

平成 25 年 6 月 10 日現在

研究種目：研究活動スタート支援
研究期間：2011～2012
課題番号：23890256
研究課題名（和文） メダカを用いた筋原線維性ミオパチーの病因解明、および新規疾患モデルの作出
研究課題名（英文） Evaluation of pathogenicity of novel mutations and generation of disease model for myofibrillar myopathy by using transgenic medaka
研究代表者 大久 敬
(Satoshi Ohisa)
独立行政法人国立精神・神経医療研究センター
神経研究所疾病研究第一部 流動研究員
研究者番号：90610840

研究成果の概要（和文）：本邦における筋原線維性ミオパチー(MFM)患者に認められた新規の変異について、トランスジェニックメダカを作成し、その病因性を検討した。その結果、BAG3における新規変異を導入したトランスジェニックメダカにおいて、体の彎曲や、筋線維の大小不同、変異タンパク質およびZ線関連タンパク質の蓄積等のMFMの臨床病理学的特徴を再現すると思われる表現型を呈し、その病因性を確かめることができた。

研究成果の概要（英文）：We evaluated pathogenicity of novel mutations in Japanese cohort by using transgenic medaka. Mutated BAG3 transgenic medaka showed clinicopathological feature of MFM such as lateral curvature of body axis, variation in muscle fiber size, and accumulation of mutated protein and Z line associated proteins. These results suggest that novel mutation in BAG3 is causative for MFM.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
23年度	1300000	390000	1690000
24年度	1200000	360000	1560000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	2500000	750000	3250000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：神経内科学

キーワード：筋原線維性ミオパチー・トランスジェニックメダカ・BAG3

1. 研究開始当初の背景

筋原線維性ミオパチー(MFM)は、筋原線維配列の強い乱れを主病変とする筋疾患群で、筋細胞内におけるZ線タンパク質や繊維性タンパク質を始めとした、種々のタンパク質の蓄積（封入体の形成）を特徴とする。発症年齢は小児期から老年期までと幅広く、進行速

度や障害を受ける筋肉の分布も様々である。遺伝学的には、ヘテロジニアスな疾患であり、その多くは常染色体優性の遺伝形式である。現在までに、DES、CRYAB、ZASP、MYOT、FLNC、BAG3などの遺伝子の変異が、MFMを引き起こすことが報告されているが、まだ多くのMFMにおいて原因遺伝子は特定され

ておらず、その分子病態も十分に明らかになっていない。既報の原因遺伝子の多くはサルコメア Z 線関連タンパク質であることや、Z 線構造の乱れが認められることから、Z 線関連タンパク質と MFМ の発症との間には深い因果関係があると考えられる。我々は、本邦における MFМ の原因遺伝子を明らかにするため、MFМ 患者から得られた DNA サンプルについて、海外において既報のものも含め、Z 線関連遺伝子について網羅的なシーケンス解析を行った。その結果、複数の Z 線関連遺伝子において、患者特異的な、アミノ酸の変化を伴う新規の変異を見出した。優性の遺伝形式を示す疾患において変異の病因性を検討する上で、トランスジェニック動物は有用なツールである。本邦固有のモデル生物であるメダカは、小型で多産、体外受精することなどから、マウスなど胎生の生物と比較して容易にトランスジェニック動物を作成することが可能であり、体が透明であることから容易に筋線維の状態を観察することができるため、筋疾患の病因性の検討や、疾患モデルとして有用であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、MFМ 患者に認められたヘテロ変異が、実際に MFМ の病態を引き起こしているか確認すること、および MFМ 病態モデル生物の作成を目的として、正常の遺伝子型（以降、野生型とする）と、MFМ 患者で認められた遺伝子型（以降、変異型とする）を導入したトランスジェニックメダカを作成し、変異型導入体で MFМ の病態を再現できるかを検討することとした。

3. 研究の方法

(1) コンストラクトの作成

骨格筋特異的に、ヒト変異型および野生型の候遺伝子を発現することを目的として、骨格筋特異的な遺伝子である α -actin の発現制御領域をメダカゲノムから単離した。さらにヒト cDNA から野生型候補遺伝子を単離した後、PCR ミュータジェネシスにより、変異型候補遺伝子を得た。それぞれの候補遺伝子の C 末端には EGFP をコードする配列を付加した。以上のフラグメントを連結した PBSKI2 ベクターにサブクローニングした。

(2) メダカ卵へのマイクロインジェクション

(1) で作成したコンストラクトを精製後、終濃度 10ng~40ng に調整し、PBSKI2 ベクター内の特異的な配列を切断する酵素である IsceI で処理した後、1~2 細胞期のメダカ卵細胞質へ顕微鏡下でマイクロインジェクションした。

(3) トランスジェニック系統の樹立

マイクロインジェクションを行った個体のうち、EGFP 陽性の個体を実態蛍光顕微鏡下でスクリーニングした。性成熟後、野生型メダカとの交配を行い、骨格筋特異的に EGFP を発現する個体をスクリーニングした。

(4) 実態顕微鏡による観察

得られたトランスジェニックメダカを、実態顕微鏡下で観察し、外見的变化、運動能の有無等を調べた。

(5) 共焦点顕微鏡による解析

共焦点顕微鏡を用いた観察を行い、筋線維の配向や、MFМ の特徴である筋線維内でのタンパク質の蓄積が認められるかを調べた。

(6) 組織学的解析

凍結切片を作成し、ヘマトキシリン・エオジンやゴモリトリクローム変法による染色を行った。

(7) 単筋線維を用いた抗体染色

トランスジェニックメダカをコラゲナーゼ処理することにより、単一の筋線維を得た後、4%パラホルムアルデヒドで固定し、Z 線関連タンパク質を始めとした各種抗体染色を行った。

(8) 透過型電子顕微鏡による解析

トランスジェニックメダカを 2%グルタルアルデヒド 2.5%パラホルムアルデヒド溶液で固定後、エポン樹脂包埋し、超薄切片を作成後、透過型電子顕微鏡による観察を行った。

4. 研究成果

MFМ 患者において変異が認められた BAG3、MYOZENIN3、TCAP、MURF1、MURF3 等各種 Z 線関連遺伝子について、トランスジェニックメダカを作成した。そのうち、BAG3 において 780 番目から 794 番目までの塩基を欠失した (c. 780-c. 794del) 変異型を導入したトランスジェニックメダカについて、MFМ の臨床病理学的な特徴を再現することができた。変異型 BAG3 を導入したトランスジェニックメダカにおいては、顕著な体の彎曲が認められ、それに伴い、運動能が失われていた (図 1)。

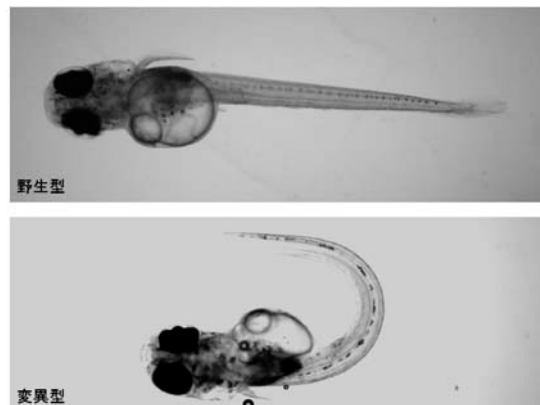


図 1: 変異型 BAG3 のトランスジェニックメダカは体の彎曲を示した。

当該魚の凍結切片のゴモリトリクローム染色の結果、顕著な萎縮を伴う筋線維の大小不同が認められ、筋線維間に間隙が生じており(図 2)、ヒトにおけるミオパチーに対応する表現型を呈していると考えられた。

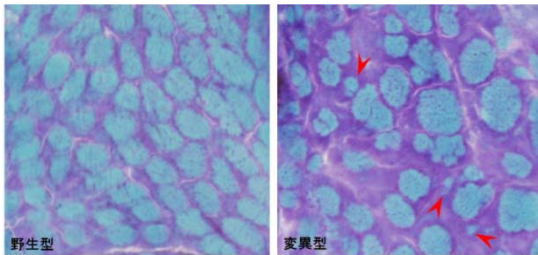


図 2: 変異型 BAG3 トランスジェニックメダカでは、顕著な萎縮(矢頭)を伴う筋線維の大小不同が認められた。

共焦点顕微鏡による観察を行った結果、野生型 BAG3 は Z 線周辺と思われる横紋様の局在を示した。一方、変異型 BAG3 は横紋様の局在を示したものの、一部の筋線維内での蓄積が認められた(図 3)。また筋線維の配向にも乱れが認められた。

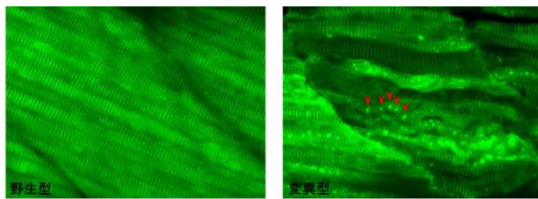


図 3: 変異型 BAG3 は筋線維内での蓄積(矢頭)が認められた。

単筋線維を用いた抗体染色を行った結果、筋線維内で認められた BAG3 の蓄積は filamin C や desmin などの Z 線関連タンパク質と共局在しており、MFM で認められる細胞内封入体の特徴を有していた(図 4)。

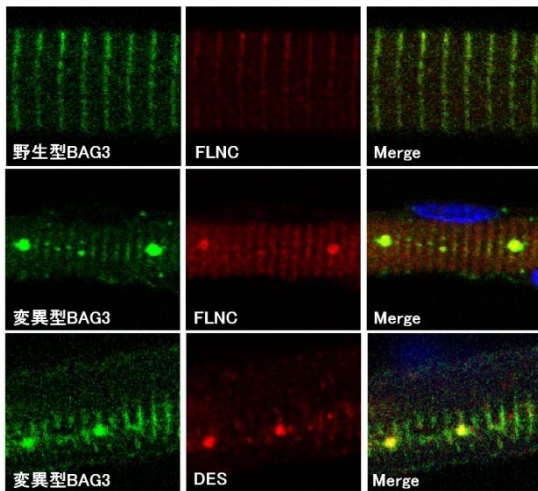


図 4: 変異型 BAG3 は筋線維内で filaminC や desmin などの Z 線関連タンパク質と共に蓄積していた。

また、野生型および変異型 BAG3 それぞれのトランスジェニックメダカの電子顕微鏡観察を行った結果、変異型トランスジェニックメダカにおいて、Z 線の拡張を伴う構造異常が認められた(図 5)。

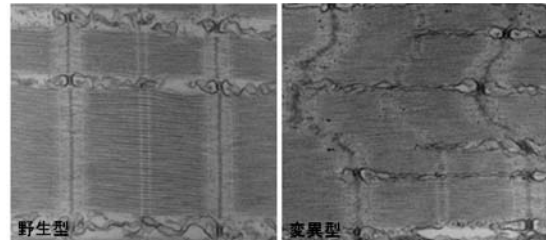


図 5: 変異型 BAG3 のトランスジェニックメダカでは、Z 線の拡張を伴う構造異常が認められた。

本研究で得られた c. 780-c. 794del 変異型トランスジェニックメダカが示した、体の彎曲や運動能の低下等の表現型は MFM の臨床的特徴を再現していると考えられ、さらに筋線維の萎縮を伴う大小不同、変異型 BAG3 および Z 線関連タンパク質の筋線維内蓄積、Z 線の構造異常等の表現型は MFM の病理学的所見を再現していると考えられる。以上のことから、c. 780-c. 794del の変異は MFM の責任変異であると考えられる。遺伝子変異の生体における機能を調べる上でトランスジェニック動物は強力なツールであるが、マウスなどの胎生の動物での作成は、飼育スペースや個体数の確保、実験的技術などの点から、多数の変異遺伝子の病因性の検定を行うのは困難である。本研究では、多産かつ体外受精のメダカを用いることで、多くの候補遺伝子について個体レベルでの変異タンパク質の影響を検討することができた。トランスジェニックメダカは、MFM のみではなく多くの優性変異型の筋疾患において、変異の病因性の検定や病態モデルとして有用であると考えられる。今後、病態モデルとして、疾患の分子病態の解明や、薬剤スクリーニング等治療法開発の分野に応用可能であると考えている。

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)

[学会発表] (計 1 件)

発表者: 大久 敬

発表標題: Evaluation of pathogenicity of a novel BAG3 mutation by using transgenic medaka

学会名: The 17th International Congress of
the World Muscle Society

発表年月日: 2012年10月09日～2012年10
月13日

発表場所: Perth Convention Exhibition
Centre(オーストラリア)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大久 敬 (Satoshi Ohisa)

研究者番号: 90610840

研究機関: 独立行政法人国立精神・神経医療
研究センター・神経研究所

部局: 疾病研究第一部

職名: 流動研究員