	5'-CCACAAGGATTCACAGCCAGATTGG-3'
シ	5'-CCAATCTGGCTGTGAATCCTTGTGG-3'

表 2 GDAP-1 プライマー

(3) 哺乳類細胞での GDAP-1 の発現

1 塩基置換作成用プライマー (表 1、2 オ～シ) で変異を導入した cDNA もしくは全長マウス GDAP-1 を含む cDNA を使い、GDAP-1 プライマー (表 2 ア、ウ) でそれぞれを合成後発現用ベクター (pcDNA4/TO) に挿入した。導入する neuro-2a 細胞は、あらかじめ pcDNA6/TR プラスミドを導入し、Tet リプレッサー (TR) を発現する安定株を作成した。

さらに、上記 pcDNA4/TO -GDAP-1 プラスミド各々を導入し、Tet 誘導で GDAP-1 を発現する neuro-2a 細胞を作成した。

(4) GDAP-1 の機能解析

① LinD、pcpC 活性の測定

LinD の基質として 2,5 ジクロロヒドロキノン、pcpC の基質としてテトラクロロヒドロキノンを用いた。20 mM リン酸緩衝液 (pH7) で平衡化した発現酵素液に上記基質をそれぞれ 50 µg/ml で加え、30°C で 4 時間～16 時間反応した。反応後、同量のエチルアセテートを加えよく混合し、遠心後エチルアセテート層を回収し、乾燥固化したものを少量のエチルアセテートで溶かし、TLC で展開した。展開溶媒には、ベンゼン：エチルアセテートを 85:15 (vol/vol) で混合したものを用いた。

② アフィニティークラムを用いた測定

Blue-sepharose はアデニルキを含むコファクターを要求する酵素に対して、また Red-sepharose は NAD 依存性酵素に対してより選択性の高いアフィニティークラムである。発現酵素液およびアフィニティークラムを 20 mM リン酸緩衝液 (pH7) で平衡化した後、4°C で 16 時間混和し、塩濃度、pH、NADH、NADPH を含む溶液での結合性を SDS-PAGE で確認検討した。

4. 研究成果

(1) GDAP-1 のホモロジー検索

ホモロジー検索の結果、GST ファミリーの中でも Tetrachloro -p -hydroquinone reductive dehalogenase (PcpC) や 2,5-dichlorohydroquinone reductive dechlorinase (LinD) と相同性の高いことがわかった。また、N 末端側は、一部 NADH-quinone oxidoreductase B subunit とも相同な配列が存在する事から、細胞内 (ミトコンドリア) での酸化還元に関わる酵素である可能性も考えられた。

(2) 大腸菌での GDAP-1 の発現

① GDAP-1 全長の発現

我々は宿主に毒性を示すタンパク質や封入体を形成し易いタンパク質を可溶性の融合タンパク質として大腸菌で発現させるシステムを用いた。このシステムによって、GDAP-1 組換えタンパク質は、Ara 誘導によるチオレドキシシン (切断可能) との融合タンパク質として発現し、C 末端に V5 エピトープと精製に有効な 6xHis タグ配列をもつ

ことになる (Fig. 3)。様々な条件 (Ara 濃度、温度) を試みた結果、全長 GDAP-1 (GDAP-1 full) は多くは不溶性となったものの、Ara 濃度 0.2~0.002%、30°C での可溶性の発現が確認できた (図 2)。

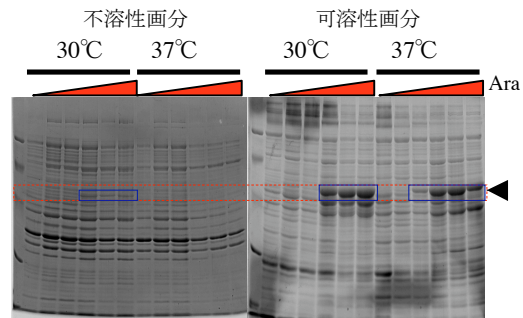


図 2 GDAP-1—full の大腸菌での発現

*Ara 濃度；各画分、各温度での 6 レーンのうち左から 0.000002%~0.2%の範囲で 10 倍ずつ変化

② 膜貫通ドメインを欠損した GDAP-1-d1 および GDAP-1-d2 の発現

GDAP-1 は、C 末端側に 2ヶ所の膜貫通領域と推定される疎水部位が存在し、このことが可溶性タンパク質として大量に発現することを難しくしている可能性が示唆されるため、2つの疎水性領域を 1つ欠失した GDAP-1-d1、2つ欠失した GDAP-1-d2 の発現を同様に試みた。結果、両者とも Ara 0.002% 以下の低濃度で発現が認められ (図 3)、発現量は疎水領域を除いたもの程増加する傾向にあった。

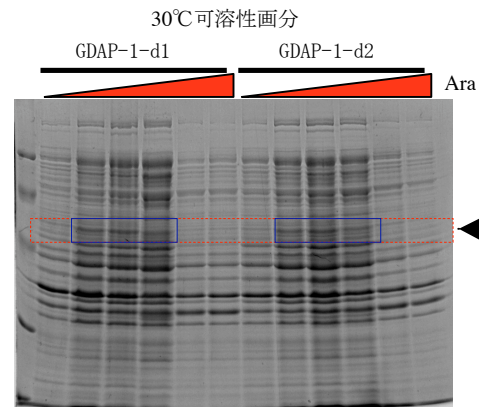


図 3 GDAP-1—d1、d2 の大腸菌での発現

*Ara 濃度；各画分、各温度での 6 レーンのうち左から 0.000002%~0.2%の範囲で 10 倍ずつ変化

可溶性画分に発現したものはいずれも、His タグ配列経由で固定化金属アフィニティークロマトグラフィー樹脂を用いて精製することも明らかとなった (図 4)。以上により、機能解析に向けた発現系が一応確立できた。

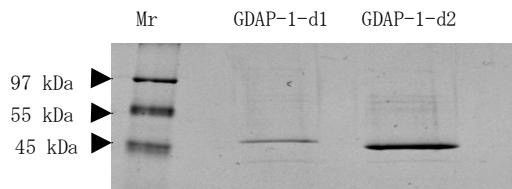


図4 GDAP-1-d1、d2のHis-Tagカラム精製

③CMT病に関与するGDAP-1 1アミノ酸置換体の作成

1アミノ酸置換体をコードする6種類のpBAD/Tio-TOPO-GDAP-1を作成し、シークエンスを確認した。現在これらの可溶性酵素としての発現効率をあげるために、さらに膜貫通領域を除いた発現を試みている。

(3) 哺乳類細胞でのTet誘導GDAP-1の発現系の確立

使用するneuro-2a細胞にpcDNA6/TRプラスミドを導入し、TRの発現レベルを抗体で確認し、3クローンを得た。得られたTR高発現のneuro-2aにpcDNA4/TO-GDAP-1および各pcDNA4/TO-GDAP-1 1塩基置換プラスミドを導入した。現在、Tet誘導下での経時的GDAP-1 mRNA量をPCRで確認中である。今後は、これら細胞を用いて形態変化やATP産生をはじめとしたミトコンドリア活性の変化を比較検討する予定である。

(4) GDAP-1の活性測定法

①LinD、pepC活性

基質として2,5ジクロロヒドロキノン、もしくはテトラクロロヒドロキノンを用いた活性測定を行なったが、反応は認められなかった。さらに1mMアスコルビン酸、コファクターとして1mM GST、100 μM NADH、100 μM NADPH、を加えて活性測定を同様にしたが、反応は認められなかった。

②アフィニティーカラムを用いた測定

大腸菌で発現したGDAP-1-d1、GDAP-1-d2を用いてBlue-sepharoseおよびRed-sepharoseへの結合性を調べた。結果、共にBlue-sepharoseへの強い結合性を得た。また、この結合は、pHの変化や他のGSTやNADH等のコファクター存在下では外れず、10mM NADPH存在下ではじめて遊離することから、GDAP-1中にNADPH結合部位が存在する可能性が示唆された。現在、この現象の詳細を確認中である。

本研究により、ようやく当該タンパク質の機能解析の準備が整った。

また、アフィニティーカラムの使用により、NADPHへの結合性が確認でき、酸化還元酵素

とのホモロジーも高いことから、酸化還元酵素としての機能をもつ可能性が高いが、coiled-coil領域や核移行シグナルとのホモロジーも部分的に高いため、両可能性を検討する予定である。このためには、GDAP-1の細胞内局在性を明らかにすることは機能解析に必須である。幾つかのペプチド抗体を作成し、調製したが、本研究期間内に有効な抗体を作成することはできなかった。今後も抗体作成を試みる予定である。

今後、GDAP-1の機能が明らかにするとともに、本研究で作成した変異体との比較によりCMT-4A病の原因を明らかにし、治療薬の開発に役立てたい。

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 辻崇一、高木淑江、神経系に置けるシアロ糖鎖の機能解析とシアル酸転移酵素の構造と機能の解析、東海大学紀要糖鎖工学研究施設、2、p18-21、2008年、査読無
- ② 辻崇一、高木淑江、神経系におけるシアル酸含有糖鎖の機能解析とシアル酸転移酵素の構造と機能の解析、東海大学紀要糖鎖工学研究施設、1、p12-14、2007年、査読無

[学会発表] (計 5件)

- ① 高木淑江、岡田洋子、辻崇一、マウスST6Gal-I シアリルモチーフL変異タンパク質(L2)の生化学的解析、BMB2008、2008年12月11日、神戸
- ② 平野雄一、鈴木健裕、高木淑江、堂前直、辻崇一、マウスST6Gal-I分子内におけるジスルフィド結合様式の解析、BMB2008、2008年12月11日、神戸
- ③ 古井義博、岡田洋子、高木淑江、鳥居知宏、池中一裕、辻崇一、マウス神経系におけるST6Gal-I familyの発現解析、BMB2007、2007年12月14日、横浜
- ④ 鳥居知宏、高木淑江、辻崇一、等誠司、池中一裕、大脳皮質発達過程におけるシアル酸付加N結合型糖鎖解析、BMB2007、2007年12月12日、横浜
- ⑤ 高木淑江、ガングリオシドによる神経分化誘導過程で、新たに見つかった因子群(GDAP)の解析-Charcot Marie Tooth (CMT)病2/4A型遺伝性末梢神経疾患の原因遺伝子GDAP-1について、東海大学研究フォーラム2007、2007年3月2日、平塚

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高木 淑江 (TAKAKI YOSHIE)
東海大学・糖鎖科学研究所・講師
9 0 3 1 2 2 7 2