

課題番号 29

## プロテオーム解析を用いた筋ジストロフィーの病態解明と治療標的の検討

[1] 組織

代表者：鈴木直輝（東北大学医学系研究科）  
対応者：安井明（東北大学加齢医学研究所）  
分担者：小野洋也（東北大学医学系研究科）  
菅野新一郎（東北大学加齢医学研究所）

研究費：物件費 20万円

[2] 研究経過

筋細胞膜タンパク質である *dysferlin* の欠損は、成人発症の筋ジストロフィーである三好型遠位型筋ジストロフィーと肢帯型筋ジストロフィー2B型（総称して *dysferlinopathy*）を引き起こす（Liu J, Aoki M, et al. Nat Genet 1998）。*dysferlin* 欠損によって筋細胞膜の修復機構が損なわれ、そのため筋細胞の変性、壊死が生じるとされる（Bansal D, et al. Nature 2003）。近年、*dysferlin* のほかにも筋細胞膜修復に関与する *dysferlin* 結合タンパク質の存在が徐々に明らかになっている。たとえば結合タンパク質のひとつである *TRIM72* を筋ジストロフィーモデルマウスへ投与した実験的治療では、骨格筋の変性壊死が減少することが確認され、治療標的として注目されている（Weisleder N, et al. Sci Transl Med 2012）。新規 *dysferlin* 結合タンパク質の同定が、まだ全容が明らかでない筋細胞膜修復機構の解明、ひいては *dysferlinopathy* 治療標的の発見に結びつく可能性がある。

本研究では、プロテオミクス技術を用いて新規 *dysferlin* 結合タンパク質を同定することを目的として、研究を行った。

以下、研究活動状況の概要を示す。（3-1）研究成果に示した実験は、東北大学医学部神経内科学教室と東北大学加齢医学研究所で行った。*dysferlin* 結合タンパク質候補のサンプルの質量分析は、株式会社日本バイオサービスへ依頼した。随時電子メールで意見を交換し、加齢医学研究所で、1ヶ月に1回、研究のまとめと打ち合わせを行った。

[3] 成果

（3-1）研究成果

本年度の研究成果は、複数の新規 *dysferlin* 結合タンパク質候補を同定したことである。

*dysferlin* は、約 220 kDa の非常に大きな膜タンパク質であり、複合体形成による立体障害のため、免疫沈降法による結合タンパク質の同定は難しい。そこで本研究では、*dysferlin* のドメイン構造に着目し、特定領域のアフィニティカラムを作成した。具体的には、ヒト cDNA ライブラリーを鋳型として、ヒト *dysferlin* 特定領域をクローニングし、大腸菌またはバキュロウイルスを用いて GST 融合リコンビナントタンパク質を発現・精製し、担体に固定化してアフィニティカラムを作成した。このカラムに細胞抽出物を加えて相互作用するタンパク質を結合させ、アフィニティ精製により結合タンパク質を溶出後、SDS-PAGE により分離し（図）、質量分析にかけて結合タンパク質を同定した。

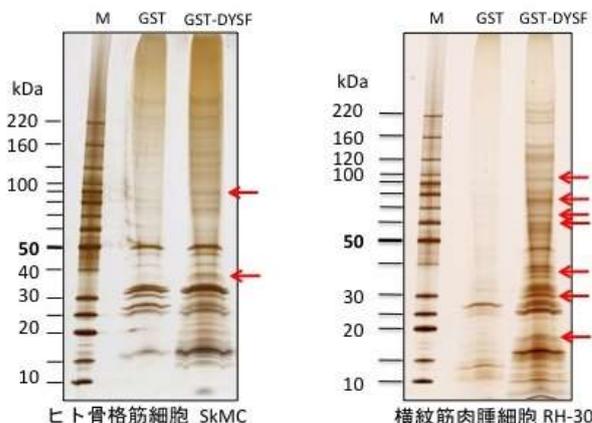


図. *dysferlin* 特定領域の結合タンパク質候補 (SDS-PAGE の銀染色結果)

（3-2）波及効果と発展性など

現在、香川大学組織細胞生物学教室と共同し、本研究で同定した *dysferlin* 結合タンパク質の機能解析を進めている。高感度検出器 (GaAsP) と二光子および一光子を組み合わせた高感度多光子レーザー顕微鏡を用いて、*dysferlin* 結合タンパク質のライブセルイメージングを行い、膜修復との関わりを検討し、*dysferlinopathy* の病態解明に繋げていく。

[4] 成果資料

(1) dysferlinopathy の病態解明-プロテオミクス技術による dysferlin 結合タンパク質の探索-. 小野洋也. 第 11 回神経内科 Research-Seminar. 仙台. 2015 年 11 月 4 日