

令和 5 年 6 月 30 日現在

機関番号：18001

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21385

研究課題名（和文）拡張型心筋症で変異が見られるスプライシング制御因子RBM20の機能の解明

研究課題名（英文）Functional Analysis of RBM20 Whose Mutation Causes Dilated Cardiomyopathy

研究代表者

黒柳 秀人（KUROYANAGI, Hidehito）

琉球大学・医学（系）研究科（研究院）・教授

研究者番号：30323702

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：拡張型心筋症は、心筋収縮不全と心室内腔の拡張を特徴とする難病である。本研究では、DCM患者の約2%で見つかるRBM20遺伝子の変異が特定のアミノ酸に集中していることに着目し、これらの変異は単なる機能喪失型ではなく機能獲得変異であることをRbm20ノックアウトマウスと患者型変異を模したノックインマウスの作製により明らかにし、このノックインマウスが拡張型心筋症の有用な疾患モデル動物であることを論文として発表した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DCMは、多くの原因遺伝子が報告されているものの、現時点では心移植以外の有効な治療法がない難病である。RBM20遺伝子が原因のDCMは若年期から発症して特に重症であることが知られている。しかし、Rbm20の機能喪失変異マウスでは病態が再現しないことから、病態発現機構は不明であった。本研究では、患者に見られる一アミノ酸置換変異を導入したことで病態を再現できることを明らかにし、このDCMモデル動物は、今後のDCMの病態発現機構の解明や治療法の開発などに幅広く利用できると期待される。

研究成果の概要（英文）：Dilated cardiomyopathy (DCM) is characterized by left ventricular dilatation and systolic dysfunction. We found that mutations in the RBM20 gene, one of the causal genes of DCM, are gain-of-function and not mere loss-of-function mutations by generating and characterizing Rbm20 knock-out and knock-in mice. The Rbm20 knock-in mice we generated in this study turned out to be a good animal model for DCM mimicking various aspects of DCM symptoms in human patients with RBM20 mutations.

研究分野：分子細胞生物学、疾患生命科学

キーワード：拡張型心筋症 mRNA前駆体 選択的スプライシング ノックインマウス 長リード次世代シーケンサー RNA結合タンパク質

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

拡張型心筋症は、心筋収縮不全と心室内腔の拡張を特徴とし、根本的治療が心移植しかない難病である。本研究で解析する RBM20 は、家族性拡張型心筋症の家系解析により原因遺伝子として同定され、後に *TTN* 遺伝子など筋収縮関連遺伝子の mRNA 前駆体の心筋特異的選択的スプライシングを制御することが明らかにされた。代表者らは、*Rbm20* ノックアウトマウスと拡張型心筋症患者の変異を模した *Rbm20* ノックインマウスを作製し、ノックインマウスのみが若齢から収縮機能の著明な低下を呈することを見出している。

2. 研究の目的

本研究では、RBM20 が心筋で *TTN* 遺伝子の 160 個以上もの連続するエクソンのスプライシングを抑制する分子基盤を明らかにすること、および *Rbm20* ノックインマウスにおける変異型 RBM20 の獲得機能と心筋症様病態発現機構を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

1) タイチンの全長 mRNA の配列解析。*Rbm20* ノックインおよびノックアウトマウスのヘテロ接合体では N2BA 型タイチンが主となる。長い RNA を濃縮する方法を検討した上で長リードの次世代シーケンサーを利用して全長 *Ttn* mRNA をシーケンス解析する方法を確立し、N2BA 型タイチンのエクソン構成の多様性の全容を明らかにする。

2) RBM20 による *TTN* 遺伝子のスプライシング抑制を再現する実験系の構築。RBM20 が局在する構造体は長鎖非コード RNA を足場として液-液相分離により形成される核内構造体を想起させる。RBM20 の機能においても構造体の形成が重要であると想定されることから、培養細胞レベルでそれを検証する実験系が必要となる。*Ttn* 遺伝子の連続する複数のエクソンのスプライシングをモニターできるレポータミニ遺伝子を作製し、野生型 RBM20 を発現させることで、内在性の *TTN* 遺伝子と同様の RBM20 発現量依存的な選択的スプライシング制御ができるか検証する。確認ができたなら、RBM20 の各ドメインを欠失した変異型を用いて *Ttn* 遺伝子座への局在とスプライシング抑制に必要なドメインを特定する。前項の *Ttn* 全長 mRNA のエクソン構成情報と塩基配列の進化的保存性を基に *Ttn* 遺伝子の領域候補を欠失させ、RBM20 が核内構造体を形成するための足場として必要な領域を特定する。

3) *Rbm20* ノックインマウスの変異型 RBM20 に結合するタンパク質と RNA の網羅的同定。ノックインマウスの心筋で変異型 RBM20 に特異的に結合する RNA を架橋-免疫沈降法と RNA-seq 解析を組み合わせる網羅的に同定する。同定された RNA の細胞内局在を *in situ* ハイブリダイゼーションで検証し、安定性と翻訳率への影響を明らかにするために心臓の RNA-seq 解析とリボソームプロファイリングを行う。また、変異型 RBM20 と免疫共沈するタンパク質も質量分析により網羅的に同定し、免疫染色で *Rbm20S637A* マウス心筋細胞での局在を検証する。*TTN* 遺伝子の足場領域 RNA に結合するタンパク質をプルダウンで精製し質量分析で同定する。

4) 遺伝子組換えマウスの作製による RBM20 の機能および拡張型心筋症様表現型との関連の検証。方法 1) ~ 3) により RBM20 の局在に関わるドメイン、共存タンパク質、*TTN* 遺伝子領域、変異型 RBM20 の標的候補 RNA を特定したら、生体でのこれらの機能をゲノム編集マウスで検証する。

4. 研究成果

2020 年度は、*Rbm20* ノックアウトマウスと患者型変異ノックインマウスの表現型解析を行い、いずれも *Ttn* 遺伝子の心筋特異的スプライシング制御が失われていることから機能欠損であることを見出した。一方で、ノックインマウスのみが、心機能の低下と心室腔の拡大、致死的な不整脈など、ヒトの患者と同様の重篤な症状を示すことを明らかにして論文に発表した。また、ノックインマウスにおける変異型 RBM20 が機能獲得変異と考えられることから、その細胞内局在を解析し、心筋細胞の細胞質に顆粒状の構造に存在していることを明らかにした。これらの研究成果は、作製した *Rbm20* ノックインマウスが患者の拡張型心筋症の症状をよく再現する優れたモデル動物であることを示しており、病態発現機構の解明に向けた今後の研究の進展が期待される。

一方、*Ttn* mRNA については、RBM20 ノックアウトやノックインのヘテロ接合体でも中程度にスプライシング異常が見られたことから、RBM20 のタンパク質の量に依存する標的エクソンと、半量でも十分制御可能な標的エクソンに分類されることが想定された。そこで、ノックアウトおよびノックインのホモ接合体およびヘテロ接合体における *Ttn* mRNA の配列レパートリーを精度よく明らかにする必要性があり、そのための手段として全長 *Ttn* mRNA を複数の断片に分けて RT-PCR により増幅するための条件検討を行った。そして、予備実験としてノックインのヘテロ接合体から作製したライブラリについて、長リードシーケンサーによる配列解析を進めた。

2021 年度は、*Rbm20* ノックアウトマウスでは拡張型心筋症様の表現型が現れず、患者型変異の

S637A ノックインマウスでのみ表現型が現れることの原因として、RBM20(S637A)変異型タンパク質が細胞質で形成する顆粒状構造が関与する可能性について検討するため、核移行シグナルとして必須である RSRSP 配列以外で報告された家族性拡張型心筋症の変異が RBM20 の核局在と *Ttn* レポーターのスプライシング制御に与える影響を解析した。その結果、この変異は培養細胞での核局在には影響しないにも拘わらず、スプライシング制御能が有意に低下することがわかった。したがって、この変異は変異型 RBM20 の細胞質顆粒を形成せずとも拡張型心筋症を引き起こしている可能性が高くなったことから、新たにこのノックインマウスを作製し、遺伝子型解析によりデザインどおりに一塩基置換のノックインマウスが作製できていることを確認した。

長リード次世代シーケンサーによる *Ttn* mRNA の配列解析については、直接 RNA シーケンス解析、直接 cDNA シーケンス解析、長鎖 PCR 産物のシーケンス解析の 3 つの方法を比較した結果、現時点では長鎖 PCR 産物が現実的であると判断した。

2022 年度は、1) *Rbm20* ノックアウトマウスおよびノックインマウスの *Ttn* mRNA を長鎖 PCR 法で増幅して長リード次世代シーケンサーでシーケンシング解析した。ヘテロ接合体では、これまでの論文で予測されていたとおり、さまざまなパターンの N2BA 型が発現していることを確認できた。ヘテロ接合体では、これまでの論文で予測されていたとおり、さまざまなパターンの N2BA 型が発現していること、ホモ接合体ではエクソン 51-100 のすべてのエクソンが包含されていることを確認できた。

2) RBM20 遺伝子変異によるヒト拡張型心筋症で、核移行シグナルとして必須である RSRSP 配列以外で報告された家族性拡張型心筋症の変異が RBM20 の核局在と *Ttn* レポーターのスプライシング制御に与える影響を解析した。その結果、この変異は培養細胞での核局在には影響しないにも拘わらず、スプライシング制御能が有意に低下していた。そこで、新たにこの変異のノックインマウスを作製したところ、個体レベルでは、*Ldb3* 遺伝子や *Camk2d* 遺伝子の心筋特異的スプライシングへの影響は S637A マウスやノックアウトマウスと同程度であったが、*Ttn* 遺伝子では予想に反して一部のエクソンのスプライシング異常に影響がとどまっており、標的遺伝子によってこの変異の影響が異なることが明らかとなった。

3) RBM20 が *Ttn* 遺伝子の連続したエクソンを効率よく抑制する分子機構、さらに、ヘテロノックアウトで全く影響を受けないエクソン群と大きく影響を受けるエクソン群が存在する理由を明らかにするために、ヘテロマウスで異なる挙動を示すエクソン群を用いて RBM20 のスプライシング抑制活性をモニターするためのレポーターミニ遺伝子を作製した。

4) 抗 RBM20 抗体を用いて内在性 RBM20 を染色したり免疫沈降したりする条件の検討を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ihara Kensuke, Sasano Tetsuo, Hiraoka Yuichi, Togo-Ohno Marina, Soejima Yurie, Sawabe Motoji, Tsuchiya Megumi, Ogawa Hidesato, Furukawa Tetsushi, Kuroyanagi Hidehito	4. 巻 10
2. 論文標題 A missense mutation in the RSRSP stretch of Rbm20 causes dilated cardiomyopathy and atrial fibrillation in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 17894
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-74800-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Schneider Jay W., Wanek Program Preclinical Pipeline, Oommen Saji, Qureshi Muhammad Y., Goetsch Sean C., Pease David R., Sundsbak Rhianna S., Guo Wei, Sun Mingming, Sun Han, Kuroyanagi Hidehitoほか	4. 巻 26
2. 論文標題 Dysregulated ribonucleoprotein granules promote cardiomyopathy in RBM20 gene-edited pigs	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Medicine	6. 最初と最後の頁 1788 ~ 1800
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41591-020-1087-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Yamamoto Takuma, Sano Rie, Miura Aya, Imasaka Mai, Naito Yoshiro, Nishiguchi Minori, Ihara Kensuke, Otani Naruhito, Kominato Yoshihiko, Ohmuraya Masaki, Kuroyanagi Hidehito, Nishio Hajime	4. 巻 100
2. 論文標題 I536T variant of RBM20 affects splicing of cardiac structural proteins that are causative for developing dilated cardiomyopathy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Molecular Medicine	6. 最初と最後の頁 1741 ~ 1754
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00109-022-02262-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計1件

1. 著者名 日本遺伝学会	4. 発行年 2022年
2. 出版社 丸善出版	5. 総ページ数 690
3. 書名 遺伝学の百科事典	

〔産業財産権〕

〔その他〕

国立大学法人 琉球大学 大学院 医学研究科 生化学講座 研究内容 http://biochem.med.u-ryukyu.ac.jp/research/detail/122 プレス通知資料「変異型タンパク質の細胞質への蓄積が拡張型心筋症を重症化する」 https://www.tmd.ac.jp/archive-tmdu/kouhou/20201027-1.pdf
--

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------