

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 20 日現在

機関番号：84404

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659179

研究課題名（和文）心臓病の増悪を防止する機能分子としての β B1-クリスタリンの新たな役割の解明研究課題名（英文）Study on β B1-crystallin and Heart

研究代表者

阪本 英二 (SAKAMOTO AIJI)

独立行政法人国立循環器病研究センター・研究所・室長

研究者番号：40291067

研究成果の概要（和文）：我々は、突然変異ハムスターを活用することで、疾患の発症・進展に関わる意外な分子メカニズムの発見を目指している。本研究においては、心臓肥大が著明な BI014.6 心筋症ハムスターでは β B1-クリスタリン遺伝子に点突然変異が存在し、当該タンパク質が水晶体のみでなく心筋でも欠損することを明らかにした。さらに、BI014.6 を正常ハムスターと交配させることで、新たに β B1-クリスタリンのみを欠損するハムスターを作出した。本研究は、これまでは水晶体特異的タンパク質と考えられてきた β B1-クリスタリンが、心臓の機能維持において果たす役割を解明するための基礎となるであろう。

研究成果の概要（英文）：We are aiming to find unexpected molecular mechanisms underlying various diseases by using natural mutant hamsters. In this study, we found that BI014.6 cardiomyopathic hamster had a point mutation in β B1-crystallin gene, causing the loss of its protein product in the heart. Furthermore, we created a new hamster line lacking β B1-crystallin protein by crossing normal and BI014.6 hamsters. This study will set a basis to elucidate the cardiac roles of β B1-crystallin, which has been recognized as a lens-specific protein so far.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：心臓病

1. 研究開始当初の背景

(1) 心臓の正常な拍動には様々な分子が関わっており、それら分子の機能解明は心臓病の克服に必要不可欠である。これまでに、心機能調節に重要な役割を果たす分子が多数同定されてきている。特にノックアウトマウスなど発生工学を用いた手法は特定分子の生体内機能を解明する有力な手段であり、様々な分子の生体内における機能の解明に貢献してきた。しかし、特定臓器における未知の疾患関連分子の探索を試みようとする

場合、その切り口を論理的に見つけることは難しい。こうした難局を打開する活路の一つとして、我々は突然変異疾患モデル動物に着目した。心臓病の場合、心筋症ハムスターがよく知られているが、実はそれには心筋肥大の著明な BI014.6 と心筋拡張の著明な T0-2 など表現型や重症度の異なる亜系統が存在する。

(2) 我々はこれまでに、全ての心筋症ハムスターに共通する遺伝的原因として、約 30 kb

の染色体領域の欠失を見出している。正常の当該ゲノム領域にはジストロフィン結合タンパク質の一つである δ -サルコグリカン遺伝子のプロモーターが存在しており、それゆえ、心筋症ハムスターでは δ -サルコグリカンの転写ならびに翻訳産物が欠損する。その結果、心筋形質膜を安定化させる機能を有するジストロフィン結合タンパク質複合体の2次的崩壊、ひいては心筋細胞の変性に至ることを明らかにした。

(3) では、なぜBI014.6では他の心筋症ハムスターに比べて心肥大が著明なのであろうか。我々は、BI014.6には δ -サルコグリカン以外にも別の遺伝子異常が存在するのではないかと考え、その探索を続けてきた。その解決の糸口は、意外なところから現れた。

(4) 我々は数多くの心筋症ハムスターの個体を観察する過程で、BI014.6のみが高頻度に白内障を伴うことに気がついた。そして、水晶体のタンパク質を解析することで、BI014.6の水晶体では β B1-クリスタリン分子が欠損していることを見出した。その後、 β B1-クリスタリンは正常では心筋でも発現しており、BI014.6では水晶体のみでなく心臓でも欠損しているのではないかとの思いが頭をよぎった。そして実際に調べてみると、その予想は正しかった。これが、本研究に着手するきっかけである。

2. 研究の目的

(1) 心臓における β B1-クリスタリンの機能を解析するためには、それが単独で欠損する実験モデル動物が必要である。これまでに、そのようなノックアウトマウスは存在しない。また、BI014.6は、 β B1-クリスタリンのみでなく δ -サルコグリカンも欠損するため、 β B1-クリスタリン単独の機能を調べるには不向きである。そこで、BI014.6を正常ハムスターと交配させることで、目的とする β B1-クリスタリン単独ハムスターを作出しなければならない。

ハムスターは、マウスやラットと異なり、キャニバリズムが激しい。すなわち、理由はよく分らないが、母親が胎児を容易に食殺してしまうのである。それゆえ、ハムスターの交配ならびに系統維持は、非常に難しいことが予想される。しかし、 β B1-クリスタリンの心臓機能というフロンティアを開拓するためには、 β B1-クリスタリン単独ハムスターを作出しなければならない。これはやり遂げなければならないミッションであり、

挑戦的萌芽研究という名に相応しいと考えた。

(2) 本研究で作出する β B1-クリスタリン単独欠損ハムスターを今後の心臓病研究の確かな基盤とするためには、その遺伝子異常の詳細も明らかにすべきと考えた。我々は予備実験において、BI014.6で β B1-クリスタリンのタンパク質が欠損するのは、そのmRNAのスプライシング異常に原因があることを明らかにしていた。しかし、そのゲノムにおける変異の詳細については全く分かっていなかった。そこで、本研究では、BI014.6における β B1-クリスタリンのゲノム変異を同定し、さらに、それがどのようなメカニズムでmRNAのスプライシング異常を引き起こすのかを明らかにすることにした。

3. 研究の方法

(1) BI014.6と正常ハムスターとの交配：BI014.6と正常ハムスターは δ -サルコグリカン遺伝子と β B1-クリスタリン遺伝子に関して異常ホモ(-/-, -/-)と正常ホモ(+/, +/)であり、次の第1世代は全例でヘテロ(+/-, +/-)になる。第2世代で δ -サルコグリカンが(+/)になる確率は1/4、かつ β B1-クリスタリンが(-/-)になる確率は $1/4 \times 1/4 = 1/16$ 、それが♂あるいは♀である確率は $1/16 \times 1/2 = 1/32$ である。この♂と♀を交配させた第3世代は、全例で(+/, -/-)になる。例えば、最初に8組交配すると、ハムスターの平均産児数を6匹(♂♀3組)とすると、第2世代では生まれる144匹(=8組 \times 3組 \times 6匹)の1/32、つまり目的とする♂と♀がそれぞれ4~5匹ずつ得られることが期待される。

各個体の遺伝子型は、ゲノムのPCRで決定する。尚、ハムスターにはマウスやラットと異なり尾が無いため、遺伝子診断に必要なゲノムは耳介から抽出する。

(2) BI014.6における β B1-クリスタリンの遺伝子変異の解明：我々は予備実験において、正常ハムスターの β B1-クリスタリンに対応するcDNAとゲノムをクローニングし、正常ハムスターの β B1-クリスタリン遺伝子は6つのエクソンから構成されていることを明らかにしている。さらに、BI014.6では第1エクソンと第4エクソンがスプライスされた異常mRNAが主として存在していることも明らかにしている。このことから、BI014.6の β B1-クリスタリン遺伝子のスプライシング異常の原因となる遺伝子変異は、

そのイントロン1、2、3のどこかに潜んでいることが推測された。

そこでまず、BI014.6の β B1-クリスタリン遺伝子の第1エクソンから第4エクソンに至るゲノム領域をPCRで増幅して得る。その全塩基配列を決定し、当該正常配列と比較し、BI014.6における塩基変異を探索する。変異が見つかった場合には、それがmRNAのスプライシングにどのような影響を及ぼすかをエクソン・トラッピング実験によって検証する。具体的には、変異が見出されたイントロンと隣接するエクソンを含むゲノムをpSPL3ベクターにクローニングし、培養細胞にトランスフェクションする。培養細胞から抽出したRNAからcDNAを合成し、pSPL3ベクター内のエクソン配列に対応するプライマーセットでRT-PCRを行う。もし、pSPL3ベクターに組み込んだ β B1-クリスタリンの当該エクソンが正しくスプライシングされるならば、RT-PCRで増幅されるcDNAはその分だけベクター由来のものより大きくなるはずである。

4. 研究成果

(1) BI014.6と正常ハムスターとの交配：ハムスターの交配はキャニバリズムの問題もあり、単純計算通りには行かずに予想以上に苦しめられた。しかし、交配を第1世代、第2世代、第3世代と進めることで、 δ -サルコグリカン遺伝子が(+/+), β B1-クリスタリン遺伝子が(-/-)である個体、すなわち、 β B1-クリスタリン単独ハムスターを♂と♀共に数匹ずつ得ることができた。それらをさらに交配させることで、最終的に β B1-クリスタリン単独ハムスターを♂と♀共に数十匹ずつ得ることに成功した。

(2) BI014.6における β B1-クリスタリンの遺伝子変異の解明： β B1-クリスタリンの第3イントロンの開始部分(splice donor site)にGからAへの点突然変異を見出した。これは、いわゆるGT-AGルール(mRNAのスプライシングに関わるコンセンサス配列)を崩壊させるものである。

実際、エクソン・トラッピング実験を行ってみると、正常ハムスター由来の第3エクソンはスプライシングされたが、BI014.6由来の第3エクソンはスプライシングされなかった。

以上のことから、BI014.6の生体内で β B1-クリスタリン遺伝子が正常にスプライシングされなくなる遺伝的原因は、その第3イントロン開始部分におけるGからAへの点突然変異であると考えられた。

(3) その他の成果：ハムスターを交配させ

る合間を縫い、本研究に深く関連する重症心筋症ハムスターT0-2の分子病態の解明も進めた。以下に、その概略を記す。

我々は、T0-2では心室筋のT管とZ線の微細構造が崩壊することを見出した。Z線を構成するタンパク質をウエスタンブロットで調べたところ、T0-2では、加齢と共にデスミンが特異的に減少していた。そこで、デスミンのcDNAを単離してその塩基配列を調べたところ、T0-2のデスミンは191番目のアミノ酸がアラニンからスレオニンに変異していた。このアミノ酸の変異により、Cキナーゼによるリン酸化配列が生ずるが、実際のリン酸化は検出できなかった。また、当該アミノ酸が存在するコイル1ドメイン同士の結合にも差異は検出できなかった。しかし、正常と変異デスミンを中間系フィラメントの欠損株であるSW13細胞に発現させ、線維形成の程度を比較すると、T0-2のデスミンは線維を形成したが、正常に比べて細く、疎であることが分かった。

以上の知見から、T0-2のデスミン分子には、アラニンからスレオニンへのアミノ酸変異があることが分かった。デスミン分子は中間系フィラメントであるが、この点突然変異のために筋原線維のバンドリング能などが低下し、結果として心筋変性が促進されるものと考えられた。

(4) 総括：本研究により、 β B1-クリスタリン単独ハムスターという新しい疾患モデル動物を作出することができた。このモデル動物の誕生によって、心臓における β B1-クリスタリンの機能という医学のフロンティアを切り開くことが可能になった。

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計5件)

①

発表者：Aiji Sakamoto & Kageyoshi Ono
発表演題：Desmin A191T Mutation Aggravates delta-Sarcoglycan-Deficient Cardiomyopathy in T0-2 Hamster
学会名：American Heart Association Scientific Sessions 2011
発表年月日：2011年11月14日
発表場所：オーランド(米国)

②

発表者：阪本 英二
発表演題：Desmin A191T Point Mutation Aggravates delta-Sarcoglycan-Deficient Cardiomyopathy in T0-2 Hamster
学会名：第76回日本循環器学会学術集会

発表年月日：2012年3月18日
発表場所：福岡

③

発表者：Aiji Sakamoto
発表演題：CARDIOMYOPATHIC HAMSTERS:
DELTA-SARCOGLYCAN AND BEYOND
学会名：35th Annual Meeting of the Japanese
Working Group "Cardiac Structure and
Metabolism"
発表場所：東京

④

発表者：阪本英二、佐々木健、南野直人
発表演題：BI014.6 心筋症ハムスターにおけ
る水晶体変性と β B1 クリスタリン遺伝子に
おける点突然変異
学会名：第39回水晶体研究会
発表年月日：2013年1月12日
発表場所：東京

⑤

発表者：Aiji Sakamoto & Kageyoshi Ono
発表演題：T0-2 Hamster: Unique Animal
Model for Severe Cardiomyopathy
学会名：2nd Biotechnology World Congress
発表年月日：2013年2月19日
発表場所：ドバイ（アラブ首長国連邦）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阪本 英二 (SAKAMOTO AIJI)
独立行政法人国立循環器病研究センタ
ー・研究所・室長
研究者番号：40291067

(3) 連携研究者

小野 景義 (ONO KAGEYOSHI)
帝京大学・薬学部・教授
研究者番号：40177259