

様式3

群馬大学生体調節研究所内分泌・代謝学共同研究拠点共同研究報告書

平成27年 2月21日

群馬大学生体調節研究所長 殿

所属機関名 群馬大学医学部附属行院皮膚科
職 名 講師
研究代表者 清水 晶

下記のとおり平成26年度の共同研究成果を報告します。

記

(課題番号: 14001)

1. 共同研究課題名	連珠毛形成に関与する変異型デスモグレイン4蛋白の細胞内処理過程		
2. 共同研究目的	研究期間の短縮とレベルアップのため		
3. 共同研究期間	平成26年 4月 1日 ~ 平成27年 3月31日		
4. 共同研究組織			
氏 名	所属部局等	職名等	役割分担
(研究代表者) 清水 晶	皮膚科	講師	研究立案 遂行
(分担研究者) 加藤円香	皮膚科	大学院生	研究立案 遂行
5. 群馬大学生体調節研究所 の共同研究担当教員	分野名	分子細胞制御	氏 名 徳永文稔

※ 次の6, 7, 8の項目は、枠幅を自由に変更できます。但し、6, 7, 8の項目全体では1頁に収めて下さい。

6. 共同研究計画

我々は、常染色体劣性遺伝の先天性乏毛症/連珠毛を呈する症例を経験した。デスモグレイン 4 (DSG4)の遺伝子検索を行い、細胞質内ドメインに新規ホモ接合体変異[c.2119delG(p.Asp707)IlefsX109])を見出した。母親は健常でヘテロ接合体であった。母親の毛髪を用いた RT-PCR では、変異型 DSG4 mRNA は、nonsense mediated mRNA decay を免れ健常型とほぼ同数存在した。DSG4 を HeLa 細胞に発現させたところ、野生型は細胞辺縁に見られたが、変異型は細胞辺縁の染色はわずかであり、核周辺に沈着していた。変異型 DSG4 の沈着部位を明らかにし、細胞内処理過程を明らかにする。

1. HeLa 細胞に野生型、変異型 DSG4 を発現させ、薬剤セレクションにより安定発現細胞株を樹立する。
2. 変異体の沈着部位を同定するために、DSG4 と抗 calnexin 抗体(ER)、抗 RCAS1 抗体 (ゴルジ体)、抗 γ チューブリン抗体(アグリソーム)などと共染色を行い変異蛋白の沈着部位を共焦点顕微鏡で同定する。
3. 変異型 DSG4 を免疫沈降し、糖鎖付加の状態をウェスタンブロットで検討し沈着部位を同定する。

7. 共同研究の成果

1. 変異型 DSG4 の機能解析。

293T細胞に野生型と変異型 DSG4 を導入し、免疫沈降法で変異型 DSG4 とプラコグロビンの結合を検討した。野生型と異なり、変異型 DSG4 ではプラコグロビンとの結合が障害されていた。野生型 DSG4 は細胞膜に蛋白が発現していたが、変異型では核周囲に沈着していた。ER に発現するカルネキシンとの共染色や糖鎖切断による解析により、沈着部位を ER と同定した。

2. ER に沈着する変異型 DSG4 と ER ストレスについて検討。

ER ストレスの分子シャペロンである GRP78/BiP が患者表皮で発現が増強していることから、生体において小胞体ストレス応答の分子シャペロン誘導が生じていることが示唆された。また、変異型 DSG4 を導入した培養細胞においてプロテアソーム阻害剤を用いた検討で、変異型 DSG4 は ERAD を介して分解されていることを明らかにした。

3. DSG4 変異による先天性連珠毛では ER ストレスが病態に関与していることを明らかにした。以上の結果は Journal of Investigative Dermatology (IF6.372 皮膚科領域1位)にアクセプトされた。

また、筆頭著者は大学院優秀卒業生に選ばれ、学長表彰を受けた。

8. 共同研究成果の学会発表・研究論文発表状況

(本研究所の担当教員の氏名の記載、又はこの共同研究に基づくとの記載のある論文等。なお、論文の場合は、別刷りを1部提出してください。)

<学会発表>

加藤円香、清水 晶、横山洋子、山本明美、下村 裕、徳永文稔、石川 治

先天性乏毛症/連珠毛の1例 デスモグレイン 4 遺伝子変異による病変形成メカニズムの検討

分子フォーラム

H26 4月 京都

(徳永文稔教授と共同)

The possible mechanism of monilethrix due to a novel homozygous mutation in the desmoglein 4 (DSG4) gene
Kato M, Shimizu A, Yokoyama Y, Kaira K, Shimomura Y, Ishida-Yamamoto A, Kamei K, Tokunaga F, Ishikawa O.

Eastern Asia Dermatology Congress

H26 9月 韓国

(Travel grant 獲得。亀井紀代子先生、徳永文稔教授と共同)

<論文発表>

An Autosomal Recessive Mutation of DSG4 Causes Monilethrix through the ER Stress Response.

Kato M, Shimizu A, Yokoyama Y, Kaira K, Shimomura Y, Ishida-Yamamoto A, Kamei K, Tokunaga F, Ishikawa O.

J Invest Dermatol. In press

(亀井紀代子先生、徳永文稔教授と共同)