

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月27日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22390162

研究課題名（和文） 心筋梗塞感受性分子の網羅的プロテオーム、ゲノム解析による疾患発症機構の解明

研究課題名（英文） Functional genomics of myocardial infarction susceptible molecules.

研究代表者

尾崎 浩一 (OZAKI KOUICHI)

独立行政法人理化学研究所・循環器疾患研究チーム・上級研究員

研究者番号：50373288

研究成果の概要（和文）：

心筋梗塞 (MI) 感受性分子 BRAP に結合するタンパク質の同定を網羅的に進め、さらにその分子群をコードする遺伝子領域について SNP 関連解析を試行した。BRAP 結合タンパクとしては IKK-signalosome を構成する分子群等、炎症や細胞増殖に強く関連する分子を同定するとともに、さらにこれら結合分子の中で E3 ubiquitin ligase 様の分子をコードする遺伝子領域の SNP がまた MI と強い関連を示すことを発見した。

研究成果の概要（英文）：

To clarify detailed function of BRAP in the pathogenesis of MI, we searched for its binding partners comprehensively, and found several molecules related with inflammation and cell proliferation, such as major components of IKK-signalosome. Furthermore, we found that the SNP in gene encoding E3 ubiquitin ligase like protein binds BRAP also associated with risk of MI.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
2011年度	5,700,000	1,710,000	7,410,000
2012年度	2,600,000	780,000	3,380,000
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：心筋梗塞 (MI)、BRAP、関連解析、炎症、遺伝子検査

1. 研究開始当初の背景

心筋梗塞 (MI) の遺伝的背景の同定から虚血性心疾患 (CAD) のエビデンスに基づく予防、治療を目標として、これまでに一塩基多型 (SNP) を用いたケース・コントロール関連解析を基盤とした遺伝統計学および分子生物学的手法により、リンホトキシナルファ (*LTA*)、および独自に探索した *LTA* 結合タンパク質であるガレクシン-2 (*LGALS2*) が MI 感受性分子であることを見出し、MI の発症、進展

には炎症が一要因であることを報告してきた (Ozaki K et al. *Nature Genet.* 32, 650-654 (2002), Ozaki K et al. *Nature* 429, 72-75 (2004))。また、この一連の研究から、*LTA* シグナルの細胞内調節分子である 20S プロテアソームのサブユニット、プロテアソームサブユニットアルファタイプ 6 (*PSMA6*) 内の SNP もまた MI 感受性であることを示しており (Ozaki K et al. *Nature Genet.* 38, 921-925 (2006))、*LTA* カスケードの異常、す

なわち冠動脈血管における炎症反応の異常がMIの発症、進展に関わることを報告してきた。さらに最近、ガレクチン-2に新たに結合することを発見した BRCA1 associated protein (BRAP)は Nuclear Factor kappa B (NFkB)を介して炎症反応の中心的なメディエータとして働くことを突き止め、この分子をコードする遺伝子内のSNPもまたMIと非常に強い関連があることを報告している(患者、一般集団それぞれ約3,500人、約3,900人による関連解析のP値; $< 10^{-20}$ 、オッズ比; 1.5、Ozaki K et al. *Nature Genet.* 41, 329-333, (2009))。この結果を踏まえて、本研究ではこのBRAPの機能を調節する分子についてプロテオミクス解析を通して網羅的に明らかにし、ゲノム、統計学、分子生物学的解析によりMIとの関連を精査することにより、さらに詳細なMIの発症、進展機構を解明すること、新規疾患関連分子の生体内の機能の解明、疾患発症における役割を明らかとし、創薬関連分子(治療のターゲット分子)を探索する狙いがある。また、これらの分子をコードする遺伝子内の多型を用いた遺伝統計学的解析を通して新たなリスク因子の同定、解析し、これらリスク因子を組み合わせることによって疾患の新規予知、予防法を開発することも目標にしている。

2. 研究の目的

心筋梗塞(MI)の発症、進展には環境因子および遺伝的素因の双方が複雑に関連しており、遺伝的素因の同定は少なからずMIの発症、進展機構解明の糸口となると考えられる。これまでにゲノム遺伝統計学的解析および分子・細胞生物学的手法を基盤としてMI感受性分子の同定を進め、炎症のカスケードに関連した複数の分子がMIに関連していることを発見してきた。今回の研究課題ではこれまでの研究をさらに発展させ、①網羅的プロテオミクス解析を基盤としてMIの発症、進展機構を分子レベルで解明し、創薬の分子ターゲットを発掘すること②さらなる遺伝的リスクファクターを同定し、精度良く疾患の発症を予知できるリスクファクターの組み合わせを選別し、新たな疾患発症予知法の開発を行うことを目的としている。

3. 研究の方法

BRAPタンパクに結合する生体内タンパクを同定するために、当初はBRAP配列にS-tag-TEV protease site-His-tagを付加することで2段階精製による方法(タンデムアフィニティー精製法)2)を試みたが、精製段階で強制発現したBRAPを著しくロスしてしまうというアクシデントに遭遇したため、S-tag:S-proteinの系のみを用いたプルダウン法を利用した。細胞はHEK293細胞、冠動脈

血管平滑筋細胞(HCASC)を用いた。pTriEx4 vector(ノバジェン社)にBRAP遺伝子をクローニングし、S-protein-HRPを用いてその発現を確認した。HEK293細胞はHCASCともにfugeneによるトランスフェクションを施行した(HCASCの場合fugeneを用いるとその導入効率は低下したが、エレクトロポレーション法による場合、ほとんどの細胞が死滅してしまうためfugene法を採用した)。BRAP siRNAはインビトロジェン社より購入した。細胞(15cmシャーレ使用、BRAPおよびコントロールそれぞれ10枚)が70-80%コンフルエントの状態に達した後に20~24時間後に発現ベクターを導入した。コントロールベクターとしてはS-tagベクターを用い、24時間後細胞を回収し、細胞抽出液を調整し、S-proteinによるプルダウン後、ラージゲルを用いたSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)を行った。銀染色(和光純薬社)後、目的のバンド(BRAPレーンのみに存在するバンド)を切り出し、2-3バンドを混合してペプチドマスフィンガープリンティング(PMF)分析(島津テクノリサーチ)により解析した。PMF分析によりBRAPタンパク結合候補タンパクとして同定した分子はそれぞれの分子をS-tagやMyc-tagあるいはFLAG-tagとのタグタンパク質として調整し、COS7細胞を用いた免疫沈降法により結合の確認を試みた。結合が確認できた分子についてはさらにこれらをコードする遺伝子領域(その遺伝子を含んでいる連鎖不平衡ブロック領域)のタグ(代表)SNPsを選択しMIとの関連解析をスクリーニングとしてケース約1,000例、コントロール約1,000例用いて、high-throughput multiplex PCR-invader assay systemより施行した。ジェノタイプデータは優性モデル、劣性モデル、アレル頻度における比較をカイ二乗検定により統計解析し、P値が0.05未満のSNPについてはさらにサンプル数を増加する戦略をとった。また、ここで用いたDNA試料は各施設において提供者からの文章による同意を得たものであり、この研究は理化学研究所 横浜研究所における倫理委員会において遂行することを承認されている。

4. 研究成果

心筋梗塞感受性遺伝子BRAPがコードするタンパクに結合する新規分子をS-tagを用いたプルダウン法により行い、ペプチドマスフィンガープリンティング(PMF)分析により網羅的に解析した。図1に示したように、HEK293細胞、ヒト冠動脈血管平滑筋細胞(HCASC)を用いて、内在性のBRAPをsiRNAによりノックダウンした状態でプルダウンを試行し、S-tag BRAPのレーンで特異的に銀染色されるバンドをピックアップし、PMF解析を行った。

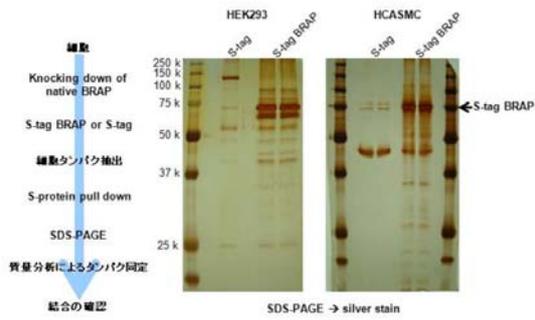


図1 BRAP 結合候補タンパクの同定

PMF 分析により BRAP タンパク結合候補タンパクとして同定した分子はそれぞれの分子を S-tag や Myc-tag あるいは FLAG-tag とのタグタンパク質として調整し、順次 COS7 細胞を用いた免疫沈降法により結合の確認を進めた。結果的に BRAP の結合タンパクとして RASA1 (RAS p21 protein activator (GTPase activating protein) 1)、RASSF6 (Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 6)、TRAP1 (TNF receptor-associated protein 1)、TRAF5 (TNF receptor-associated factor 5)、SHC4 (Src homology 2 domain containing) family, member 4)、NFKBIB (nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, beta)、IKKB (inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase beta) を同定している。興味深いことに、BRAP は NFKBIB に結合するが NFKBIA には結合しない (図2)。

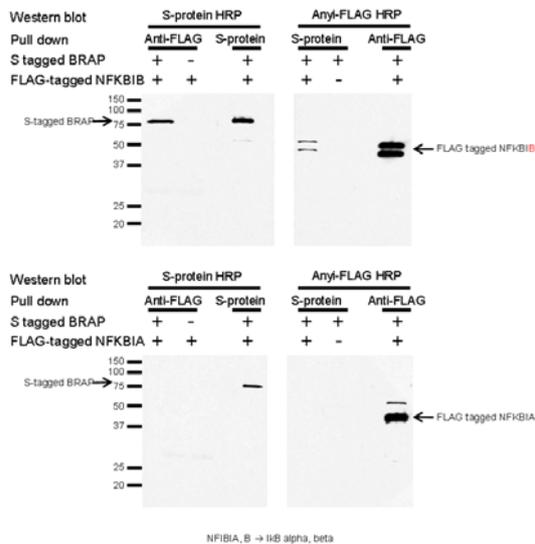


図2 BRAP はNFKBIB と結合し、NFKBIA とは結合しない

これらの分子のほとんどは炎症に関連しているものであり、BRAP が炎症の過程で重要

な働きをしていることが示唆された。今回発見した新規 BRAP 結合分子、既存の関連分子について図3にまとめている。

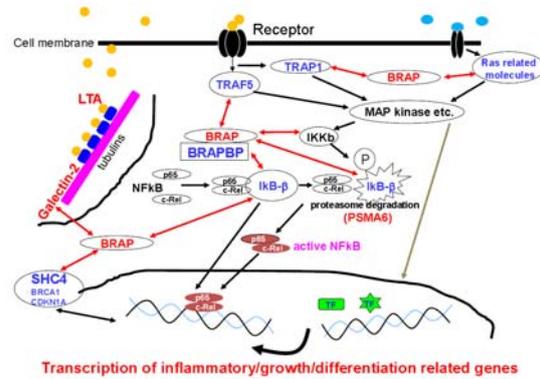


図3 MI 関連炎症カスケード

BRAP に結合する分子の探索をさらに進めると同時に、結合が確認できた分子群のそれぞれをコードする遺伝子を含むゲノム領域から HapMap データベース (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>) と Haploview ソフトウェアを用いてタグ塩基多型 (タグ SNP; 連鎖不平衡の関係により選択した代表 SNP) を選択し、MI のケース・コントロール関連解析を施行した。一次スクリーニングとして MI 患者由来および一般人由来 DNA それぞれ約 1,000 例についてタイピング、統計解析を行い、有意な SNP については再検証としてさらに独立のケース・コントロールサンプルをタイピングして解析を行った。ここで再現性がとれた SNP についてはさらに異なるサンプルセットを用いたタイピング、統計解析を行った。その結果、新規に結合を確認した分子 (仮称; BRAPBP) をコードする遺伝子内に存在するタグ SNP はすべてのサンプルセットにおいてカイ二乗検定での P 値が 0.01 未満を示し、全体を合計するとさらに MI と強い関連を統計学的に示した。この分子は細胞内に存在し、機能としては炎症関連分子と結合し、炎症シグナルを調節していることが知られている。また、BRAP のタンパク構造には E3 ユビキチンライゲースドメインがあり、これはプロテアソーム系を介したタンパク分解に関係すると考えられることから、この分子と BRAP が相互作用することにより炎症関連分子の分解や安定性等に関係している可能性が示唆される。さらに、BRAPBP 遺伝子を含む連鎖不平衡 (LD) 領域の詳細な SNP 遺伝的地図 (LD マッピング) の作成を行い、原因 SNP の同定を進めていった。約 200kb にわたる BRAPBP 遺伝子を含む LD 領域をダイレクトシークエンス法により 48 人の MI 患者由来 DNA を再シークエンスし SNP の同定を行ったところ、マイナーアレル

頻度が 0.05 (5%) 以上の SNP を 125 個程度同定した。これらの SNP の LD 解析によりタグ SNP を選抜し、タイピングを行ったところ、やはり元々のマーカー SNP が MI と最も強い関連を示すことが判明した (P < 0.0000001, オッズ比 ~ 1.23)。この SNP と同じ挙動を示す (完全な LD) にある SNP は他に 16 個存在しており、合計 17 個の SNP (すべて非翻訳領域に存在) のいずれかが MI 感受性の原因になりうることを突き止めた。これらの 17 個はすべてアミノ酸の変化を伴わない SNP であり、現在これらの SNP が BRAPBP 遺伝子の転写や分解に与える影響を解析中である。この BRAPBP もまた Nuclear factor kappa B (NFkB) を介した炎症に中心的な役割を果たす IKK-signalosome に関連した分子であることが知られており、炎症が MI 発症に強く関わることをさらに裏付ける結果となった。また、これまでに発見した遺伝的因子を組み合わせることにより疾患に対するオッズ比は 30 を超えることが判明しており、発症の予知、予防のための遺伝子検査が可能になることを示唆している。

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 5 件)

- 1) Suna S, Sakata Y, Nakatani D, Okuda K, Shimizu M, Usami M, Matsumoto S, Hara M, Ozaki K, Mizuno H, Minamino T, Takashima S, Nishino S, Matsumura Y, Takeda H, Tanaka T, Sato H, Horii M, Komuro I, on behalf of the Osaka Acute Coronary Insufficiency Study. Decreased Mortality Associated with Statin Treatment in Patients with Acute Myocardial Infarction and Lymphotoxin- α C804A Polymorphism. *Atherosclerosis* 227, 373-379 (2013).
- 2) Ellinor PT*, Lunetta KL*, Albert CM*, Glazer NL*, Ritchie MD*, Smith AV*, Arking DE*, Müller-Nurasyid M*, Krijthe BP*, Lubitz SA*, Bis JC*, Chung MK*, Ozaki K* (87人中13番目) Meta-analysis identifies six new susceptibility loci for atrial fibrillation. *Nature Genetics* 44, 670-675 (2012). *Equally contributors
- 3) Aoki A, Ozaki K, Sato H, Takahashi A, Kubo M, Sakata Y, Onouchi Y, Kawaguchi T, Lin TH, Takano H, Yasutake M, Hsu P, Ikegawa S, Kamatani N, Tsunoda T, Juo SH, Horii M, Komuro I, Mizuno K, Nakamura Y and Tanaka T. SNPs on 5p15.3 associated with myocardial infarction in Japanese

population. *Journal of Human Genetics* 56, 47-51 (2011).

- 4) Liao YC, Wang YS, Guo YC, Ozaki K, Tanaka T, Lin HF, Chang MH, Chen KC, Yu ML, Sheu SH, Juo SH. BRAP activates the inflammatory cascades and increases the risk for carotid atherosclerosis. *Molecular Medicine* 17, 1065-1074 (2011).
- 5) Onouchi Y, Ozaki K (43人中2番目) Genome-wide association study identified four novel susceptibility loci for Kawasaki disease. *Nature Genetics* 44, 517-521 (2012)

[学会発表] (計 8 件)

- 1) 尾崎浩一 Genetic Variations and Heart Diseases 第 7 7 回日本循環器学会 2013 年 3 月 15 日 パシフィコ横浜・横浜市
- 2) Kouichi Ozaki Identification of protein that interact BRAP, encoded by a gene associated with myocardial infarction susceptibility World Congress of Cardiology, Scientific Sessions 2012 2012 年 4 月 19 日 Dubai, United Arab Emirates
- 3) 尾崎浩一 心筋梗塞感受性分子 BRAP の機能解析と新規結合分子の同定 第 3 4 回 日本分子生物学会 2011 年 12 月 14 日 パシフィコ横浜・横浜
- 4) 尾崎浩一 心筋梗塞の全ゲノム関連解析 第 15 回 日本心血管内分泌代謝学会 2011 年 11 月 25 日 千里ライフサイエンスセンター・大阪
- 5) 尾崎浩一 心筋梗塞感受性分子 BRAP の機能解析と新規結合分子の同定 第 56 回 日本人類遺伝学会 2011 年 11 月 12 日 幕張メッセ・千葉市
- 6) 尾崎浩一 Analysis of BRAP, encoded by a gene associated with myocardial infarction susceptibility, and its binding partner 第 84 回 日本生化学会 2011 年 9 月 23 日 国立京都国際会議場・京都
- 7) 尾崎浩一 Identification of proteins that bind BRAP, encoded by a gene associated with myocardial infarction, using an S-protein tag pull down method 日本人類遺伝学会 第 55 回大会 2010 年 10 月 29 日 大宮ソニックシティ・さいたま市
- 8) 尾崎浩一 Genetic factors confer risk of myocardial infarction 第 42 回 日本動脈硬化学会 2010 年 7 月 15 日 長良川国際会議場・岐阜市

〔図書〕（計7件）

- 1) 尾崎浩一、日本臨床検査医学会、臨床病理、2013、167-175
- 2) 尾崎浩一、日本臨床社、日本臨床、2010、615-620
- 3) 尾崎浩一、田中敏博、中外医学社、Annual Review 循環器、2012、37-41
- 4) 尾崎浩一、田中敏博、西村書店、カラー版 内科学、2012、143-146
- 5) 尾崎浩一、日本臨床社、日本臨床、2011、217-221
- 6) 尾崎浩一、田中敏博、南江堂、内科、2010、514-520
- 7) 尾崎浩一、田中敏博、科学評論社、循環器内科、2011、210-218

6. 研究組織

(1) 研究代表者

尾崎 浩一 (OZAKI KOUICHI)

独立行政法人理化学研究所・循環器疾患研究チーム・上級研究員

研究者番号：50373288