

平成 21 年 6 月 22 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2006-2008
 課題番号：18590661
 研究課題名 (和文) ラミニンプロモーター遺伝子の心筋症、腎硬化症、糖尿病病態発症に関する研究
 研究課題名 (英文) The study of laminin promoter associated genes in the pathogenesis of the cardiomyopathy, kidney sclerosis and diabetes.
 研究代表者
 鈴木 英明 (SUZUKI HIDEAKI)
 東京慈恵会医科大学・医学部・准教授
 研究者番号：70196856

研究成果の概要：

心臓病、腎臓病、糖尿病の患者さんにおいて血管壁が硬くなり、その硬い血管壁の成分の中にラミニンという線維状の物質が異常に増加していることが知られていたが、本研究ではそのラミニンの遺伝子を調節するたんぱく質を見出し検討した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,500,000	0	1,500,000
2007 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2008 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	570,000	3,970,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内科学一般 (含心身医学)

キーワード：ラミニン、酵母、クローニング

1. 研究開始当初の背景

細胞外マトリックスの正常構成成分の一つであるラミニンは、拡張型心筋症や糖尿病において、心筋細胞および血管平滑筋細胞内に病的増加し組織の硬化を招くと報告されているが、その病態は明らかではない。申請者は、その病因の解明に、ラミニン γ 1 鎖プロモーター領域の DNA の機能を解析した結果、ラミニン γ 1 鎖の転写発現を強く促進する bcn-1 DNA モチーフを見出し報告した (J. Biol. Chem. 271, 1996)。その後、bcn-1 モチーフに結合し、心筋の細胞に普遍的に発現

する転写因子の存在を報告し (Am. J. Physiol. 275, 1998)、イーストのワンハイブリッドシステムを用いてライブラリーのスクリーニングを施行、bcn-1 に結合する転写因子 Smarcel1r を同定しデータベースに登録した (Genebank AF072836, H. Suzuki, 1998)。さらに、ワンハイブリッドシステムによるクローニングを繰り返し、転写因子 TFE-3 が、TGF- β を介しラミニンプロモーターを活性化することを報告した (J Biol Chem. 277, 2002)。また、これまでに、ツーハイブリッドシステムによるスクリーニングを施行、Smarcel1r に

結合し心筋に特異的に発現する新規蛋白 SMARP を同定した (Exp. and Clinic. Cardiol. 9, 2004)。さらに、ツーハイブリッドシステムによるスクリーニングを繰り返し、ラミニンの増加に関与する因子を同定しその一つとしてトロポニン I の新しいアイソフォーム (トロポニン I r) を見出した。

しかし、これら新規蛋白と心筋症 (心臓疾患) の病態との関連は国内外で未だ報告されていない。

2. 研究の目的

以上の背景から、本研究では次の段階として Smarcelr, SMARP, トロポニン Ir の心臓、腎臓疾患、糖尿病の病態発症との関係を解明することを目的に、以下検討した。

(1) Smarcelr の機能解析:

- (A) Smarcelr 遺伝子の調節発現について検討
- (B) Smarcelr 遺伝子の細胞内局在の検討
- (C) ノックアウトマウスの作製

(2) SMARP 遺伝子の機能解析:

- (A) SMARP 遺伝子の調節発現について検討
- (B) SMARP 遺伝子の細胞内局在の検討
- (C) SMARP 遺伝子の相互分子のクローニング

(3) トロポニン Ir 遺伝子の機能解析:

- (A) トロポニン Ir 遺伝子の調節発現について検討
 - (B) トロポニン Ir 遺伝子の分子間相互分子のクローニング
- 以上を目的とし検討した。

3. 研究の方法

(1) Smarcelr の機能解析: (A) Smarcelr 遺伝子の調節、発現については、EMSAにてラミニンプロモーター結合能ならびに mutant を用いたルシフェラーゼレポーターアッセイを施行し、ラミニン発現への関与を検討、Smarcelr の binding assay を施行した。

(B) Smarcelr 遺伝子の細胞内局在の検討では抗 Smarcelr 抗体を作製、ならびに、GST-fusion 蛋白を強制発現し、Smarcelr 遺伝子の細胞内局在を Confocal Microscopy にて調べた。

(C) Smarcelr ノックアウトマウスの作製を試みるために、マウス Smarcelr cDNA のクローニングを試みた。

(2) SMARP 遺伝子の機能解析: (A) SMARP 遺伝子の調節発現については、Smarcelr 遺伝子と同様の方法にてラミニンプロモーターとの

結合能を EMSA にて検討した。また、ルシフェラーゼレポーターアッセイを施行し Smarcelr との結合能を調べた。さらに、ノーザンブロットにて組織特異性を調べた。

(B) SMARP 遺伝子の細胞内局在は抗 SMARP 抗体を用い GST-fusion 蛋白を強制発現し、細胞内局在を Confocal Microscopy にて検討した。

(C) SMARP 遺伝子の相互分子をクローニングするためにイーストのツーハイブリッドシステムによる分子間相互作用を利用し、SMARP をベイト蛋白に心筋由来 cDNA ライブラリーのスクリーニングを施行した。方法原理は GAL4-DNA binding domain を含むレポータープラスミドに遺伝子 cDNA を fusion し、GAL4-Activation domain と fusion したライブラリーを Yeast にトランスフォームする。分子間相互作用したものにレポーター遺伝子が表現され、培地によるコロニー選択を可能とし目的の cDNA が抽出された。

(3) トロポニン Ir 遺伝子の機能解析:

(A) トロポニン Ir 遺伝子の調節発現については、In vivo の Pull-down assay, および In vitro の免疫沈降反応を用いてトロポニン T との結合能を検討した。

(B) トロポニン Ir 遺伝子の分子間相互分子のクローニングとして、SMARP と同様に、相互分子をクローニングするためにイーストのツーハイブリッドシステムによる分子間相互作用を利用し、トロポニン Ir をベイト蛋白に心筋由来 cDNA ライブラリーのスクリーニングを施行した。

以上を方法とし検討した。

4. 研究の成果

(1) Smarcelr の機能解析: (A) Smarcelr の遺伝子の調節、発現について、EMSAにてラミニンプロモーター結合能ならびに mutant を用いたルシフェラーゼレポーターアッセイを施行し、Smarcelr はラミニンプロモーターに結合し発現へ強く関与することを確認した。(B) Smarcelr 遺伝子の細胞内局在の検討では GFP ならびに DsRed 融合 Smarcelr を作製強制発現系で細胞内局在を調べ Smarcelr は核内蛋白であることが解った。

(C) Smarcelr ノックアウトマウスの作製に関しては、以前にクローニングしていた Human Smarcelr cDNA をプローベにマウスライブラリーのスクリーニングを終了した。Smarcelr は、ノーザンブロットで mRNA が心筋および腎臓に強く発現し、また、細胞分化に関与する HMG-domain を有することより心筋の分化ならびに腎臓の発生に強く関与する遺伝子で

ある可能性が期待される。このことから Smarcelr ノックアウトマウスの作製は、心奇形、心臓疾患ならびに腎硬化症との因果関係の解明につながり意義は大きいと思われた。さらに Smarcelr 遺伝子は、BAF 類似構造を所有し、近年、BAF 類似構造は細胞核内のクロマチンリモデリングの異常へ関与し癌化に関与していると言われている。そこで、Smarcelr のクロマチンリモデリングの異常との関連を検討することは心筋症、腎硬化症における病態の解明のみならず、心筋症、腎硬化症、糖尿病などの発症機構の解明など多領域にわたり寄与し有用と考えられた。

(2) SMARP 遺伝子の機能解析：(A) SMARP 遺伝子の調節、発現については、EMSA にてラミニンプロモーターと結合すること、ならびに、ルシフェラーゼレポーターアッセイにて Smarcelr との結合することを確認した。さらに SMARPSmRNA の発現をノーザンブロットにて検討したところ、心臓、精巣に特異的に発現することが判明した。(B) SMARP 遺伝子の細胞内局在を調べたところ SMARP は核小体蛋白であることが判明した。Smarcelr と SMARP の細胞内局在についての結果をあわせて文献報告した(発表論文③)。(C) 次に、SMARP 遺伝子の相互分子をクローニングするためにイーストのハイブリッドシステムにより SMARP をベイト蛋白に心筋由来 cDNA ライブラリーのスクリーニングを施行し、数種類のジンクフィンガー構造を有する核小体蛋白をクローニングした。

(3) トロポニン Ir 遺伝子の機能解析：
(A) トロポニン Ir 遺伝子の調節発現については、トロポニン Ir がトロポニン T との結合領域の C 末端を欠損していたため、トロポニン T との結合能を検討した。GST-融合蛋白を用い In vivo での Pull-down assay の施行、および In vivo にて In cell での分子間結合力を測定し、トロポニン T との結合が著明に低下していることを確認した。この結果については文献報告した(発表論文④)。
(B) トロポニン Ir 遺伝子の分子間相互分子のクローニングとして、SMARP と同様に、相互分子をクローニングするためにイーストのツーハイブリッドシステムによる分子間相互作用を利用し、トロポニン Ir をベイト蛋白に心筋由来 cDNA ライブラリーのスクリーニングを施行したところ、トロポニン T、トロポニン C ならびにアクチンがクローニングされた。さらに、Smarcelr と SMARP は In vivo, in vitro で分子間結合し、あわせて国内外で初めて文献報告した(発表論文③)。

終わりに、本研究の国内外での位置付けとして、Smarcelr は申請者らにより初めて登録された新規タンパクであり(H. Suzuki, et al. Genbank AF072836, 1998)、また SMARP も国内外での報告はなく、申請者により報告された新規タンパクで、両者の機能の検討や、疾患とのつながりを検討することは今までに報告のない領域で重要と思われた。さらに、トロポニン I には今までに、トロポニン I -slow, -fast, -cardiac の 3 種類のアイソフォームが知られていたが、申請者らクローニングしたトロポニン Ir は報告がなく、第 4 番目のアイソフォームとして報告した。機能ではトロポニン Ir はトロポニン I に認めるトロポニン T との結合部位を欠損しておりその病的意義、疾患との関連が強く示唆され、心臓疾患とのつながりを明らかにする意義は大きいと考えられ、今後の検討はさらなる新しい結果を得ることにつながり意義があると思われた。

以上より本研究はラミニンの増加機構のみならず、心筋症、腎硬化症、糖尿病などの発症機構の解明などにわたり成果があると考えられた。

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 Horiguchi-Yamada J, Suzuki H, Takeda N, Yamada H. Sequential alterations in cell cycle and survival after X-ray irradiation in p53-deficient leukemia cells. Cytometry Research. 19(1), 53-60, 2009. 査読有

② H Yamada, T Sekikawa, H Suzuki, et. al (6). Segregation of megakaryocytic or erythroid cells from a megakaryocytic leukemia cell line by adhesion during culture. Leukemia Res. 28, 261-6, 2008. 査読有

③ Suzuki H, Arakawa Y, et. al (6). MLF1-interacting protein is mainly localized in nucleolus through N-terminal biparticle nucleolar localization signal. Anticancer Res. 27, 1423-30, 2007. 査読有

④ Suzuki H, Ito M, Arakawa M, et. al (4). Cloning of a newly identified troponin I isoform, which lacks troponin T binding portion using the yeast two hybrid system. Experimental and clinical cardiology. 11(1), 4-7, 2006. 査読有

⑤ Arakawa M, Suzuki H, Saito S, and Yamada H. Novel missense mutation of the DNA topoisomerase 1 gene in SN-38-resistant DLD-1 cells. Mol Cancer Ther. 5(3), 502-8, 2006. 査読有

〔学会発表〕(計 3 件)

①伊藤正紀、佐川由紀子、鈴木英明、本間 定、新規 MIA (melanoma inhibitory activity) 分子の同定と機能解析、第 67 回日本癌学会学術総会、2008 年 10 月 29 日、名古屋

②荒川泰弘、斎藤 忍、鈴木英明、山田 尚、MLF1-IP の発現と細胞内局在について、第 65 回日本癌学会学術総会、2006 年 9 月 29 日、横浜

③荒川泰弘、斎藤 忍、鈴木英明、山田 尚、DNA トポイソメラーゼ I の変異がカンプトテイシン誘導体感受性に与える影響について、第 64 回日本癌学会学術総会、2005 年 9 月 14 日、北海道

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 英明
東京慈恵会医科大学・医学部・准教授
研究者番号：70196856

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし