

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 8日現在

機関番号：82611
研究種目：基盤研究（C）
研究期間：2009～2011
課題番号：21500384
研究課題名（和文）変異型ユビキチンリガーゼを発現する筋ジストロフィーモデルマウスの開発と病態の解析
研究課題名（英文）Generation and characterization of transgenic mice expressing mutated *WWP1* gene responsible for chicken muscular dystrophy
研究代表者
今村 道博（IMAMURA MICHHIRO）
独立行政法人国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 遺伝子疾患治療研究部・室長
研究者番号：80221787

研究成果の概要（和文）：筋ジストロフィーニワトリの筋変性は *WWP1* E3 ユビキチンリガーゼ遺伝子に生じたミスセンス変異によるものと考えられる。そこで我々はこれと同じ変異型 *WWP1* を発現する遺伝子改変マウスを作製してその筋組織を解析した。その結果、軽度の筋変性と加齢に伴う空胞の形成が観察された。一方、生化学的解析からは、既に報告されているようなジストログリカンの糖鎖修飾の異常は認められなかった。

研究成果の概要（英文）：The *WWP1* gene was identified as a promising candidate responsible for chicken muscular dystrophy, which encodes a E3 ubiquitin protein ligase. Dystrophy chicken has a missense mutation in the gene causes one amino acid change in the molecule. To gain insight into molecular mechanism of the muscular dystrophy, we generated transgenic (Tg) mice expressing the same mutated *WWP1* as found in dystrophy chicken. Tg mice showed a small number of necrotic and regenerating fibers in the hind limb muscle. Moreover, vacuoles were often found in aged Tg mice. Whereas, aberrant glycosylation of α -dystroglycan was not shown in Tg muscle despite of a report with dystrophy chicken.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経筋肉生理学

キーワード：酵素、細胞組織、遺伝子、実験動物、筋ジストロフィー

1. 研究開始当初の背景

(1) 1987年にデュシェンヌ型筋ジストロフィーの原因遺伝子とその遺伝子産物であるジストロフィンが同定されて以来、様々な種類の筋ジストロフィー原因遺伝子が明らかにされてきた。これと並行して、筋ジストロフィーの実験動物においてもほとんどの原因遺伝子が解明され、ヒトの疾患モデルとして

病態解明に大きな役割を果たして来た。一方、常染色体優性の遺伝形式を示す筋ジストロフィーニワトリは1956年に報告された最も古い筋ジストロフィーの実験動物であるが、鳥類という特殊性から長い間その原因遺伝子は不明であった。しかしながら、2008年になると分担研究者である万年の独自の遺伝子解析により、この筋ジストロフィーの原

因遺伝子が 922 アミノ酸から成り 4 つの WWドメインを持つ HECT 型 E3 ユビキチンリガーゼ (WWP1) をコードしていると示され、ミスセンス変異により生じる WWP1 内の 1 アミノ酸 (441 番目のアミノ酸) 変異が、筋ジストロフィーの病因となる可能性が示唆された (下図)。



(2) 筋ジストロフィーニワトリでは遺伝学的解析から原因遺伝子探索がなされる一方、これまでに明らかにされている様々なタイプの筋ジストロフィーの分子機構を参考にして、生化学的アプローチから原因を解明しようという試みもなされており、ジストログリカンと呼ばれるラミニン結合タンパク質がこれに関わるとする報告がなされていた。ジストログリカンはジストロフィン結合タンパク質複合体を構成する主要な糖タンパク質であり、筋ジストロフィーニワトリに特徴的な糖鎖修飾の異常と病態との関連が示唆されていた。

2. 研究の目的

(1) WWP1 遺伝子のミスセンス変異と筋ジストロフィーとの関連については、まず、これが生物種に因らない一般化可能な問題であるのか、或いはニワトリという鳥類などに見られる特殊な事例であるのかを明らかにする必要がある。また、筋ジストロフィーニワトリは優性遺伝であり、分子内に生じる 1 アミノ酸残基の変異が他方の正常 WWP1 機能に影響

を与えているのであれば、それが本来の機能の抑制なのか亢進なのかという問題が注目され、筋細胞のメンテナンスとタンパク質分子の代謝回転との関連について重要な知見が得られるものと期待される。しかしながら、分子内のアミノ酸変異により本来の WWP1 とは異なった機能を獲得する可能性も否定できない。そこで我々はこれらの問題を解き、筋変性における変異型 WWP1 の分子機構を明らかにすることを本研究の目的とした。

(2) 筋ジストロフィーニワトリの病態の分子機構については、ジストログリカンと呼ばれるラミニン結合タンパク質の糖鎖修飾に異常があり、これが筋変性と関連するという報告がある。そのため本研究では正常型及び変異型 WWP1 とジストログリカンの相互作用について明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) トランスジェニックマウスの作製と系統の樹立：遺伝子改変技術により、筋ジストロフィーニワトリで同定されたのと同じアミノ酸変異の WWP1 を発現する Tg マウスを作製し、筋組織の解析を行った (下図参照)。



WWP1 は生体内に広く分布するため、発現ベクターには CAG プロモーターにより発現制御される pCAGGS を用いた。また、WWP1 cDNA は新たにマウスからクローニングしたため、ニワトリでは 441 番目のアルギニンがグルタミンに変異しているが (R441Q)、マウスでは 436 番目に変異を導入した (R436Q)。

(2) WWP1 に対する抗体の作製：変異型 WWP1 の Tg マウスを解析するため、変異部分を特

異的に認識する抗体を作製した。マウス WWP1 の変異アミノ酸を中心に据えた 25 残基のペプチドを抗原としてウサギに免疫し、得られた抗血清をアフィニティー精製することで変異型 WWP1 に対する特異抗体を得た。また、マウスには 8 種類の WWP1 類似分子が存在するため、これらと相同性が低い領域のリコンビナントタンパク質を作り、WWP1 に対する特異抗体を作製した。

上記の(1)と(2)により、変異型 WWP1 を発現する骨格筋の組織学的、生化学的解析を行った。

4. 研究成果

(1) Tgマウスの作成と系統の樹立：筋ジストロフィーニワトリと同じ変異型 WWP1 を発現する Tgマウスは 2 匹のファウンダーが得られ、1 系統を樹立した。この Tgマウスに外見上の異常は認められなかったが、組織学的解析では僅かながら筋細胞の壊死・再生像が認められた。また 1 年齢近くから筋線維内に空胞形成が認められるようになり、これに雌雄差が認められなかったため変異型 WWP1 の発現との関連が示唆された。

(2) 変異型 WWP1 の細胞内局在：我々が作成した抗体を用いて骨格筋における WWP1 の局在について調べたところ、正常マウスにおいて WWP1 は筋小胞と筋細胞膜に存在することが示されたが、Tgマウスにおいては細胞膜への局在が顕著になり、変異型 WWP1 に対する特異抗体を用いると細胞膜にしか分子が検出されなかった。これらは変異型分子が細胞内分布を変化させ主に細胞膜へ局在するようになることを示唆していた。

(3) WWP1 とジストログリカンとの相互作用：マウスの筋組織を材料とした生化学的解析から、Tgマウスと正常マウスの α -ジストログリカンの糖鎖修飾に差は認められなかった。また、WWP1 に対する抗体を用いた免疫沈降法では WWP1 とジストログリカンとの結合は認められなかった。更に、変異型 WWP1 は骨格筋や

心筋でのみ特徴的な部分消化を生じ、E3 リガーゼとしての機能を消失している可能性が示唆された。

上記の(1), (2), (3)より、WWP1 の 436 番目の(ニワトリでは 441 番目)アミノ酸変異は、自らの分解を誘導して酵素機能を消失させる可能性が示唆されたが、基質への結合能は維持されると考えられるため、正常な WWP1 と競合して標的分子のユビキチン化を抑制する可能性が考えられた。或いは、アミノ酸の変異により WWP1 の細胞内局在が変化するため、本来の基質とは異なる分子を認識するようになった可能性もある。しかしながら、免疫沈降法での解析によると、そのターゲット分子はジストログリカンではないものと推察された。

本研究から我々が導いた「1 残基のアミノ酸変異が分子の機能領域の分解を誘導し、その結果、正常分子の基質結合を競合阻害して本来の酵素機能を抑制する」という仮説はユニークであり、筋ジストロフィーの病態解析に新たな視点をもたらすだけでなく、WWP1 に類似した多くの HECT 型 E3 リガーゼの制御機構を考える上で大きな意義を持つものと考えられた。

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 3 件)

① Matsumoto H, Sasazaki S, Fujiwara A, Ichihara N, Kikuchi T, Mannen H, *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 査読有, vol. 157, 2010, pp. 68-72

DOI:10.1016/j.cbpa.2010.04.019

② Masuda-Hirata M, Suzuki A, Amano Y, Yamashita K, Ide M, Yamanaka T, Sakai M, Imamura M, Ohno S, *Genes to Cells*, 査読有, vol. 14, 2009, pp835-850

DOI:10.1111/j.1365-2443.2009.01315.x

③ Matsumoto H, Maruse H, Sasazaki S,

Fujiwara A, Takeda S, Ichihara N, Kikuchi T, Mukai F, Mannen H, The Journal of Poultry Science, 査読有, vol. 46, 2009, pp95-99
DOI:10.2141/jpsa.46.95

〔学会発表〕（計4件）

- ① Imamura M, Takeda S, 49th Annual Meeting American Society for Cell Biology, 2009, San Diego (U.S.A.)
- ② Imamura M, Takeda S, 50th Annual Meeting American Society for Cell Biology, 2010, Philadelphia (U.S.A.)
- ③ 今村道博, 松本大和, 稲葉由美, 万年英之, 武田伸一, 第63回日本細胞生物学会大会, 2010, 札幌
- ④ Imamura M, Takeda S, 51th Annual Meeting American Society for Cell Biology, 2011, Denver (U.S.A.)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今村 道博 (IMAMURA MICHIMIRO)

独立行政法人国立精神・神経医療研究センター
神経研究所 遺伝子疾患治療研究部・室長
研究者番号：80221787

(2) 研究分担者

万年 英之 (MANNEN HIDEYUKI)

神戸大学大学院農学研究科・教授
研究者番号：20263395