

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 25 年 3 月 31 日現在

機関番号：17501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011 ～ 2012

課題番号：23890165

研究課題名（和文） GNE と相互作用する蛋白質の解明による遠位型ミオパチーの病態解明

研究課題名（英文） The study of novel GNE-binding proteins

研究代表者

中村 憲一郎 (Kenichiro Nakamura)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：70608372

研究成果の概要（和文）：縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチー(DMRV)の原因遺伝子である GNE は、生体内でユビキタスに発現しているが、GNE の機能障害によって骨格筋が特異的に障害される機序については未だ明らかにされていない。GNE の筋における機能及び DMRV 発症機序を解明するため、酵母ツーハイブリッド法を用いて GNE と相互作用する蛋白質を調べた。GNE の翻訳領域全長、epimerase domain あるいは kinase domain に対応する GNE の bait コンストラクトを作製し、ヒト骨格筋 cDNA ライブラリー(preym)を用いてスクリーニングし、再形質転換実験で確認した。GNE と相互作用する候補として 18 蛋白質を認め、いずれの候補もこれまで GNE との相互作用が報告されていないものであった。候補の中には筋細胞に特異的に発現している蛋白質や遺伝性筋疾患の原因と考えられている蛋白質等が含まれており、候補蛋白質の 1 つは二重免疫蛍光染色でマウス骨格筋組織において GNE と共局在を示した。本研究結果から GNE が筋細胞で発現している蛋白質と相互作用して筋に特異的な役割を果たしている可能性が示唆される。今後これらの候補蛋白質と GNE との相互作用を詳細に解析することによって、筋における GNE の機能並びに GNE 機能障害による筋障害発症機序の解明が期待できる。

研究成果の概要（英文）：Distal myopathy with rimmed vacuoles (DMRV), an early adult-onset progressive myopathy, is caused by mutations in the GNE gene. The pathomechanism that impairment of GNE expressed ubiquitously in vivo leads to myopathy remains to be elucidated. Yeast two-hybrid experiments with recombinant GNE proteins as the bait and with cDNA library from the human skeletal muscle as the prey screened 18 candidate proteins. These candidate proteins include a protein believed to cause hereditary myopathy and a protein expressed specifically in the myofiber. Double-labeled immunofluorescence showed co-localization of GNE and a candidate protein in the myofiber of the mouse skeletal muscle. These results suggest that GNE have a specific role in the muscle by interacting with the GNE-binding protein expressed selectively in the myofiber. Future study of the interaction between GNE and these candidate proteins will contribute to elucidate the specific function of GNE in the muscle.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：神経内科学

キーワード：GNE、縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチー、酵母ツーハイブリッド法

1. 研究開始当初の背景

縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチー(distal myopathy with rimmed vacuoles; DMRV)は、骨格筋の筋線維内に多数の縁取り空胞が出現する、常染色体劣性遺伝の難治性筋疾患である (Nonaka et al., 1981; Kumamoto et al., 1982)。DMRV 患者は、10~20 歳代に遠位筋優位の筋力低下・筋萎縮で発症し、緩徐に進行して四肢麻痺に至る。有効な治療法は未だ確立されていない。2001 年に GNE 遺伝子の変異が DMRV 患者で報告され (Eisenberg et al., 2001)、この変異が病気の原因であると考えられている。GNE は 722 アミノ酸からなる蛋白質で、シアル酸生合成酵素として知られており、生体内でユビキタスに発現しているが、GNE の機能障害によって骨格筋が特異的に障害される機序については未だ明らかにされていない。我々は、マウス及びヒトで筋細胞を含めてあらゆる組織の細胞において GNE が細胞質と核内に局在していること、筋障害・再生モデルマウスにおいて障害を受けた筋線維と再生筋線維で GNE が誘導されること、再生筋線維の核内ではヘテロクロマチン領域と核小体に局在していることを報告した (Nakamura et al., 2010)。これらの知見から、筋細胞において GNE がシアル酸生合成の調節だけでなく遺伝子発現調節にも関与している可能性が示唆される。これまでに、ヒト胎児脳の cDNA ライブラリーを用いたスクリーニングによって CRMP-1 と転写調節因子である PLZF/ZBTB16 が GNE と相互作用することが報告され (Weidemann et al., 2006)、GNE が転写調節因子など他の蛋白質

と相互作用して働いている可能性が示唆された。しかし、CRMP-1 と PLZF/ZBTB16 は、筋細胞における発現は文献上明らかでなく、我々がラット骨格筋組織及びマウス筋芽細胞由来の C2 細胞を網羅的遺伝子発現解析で調べたところ発現が極めて低いかほとんど発現していなかった。そこで、筋細胞では GNE と相互作用する別の蛋白質が存在する可能性が推測される。本研究の目的は、筋細胞において GNE と相互作用する蛋白質を同定し、その機能を明らかにすることによって、筋における GNE の機能を解明することである。

2. 研究の目的

筋細胞において GNE と相互作用する蛋白質を同定することにより、筋における GNE の機能を解明する。

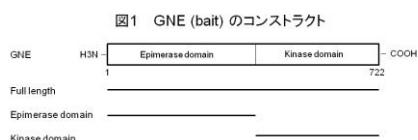
3. 研究の方法

酵母ツーハイブリッド法 (Clontech 社) を用いて GNE と相互作用する蛋白質を調べた。

RT-PCR 法で翻訳領域全長を含むヒト GNE 遺伝子をクローニングし、GNE の翻訳領域全長(GNE)及び epimerase domain (GNE-E)あるいは kinase domain (GNE-K) に対応する GNE 遺伝子の断片を bait 発現ベクターにサブクローニングして bait コンストラクトを作製した (図 1)。これらのコンストラクトを酵母細胞に導入して、蛋白質を精製し、Western blotting で bait 蛋白質の発現を確認した。

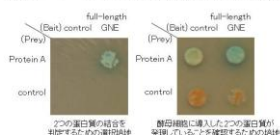
これらの bait コンストラクト導入酵母細胞をそれぞれ、ヒト骨格筋 cDNA ライブラリー

一を導入した酵母細胞(Clontech 社)と融合させ、選択培地で培養した。陽性コロニーからプラスミドを精製してシーケンスで塩基配列を調べ、データベースで検索してスクリーニングした。



次に、bait コンストラクトとそれぞれスクリーニングされた prey 遺伝子の両者を酵母細胞に共形質転換し、選択培地で陽性コロニーを形成するかどうかを調べ、GNE 蛋白質との結合の再現性を確認した（再形質転換実験、図 2）。

図2 酵母ツーハイブリッド法・再形質転換実験結果の例



候補蛋白質の1つについて二重免疫蛍光染色でマウス骨格筋組織における GNE との共局在を調べた。

4. 研究成果

GNEの筋における機能及びDMRV発症機序を解明するため、酵母ツーハイブリッド法を用いて GNE と相互作用する蛋白質を調べ

た。GNE の翻訳領域全長 (GNE)、epimerase domain (GNE-E)あるいは kinase domain (GNE-K) に対応する GNE の bait コンストラクトを作製し、ヒト骨格筋 cDNA ライブラリー (prey)を用いてスクリーニングしたところ、3 (GNE)、15 (GNE-E)、6 (GNE-K) 蛋白質がヒットした。再形質転換実験によってこのうち18蛋白質についてGNEとの相互作用の再現性を確認した。いずれの候補もこれまで GNE との相互作用が報告されていないものであった。候補の中には筋細胞に特異的に発現している蛋白質、遺伝性筋疾患の原因と考えられている蛋白質、転写調節因子、等が含まれており、候補蛋白質の1つは二重免疫蛍光染色でマウス骨格筋組織において GNE と共局在を示した。

GNE と相互作用する候補蛋白質が、それぞれ GNE とどのように相互作用して、どのように働いているのかについては今後詳細に解析する必要があるが、本研究結果から GNE が筋細胞で発現している蛋白質と相互作用して筋において特異的な役割を果たしている可能性が示唆される。例えば、生体内でユビキタスに発現している GNE が筋細胞に特異的に発現している蛋白質と相互作用することによって筋において特異的な役割を果たしている可能性、GNE の変異によって筋障害を発症する病態機序として GNE と遺伝性筋疾患の原因と考えられている蛋白質との相互作用が関連している可能性、GNE が転写調節因子と相互作用して筋細胞で転写調節に関与している可能性などが推察される。

今後これらの候補蛋白質と GNE との相互作用を詳細に解析することによって、筋に特異的な GNE の機能を解明することが期待できる。筋における GNE の機能を明らかにすることにより、GNE の機能障害によって

DMRV を発症する機序を解明して DMRV の治療法開発の基盤を提供する可能性が期待できる。

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 0 件)

[学会発表] (計 3 件)

- 1) 中村憲一郎, ほか、GNE 結合蛋白質の検索、第 54 回日本神経学会学術大会、2013 年 5 月 29 日～6 月 1 日、東京.
- 2) 中村憲一郎, ほか、培養細胞における変異 GNE の細胞内局在及びライソゾームの観察、第 53 回日本神経学会学術大会、2012 年 5 月 22 日～25 日、東京.
- 3) 中村憲一郎, ほか、GNE ノックダウン細胞における網羅的遺伝子発現解析、第 52 回日本神経学会学術大会、2011 年 5 月 18 日～20 日、名古屋.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 憲一郎 (Kenichiro Nakamura)
大分大学・医学部・助教
研究者番号：70608372

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし