

平成 28 年 6 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：2013～2015

課題番号：25670171

研究課題名(和文)心筋細胞における筋原線維の同期的収縮を支えるT管の分子機構の解明

研究課題名(英文)Genetic analysis of molecular networks supporting cardiac T-tubules

研究代表者

阪本 英二 (Sakamoto, Eiji)

国立研究開発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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：心筋のT管は筋形質膜表面に生じた電気的興奮を瞬時に内部へ伝え、全ての筋原線維の収縮を同時に誘発させる。我々は、T管を支持する分子群を解明するために、心筋症ハムスターT0-2に着目した。

本研究では、T0-2ハムスターでは心室筋のZ線とT管が崩壊し、ジストロフィン結合タンパク質である δ -サルコグリカンの欠損と中間径フィラメントであるデスミンのアミノ点変異(Ala191Thr)が存在することを明らかにした。さらに正常心筋においてデスミンは δ -サルコグリカンと架橋し、T管の安定性に寄与していることも明らかにした。本研究で得られた知見は、心臓病治療に対する新たな戦略的視点を与えるものである。

研究成果の概要(英文)：We aimed to genetically elucidate the molecular basis of cardiac T-tubules. For this purpose, we used unique spontaneous mutant hamster of T0-2 manifesting severe dilated cardiomyopathy (CM). It derives from BIO14.6 and both strains share the chromosomal deletion to lack delta-sarcoglycan, a member of dystrophin-associated proteins. A series of morphological, biochemical and molecular biological studies led us to find that T0-2 has an additional genetic mutation in desmin, an intermediate filament protein connecting with dystrophin. We further elucidated that this desmin Ala191Thr point mutation weakened the filament formation of desmin protein, leading to fragility of myofibrils and T-tubules. These facts showed that the T-tubular disruption leading to severe CM in T0-2 is caused by mutations of two closely related proteins, delta-sarcoglycan and desmin. The results of this study laid the foundation of further analysis for the whole molecular network supporting cardiac T-tubules.

研究分野：分子医学

キーワード：心筋細胞 T管 心臓病

1. 研究開始当初の背景

心臓が血液ポンプとして機能するためには、全ての心筋細胞の電氣的興奮が同期することに加え、個々の心筋細胞内部に無数に存在する筋原線維の収縮も同期することが重要である。

心筋細胞には形質膜が内部に陥入したT管という膜構造が存在する。T管は、形質膜表面に生じた電氣的興奮を瞬時に内部へ伝え、全ての筋原線維の収縮を同時に誘発させると考えられている。また近年、単離心筋細胞のT管を薬物処理で非特異的に破壊すると、電気刺激で誘発される細胞内部の電位上昇は膜直下に比べ内部では有意に遅延することが実証されつつある。しかし、心筋におけるT管とZ線の架橋分子機構に関する報告はあまりなく、その解明は心臓病治療に対する新たな戦略的見地からも極めて重要と考えられている。

心臓の難病である心筋症は心筋の変性を特徴とするが、そこには細胞骨格タンパク質の異常が深く関わっている。これまでに、様々な細胞骨格分子をノックアウトした心筋症マウスが作成されているが、いずれもT管構造はよく保たれている。このことは、T管とZ線の架橋には複数の分子が相互補完的に関与していることを強く示唆する。

一方で、突然変異動物である心筋症ハムスターには重症度の異なる亜系統が存在し、その共通の遺伝的原因がジストロフィン結合タンパク質である β -サルコグリカンの欠損であることを我々は先に明らかにした。我々はさらに、その中でもT0-2ハムスターは他のBI014.6ハムスターなどより重症であり、しかも心室全体の収縮が時として空間的に不均一になることを見出していた。こうした事実から、T0-2にはSGに加え第2の遺伝子異常が存在し、それを解明できれば心筋のT管を支持する分子構築の解明に向けた手掛かりが得られるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究は、心筋細胞内の電氣的収縮を同期させるT管が、筋形質膜から陥入して筋原線維のZ線へ架橋され、その破綻が心臓病に及ぼす影響を明らかにすることである。

3. 研究の方法

心筋におけるT管の微細構造を調べるために、正常ならびにT0-2、BI014.6ハムスターの左心室筋を透過型電子顕微鏡で観察した。T0-2の心筋において特異的に減少するZ線結合タンパク質があるかを調べるために、正常ならびにT0-2、BI014.6ハムスターの左心室筋でイムノプロットを行った。正常ハムスターのデスミンcDNAを単離し、塩基配列を決定した。その配列を基にプライマーをデザインし、T0-2、BI014.6ハムスターのデスミンcDNAの塩基配列を決定した。正常ならびにT0-2ハムスターのデスミンcDNAをSW13細胞

に発現させ、その線維形成状態を蛍光免疫染色で観察した。さらに、心室筋における β -サルコグリカンの局在を免疫染色で観察した。

4. 研究成果

本研究では形態学、生化学、分子生物学手法を駆使することで、T0-2ハムスターには予想通り第2の遺伝子異常が存在し、それはZ線結合タンパク質であるデスミンの191番目のアミノ酸をアラニンからスレオニンに変える点突然変異(Ala191Thr)であることを明らかにした。さらに、正常心筋において、デスミン分子は β -サルコグリカンと架橋し、T管の安定性に寄与していることも明らかにした。以下に、詳細を述べる。

まず、透過型電子顕微鏡による観察から、T0-2の心室では、Z線とT管の微細構造が損傷されていることを見出した。次に、Z線に局在することが知られているタンパク質を対象とし、T0-2ハムスターの心筋において発現が低下あるいは消失するものをイムノプロットでスクリーニングした。その結果、中間径フィラメントであるデスミンは、T0-2ハムスターの加齢と共に減弱することを見出した。そして、T0-2ハムスター由来のデスミンcDNAの解析から、191番目のアミノ酸をアラニンからスレオニンに変える点突然変異(Ala191Thr)が存在することが分かった。

次に、正常あるいは変異デスミンcDNAを中間径フィラメント分子が発現してないSW13細胞にトランスフェクションし、発現したデスミン分子の線維形成状態を免疫染色で検討したところ、変異デスミンでも線維は形成するが正常に比べ明らかに脆弱であることが分かった。これらの結果から、Ala191Thrはデスミンのダイマー形成に必要なコイル-1ドメインに軽度の構造変化をもたらし、その結果、ダイマー形成ひいてはデスミン線維全体の形成に障害が生ずるものと考えられた。しかしながら、培養細胞に発現させた場合の繊維形成障害は軽微であり、この組織内と培養細胞内における変異デスミンの著しい挙動のギャップには、何か隠れた分子メカニズムがある筈と考えた。

一方、 β -サルコグリカンの心筋細胞内の局在を免疫染色で検討したところ、 β -サルコグリカンは正常ハムスターの心筋では従来報告されている筋形質膜に加えT管にも存在し、さらにZ線に接する部位でデスミンと共局在することが明らかになった。また、他の β -サルコグリカンも β -サルコグリカンと同様に、筋形質膜に加えてT管にも存在し、Z線上のデスミンと共局在することも明らかにした。このような結果に加え、デスミンはジストロフィン結合タンパク質群と結合するとの報告も考慮すると、正常心筋細胞においてはT管上に存在するいずれかのサルコグリカンの細胞内ドメインは、何らかの分子を介してZ線上のデスミンと結合し、

T 管の Z 線への架橋を支持するものと考えられる。心筋は骨格筋と異なり命ある限り収縮するため、心筋細胞中の様々なタンパク質は機械的負荷に曝され続ける。中でも筋原線維の結束点である Z 線への機械的負荷は大きく、それは加齢と共に蓄積していく。一方、T 管上の SG から Z 線上のデスミンへの分子架橋はこうした機械的負荷から T 管と Z 線を保護する可能性がある。このような分子架橋により、心筋細胞の筋形質膜が内部に陥入した T 管は、筋原線維の Z 線に架橋され、細胞表面の電気的興奮を内部に伝搬させ、筋原線維の同期的収縮を可能にするものと考えられる。

本研究は、その架橋分子構造の一端を世界に先駆けて明らかにした。そして、重症な心筋症を呈する T02 ハムスターでは、偶然にもこの架橋の両端に位置する サルコグリカンとデスミンの遺伝子変異が共存し、それが T 管の破壊さらに心臓の非同期的収縮に至ることが明らかになった。本研究を通して T 管と Z 線の分子架橋に関して得られた知見は、心臓病治療に対する新たな戦略的視点を与えるものである。

最後に本研究の意味をより広い見地で考えてみたい。疾患の分子病態を解明するアプローチのひとつとして、実験動物モデルの活用が挙げられる。ノックアウトマウスは、特定遺伝子の生体内における機能を解析する上で極めて有用である。それに対し、なんらかの原因で遺伝子変異が偶然に起きた突然変異動物は、意外な生体調節機構の発見をもたらすことがある。例えば、体節を調節するホメオボックス遺伝子は、ショウジョウバエの突然変異体の解析によって発見された。近年、この古典的とも言える突然変異動物の有用性が再認識され、ニトロソウレアを用いた突然変異マウス作成の大規模なプロジェクトが推進されつつある。今回の研究で心筋の T 管を支える分子機構の一端が明らかになったのは、T02 ハムスターでは -サルコグリカンとデスミンという相互関連するタンパク質の双方に突然変異が起きたという偶然のお蔭と言えるかもしれない。今後も突然変異の疾患モデル動物を用いた研究から、医学上の様々な発見がもたらされ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 0 件)

[学会発表](計 4 件)

1. Aiji SAKAMOTO, Kageyoshi ONO

Molecular Mechanisms Aggravating Hereditary Cardiomyopathy in T02 Hamster
第 36 回心筋代謝研究会

2013. 7.13 ~ 14、東京

2. Aiji SAKAMOTO, Kageyoshi ONO

Hamster model for severe cardiomyopathy caused by double natural mutations

Mip-Tec: Leading European Event for Drug Discovery

2013.9.24 ~ 26、Basel, Switzerland

3. Aiji SAKAMOTO, Kageyoshi ONO

T0-2 hamster: Unique rodent model for severe cardiomyopathy caused by double natural mutations

17th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology

2014.7.13 ~ 18、Cape Town, South Africa

4. Aiji SAKAMOTO, Kageyoshi ONO

Spontaneous mutations occurring on the two closely interactive proteins, delta-sarcoglycan and desmin, lead to severe dilated cardiomyopathy in T0-2 hamster

2015.12.4 ~ 6 Shanghai, People's Republic of China

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阪本 英二 (SAKAMOTO Eiji)
国立循環器病研究センター・研究所・室長
研究者番号：40291067

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(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