

機関番号：15401

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20791517

研究課題名 (和文) 顎骨骨幹異形成症 (GDD) の原因遺伝子GDD1の機能解析

研究課題名 (英文)

Functional analysis of GDD1 gene responsible for gnathodiaphyseal dysplasia(GDD)

研究代表者

水田 邦子 (MIZUTA KUNIKO)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：40432679

研究成果の概要 (和文)：

本研究で新たに抗ヒトGDD1ポリクローナル抗体を作製した。また、GDD1遺伝子の機能解析を目的にGDD1発現ベクターを作製し、培養細胞における外来性GDD1安定発現システムの確立を試みてきた。しかし、GDD1タンパクは細胞内で非常に分解を受けやすく、タンパク検出が困難であった。このため、GDD1遺伝子の生理的機能は長く不明であったが、申請者らはGDD1が筋萎縮を症状とするLGMD2の原因遺伝子であることを発見し、筋芽細胞株を用いた発現実験で骨格筋恒常性維持にGDD1遺伝子が重要な役割を發揮していることを証明した。

研究成果の概要 (英文)：

In this study, we generated specific antibodies against the human GDD1 protein. As an essential step toward elucidating the molecular functions of GDD1 gene, we also made the GDD1 expression vector and had been tried to establish stable expression system of GDD1 protein in the cultured cell. The GDD1 protein was easily degraded in the cell, and the protein detection was difficult. Therefore, the physiological and molecular biochemical functions of GDD1 gene have been uncertain. However, our recent study led to identify that GDD1 gene was also the responsible gene of proximal limb girdle muscular dystrophy (LGMD2L) of which the symptom was a muscular atrophy, and the GDD1 gene was demonstrated to play important roles in the skeletal muscle homeostasis maintenance by the expression experiment using the myoblastic cell line.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2008年度 | 1,800,000 | 540,000 | 2,340,000 |
| 2009年度 | 800,000 | 240,000 | 1,040,000 |
| 2010年度 | 700,000 | 210,000 | 910,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,300,000 | 990,000 | 4,290,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：遺伝子, 発生・分化, 細胞・組織

1. 研究開始当初の背景

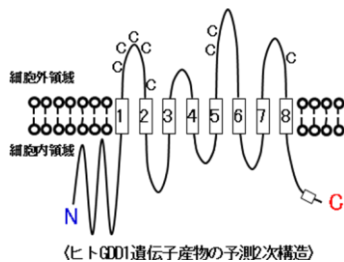
顎骨骨幹異形成症 (GDD) は、顎骨の骨性異形成症、四肢の易骨折性、長管骨骨幹部皮質の肥厚を特徴とする遺伝性骨系統疾患である。われわれ研究グループはポジショナルクローニングにより、2003年に疾患責任遺伝子 *GDD1* を同定した。しかしながら、*GDD1* 遺伝子は機能未知の新規遺伝子で *GDD1* 遺伝子産物の生化学的機能や *GDD1* 遺伝子の変異により引き起こされる GDD の分子病態は不明であった。

2. 研究の目的

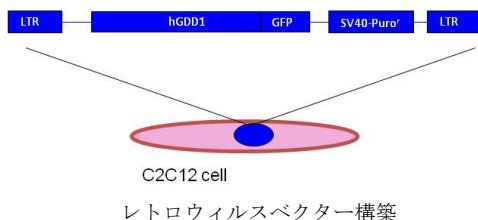
本研究ではヒト *GDD1* 遺伝子の機能解析および GDD の病態解析を行う上で必要不可欠な抗ヒト *GDD1* 抗体を作製し、ヒト *GDD1* 蛋白の細胞内局在、組織分布の検討等を行い、*GDD1* 遺伝子の機能の解明と GDD の原因の解明と病態解析を行う。

3. 研究の方法

①ヒト *GDD1* 遺伝子上の任意の配列3か所を選択し、そのペプチドを抗原としラビットに免疫し抗体を作製した。抗体の有用性はウェスタンブロッティングおよび免疫染色で確認した。



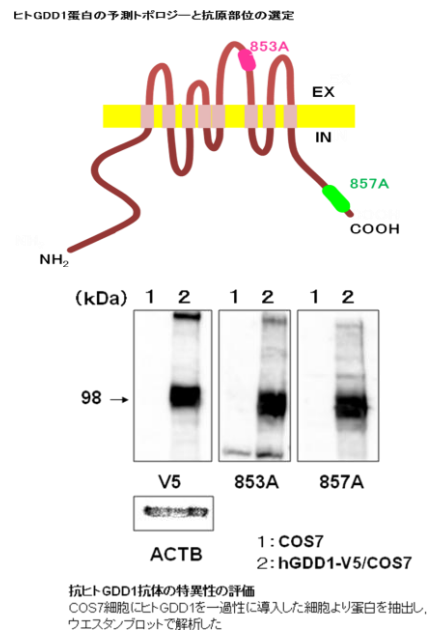
② *GDD1* 遺伝子の変異が GDD の発症・病態にどのように関係するか検討するため、ヒト *GDD1* 遺伝子をクローニングし、野生型および変異型の *GDD1* 遺伝子発現ベクターを作製した。さらにウイルスベクターの構築も行った。



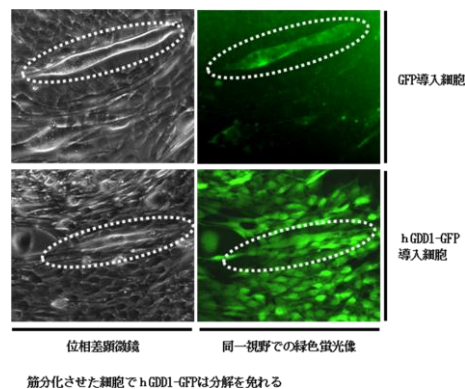
③作製した *GDD1* 遺伝子発現ベクターの野生型と変異型をマウス、ヒト培養細胞に導入し安定株を樹立し、その解析を行った。

4. 研究成果

① 3種類の抗ヒト *GDD1* ポリクローナル抗体を作製し、その抗体の評価を行い、そのうち2種類がウェスタンブロッティング、免疫染色に使用可能であることを確認できた。

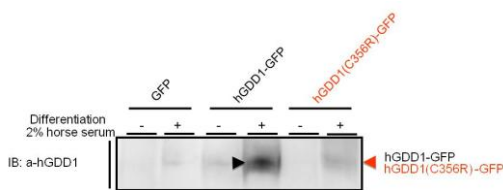


② 申請者らはこれまでに、培養筋芽細胞株を筋分化させる過程で *GDD1* 遺伝子の発現が上昇することを明らかにし、*GDD1*-GFP 遺伝子を安定発現する培養筋芽細胞株 (C2C12) を樹立している。樹立した細胞を *in vitro* で筋分化誘導したところ、分化を完了した筋管細胞 (細長い筋管と呼ばれる点線で囲った細胞) のみで、*GDD1*-GFP の蛍光が検出できることを発見した。一方、コントロールの *GFP* 遺伝子を安定発現する筋芽細胞株は筋分化の有無にかかわらず、すべての細胞で *GFP* の蛍光が検出される。この結果より、申請者らは *GDD1*-GFP タンパクは分化していない筋芽細胞では恒常的に分解破壊されていることを世界に先駆けて確認した。



GDD1 の機能解析を行う目的で、導入した

GDD1 遺伝子産物を骨芽細胞, 各種扁平上皮癌細胞や骨肉腫細胞などにレトロウイルスベクターを用いて遺伝子導入を行い安定化発現させた細胞を樹立し, 遺伝子産物の発現検討を行った. その結果, GDD1 タンパクは多くの細胞, 組織においても恒常的に分解されていることが判明した. また, GFP 融合野生型, 変異型 GDD1 を安定導入した C2C12 細胞の筋分化誘導時における GDD1 タンパクの発現をウエスタンブロッティングにて検討したところ, カベオリン 3 の発現が確認された筋分化細胞においてのみ, GFP 融合野生型, 変異型 GDD1 蛋白の発現が確認された. このことから, GDD1 遺伝子産物が筋分化に伴って安定化することを見出した.

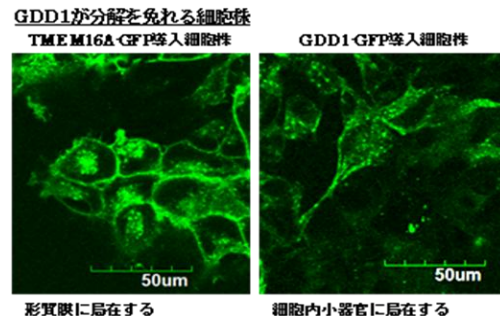


筋分化誘導したいずれの遺伝子導入細胞においても, 筋分化マーカーであるカベオリン 3 の発現が誘導され, 同時に GFP 融合野生型, 変異型 GDD1/TMEM16B 蛋白の発現が確認された.

③ GDD1 は *TMEM16E* とも呼ばれ, *TMEM16* 遺伝子ファミリー (*TMEM16A~K*) に属するが, *TMEM16* ファミリー遺伝子産物の機能はこれまで不明であった. 2008 年に *TMEM16A* がカルシウム依存性 Cl⁻ チャンネルとして機能する (Schroeder BC et al., *Cell*, 2008) ことが, また 2009 年には *TMEM16B* も同様の機能をする (Stöhr H et al., *J Neurosci.*, 2009) ことが相次いで報告された. GDD1 と *TMEM16A* のアミノ酸配列の相同性が非常に高いことから, GDD1 もカルシウム依存性 Cl⁻ チャンネルとして機能する可能性があると考え, 培養細胞を用いた発現比較実験を行った. *TMEM16A* の安定的タンパク発現は, 検討に用いたすべての細胞株において可能であった. GDD1 のイオンチャンネル活性を検討するために, GDD1-GFP を通常の培養条件で恒常発現できる細胞株があることが望ましく, 網羅的に検索した結果, 図に示すように, ある細胞株 (未公開) に安定導入した GDD1-GFP は恒常的に発現可能であることを発見した.

また, GDD1-GFP は分化した筋管細胞では細胞内小器官膜へソーティングされ形質膜への局在が乏しかったが, この細胞株でも GDD1-GFP の局在動態は同様であった. 一方この細胞株における *TMEM16A*-GFP は形質膜へ非常に効率的にソーティングされており, イオンチャンネル活性を検出することが可能であったが, GDD1-GFP 導入細胞に同様のイオン

チャンネル活性は検出できなかった.



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 1 件)

1. Bolduc V, Marlow G, Boycott KM, Saleki K, Inoue H, Kroon J, Itakura M, Robitaille Y, Parent L, Baas F, Mizuta K, Kamata N, Richard I, Linssen WH, Mahjneh I, de Visser M, Bashir R, Brais B: Recessive mutations in the putative calcium-activated chloride channel Anoctamin 5 cause proximal LGMD2L and distal MMD3 muscular dystrophies. *Am J Hum Genet.* 2010 Feb 12;86(2):213-21. 査読有

[学会発表] (計 6 件)

1. TA TO TRAN, 飛梅 圭, 藤本伸一, 水田邦子, 廣野 力, 杉田 誠, 鎌田伸之.: 顎骨骨幹異形成症原因遺伝子 GDD1 の細胞内発現と機能解析: 第 47 回日本口腔組織培養学会学術大会 (2010. 11. 13 高知)

2. 藤本伸一, 飛梅 圭, 廣野 力, 水田邦子, 鎌田伸之.: 顎骨骨幹異形成症原因遺伝子 GDD1/GDD1 の細胞内および組織内発現についての検討: 第 28 回日本骨代謝学会 (2010. 7. 23 東京)

3. 藤本伸一, 飛梅 圭, 廣野 力, 水田邦子, TA TO TRAN, 柴 芳樹, 鎌田伸之.: 顎骨骨幹異形成症原因遺伝子 GDD1/GDD1 の機能解析: 第 64 回日本口腔科学会学術集会・学術総会 (2010. 6. 24-25 札幌)

4. Fujimoto S, Shiba T, Hirono C, Mizuta K, Kamata N: Molecular characterization of *GDD1/GDD1*, the gene product responsible for autosomal dominant gnathodiaphyseal dysplasia.: *biodentist* (2010. 2. 11-12 hirosshima)

5. 水田邦子, 藤本伸一, 鎌田伸之.: 顎骨骨幹異形成症原因遺伝子 GDD1 のマウス歯・歯周組織における免疫組織化学的発現解析: 第

54回(社)日本口腔外科学会総会(2009.10.9
札幌)

6. **Mizuta K**, Inoue H, Fujimoto S, Itakura
M, Kamata N.: Immunohistochemical
localization of GDD1 gene product :
International Association for Dental
Research 86Th general session and
exhibition. (July 2-5, 2008, Metro Toronto
convention centre, Canada)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水田 邦子 (MIZUTA KUNIKO)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・
助教

研究者番号 : 40432679

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし