

平成30年6月6日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K13015

研究課題名(和文) スポーツ遺伝子ACTN3のX型をR型に近似させる方法論とその実現性

研究課題名(英文) Production of full length alpha-actinin-3 protein from ACTN3 gene X genotype

研究代表者

原田 永勝 (HARADA, Nagakatsu)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学系)・講師

研究者番号：40359914

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：速筋で発現するACTN3遺伝子にはR型とX型の遺伝子多型が存在する。異所性の翻訳終止コドン(PTC)をもつX型のmRNAは細胞内でナンセンスコドン依存性mRNA分解(NMD)により分解されるため、XX型のヒトではコードタンパク質であるalpha-actinin-3が発現しない。本研究では、PTCを読み飛ばすリードスルー物質(アミノグリコシド系抗生物質)によって、X型のACTN3遺伝子からR型と同じ全長サイズのalpha-actinin-3を発現できることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：A nonsense mutation of the ACTN3 gene generates a premature termination codon (PTC) and produces R/X polymorphism in humans. Since the X mRNA which contains a PTC is degraded by the cellular nonsense-mediated mRNA decay (NMD) system, ACTN3 XX genotype does not produce alpha-actinin-3 protein. Here we show that the readthrough drugs such as aminoglycosides could produce a full-length alpha-actinin-3 protein from the ACTN3 X gene.

研究分野：代謝栄養学、分子生物学

キーワード：ACTN3 alpha-actinin-3 リードスルー スポーツ パワー・瞬発系 R577X 遺伝子多型 アミノグリコシド系抗生物質

1. 研究開始当初の背景

ACTN3 遺伝子は筋肉とくに速筋の筋原線維の Z 膜を構成する 901 アミノ酸から成るタンパク質 alpha-actinin-3 をコードする。ヒトの ACTN3 遺伝子には R 型と X 型が存在する。R 型 mRNA は alpha-actinin-3 の 577 番目のアミノ酸にアルギニン (R; コドンは CGA) を、X 型は翻訳終止コドン (X; コドンは UGA) をコードする。X 型の mRNA はその異所性の終止コドン (premature termination codon; PTC) でリボソームが翻訳を停止するため細胞内で mRNA 品質管理機構 (NMD 機構) の標的となり分解される。このため、X 型 mRNA からは短い配列の alpha-actinin-3 さえも作られない。ヒトでは、ACTN3 アレルの組合せに RR 型、RX 型、および XX 型の 3 型が存在するが、XX 型では速筋内に alpha-actinin-3 が発現しない。R 型アレルの保有者 (とくに RR 型) は短距離走など瞬発・パワー系競技に最適と考えられている。一方、XX 型は筋肉量が少なく日本人ではスポーツ (とくに走る競技) に向かないという報告が多い。さらに、XX 型と加齢による筋肉量や筋機能の低下のしやすさとの関連性も指摘されている。申請者は、X 型 mRNA 上で翻訳時にリボソームが PTC を読み飛ばせば (この現象をリードスルーという。この場合翻訳時に PTC 部分にはいずれかのアミノ酸がコードされるため翻訳は停止せず続行する) mRNA 分解を回避し R 型に近似した全長の alpha-actinin-3 タンパク質を発現すると考えた。リードスルー法はデュシェンヌ型筋ジストロフィーや嚢胞性線維症などの様々な遺伝性疾患の治療研究において検証されてきたが、ACTN3 の遺伝子多型に対しての効果についてこれまで報告はされていない。

2. 研究の目的

本研究では、PTC を読み飛ばす作用を示すリードスルー物質によって、X 型の ACTN3 遺伝子から R 型と同じ alpha-actinin-3 タンパク質を発現できるか否かを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

実験にはヒト胎児由来の腎細胞株 HEK293 を用いた。細胞は、10% ウシ胎仔血清 (FBS) と 1% Penicillin/Streptomycin を含んだ Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) を用いて 37 °C、5% CO₂ 条件下で培養した。後述の方法で発現プラスミドのトランスフェクションを行った。トランスフェクション後の細胞に、G418、ゲンタマイシンあるいはカフェインを添加した。G418、ゲンタマイシンおよびカフェインの溶媒は水とした。

(2) プラスミド

ACTN3 R 型の成熟 (mature) -mRNA をコードする配列 R, ACTN3 X 型の mature-mRNA をコードする配列 X, ACTN3 R 型の pre-mRNA をコードする配列 R_{pre} および ACTN3 X 型の pre-mRNA をコードする配列 X_{pre} を挿入した発現プラスミドを作成した。各配列の 5' 端には DYKDDDDK タグ、3' 端には Myc エピトープタグをコードする配列が融合している。それぞれのプラスミドを HEK293 細胞にトランスフェクションした。

(3) 細胞ライセートの調製とイムノプロット

HEK293 細胞ライセートを、4 °C、15,000 rpm で 20 分遠心分離し、上清を回収しタンパク質サンプルとした。抽出したタンパク質サンプル濃度は、BCA protein assay kit (Pierce, Rockford, IL) を用いて測定した。タンパク質サンプルは SDS-PAGE で電気泳動した後、Immobilon-P メンブレン (Millipore, Bedford, MA) に転写した。転写後、メンブレンを 5% スキムミルク in TBS-T [Tris-buffered saline containing 0.05% Tween20] で 1 時間ブロッキング操作を行った。一次抗体をスキムミルクに希釈し一晩 4 °C でインキュベートした。TBS-T でメンブレンを洗浄後、二次抗体を 1 時間室温で反応させ、基質 [Amersham ECL Select detection kit (GE Healthcare Japan, Tokyo, Japan)] を用いて検出を行った。

(4) 細胞ライセートの調製と免疫沈降

HEK293 細胞に NP40 Lysis Buffer [10 mM Tris-HCl (pH7.4), 150 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 10 mM NaF, 1% Nonidet P-40, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 4 µg/ml leupeptin, 4 µg/ml aprotinin] を添加し、遠心分離後、上清を回収しタンパク質サンプルとした。膨潤させた protein A-sepharose と anti-DYKDDDDK tag 抗体または anti-Myc-tag 抗体を混合し 1 時間 4 °C でインキュベートした。その後タンパク質サンプルを加えて一晩 4 °C でインキュベートした。遠心後上清を除去して NP40 Lysis buffer で沈殿を洗浄し、遠心後上清を除去した沈殿に、Sampling Buffer [62.5 mM Tris-HCl (pH6.8), 2% SDS, 0.005% bromophenol blue, 10% glycerol, 5% β-mercaptoethanol] を加えて 95 °C で 5 分インキュベートした。遠心後上清を電気泳動し Immobilon-P メンブレンに転写した。5% スキムミルク in TBST にてブロッキング後、一次抗体を一晩 4 °C でインキュベートし、上述のとおり二次抗体を 1 時間室温で反応させ、基質を用いて検出を行った。

4. 研究成果

(1) 外来性ヒト ACTN3 発現細胞の作成

X 型 ACTN3 遺伝子のリードスルーを検討するためには、X 型 ACTN3 遺伝子を発現するヒト細胞が必要である。しかし、このような細胞（とくに XX 型の骨格筋細胞）の入手は困難であるため、我々は、外来性の ACTN3 遺伝子を培養細胞株に発現する方法を確立した。本研究で用いた外来性ヒト ACTN3 遺伝子は次のとおりである。ACTN3 R 型の成熟 (mature) -mRNA をコードする配列 R, ACTN3 X 型の mature-mRNA をコードする配列 X, ACTN3 R 型の pre-mRNA をコードする配列 R_{pre} , および ACTN3 X 型の pre-mRNA をコードする配列 X_{pre} 。それぞれを哺乳類細胞用発現ベクターに組み込み、HEK293 細胞にトランスフェクションした。各配列の 5' 端には DYKDDDDK タグ、3' 端には Myc エピトプタグをコードする配列が融合している。HEK293 細胞に空ベクター (Ev)、ACTN3 R 型 mature-mRNA (R)、ACTN3 X 型 mature-mRNA (X)、ACTN3 R 型 pre-mRNA (R_{pre})、あるいは ACTN3 X 型 pre-mRNA (X_{pre}) をコードするプラスミドを遺伝子導入した。細胞から抽出したタンパク質サンプルに対して、anti-DYKDDDDK タグ抗体、anti-Myc タグ抗体を用いてイムノブロットを行った。Anti-DYKDDDDK タグ抗体で検出した結果、R を導入した細胞では全長サイズの alpha-actinin-3 タンパク質バンド (約 100 kDa) が検出された。X を導入した細胞では短いサイズの alpha-actinin-3 タンパク質バンド (約 80 kDa) が検出された。 R_{pre} を導入した細胞では全長の alpha-actinin-3 タンパク質バンドが検出された。 X_{pre} を導入した細胞では alpha-actinin-3 タンパク質バンドは検出されなかった。これは、 X_{pre} がスプライシングを受けた後、NMD によって分解されたためと考えられる。実際、NMD 機構を高濃度カフェインで阻害すると、 X_{pre} 導入細胞で短いサイズの alpha-actinin-3 タンパク質バンド (約 80 kDa) が検出された。外来性タンパク質の C 末を認識する anti-Myc タグ抗体を用いた結果、R および R_{pre} を導入した細胞では全長サイズの alpha-actinin-3 タンパク質バンドが検出されたが、X や X_{pre} を導入した細胞では alpha-actinin-3 タンパク質は検出されなかった。このように、外来性に R 型あるいは X 型の ACTN3 遺伝子を発現する HEK293 細胞の実験系を確立した。

(2) X 型 ACTN3 遺伝子の PTC に対するリードスルー薬の影響

X 型 ACTN3 の PTC に対してリードスルーを起こすことが可能か否かを検討するために、まず X を用いた検討を行った。リードスルー薬として、ゲンタマイシンおよび G418 を用いた。Ev あるいは X を導入した HEK293 細胞に、ゲンタマイシンあるいは G418 を作用させ、細胞からタンパク質を抽出した。Anti-DYKDDDDK 抗体あるいは anti-Myc 抗体を用いてイムノブロットを行ったところ、どちらのリードスルー薬でも濃度依存的に全長サイズ (R と同じサイズ) の alpha-actinin-3 タンパク質発現量が増加した。

今回、外来性の alpha-actinin-3 タンパク質に対して免疫沈降法を導入した。ゲンタマイシンあるいは G418 を作用させた HEK293 細胞のタンパク質抽出物に対して、anti-DYKDDDDK タグ抗体、あるいは anti-Myc タグ抗体の組み合わせで免疫沈降とイムノブロットを行ったところ、これらリードスルー薬によって、X から全長サイズ (R と同じサイズ) の alpha-actinin-3 タンパク質が発現することを確認した。

以上の結果から、リードスルー薬 (ゲンタマイシンや G418) は X 型 ACTN3 遺伝子の PTC をリードスルーできると考えられた。

(3) X 型 ACTN3 遺伝子の発現に対するリードスルー薬の影響

先述したように、X 型の ACTN3 遺伝子は、pre-mRNA のスプライシング後に、細胞に備わる NMD 機構によって mRNA が分解される。X に対してリードスルー薬 (ゲンタマイシンや G418) の効果を確認することができたことから我々は、X 型 ACTN3 の本来の配列である X_{pre} に対するリードスルーの効果を検討した。 X_{pre} を導入した HEK293 細胞に、G418 を作用させ、anti-DYKDDDDK タグ抗体を用いて外来性 alpha-actinin-3 タンパク質を免疫沈降させた。このタンパク質サンプルに対して anti-Myc タグ抗体を用いてイムノブロットを行ったところ、全長サイズ (R と同じサイズ) の alpha-actinin-3 タンパク質は検出できなかった。そこで、高濃度カフェインの存在下で HEK293 細胞に G418 を作用させたところ、同じ条件の免疫沈降 イムノブロットによって全長サイズ (R と同じサイズ) の alpha-actinin-3 タンパク質が検出された。以上のことから、 X_{pre} を発現する細胞では、NMD 機構を阻害した条件でリードスルー薬を投与することで、検出可能レベルの全長 alpha-actinin-3 タンパク質が発現することが明らかとなった。

このように本研究では、X 型 ACTN3 遺伝子から R 型と同じ全長の alpha-actinin-3 タンパ

ク質を発現できることを明らかにした。ACTN3 遺伝子の X 型アレルは、スポーツ・運動能力との関係のみならず、サルコペニアや骨粗鬆症などの疾患発症との関連性も指摘されている。X 型 ACTN3 遺伝子のリードスルー法を確立することで、ACTN3 の XX 型の人々に対して、これら疾患を制御する新しい手段の開発へとつながることが期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3 件)

Harada N, Okuyama M, Yoshikatsu A, Yamamoto H, Ishiwata S, Hamada C, Hirose T, Shono M, Kuroda M, Tsutsumi R, Takeo J, Taketani Y, Nakaya Y, Sakaue H. Endoplasmic reticulum stress in mice increases hepatic expression of genes carrying a premature termination codon via a nutritional status-independent GRP78-dependent mechanism. J Cell Biochem 118: 3810-3824, 2017 査読有, DOI : 10.1002/jcb.26031

Nakaya Y, Fukuda D, Oyamada T, Ogawa K, Harada N, Nakagami H, Morishita R, Sata M, Sakaue H. A novel lipoprotein (a) lowering drug, D-47, decreases neointima thickening after vascular injury. J Med Invest 64:64-67, 2017 査読有, DOI : 10.2152/jmi.64.64

Miyatake Y, Shiuchi T, Mawatari K, Toda S, Taniguchi Y, Futami A, Sato F, Kuroda M, Sebe M, Tsutsumi R, Harada N, Minokoshi Y, Kitamura T, Gotoh K, Ueno M, Nakaya Y, Sakaue H. Intracerebroventricular injection of ghrelin decreases wheel running activity in rats. Peptides 87:12-19, 2017 査読有, DOI : 10.1016/j.peptides.2016.11.005

[学会発表](計 3 件)

丹波 洋介, 竹尾 仁良, 板東 正浩, 瀬部 真由, 山崎 幸, 福田 大受, 宮原 裕子, 宮武 由実子, 末政 直哉, 黒田 雅士, 升本 早枝子, 原田 永勝, 堤 理恵, 佐田 政隆, 阪上 浩 魚由来長鎖モノエン脂肪酸は抗動脈硬化作用を有する 第 21 回日本病態栄養学会年次学術集会, 2018 年 1 月 14 日, 国立

京都国際会館(京都府・京都市)

山崎 幸, 東 千尋, 堤 理恵, 竹治 香菜, 末政 直哉, 宮武 由実子, 原田 永勝, 阪上 浩 自発運動がストレプトゾトシン誘発糖尿病モデルラットにおける筋萎縮に与える影響 第 32 回日本糖尿病合併症学会, 2017 年 10 月 27 日, 京王プラザホテル(東京都・新宿区)

大塚 良, 原田 永勝, 水澤 典子, 吉本 勝彦, 西辻 和親, 高石 和美, 中屋 豊, 阪上 浩, 北畑 洋 GADD34 の C 末端領域を欠損した CHO-K1 細胞の樹立 第 253 回徳島医学会学術集会, 2016 年 7 月 24 日, 徳島県医師会館(徳島県・徳島市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原田 永勝 (HARADA, Nagakatsu)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・講師
研究者番号: 40359914