

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670398

研究課題名(和文) タイチンアイソフォームの発現比率と拡張型心筋症の関係の解明

研究課題名(英文) Alternative splicing regulation of the titin gene in dilated cardiomyopathy.

## 研究代表者

黒柳 秀人 (KUROYANAGI, Hidehito)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授

研究者番号：30323702

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：TTN遺伝子の心筋特異的選択的スプライシングをモニターするための蛍光スプライシングレポーターを作製し、RBM20によるTTN遺伝子の心筋特異的スプライシング制御の解析系を構築した。この系を利用して、拡張型心筋症患者に変異が集中するRBM20のRSRSP配列の2つのセリン残基がともにリン酸化され、これがRBM20の核移行に必須であることが明らかとなった。作製した蛍光TTNスプライシングレポーター細胞株、RBM20発現細胞株と抗リン酸化RBM20抗体は今後のRBM20の機能解析やRBM20の局在や機能を制御する化合物のスクリーニングに役立つと期待される。

研究成果の概要(英文)：We have constructed fluorescence splicing reporter minigenes to visualize heart-specific alternative splicing of the TTN gene. We utilized the reporter system to analyze the heart-specific splicing regulation by RBM20. Mutations in the RBM20 gene identified in the dilated cardiomyopathy patients are enriched in the RSRSP stretch and we found that the RSRSP stretch is phosphorylated in cells and is crucial for RBM20 to be localized in the nucleus. The fluorescence TTN splicing reporter cell lines, RBM20-expressing cell lines and the anti-phospho-RBM20 antibody generated in this study can further be utilized in analyzing the effects of mutations in the RBM20 and screening for chemicals that can modify the function and localization of RBM20.

研究分野：分子生物学

キーワード：タイチン 拡張型心筋症 mRNA 選択的スプライシング RBM20 リン酸化 核移行

## 1. 研究開始当初の背景

拡張型心筋症は、心筋壁が薄く伸展することによって心室の内腔が拡大しポンプ機能が障害されて機能不全に陥るもので、心臓移植以外の根本的な治療法がなく、病態メカニズムの解明と有効な治療法の確立が求められている。近年、特発性拡張型心筋症患者の遺伝子解析により、心筋サルコメアを構成し筋収縮に関連するさまざまなタンパク質の遺伝子の変異が相次いで報告されており、サルコメアの収縮能の低下が拡張型心筋症の原因であると想定される。

タイチンはそのようなサルコメアタンパク質のひとつで、1分子がM帯からZ盤に及ぶ巨大な構造タンパク質である。タイチンをコードする *TTN* 遺伝子は363個のエクソンから成る巨大な遺伝子で、mRNAの選択的スプライシングにより、成人の心臓では、エクソン50からエクソン219へスプライシングする短いN2B型が主に発現し、エクソン102から111までのN2A領域を含むやや長いN2BA型も見られる。骨格筋では、エクソン50から219までの間のすべてのエクソンを含む長いN2A型が主に発現する。タイチンはサルコメアが伸展した際に受動的に張力を発揮する「バネ」として機能しサルコメアの過伸展を防ぐ重要な役割を担うが、より長いN2BA型やN2A型はN2B型に比べ受動的張力が著しく小さい。

拡張型心筋症の病的心筋では、タイチンのN2B型の発現比率が減少し、長くて張力の低いN2BA型の比率が増加している(Circ Res 95: 708, 2004)。ごく最近、心筋タイチンのほとんどがN2A型で心疾患を自然発症するモデルラットの原因遺伝子座として心筋に発現するRNA結合タンパク質RBM20の遺伝子の欠失が特定され(Nat Med 18: 766, 2012) RBM20が *Ttn* 遺伝子の心筋特異的スプライシングを制御すると報告された(Nucl Acids Res 41: 2659, 2013)。拡張型心筋症の家系や孤発例でRBM20遺伝子の変異の報告(J Am Coll Cardiol 54: 930, 2009)があることから、*TTN* 遺伝子の選択的スプライシング制御が変化してタイチンアイソフォームの発現比率が変化することで受動的張力が低下し、サルコメアや心筋細胞が伸び心臓壁全体が薄く伸展して拡張型心筋症の発症に至るといった病態モデルが提唱されている。

## 2. 研究の目的

拡張型心筋症患者でサルコメアタンパク質タイチンをコードする *TTN* 遺伝子や *TTN* 遺伝子の mRNA の心筋特異的選択的スプライシングの制御因子 RBM20 をコードする *RBM20* 遺伝子に変異が見出されることから、タイチンアイソフォームの発現比率の変化

と拡張型心筋症の因果関係が注目される。本研究は、その因果関係を実験的に明らかにすることを最終的な目的とする。そのために、*TTN* 遺伝子の選択的スプライシングを培養細胞で解析するためのスプライシングレポーターミニ遺伝子を構築し、*TTN* 遺伝子の心筋特異的選択的スプライシング制御におけるRBM20の機能ドメインや患者型変異の影響、シスエレメントを実験的に解明する。そして、*TTN* 遺伝子のスプライシングパターンを可視化する蛍光スプライシングレポーター細胞やマウスを作製し、*TTN* 遺伝子のスプライシングパターンを人為的に変化させる化合物を探索する。また、内在性 *Ttn* 遺伝子の改変により心筋でのタイチンアイソフォームの発現比率を人為的に変化させたノックインマウスの作製を試みる。

## 3. 研究の方法

プラスミドレポーターの作製：心筋においてはRBM20によってイントロン50およびイントロン218のスプライシングが抑制されていると推測し、*Ttn* 遺伝子のエクソン50から51およびエクソン218から219のゲノム断片のみを連結した蛍光レポーターミニ遺伝子をプラスミドベクターで構築した。このレポーターでは、エクソン51/218融合エクソンが包含されるとGFPが発現し、抑制されるとRFPが発現する。

BACレポーターの作製：ヒト *TTN* 遺伝子のエクソン50から219のゲノム領域全体を含む細菌人工染色体(BAC)クローンを基に、エクソン50の上流にプロモーターを導入し、N2A型のスプライシングによりエクソン50から115までがスプライシングされるとRFPが発現する蛍光レポーターミニ遺伝子とN2B型のスプライシングによりエクソン50から219へスキップするとGFPが発現する蛍光レポーターミニ遺伝子を作製した。

患者型変異がRBM20の細胞内局在に与える影響の解析：N末端にFLAGタグを融合したRBM20の発現ベクターを作製し、FLAGタグに対する抗体で免疫細胞染色することにより細胞内局在を解析した。

RBM20のドメイン機能の解析：RBM20はRNA結合ドメインと推定される2つのZnフィンガードメインと1つのRNA認識モチーフ(RRM)ドメインをもつ。そこで、これらの各ドメインを欠失した変異型RBM20の発現ベクターを作製し、プラスミド蛍光レポーターミニ遺伝子との共発現によりスプライシング制御能を解析した。

リン酸化の解析：RRMドメインとRS-rich領域のみをもつ短縮型RBM20の野生型および患者変異型についてPhos-tagゲルを用いた電気泳動し、ウェスタンブロット法により移動度を解析した。また、2つのセリン残基がと

もにリン酸化された RSRSP 配列とその周辺の配列を含むリン酸化ペプチドを合成してウサギ抗リン酸化ペプチドポリクローナル抗体を作製し、ウェスタンブロットを行った。

蛍光レポーター安定発現細胞株および RBM20 安定発現細胞株の作製: Flp-In T-Rex 293 細胞株にプラスミドベクターで作製した蛍光二色 *Ttn* スプライシングレポーターミニ遺伝子、および N 末端に FLAG タグを付した野生型または S637A 変異型 RBM20 発現ベクターをトランスフェクションし、安定発現細胞株を作製した。

リン酸化酵素阻害剤: 野生型 RBM20 を安定発現細胞株に既知のリン酸化酵素の阻害剤を作用させ、FLAG 抗体を用いた免疫細胞染色により RBM20 の細胞内局在を解析した。

#### 4. 研究成果

プラスミドレポーターによる解析: 作製したプラスミドレポーターミニ遺伝子のトランスフェクションにより GFP と RFP の両方の蛍光タンパク質が発現すること、RBM20 の共発現により融合エクソン 51/218 が抑制され、GFP の発現が減少して RFP の発現が増加することを確認した。さらに、拡張型心筋症患者で変異が報告 (J Am Coll Cardiol 54: 930, 2009) されている Ser635 (マウスでは Ser637) や Ser637 (マウスでは Ser639) を Ala に置換した変異型 RBM20 ではこのスプライシング制御能が大きく低下していることを確認した。これらのことから、このプラスミドレポーターは RBM20 による *Ttn* 遺伝子の心筋特異的選択的スプライシング制御を模した制御を受け、RBM20 の機能解析に利用可能であることが明らかとなった。一方、*Ttn* レポーターで進化的に保存された配列を欠失させる実験では、制御に必要なシスエレメントの同定に至らなかった。

BAC レポーターによる解析: N2A 型のスプライシングをモニターする蛍光レポーターミニ遺伝子では、培養細胞へのトランスフェクションにより RFP が発現することを確認した。N2B 型のスプライシングをモニターする蛍光レポーターミニ遺伝子では、RBM20 との共発現によりエクソン 50 から 219 への N2B 型スプライシングが誘導されることを RT-PCR により確認したが、それに伴う GFP の蛍光は観察されなかった。

RSRSP 配列の変異が RBM20 の細胞内局在に与える影響の解析: 野生型 RBM20 は、mRNA のスプライシングが行われる細胞核に局在したが、Ser635 (マウスでは Ser637) や Ser637 (マウスでは Ser639) を Ala に置換した変異型 RBM20 では核に局在できず細胞質に留まった。この結果は、RSRSP 配列が核移行に必要であることを示しており、患者型変異によりスプライシング制御能が低下するのは核局

在の異常が原因であることが疑われた。

RBM20 のドメイン機能の解析: RBM20 は RNA 結合ドメインと推定される 2 つの Zn フィンガードドメインと 1 つの RNA 認識モチーフ (RRM) ドメインのいずれかを欠失した変異型 RBM20 では、細胞内局在や *Ttn* レポーターのスプライシング制御能には大きな影響は見られなかった。したがって、これらのドメインは標的 RNA の認識やスプライシング制御にそれほど寄与しないことが示唆され、拡張型心筋症患者で変異が集中する RSRSP 配列の決定的重要性が際立つ結果となった。

RBM20 の RSRSP 配列のリン酸化: 短縮型 RBM20 と Phos-tag ゲルを用いた解析で、RSRSP 配列の 2 つのセリン残基が共にリン酸化されていることが示唆された。さらに、抗リン酸化ペプチド抗体でのウェスタンブロットにより、全長の野生型 RBM20 でも RSRSP 配列がリン酸化されていることが示された。また、培養細胞に発現させた RBM20 に対してこのポリクローナル抗体を用いて免疫沈降したり免疫細胞染色したりできることを確認した。

RBM20 のスプライシング制御能における RSRSP 配列の必要性の解析: RSRSP 配列変異型 RBM20 に核移行シグナルを付加して強制的に核移行させたところ、*Ttn* スプライシングレポーターのスプライシング制御能をある程度回復した。このことから、RSRSP 配列は RBM20 の核移行に必須であってスプライシング制御には直接は関与しないことが明らかとなった。

内在性 RBM20 の RSRSP 配列のリン酸化の解析: 心筋で内在性 RBM20 がリン酸化されているか確認するために、マウス心臓抽出液とヒト胎児心筋各抽出液を用いて抗リン酸化 RBM20 抗体によるウェスタンブロット解析を行った。しかし、他のリン酸化タンパク質との非特異的に反応も強く、内在性 RBM20 のリン酸化を検出するには至らなかった。

蛍光レポーター安定発現細胞株の作製: Flp-In T-Rex 293 細胞株で作製した蛍光二色 *Ttn* スプライシングレポーター安定発現細胞に RBM20 を共発現することでスプライシングが心筋型に変化して蛍光タンパク質の発現比率が変化することを確認した。したがって、このレポーター細胞株は今後の拡張型心筋症患者のスクリーニングで見つかるであろう変異型 RBM20 の機能解析や *Ttn* 遺伝子の心筋型スプライシングを操作する化合物のスクリーニングに利用可能である。

RSRSP 配列のリン酸化酵素の解析: RSRSP 配列がスプライシング制御因子である SR タンパク質の RS ドメインの配列に似ていることから、SR タンパク質をリン酸化するプロテインキナーゼの特異的阻害剤で野生型 RBM20 安定発現細胞株を処理したが、核局在やリン酸化への影響は見られなかった。

今後の展開：*Ttn* 遺伝子のスプライシングパターンを人為的に変化させる遺伝子改変マウスの作製について、当初計画ではプラスミドレポーターミニ遺伝子と人工細菌染色体（BAC）レポーターミニ遺伝子で制御エレメントを特定した上でノックインマウスを作製する予定であったが、CRISPR/Cas9 によるゲノム編集が容易になってきたことから、*Ttn* 遺伝子のエクソン 51-218 の約 50 kb の領域を大きく欠損させて N2B 型 mRNA しか産生できない変異アレルを作製する計画に変更し、組換え DNA 実験計画と動物実験計画の承認を受けている。また、*Rbm20* 遺伝子に患者型のアミノ酸置換変異を導入するマウスも並行して作製する。現在、組換えマウス実験室でのマウス作製に向けて準備を行っている。

拡張型心筋症患者で R634W、G1031X、D888N、P1081R など、RSRSP 配列以外の変異が報告されている。そこで、これら変異型 RBM20 の発現ベクターを構築して、細胞内局在、RSRSP 配列のリン酸化状態、*Ttn* レポーターのスプライシング制御能の解析を順次行い、RBM20 の機能に与える影響を実験的に検証して、拡張型心筋症の原因になりうる RBM20 変異を特定する予定である。

RSRSP 配列のリン酸化が RBM20 の核移行に決定的な役割を果たすことから、リン酸化酵素の特定はたいへん興味深い。*TTN* の選択的スプライシングは、動物種間、心筋と骨格筋、心房と心室、胎仔期と成獣で差異があることから、心筋の生理学的機能や機械的刺激とリン酸化酵素の活性、内在性 RBM20 のリン酸化状態や細胞内局在との関係の解明は、心筋のリモデリングや進化的な側面にも新たな知見をもたらすことが期待される。一方で、RSRSP 配列に変異があっても核移行すれば機能を回復できたことから、変異型 RBM20 を核移行させる化合物が新たな薬剤スクリーニングの標的になったといえる。

## 5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 3 件)

村山里枝、木村まり子、大野麻理奈、山崎・加藤裕美子、黒柳秀人。拡張型心筋症患者に変異が見出される RNA 結合タンパク質 RBM20 による *TTN* 遺伝子の心筋特異的スプライシング制御機構。冬の若手ワークショップ 2016@山中湖。山中湖畔荘 ホテル清溪（山梨県南都留郡山中湖村）2016 年 2 月 4～6 日。

山崎裕美子、村山里枝、大野麻理奈、黒柳秀人。*TTN* 遺伝子の選択的スプライシングモニタリングと拡張型心筋症の創薬スクリーニング。BMB2015（第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会）神戸ポートアイランド（神戸市）

2015 年 12 月 1～4 日。

村山里枝、木村まり子、大野麻理奈、黒柳秀人。拡張型心筋症患者に変異が見出される RBM20 の RS-rich 領域はリン酸化され核移行とスプライシング制御に必須である。第 16 回日本 RNA 学会年会。ウイックあいち（名古屋市）2014 年 7 月 23～25 日。

〔図書〕(計 2 件)

黒柳秀人。第 26 章「デコイ非コード RNA」。『ノンコーディング RNA RNA 分子の全体像を俯瞰する』廣瀬哲郎・泊幸秀（編）（化学同人、印刷中）。

黒柳秀人。9 章 4 節「転写と転写後の共役」。『基礎分子生物学 II：遺伝子発現制御機構 - クロマチン、転写制御、エピジェネティクス - (仮称)』田村隆明・浦聖恵（編）（東京化学同人、印刷中）。

〔その他〕

ホームページ

<http://www.tmd.ac.jp/musdp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

黒柳 秀人 (KUROYANAGI, Hidehito)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授

研究者番号：30323702