

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：34509

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670480

研究課題名(和文) 巨大ジストロフィン遺伝子に内在する非ジストロフィン遺伝子のクローニング

研究課題名(英文) Cloning of non-dystrophin transcript from the dystrophin gene

研究代表者

松尾 雅文 (Matsuo, Masafumi)

神戸学院大学・総合リハビリテーション学部・教授

研究者番号：10157266

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)：ジストロフィン遺伝子の中央部に独自のプロモーターと終止コドンをもつ転写産物の断片配列を入手し、その断片配列を手懸りとして転写産物の全長配列を明らかにした。得られたアミノ酸配列から抗体を作成し、ヒト各組織を免疫染色した。ヒト各種の組織でひろくこの抗体に反応するタンパクが発現していることが確認された。また、尿のタンパクをこの抗体を用いたウェスタンブロット法により解析したところ、この抗体に反応するタンパクが尿中に存在することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：A novel transcript from the central part of the dystrophin gene was cloned. From the elucidated amino acid sequence, an antibody was produced and used for immunostaining of human tissues. Immunoreactive materials were detected in several human tissues. Especially, immunoreactive material was identified in urine sample.

研究分野：内科系・臨床医学 小児科学

キーワード：ジストロフィン遺伝子 クローニング 内在遺伝子 ウェスタンブロット

1. 研究開始当初の背景

デュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)は、最も頻度が高い致死性の筋疾患で、骨格筋でのジストロフィンが欠損した進行性の筋萎縮を示す。DMDでは、精神発達遅滞あるいは早発性の心筋症などの非骨格筋症状を高頻度に合併する。そのため、非骨格筋症状の発症機序の解明は、世界中のDMD研究者に課された大きな課題となっている。申請者は、これまで400名以上のDMD症例でジストロフィン遺伝子異常を解析し、世界でも有数のジストロフィン遺伝子異常のデータベースを構築してきた。さらに、DMDの画期的治療法について世界で初めての成果を挙げた。この提唱した治療法を用いた私たち独自の治療法は、新聞報道されたように治験実施の方向へと進んでいる。こうしたこれまでの成果から、申請者はDMDの非骨格筋症状が、ジストロフィン遺伝子内のある特定領域に非ジストロフィン遺伝子を想定すると解明できることを着想した。さらに、この着想に基づいて非ジストロフィン遺伝子の転写産物の探索を行ったところ、想定遺伝子の存在を強く示唆する結果を得ている。

本研究は、ジストロフィン遺伝子に内在する非ジストロフィン遺伝子を明らかにするものである。これまでの申請者の予備的な検討により、非ジストロフィン遺伝子の存在を強く示唆するcDNA断片配列を得ることに成功している。本研究では、この断片を起点として非ジストロフィン遺伝子cDNAの全長を分子生物学的手法を駆使してクローニングする。さらに、その配列からコードされたタンパクのアミノ酸配列をもとに抗体を作成し、その抗体を用いてタンパクについて解析を進め、DMDの非骨格筋症状の発症機序の解明の手掛かりを得るものである。

2. 研究の目的

デュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)は、ジストロフィン遺伝子の異常による進行性の筋萎縮を特徴とするが、高頻度に非骨格筋症状を合併する。DMDにみられる非骨格筋症状の発症機序の解明は、世界の研究者に課された大きな課題となっている。申請者は、これまでに400名以上のDMD症例でジストロフィン遺伝子の解析を行ってきた。その結果を詳細に検討したところ、巨大なジストロフィン遺伝子内に非ジストロフィン遺伝子の存在を想定すると、先の課題が解決できることを着想した。さらに、想定した遺伝子の存在を強く示唆する予備的な検討結果を得ている。

本研究は、想定した非ジストロフィン遺伝子を世界で初めてクローニングする極めて挑戦性の高い研究である。このクローニングしたcDNA配列にコードされたタンパクについて、抗体の作成とその抗体を用いた組織免疫染色あるいはウェスタンブロット解析をおこなう。そして、DMDの非骨格筋症

状の発症機序解明の手掛かりを得るものである。

3. 研究の方法

本研究は、申請者がすでに断片配列を得ているジストロフィン遺伝子に内在する非ジストロフィン遺伝子の全cDNA配列を明らかにするものである。まず、入手している断片配列を起点として、RACE法を駆使してそのcDNAの全長を明らかにする。そして、その配列情報をもとに逆転写PCR法により発現組織を、そして抗体を用いたにより組織免疫染色とウェスタンブロット解析を行う。

1) 非ジストロフィン遺伝子の全長cDNAのクローニング

これまでのDMD症例の詳細な解析結果と多数のジストロフィンmRNA解析結果からジストロフィン遺伝子の中央部に独自のプロモーターと終止コドンをもつmRNAの存在が強く示唆されている。また、その示唆に基づいて検討したところ、新しいmRNAの断片配列を入手している。そこで、この断片配列を手懸りとして転写産物の全長を明らかにする。

(1) 3' RACE (Rapid amplification of cDNA end) と 5' RACE

ヒト骨格筋由来mRNAを購入し、それをテンプレートとしてランダムプライマーを用いてcDNAを合成する。このDNAを用いて目的とする転写産物の全長を明らかにする。

まず、既得配列を起点として、3' RACEを実施する。3' RACE産物が得られるまで、プライマーの位置を様々な位置に変えて実施する。産物が得られた時にはその塩基配列を明らかにする。次いで、5' RACEを行う。産物が得られるまでプライマーの位置を順々に上流の位置に変えるなど繰り返し5' RACEを行う。そして、5' RACE産物を得、その塩基配列の同定を行う。こうして新規転写産物の5' 端を明らかにする。

(2) ジストロフィン遺伝子内での座位

確認された全長cDNAの配列とホモロジーのある配列をジストロフィン遺伝子内で探索する。そして、新規遺伝子は転写されてきた領域を同定する。同定した領域内の上流にプロモーター配列があることを確認し、実際の遺伝子であることを確認する。

2) 遺伝子発現組織の解析

新規遺伝子が発現するヒト組織を明らかにする。そのために、先に明らかにした塩基配列をもとに、ヒト各種組織から抽出したRNAを用いてその配列が増幅できるか否かを逆転写PCR法を用いて検討する。

(1) 骨格筋RNAでRT-PCR産物の同定

先に明らかにした全長配列の中から、極めて特異性の高い部分を選び、そこにプライマー設計してRT-PCRする。そして、まず骨格筋において新規転写産物が発現されていることを明らかにする。

(2) 組織分布の確定

ヒト各組織の抽出 RNA のパネルを購入し、それぞれをランダムプライマーを用いて cDNA 合成する。そして、PCR 増幅をおこない、その増幅産物の量から非ジストロフィン mRNA の発現の大きい組織を明らかにする。

3) 特異抗体の作成

cDNA の塩基配列にコードされたアミノ酸配列の中から特異性に優れた領域の配列を抽出する。抽出したアミノ酸配列に対応するペプチドを合成する。合成したペプチドをウサギに投与し、抗体を産生させる。産生された血清からペプチドカラムを用いて、精製抗体を得る。

4) 新規タンパクの組織免疫染色

先に得た精製抗体を用いてヒト組織の蛍光免疫染色を実施する。特にヒト組織のパラフィン包埋切片での染色について力点において免疫染色を確立する。ヒト組織の染色パターンを明らかにする。

5) ウェスタープロット解析

作成した抗体を用いて骨格筋などを用いてウェスタープロット解析を行う。

4. 研究成果

(1) 非ジストロフィン遺伝子の全長 cDNA のクローニング

これまでの DMD 症例の詳細な解析結果と多数のジストロフィン mRNA 解析結果からジストロフィン遺伝子の中央部に独自のプロモーターと終止コドンをもつ mRNA の存在が強く示唆されている。その示唆に基づき新しい mRNA の断片配列を入手し、その断片配列を手懸りとして転写産物の全長を明らかにした。明らかにした全長 cDNA は、一部ジストロフィンの配列と重なるが、3' 末端領域の配列が全く異なり非ジストロフィン遺伝子産物と確認された。さらに、ヒトの各組織由来の RNA を用いて、RT-PCR 法でその発現を検討した。その結果、RT-PCR 産物が組織特異的に得られ、この mRNA が組織特異的に発現していることが判明した。

(2) 新規 mRNA にコードされたタンパク解析

明らかにした塩基配列をもとに新規 cDNA にコードされたタンパクのアミノ酸配列を明らかにした。そして、このアミノ酸の配列中のジストロフィンとは異なる新規アミノ酸配列部位を特異的に認識する抗体の作製をはかった。新規配列中の抗原性の高い配列についてペプチドを合成し、それを免疫源としてウサギに投与したところ、特異的抗体と考えられる抗体の作製に成功した。

そして、得られた抗体を用いてヒト各組織を免疫染色した。ヒト各種の組織でひろくこの抗体に反応するタンパクが発現していることが確認された。

さらに、作成した抗体を用いてウェスタープロット解析を行ったところ、この抗体に特異的に反応するバンドが検出された。また、尿タンパクをこの抗体を用いたウェスタープロット法により解析したところ、この抗

体に反応するタンパクが尿中に存在することが明らかになった。そこで、この抗体に反応するタンパクについて、尿を試料としてさらなる解析を行っている。

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)

[雑誌論文](計 4 件)

Matsuo, M., Takeshigima, Y., Nishio, H, Contributions of Japanese patients to development of antisense therapy for DMD. Brain Dev in press, 査読有, 2015,

Matsuo, M., Investigational treatments and therapeutic targets in Becker muscular dystrophy. Expert Opin Orphan Drugs in press, 査読有, 2015,

Nishida, A., Minegishi, M., Takeuchi, A., Niba, E. T., Awano, H., Lee, T., Iijima, K., Takeshima, Y., Matsuo, M., 2014 Tissue and case-specific retention of intron 40 in mature dystrophin mRNA, J Hum Genet in press, 査読有,

DOI: 10.1038/jhg.2015.24

Dwianingsih, E. K., Malueka, R. G., Nishida, A., Itoh, K., Lee, T., Yagi, M., Iijima, K., Takeshima, Y., Matsuo, M., A novel splicing silencer generated by DMD exon 45 deletion junction could explain upstream exon 44 skipping that modifies dystrophinopathy, J Hum Genet, 査読有, 59:423-9, 2014,

DOI: 10.1038/jhg.2014.36.

[学会発表](計 0 件)

[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：
出願年月日：
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

松尾 雅文 (MATSUO, Masafumi)
神戸学院大学・総合リハビリテーション学
部・教授
研究者番号：10157266

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

竹島 泰弘 (TAKESHIMA, Yasuhiro)
兵庫医科大学・医学部・教授
研究者番号：40281141