

課題番号 12

## 細胞膜修復機構の活性化による 筋ジストロフィーの治療法開発

### [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）  
菅野新一郎（東北大学加齢医学研究所）

分担者：青木正志（東北大学医学系研究科）  
小野洋也（東北大学医学系研究科）

研究費：物件費 13 万円

### [2] 研究経過

本研究では、**dysferlinopathy** (ジスフェルリン異常症) の治療法開発を主たる目的とする。**dysferlinopathy** とは、筋細胞膜タンパク質 **dysferlin** の欠損によって引き起こされる成人発症の筋ジストロフィーの総称である。**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、壊死が生じると考えられている。近年、**dysferlin** のほかにも筋細胞膜修復に関与する **dysferlin** 結合タンパク質が複数報告されているが、細胞膜修復機構の詳細はいまだ不明である。まだ明らかになっていない膜修復機構の鍵分子の存在が考えられる。

我々は加齢研の安井、菅野の協力により、筋細胞膜修復分子として **AMPK** 複合体以外にも複数の **dysferlin** 結合タンパク質を検出している。なかでも蛋白 **X** に関しては、**AMPK** 複合体の基質と考えられ、膜損傷部位に集積することも確認できている。更に蛋白 **Y** に関しては、蛋白翻訳に関わる分子であり、細胞膜損傷をトリガーにして細胞内の恒常性維持を図るうえで鍵分子となる可能性がある。上記の **dysferlin** 結合タンパク質に関して、レーザー膜損傷の系での動態やノックダウン/ノックアウト、過剰発現における細胞膜修復機能の修飾様式を検討する。さらに既報分子と筋細胞膜修復に関与する新規分子との関連について解析をすすめ、膜修復機構の全容解明につなげていく。

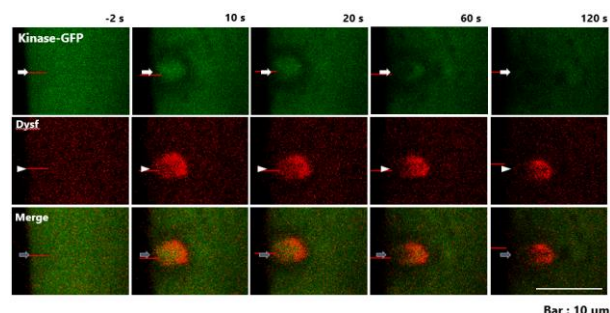
以下、研究活動状況の概要を示す。研究成果に示した実験は、東北大学医学部神経内科学教室と東北大学加齢学研究所で行った。**dysferlin** 結合タンパク質候補のサンプルの質量分析は、株式会社日本バイオサービスへ依頼した。随時電子メールで意見を交換し、加齢学研究所で、6ヶ月に一度程度、研究のまとめと打ち合わせを行った。

### [3] 成果

#### (3-1) 研究成果

**dysferlin** は、約 230 kDa の大きな膜タンパク質であり、複合体を形成するため、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。このカラムに細胞抽出物を反応させて相互作用するタンパク質を抽出し、**SDS-PAGE** により分離して、質量分析にかけることで、参考論文に挙げた **AMPK** を含む複数の結合タンパク質を同定していた。同様に同定した結合タンパク質の一つである **Protein Y** に注目し、レーザー膜損傷の実験系を用いて解析を行った。マウス骨格筋において **Protein Y** がレーザーによる膜損傷部位に集積し(図 1)、また培養細胞において **Y** 遺伝子発現抑制が筋細胞機能の低下に繋がることが見出した。

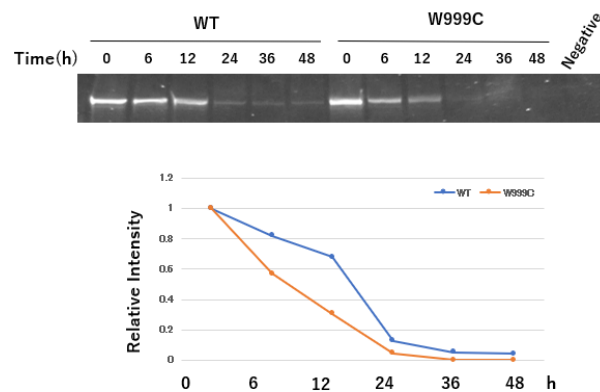
図 1: **Protein Y (Kinase GFP)** は **Dysferlin** と共局在する



また日本人に多い **p.W999C** 変異の **dysferlin** の蛋白質安定化機構に関する解析も進めてきており、今後

は他の変異における安定性について評価を行う予定である。

図 2: p.W999C 変異蛋白は消失が速い



さらには *Dysferlin* の p.W999C 変異を導入したノックインマウスを作成した。掛け合わせにより CRISPR によるオフターゲット変異を除去し、モデルマウスとしての評価を行っていく予定である。

### (3-2) 波及効果と発展性など

AMPK 活性化剤の臨床応用を目指し、*dysferlinopathy* のモデルマウス(不完全ながら *dysferlin* の発現がみられる SJL/J マウスと *dysferlin* 完全欠損の BLA/J マウスの 2 種類)を用いていたが、今後は新規作成したノックインマウスを使用していく予定である。

2020 年に報告した AMPK を含めた結合蛋白複合体の全容を明らかにするとともに、*dysferlin* 蛋白自体の安定化・分子制御機構も明らかにすることで膜修復機能に基づく治療開発を検討していく。

### [4] 成果資料

今年度は該当なし。

以下、参考資料

1. Izumi R, Takahashi T, Suzuki N, Nihori T, Ono H, Nakamura N, Katada S, Kato M, Warita H, Tateyama M, Aoki Y, Aoki M. The genetic profile of *dysferlinopathy* in a cohort of 209 cases: Genotype-phenotype relationship and a hotspot on the inner DysF domain. *Hum Mutat.* 41(9):1540-1554, 2020. doi: 10.1002/humu.24036. 査読有

2. Ono H, Suzuki N, Kanno SI, Kawahara G, Izumi R, Takahashi T, Kitajima Y, Osana S,

Nakamura N, Akiyama T, Ikeda K, Shijo T, Mitsuzawa S, Nagatomi R, Araki N, Yasui A, Warita H, Hayashi YK, Miyake K, Aoki M. AMPK Complex Activation Promotes Sarcolemmal Repair in *Dysferlinopathy*. *Mol Ther.* 28(4):1133-1153, 2020. doi: 10.1016/j.ymthe.2020.02.006. 査読有