

平成23年 5月20日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2011

課題番号：20599016

研究課題名（和文）新規リン酸化酵素の骨格筋疾患における病態生理学的意義の研究

研究課題名（英文）Significance of novel protein kinase in muscle function and disease

研究代表者

中川 修 (Osamu NAKAGAWA)

奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：40283593

研究成果の概要（和文）：

転写調節因子は多数の下流遺伝子の発現を調節する、いわば「分子スイッチ」であり、その意義を明らかにするためには下流遺伝子であるシグナル伝達分子や機能分子を同定することが極めて重要である。この見地より私たちは、筋特異的転写調節因子の下流遺伝子の探索を行い、心筋および骨格筋に特異的発現を示す新規のリン酸化酵素遺伝子SRPK3を同定した。マウスモデルにおいて、SRPK3欠損により筋肉の成長障害が、SRPK3過剰発現により心筋・骨格筋傷害が生じることより、SRPK3活性の適切な制御の重要性が示唆された。さらに、SRPK3の筋肉の成長・機能における意義と作用機序について、分子生物学的手法とマウスモデルなどを組み合わせて解析した。

研究成果の概要（英文）：

Transcription factors regulate the expression levels of various downstream genes as “molecular switches” in our body. In order to clarify the importance of transcription factors, it is crucial to identify and characterize those downstream genes. In this context, we searched for the genes regulated by muscle-specific transcription factors and identified SRPK3 to be a muscle-specific gene encoding a novel protein kinase. Both deficiency and excess of SRPK3 activity in mice caused muscle abnormalities, indicating importance of proper regulation of SRPK3 function. *In vivo* significance and mechanisms of action of SRPK3 were further studied using various molecular biology techniques and mouse models.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	0	1,700,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	510,000	3,910,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：神経内科学・神経分子病態学

キーワード：転写調節因子 リン酸化酵素 筋肉

1. 研究開始当初の背景

(1) 転写調節因子は、遺伝子発現調節領域の特異的 DNA 配列に結合すると同時に多様なパートナー分子と複合体を作り、下流遺伝子の発現レベルを調節する。個々の転写調節因子複合体が多数の下流遺伝子の発現を変化させることにより、細胞の形質・機能を大きく変化させる。転写調節因子複合体による遺伝子発現調節機構は、多数の発生シグナル・環境要因・病的刺激が集約・蓄積した後、下流遺伝子発現調節を通じて再び細胞内そして生体全体へと広がっていく Focal Point であり、血管系の発生や成熟機能の調節メカニズムの根幹である。

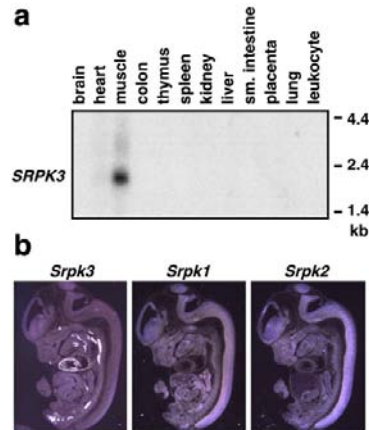
(2) MADS domain 型転写調節因子 MEF2 は、MyoD など多数の転写調節因子と協調的に働き、特に筋特異的遺伝子発現調節の中樞を担っている。MEF2 の生体における重要性はその欠損モデルマウスが重篤な骨格筋・心筋の異常を示すことにより確認されたが、MEF2 により発現調節を受ける下流遺伝子の詳細は解明されていない。転写調節因子は下流遺伝子の発現を調節する、いわば「分子スイッチ」であり、その生理的意義を明らかにするためには、下流遺伝子であるシグナル伝達分子や骨格筋機能に直結した機能分子を同定することが極めて重要である。

2. 研究の目的

(1) この見地より近年私たちは、MEF2C KO マウスの遺伝子発現パターンを Microarray 解析により検討することにより、MEF2C KO マウスで発現が低下している MEF2 下流遺伝子を同定することを試みた。同定した MEF2 下流遺伝子の一つは SRPK1/SRPK2 からなるリン酸化酵素ファミリーと共通の構造を有する新規のリン酸化酵素をコードすると考えられたため、SRPK3 と命名した (図 1)。

(2) SRPK1 と SRPK2 が様々な臓器に幅広く発現することと対照的に、SRPK3 はヒト・マウスにおいて骨格筋と心筋に特異的な発現を示し、既報の他の実験結果と合わせて、SRPK3 が MEF2 により直接転写調節を受ける新しい筋肉特異的リン酸化酵素であることが示された。そこで本研究では、分子生物学的手法とモデルマウス解析を組み合わせ、SRPK3 の骨格筋・心筋における意義について明らかにすることを目的とした。

【図 1】成人 (a: Northern 解析) とマウス胎仔 (b: *in situ* hybridization) における SRPK3 の筋肉特異的発現。SRPK1/SRPK2 はマウス胎仔において中枢神経にやや優位な幅広い発現を示した。



3. 研究の方法

(1) SRPK3 の生体における意義を明らかにするため、骨格筋や心筋において SRPK3 を過剰発現するトランスジェニックマウスモデルの組織学的・分子生物学的解析を行った。また、SRPK3 欠損モデルとして、ES 細胞における相同組み換えを利用したノックアウトマウスの解析を行った。

(2) これまで知られていた SRPK リン酸化酵素ファミリーの機能の一つに、mRNA スプライシングの制御があげられる。そこで、上記のマウスモデルや培養細胞実験系における SRPK3 の mRNA スプライシングに対する効果について、Microarray 解析や RT-PCR 法などを用いて検討した。

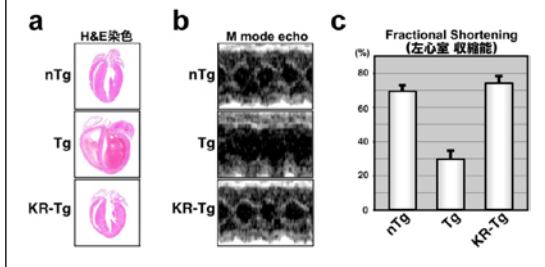
(3) 近年、典型的なアルギニン・セリン繰り返し構造を有する基質に加えて、様々な構造的特徴を有する分子が SRPK リン酸化酵素ファミリーの基質となりうることが知られてきた。そこで、two-dimensional difference gel electrophoresis (2D-DIGE) 法を用いた解析により、新しい SRPK3 基質の同定を試みた。

4. 研究成果

(1) 既に報告したように、Muscle Creatine Kinase プロモーターを用いた骨格筋 SRPK3

過剰発現マウスは重篤な筋線維変性・筋細胞死を伴う骨格筋成長障害を示して死亡した。また、筋線維の変性・細胞死に反応して生ずる筋細胞再生の所見である胎児型ミオシンの発現が明らかであった。この骨格筋過剰発現マウスモデルは今回の基質探索のために利用した。さらに、Myosin Heavy Chain プロモーターによる心筋過剰発現マウスの解析も行った。心筋過剰発現マウスは拡張型心筋症様の鬱血性心不全を示して死亡し、SRPK3 の過剰発現が骨格筋のみならず心筋においても重篤な細胞機能異常につながる事が明らかになった。これと対照的に、ATP 結合部位の点変異により酵素活性を欠失させた SRPK3^{K107R} の心筋過剰発現マウスには心機能障害が認められず、SRPK3 過剰発現マウスの異常は非特異的に生ずるのではなく、SRPK3 基質の過剰なリン酸化によることが証明された (図 2)。このことより、筋肉に発現する SRPK3 基質を同定することの重要性が示唆された。

【図 2】心筋 SRPK3 過剰発現 (Tg) マウスは拡張型心筋症様の心不全を示したが、酵素活性欠失 SRPK3 変異体の過剰発現 (KR-Tg) マウスに異常は認められなかった。nTg: 対照正常マウス。(a) H&E 染色 (b) 心エコー M mode、(c) 心エコー fraction shortening の定量。



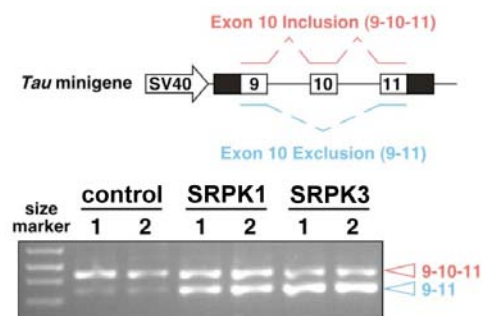
一方、SRPK3 欠損マウスは致死ではないものの、若年期より明らかな骨格筋の成長障害を有し、骨格筋重量の有意な減少と中心核 (centrally placed nuclei) の著明な増加を特徴とする組織像異常を示した。中心核の増加は筋細胞傷害後の再生時に広く認められる変化であるが、SRPK3 KO マウスの骨格筋は細胞死・再生にともなう所見 (血清 creatine kinase 値の上昇、炎症・線維化・apoptosis などの組織像、再生筋に特徴的な胎児型ミオシンの発現) を示さないことから、SRPK3 の欠損による特異的な筋細胞の異常として筋細胞萎縮と中心核の増加が生ずると考えられた。今回、この SRPK3 欠損マウスと上記の過剰発現マウスを用いた分子生物学的・生化学的解析を行うことにより、SRPK3 の筋肉機

能における意義と作用メカニズムを解明することを試みた。

(2) SRPK1 と SRPK2 が splicing factor を基質として mRNA スプライシングを調節することは広く知られる。mRNA スプライシングの異常は骨格筋疾患の原因となることより、SRPK3 欠損もしくは過剰発現マウスの筋障害もスプライシングの異常に起因している可能性がある。そこで、SRPK3 が mRNA スプライシングを直接調節するか否か、Tau minigene 実験系を用いて検証した (図 3)。この実験系において SRPK3 は Tau minigene の mRNA スプライシング調節に対して SRPK1 と同等の活性を持つことが明らかになった。

そこでさらに、SRPK3 欠損マウスと対照マウスとの間に mRNA スプライシングパターンの変化があるか否か、Microarray 解析を用いて検討した。これまでの検討で多数の遺伝子の mRNA スプライシングが有意に変化していることが示されているが、単独で SRPK3 欠損マウスの筋肉異常を説明できるような遺伝子を同定するには至っていない。例えば、ヒトにおいて中心核を有する萎縮筋線維像を特徴とする Centronuclear Myopathy は異なる病因からなる複数の疾患単位を含むが、最も重症の X-linked Myotubular Myopathy は X 染色体上の MTM1 遺伝子の変異が原因である。他には Dynamin2 遺伝子の変異も常染色体優性 Centronuclear Myopathy の一部の原因となることが知られている。しかしながら、SRPK3 欠損マウスにおいて、これらの遺伝子の mRNA スプライシングパターンに顕著な異常は認められず、今後さらに SRPK3 と mRNA スプライシング制御の関連を in vivo で検討して行く必要があると考える。

【図 3】Tau minigene mRNA splicing 定量解析。SRPK3 の発現により、Tau minigene の Exon10 が splice out された mRNA (“9-11”) が Exon 9-10-11 型 (“9-10-11”) と比較して有意に増加し、SRPK3 が mRNA splicing に直接影響しうることが示された。その効果は SRPK1 とほぼ同等であった。



(3) 前述したように、SRPK の代表的な基質はアルギニンとセリンの繰り返し配列を特徴とし、SR protein splicing factor などの mRNA 修飾の制御因子である。一方、Lamin B receptor など、アルギニンとセリンの繰り返し配列を有するが、全く機能の異なる分子も SRPK3 基質となり、さらには、典型的なアルギニン・セリンの繰り返し配列を持たない分子も SRPK3 によってリン酸化されることが報告されて来ている。これらの見地より、SRPK3 の筋細胞における基質を同定するためには、既知の基質分子に限定しない解析が必要となる。

そこで今回、北里大学薬学部服部成介博士らとの共同研究により、2D-DIGE 法を用いて骨格筋における SRPK3 基質の同定を試みた。SRPK3 欠損・骨格筋過剰発現・正常マウスの骨格筋よりリン酸化タンパクを精製した後 Cy3 もしくは Cy5 で標識し、これらのうち 2 種類の検体を同時に 2D-gel で展開してシグナルを定量比較した。サンプル間にシグナル差があるスポットに存在するタンパクを mass spectrometry により同定する際、シグナル強度が「SRPK3 過剰発現 > 正常 > SRPK3 欠損」となるものが最もよい基質候補となる。

これまでの検討において 2D 泳動解析において認められたスポットに存在するタンパクを同定したところ、癌抑制因子 NDRG2 のリン酸化が SRPK3 欠損マウスで減少し、過剰発現マウスで増加していることが明らかになった。NDRG2 は、その C 端にアルギニン・セリンに富んだ配列を有していたため、SRPK3 が直接 NDRG2 をリン酸化する可能性もあると考えたが、in vitro kinase assay の結果では、SRPK3 が直接 NDRG2 をリン酸化する結果は得られなかった。今後他のスポットに存在する基質候補分子の同定を試みるとともに、SRPK3 過剰発現マウスの骨格筋において、どのようなメカニズムで NDRG2 のリン酸化が生じているのか、その機序を明らかにし、さらに NDRG2 リン酸化の筋肉機能制御における意義を明らかにする必要がある。

(4) SRPK3 欠損マウスがヒト Centronuclear Myopathy に類似した病理像を示すこと、また SRPK3 遺伝子が X 染色体上にあることより、私たちは以前より Centronuclear Myopathy の男性症例における SRPK3 変異の有無について解析してきた。その結果、既知の Centronuclear Myopathy 原因遺伝子である MTM1 や Dynamin2 の変異を認めない男性症例 25 例のうち、孤発例 2 例において SRPK3 の Kinase Domain に異なるアミノ酸置換を来す遺伝子変異を発見し

ていた。しかしながら、これらの患者の家族の DNA 検体は入手不能であり、変異の意義を明らかにするには至っていなかった。

そこで本研究では、変異 SRPK3 分子の活性を検討するため、上記スプライシング制御分子などの既知の SRPK 基質を用いた kinase assay を行った。残念ながら、既知の基質を用いた実験においては、2 症例において認められた SRPK3 アミノ酸置換による酵素活性の変化は認めなかった。筋肉において最も重要な SRPK3 基質がどのような分子であるかは未だ不明であり、ヒト疾患における SRPK3 遺伝子変異の意義については今後の検討の課題となった。

筋ジストロフィーをはじめとする多くの骨格筋疾患は進行性の筋傷害を示す難治性疾患である。その患者予後と Quality of Life の改善のためには、疾患特異的な筋細胞障害メカニズムの抑制を図るとともに残存筋細胞の維持・増殖により骨格筋機能を保持することが重要である。また、骨格筋疾患に限らず、加齢や他疾患による全身状態の悪化に伴う骨格筋の萎縮と活動性の低下を予防・改善することは、高齢化社会において広く意味を持つ課題である。これらの見地より、私たちは今後も骨格筋細胞の発生・分化と増殖に必須の働きを有する筋肉特異的な転写調節因子とその下流シグナル伝達因子・機能分子の研究を続けていきたいと考えている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

Makita R, Uchijima Y, Nishiyama K, Amano T, Chen Q, Takeuchi T, Mitani A, Nagase T, Yatomi Y, Aburatani H, Nakagawa O, Small EV, Cobo-Stark P, Igarashi P, Murakami M, Tominaga J, Sato T, Asano T, Kurihara Y, Kurihara H. Multiple renal cysts, urinary concentration defects, and pulmonary emphysematous changes in mice lacking TAZ. *Am. J. Physiol.* 294(3):F542-53, 2008.

Itoh S, Kim H-W, Nakagawa O, Ozumi K, Lessner SM, Aoki H, Akram K, McKinney RD, Ushio-Fukai M, Fukai T. Novel role of Antioxidant-1 (Atox1) as a copper dependent transcription factor involved in cell proliferation. *J. Biol. Chem.* 283(14):9157-67, 2008.

Wilker PR, Kohyama M, Sandau MM, Albring JC, Nakagawa O, Schwarz JJ, Murphy KM.

Transcription factor Mef2c is required for B cell proliferation and survival after antigen receptor stimulation. *Nature Immunol.* 9(6):603-12, 2008.

〔図書〕 (計 1 件)

中川 修 林 寿来 坂部 正英 「心臓発生に働く転写調節因子の心肥大・心機能調節における意義」医学のあゆみ 2011年 237 巻 6号 683-687 頁

〔その他〕

ホームページ

<http://www.naramed-u.ac.jp/~amrc-lab2/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中川 修 (NAKAGAWA OSAMU)
奈良県立医科大学 先端医学研究機構
生命システム医科学分野
循環器システム医科学研究室 教授
研究者番号：40283593

(2) 分担研究者

なし

(3) 連携研究者

林 寿来 (HAYASHI HISAKI)
奈良県立医科大学 先端医学研究機構
生命システム医科学分野
循環器システム医科学研究室 助教
研究者番号：30533715

坂部 正英 (SAKABE MASAHIDE)
奈良県立医科大学 先端医学研究機構
生命システム医科学分野
循環器システム医科学研究室 助教
研究者番号：00525983