

## Charcot-Marie-Tooth-4A/4\* 病と GDAP-1

Functional and mutational analysis of GDAP-1

### 代表研究者

東海大学 辻 崇一 Tokai University Shuichi Tsuji

### 協同研究者

東海大学 高木淑江 Tokai University Yoshie Takaki

東海大学 瀧澤俊也 Tokai University Shunya Takizawa

東海大学 高木繁治 Tokai University Shigeharu Takagi

### Summary

GDAP (ganglioside-induced differentiation-associated protein)-1 was found by our group in a search for the genes involved in ganglioside-induced Neuro2a differentiation, using a tetracycline-regulated GD3 synthase cDNA expression system combined with differential display PCRs. In 2002 two groups independently reported that mutations in a gene encoding unknown function-GDAP-1 are associated with the autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth disease type 4A (CMT-4A). Since then, many mutations were found in Europe, US and Africa, and also in China, but not in Japan. The mutational locuses of Chinese patients were different from those of Europe and so on, suggesting the mutational varieties occurs in races. Thus, in this research we carefully established the mutational analyzing system for Japanese and start to survey the Japanese CMT-4A/4\* patients. Furthermore, the function of GDAP-1 is still uncovered. To make clear the function of GDAP-1 must be essential for establishing the positive remedy for these disease. The putative amino acid sequence suggests GDAP-1 has the complicated structures including the two transmembrane regions. So that, it was very difficult to express this protein using *E. coli*, yeast and so on. In this research we also establish the GDAP-1 expression system for functional research.

## 研究目的

GDAP-1は、本研究者らが神経系におけるガングリオシド(シアル酸含有糖脂質)の機能解析の過程で発見したタンパク質である。本タンパク質は、神経系培養細胞において分化過程初期に特異的に発現することから、神経分化に何等かの役割をもつものと考えられているが、その機能は全く明らかになっていない。ところで、2002年遺伝性運動・感覚ニューロパチー Charcot-Marie-Tooth (CMT)-4A/4\* 型の原因遺伝子がGDAP-1遺伝子であることが明らかになり、GDAP-1は注目を集めている。CMT-4A/4\*病は多くの場合脱髄を伴う重篤なもので、アフリカ、欧米で数千人に一人という高頻度で発症している。最近、中国でも患者が相次いで発見され、欧米とは異なる変異があることが明らかになった。このことから民族によって変異の入り方が異なる可能性が考えられ、日本人についても検討する必要がある。そのためには日本人を対象とした遺伝子診断法を確立することが急務である。そこで、本研究は日本人を対象とした遺伝子診断法を確立し、当該遺伝子に変異を持つ患者の検索を開始することを第一の目的とした。さらに、治療法を開発するためにはGDAP-1の分子レベルでの機能を明らかにすることが必要である。当該タンパク質は膜タンパク質で複雑な構造を持つことが推定され、そのため有効な大量発現系の確立が今までできていなかった。そこで、分子レベルでの解析を行うためのGDAP-1の大量発現系の確立を本研究の第二の目的とした。

(注)4\*は「A」とは異なる症例でまだ分類の確定していないものを示した。2007年3月現在、少なくとも2種の存在が知られている。

## 研究経過

### (1) 日本人向けの遺伝子診断法の確立

GDAP-1を原因遺伝子とするCMT病は、-4A型ならびに4\*-型を含め現在少なくとも3種が報告されている(Fig.1)。アミノ酸をコードするエクソン部位のみならずスプライス部位前後にも変異がみついている。

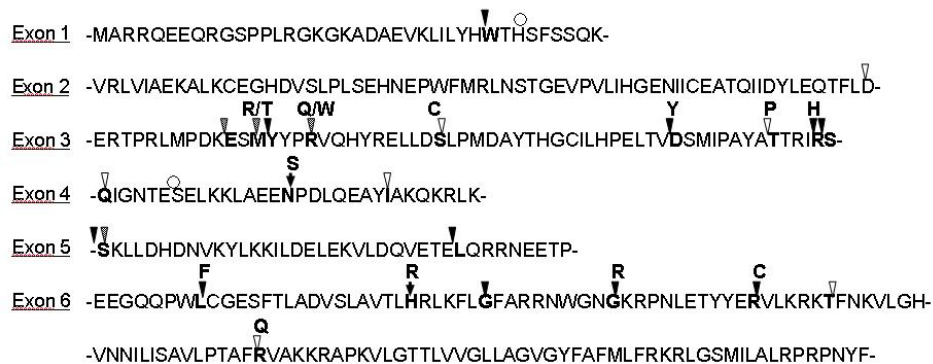


Fig.1 GDAP-1 mutations

▽, CMT-4A; ▼, CMT-4A chinese type; ▽, CMT-4\*; ▽, CNT-4/4\*; ○, non-CMT SNPs

したがって、単にエクソン部位だけではなく、スプライシングに関与すると考えられるイントロン部分をも含めて検証のできる系を作る必要があった。

Exon	Strand	Primer	Amprified fragment (bp)
1	sense	5'-AGGCTTGCCAGGGGCTTCCAGTCGCAGAC-3'	520
	antisense	5'-GCCATAGCCACATAGGATCATCTCCGATCG-3'	
2	sense	5'-CAGCAAGAGCTGATGTACCTACATGTCAGG-3'	820
	antisense	5'-GAAATCACCAACACAAACCACACATTTGCA-3'	
3	sense	5'-GTTTGGGATCTTGTCTGGTGCATCAGGCCA-3'	550
	antisense	5'-GAGCAAGTGAAGCACAGATTAATCCGACTG-3'	
4	sense	5'-TGAGGCATAGACAGGGTAAGCCCAAGGCAG-3'	376
	antisense	5'-GCCAAAGGTAACATGTGTACTGGTGAAGT-3'	
5	sense	5'-CAGCTGGGATATTTCCCTTCAACTAGCTC-3'	634
	antisense	5'-TTAGATTGGAGGCTGTCTCCCTGCCAAGG-3'	
6	sense	5'-GTCTCCTTTGGCCTAGGATACGTTTGCATG-3'	760
	antisense	5'-TGTGTCTATTGCTACCTGAACCCCTGTGT-3'	

Table I Primers for Japanese GDAP-1 mutational analysis

そこで、これらの条件を満たすように、Table 2に示すプライマーを構築した。まず、数名の健康者血液サンプルから得られたゲノムDNA標品を鋳型として作成したプライマーを用いてPCRを行い、得られたPCR産物の長さおよび塩基配列の検討を行った。その結果、これらのプライマーを用いる限り、GDAP-1遺伝子に特異的な増幅が起こりそれ以外の遺伝子DNA増幅は起こらないことが確認され、これらのプライマーの有効性が明らかになった。さらに、この過程で、欧米、アフリカ、中国で報告されているSNPsと同じものが確認されたが、日本人特有と推定されるようなSNPsあるいはその候補は今のところ見つかっていない。

当該研究期間に東海大学附属病院外来患者中、CMT病の疑いがあり、かつ本研究のために血液供与承諾のとれた患者3名の分析を試みた。その結果、この3名にGDAP-1に変異は認められなかった。

## (2)機能解析に向けた発現系の確立

GDAP-1は、cDNAの塩基配列から推定すると358アミノ酸からなり、C末端側に2ヶ所の疎水部位が存在し、それが膜貫通領域と推定され、このことが可溶性タンパク質として大量に発現することを難しくしている可能性が示唆された。

今回、我々は宿主に毒性を示すタンパク質や封入体を形成し易いタンパク質を可溶性の融合タンパク質として大腸菌で発現させるシステムを用いた。このシステムによって、GDAP-1組換えタンパク質は、アラビノース誘導によるチオレドキシン(切断可能)との融合タンパク質として発現し、C末端にV5エピトープと精製に有効な6xHisタグ配列をもつことになる(Fig.3)。様々な条件(アラビノース濃度、温度)を試みた結果、全長GDAP-1(GDAP-1 full)は多くは不溶性となったものの、アラビノース濃度0.2~0.002%、30°Cでの可溶性の発現が確認できた(Fig.2 上図)。また、さらに2つの疎水性領域を1つを欠失したGDAP-1-d1、2つ欠失したGDAP-1-d2ともアラビノース0.002%以下の低濃度で発現が認められ(Fig.2 下図)、発現量は疎水領域を除いたもの程増加する傾向にあった。

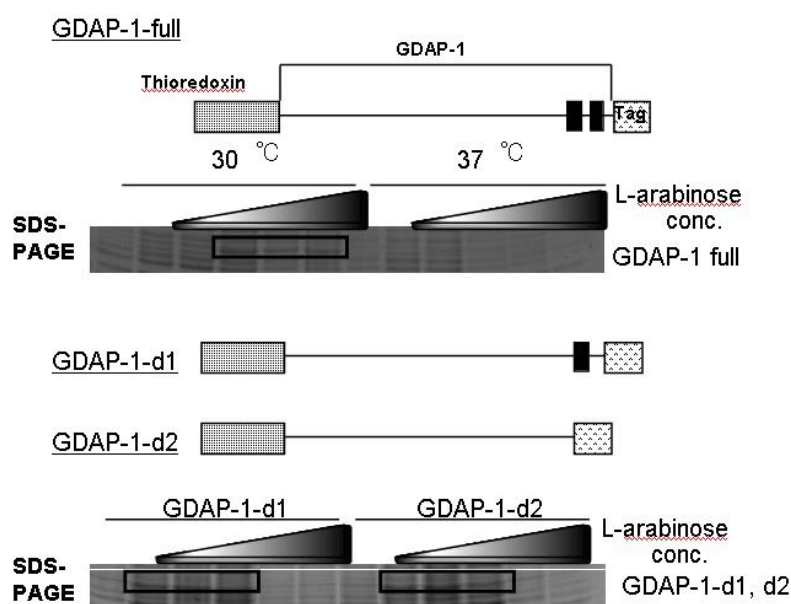


Fig. 2 GDAP-1 expression

可溶性画分に発現したものはいずれも、Hisタグ配列経由で固定化金属アフィニティクロマトグラフィー樹脂を用いて精製できることも明らかとなった。以上により、機能解析に向けた発現系が一応確立できた。

## 考察

### 1) 遺伝子診断法の確立

診断法を確立できた。本研究による方法は、血液1mlあれば十分に解析が可能であることから、汎用性も高いと考えられる。

残念ながら一病院では患者に限られるため解析は進まなかった。今後は、本研究で確立できた方法を用いて、全国レベルで患者の検索ならびに解析を推進する必要がある。

### 2) 機能解析に向けた発現系の確立

CMT病の分類基準によれば-4は常染色体劣性遺伝に分類される。しかし、奇妙なことに欧米、アフリカでの発症率は数千人に一人と見積もられ、劣性遺伝にしては頻度が高い。いずれにしても、構造と機能の関連が明確になってくれば、この謎はある程度説明がつくものと推定され、機能解析が待たれている。本研究により、ようやく当該タンパク質の機能解析の道が開かれたことになり、今後解析が一気に進むものと考えられる。

本タンパク質は、一次構造上、いくつかの相同性のある配列が見つかっている。たとえば、

- 1) グルタチオン転移酵素(GST)ファミリーと相同性のある領域
- 2) 核移行シグナル
- 3) Coiled-coil領域
- 4) 膜貫通領域近傍N-端寄りにセリンプロテアーゼで切断される部位

などがあり、GST関連の機能を持つ転写調節因子あるいはその一部としての機能が推定されるが、これらは今後決着が付けられるものと考えられる。

さらに、GDAP-1の細胞内局在性を明らかにすることは機能解析に必須である。幾つかのペプチド抗体を調製したが、本研究期間内に有効な抗体を作成することはできなかった。今後も抗体作成を試みる予定である。

今後、遺伝子治療の検討などを進めるとともに、GDAP-1の機能が明らかになった暁には、

CMT-4A/4\*病の治療薬開発の可能性も出てくる。

## 研究発表

### 口頭発表

1. 辻 崇一;「神経系発生・分化過程において時空間特異的に発現するシアル酸含有糖鎖の機能解析」 東海大学ハイテク整備事業成果報告会 (東京、2006)
2. 高木淑江;「ガングリオシドによる神経分化誘導過程で、新たに見つかった因子群 (GDAP) の解析—Charcot Marie Tooth (CMT) 病2/4A型遺伝性末梢神経疾患の原因遺伝子GDAP-1について」 東海大学研究フォーラム2007 (平塚、2007)
3. 石沢良太、高木淑江、辻 崇一; GDAP-1の大量発現系の確立と機能解析 第80回日本生化学会発表予定 (横浜、2007)

### 誌上発表

1. 辻 崇一;「シアル酸転移酵素 Sialyltransferases」未来を開く糖鎖科学 永井克孝監修 金芳堂 pp.159 (2005)
2. Shou Takashima, Tomoko Abe, Shigeo Yoshida, Hiroyuki Kawahigashi, Tamio Saito, Shuichi Tsuji and Masafumi Tsujimoto; “Analysis of sialyltransferase-like proteins from *Oryza sativa*” *J. Biochem* 139, 279–287 (2006)