

130 タンパク質品質管理機構を制御する筋萎縮治療法の開発	富永 香菜
-------------------------------	-------

**【目的】** 筋ジストロフィーは著しい筋力低下により生活に困難が生じる希少遺伝性疾患である。我々はこれまで主に筋細胞膜の維持や修復に関わる **Dysferlin (DYSF)** に遺伝子変異があるタイプの筋ジストロフィー (ジスフェルリノパチー: **Dysferlinopathy**) について研究を行ってきた。ジスフェルリノパチー患者では、変異によって **DYSF** タンパクの構造異常をおこし、細胞内でのタンパク質の過剰な凝集や分解が生じている。我々は、独自に開発した *in vitro* アッセイを利用して、新規の病的ミスセンス変異を見出し、それら変異の一部について、ケミカルシャペロンである **4-Phenylbutyric acid (4PBA)** が効果的であることを確認した。そこで、本研究では、**4PBA** がミスセンス変異をもつ **DYSF** の膜移行を亢進するメカニズムを明らかにし、より効果的で安全な化合物を発見することすることを目的とした。

**【方法】** 本研究で使用する **DYSF-T2A-DsRED** 発現ベクターを構築した。**DYSF** の細胞膜上発現量と細胞内を評価するために、元来 **DYSF** の発現がないヒト胎児腎細胞 **HEK293T** に各ベクターを導入して一過性に発現させ、抗 **2A-peptide** 抗体および **Alexa Fluor® 647** 標識抗体を用いてフローサイトメトリーおよび蛍光免疫染色を実施した。また、**DYSF WT** および病的ミスセンス変異ベクターを導入した **HEK293T** 細胞に **0.15 vol/vol%** **DMSO** (コントロール) および **1mM 4PBA** を添加し、**24~48** 時間インキュベーションした。処理時間終了後、**DsRED** 陽性細胞をフローサイトメトリーにて回収し、ウエスタンブロッティングにて小胞体ストレス関連タンパク質を確認した。

**【結果】** 病的ミスセンス変異をもつ **DYSF** を導入した細胞について、フローサイトメトリーおよび免疫染色にて細胞膜上の **DYSF** 発現量を観察したところ、**4PBA** 処理により細胞膜上への **DYSF** 発現が亢進されることを確認した。**DYSF** 病的ミスセンス変異に対する **4PBA** の作用機序について小胞体ストレス応答関連タンパク質についてウエスタンブロッティングにて確認したところ、小胞体シャペロン誘導因子 **GRP78** や小胞体ストレスセンサー **ATF6**、**IRE1** に対しては抑制されるが、小胞体ストレスセンサー **PERK** シグナルについては効果がみられないことがわかった。

ジスフェルリノパチーモデルにおける **4PBA** の小胞体ストレス応答機構への影響

