

## 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24年5月24日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590925

研究課題名（和文）心筋転写因子 HOP の会合分子同定と心不全の分子機構解明

研究課題名（英文） Identification of the molecule binding with the cardiac transcriptional regulator HOP and analysis on the molecular function of heart failure

## 研究代表者

森田 啓行（MORITA HIROYUKI）

東京大学・医学部附属病院・特任准教授

研究者番号：60323573

研究成果の概要（和文）：心筋転写制御因子 HOP（Homeodomain-Only Protein）のミスセンス遺伝子変異はヒトにおいて拡張型心筋症・難治性心不全をきたす。さらに遺伝子過剰発現マウスにおいてもこの変異が拡張型心筋症・難治性心不全をきたすことが確認されている。しかしながら、その分子機序は不明である。本研究では、酵母 two-hybrid 法を用いて、HOP と会合する分子の同定をおこなった。スクリーニングの結果、14 物質を会合分子候補として同定した。なかでも、ATPase Na/K  $\beta$ 1 サブユニットは細胞膜輸送系の膜貫通タンパク Na/K ATPase のサブユニットで心筋細胞のホメオスタシス保持に必須のタンパクといえる。HOP に連なる心筋リモデリング・心不全発症のパスウェイを解明することは、新しい心不全治療へのヒントを与えることができると期待される。

研究成果の概要（英文）：HOP（Homeodomain-Only Protein）is a unique transcriptional regulator, which lacks DNA binding capacity but functions as the repressor of SRF-induced transcription. To identify the key molecule which could account for the functional consequences triggered by the HOP missense mutation identified previously in the patients with familial dilated cardiomyopathy, protein partner of HOP was screened using yeast 2-hybrid system in this study. Here I could identify 14 proteins which can bind with HOP. Identification of the molecular pathway linking with HOP will lead to the development of the novel therapeutic approach for heart failure.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：心不全、拡張型心筋症、転写制御因子、会合分子

## 1. 研究開始当初の背景

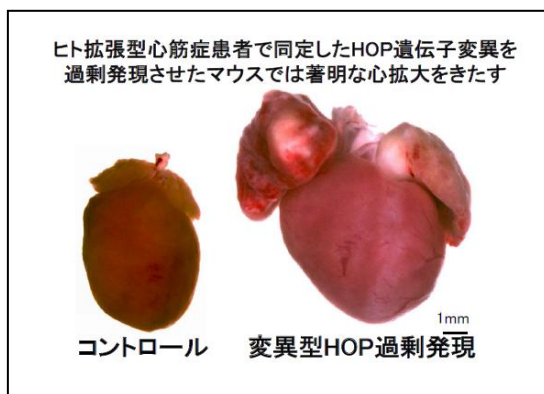
拡張型心筋症は心室腔の拡張と収縮障害をきたす心筋疾患であり、治療抵抗性で心不全死亡にいたることも多い予後不良の疾患である。根本治療は心移植において他にない。慢性的なドナー心不足から、心移植待機中に

命を落とすケースも後を立たない。拡張型心筋症の原因究明とそれに基づく治療法開発は必須事項である。現在約2割のケースでのみ原因遺伝子変異が判明している。そのほとんどがサルコメア（心筋細胞内筋原線維）、Z帯（心筋細胞間隔壁）、心筋細胞骨格など心筋

の構造タンパク異常である。しかしこれら構造タンパクを治療のターゲットに応用するのは困難である。

そこで、研究代表者は治療介入への展開を考える際に有効なターゲットとなりうる調節タンパクに注目して拡張型心筋症の原因遺伝子変異検索を進めてきた。拡張型心筋症早発家系において遺伝子スクリーニングをおこなった結果、HOP 遺伝子にミスセンス変異 Lys23Asn (23 番目のアミノ酸がリジンからアスパラギンに置換) を発見した。

HOP (Homeodomain-Only Protein) は 73 アミノ酸からなる小さな転写制御因子である。それ自体は DNA 結合配列を持たないが、おもに SRF (Serum Response Factor) と結合することで SRF 依存性転写活性を抑制し転写制御作用を発揮するとされている。胎生期から成人期までの心臓に発現がみられ、ANF (心房性ナトリウム利尿ペプチド) や心筋ミオシンの転写を制御している。次に研究代表者はこのヒト HOP 変異が拡張型心筋症の原因であることを証明するために「正常型 HOP 過剰発現マウス」と「変異型 HOP (Lys23Asn) 過剰発現マウス」とを作製し比較解析した。正常型 HOP 過剰発現マウスでは心臓は正常であったが、変異型 HOP (Lys23Asn) 過剰発現マウスでは心拡大 (下図)、心筋間質線維化、心収縮障害など拡張型心筋症様の変化が観察され 1 才齢までに約 70% が心不全死亡した。



このヒト HOP 変異を導入したマウスモデル作製により、HOP 遺伝子変異がヒト拡張型心筋症の原因であることを明らかにした。ヒト遺伝子変異を出発点にして、心筋転写制御の破綻が拡張型心筋症、重症心不全をきたすことを明示した。しかし、治療への応用を考えるためには、さらに詳細な機序解明が必要である。研究代表者はこの変異型 HOP が拡張型心筋症をきたすメカニズムを解明するため、ANF プロモーター-luc を用いたルシフェラーゼアッセイをおこなった。HOP はおもに SRF

と結合することで SRF 依存性転写活性を抑制し転写制御作用を発揮するとされていることから、HOP-SRF 軸に着目して正常型 HOP と変異型 HOP との作用差を説明しようと考えた。確かに、正常型 HOP は SRF 依存性転写活性を抑制するし、変異型 HOP ではその抑制が有意に強くなる (gain-of-function)。しかしながらその差は軽度であり、この HOP-SRF 軸だけでヒトやマウスにおける劇的なフェノタイプ差を説明するには十分でなかった。すなわち SRF 以外に何らかの会合分子 X の存在を仮定しないと辻褃が合わない。

研究代表者は「HOP は SRF 以外の転写制御因子 X と会合する、そしてこの物質 X が前述の HOP 遺伝子変異の劇的な効果を説明する」という仮説を立てた。

## 2. 研究の目的

HOP 会合分子の発見同定し、それを糸口にして HOP 変異の拡張型心筋症惹起機序を解析する。

## 3. 研究の方法

(1) 酵母 two-hybrid 法により HOP 会合分子 X を発見・同定する。

酵母 two-hybrid 法は出芽酵母を用いてタンパク質間の物理的相互作用を検出する実験法である。本研究では GAL4 の系を用いた (Fields S and Song O. *Nature* 340:245-246, 1989)。Bait (餌) 側ベクターとして pBD-GAL4 Cam vector、Prey (獲物) 側ベクターとして pAD-GAL4-2.1 vector、レポーター酵母株として YRG-2 を用いた。Bait である HOP と Prey である X とが結合すると GAL4 依存性プロモーターが ON になりヒスチジン非要求性コロニーを形成する、という性質を利用した実験系である。選択効率を高めるために抗真菌剤 Aureobasidin A も併用した。SRF は HOP と結合することが知られる (Shin CH, et al. *Cell* 110:725-735, 2002) ので、明確なポジティブコントロールとして使用できる。

(2) 免疫沈降-ウェスタンブロッティングで HOP-物質 X 間の結合を確認する。

293T 細胞を 3 群に分け、1) FLAG-tagged HOP トランスフェクション群、2) HA-tagged X トランスフェクション群、3) FLAG-tagged HOP および HA-tagged X 共トランスフェクション群を設ける。各群からタンパクを抽出、Anti-FLAG ビーズで免疫沈降の後、ビーズ吸着タンパクを回収し Anti-HA でウェスタンブロッティングをおこなう。また逆に Anti-HA ビーズで免疫沈降の後、ビーズ吸着タンパクを回収し Anti-FLAG でウェスタンブロッティ

ングをおこなう。これにより HOP-物質 X が互いに直接結合できることを示しうる。

#### 4. 研究成果

##### (1) 酵母 two-hybrid 法による HOP 会合分子 X の発見・同定

Prey として Pretransformed Human Heart Matchmaker cDNA Library (Clontech) を用い酵母 two-hybrid 法によるスクリーニングをおこなった。コントロール実験から 3.5 百万個のクローンをスクリーニングしたこと、接合効率は約 5.0% であったことを確認した。最終的にヒスチジン非要求性・Aureobasidin A 抵抗性コロニーを形成したのは 14 物質であった。物質のカテゴリーはチャンネルなど細胞膜表面に発現するタンパク、筋原線維の構成タンパク、細胞内代謝に関わるタンパクなど多岐にわたった。

##### (2) 免疫沈降-ウェスタンブロットリング法で HOP-物質 X 間の結合を確認

既に解析の完了した会合分子のひとつ、ATPase Na/K  $\beta$  1 サブユニットに関して下記に報告する。

ATPase Na/K  $\beta$  1 サブユニットは細胞膜輸送系の膜貫通タンパク Na/K ATPase のサブユニットで 303 アミノ酸残基からなる。心筋 Na/K ATPase はジギタリスにより特異的に阻害されることが知られている。また、発生段階で心筋細胞がその形態を保つために必須のタンパクであることも報告されている (Yuan S&Joseph EM Circ Res. 2004)。Na/K  $\beta$  1 サブユニットの coding region 全長の N 末端に Myc をタグしたフラグメントを発現用ベクター pcDNA3.1(-) に挿入し、N 末端に FLAG をタグしたヒト正常型 HOP とともに 293T 細胞に強制発現させ、抽出したタンパクを Anti-FLAG ビーズで免疫沈降することによりこれら 2 種類のタンパク間結合が確認された。

しかしながら、N 末端に FLAG をタグしたヒト変異型 HOP を用いて同じプロトコールで免疫沈降実験をおこなっても、同等の結合が確認された。すなわち、ATPase Na/K  $\beta$  1 サブユニットは HOP と結合はするが、正常型 HOP でも変異型 HOP でもこれは同等であり、この会合分子との結合の多寡で HOP 遺伝子変異の劇的な効果を説明することはできなかった。そこで遺伝子活性化の程度の違いを現在検討中である。なお、他の物質に対しても同様の解析を進行している。

本研究では、家族性拡張型心筋症患者で同定された HOP 遺伝子変異が拡張型心筋症・重

症心不全をきたす機序の解明をおこなうことを最終目標に、HOP の会合分子を同定し、分子生物学的解析をおこなった。酵母 two-hybrid 法によるスクリーニングの結果、14 種類の会合分子を同定した。特に、ATPase Na/K  $\beta$  1 サブユニットに関しては免疫沈降-ウェスタンブロットリング法でヒト HOP との結合を確認した。しかしながら、ヒト HOP は、正常型であっても変異型であっても ATPase Na/K  $\beta$  1 サブユニットと等しく結合可能であることから、ATPase Na/K  $\beta$  1 サブユニットとの結合の多寡で HOP 遺伝子変異の劇的な効果を説明することはできなかった。遺伝子活性化に与える影響などダウストリームメカニズム解析を進める必要がある。本研究では厳格な品質管理の下、条件決めをおこない、酵母 two-hybrid 法によるスクリーニングを有効におこなうことができたことを確信しているが、免疫沈降-ウェスタンブロットリング法で確認してみると必ずしもはっきりとした結合が確認できない物質が存在するのも事実である。酵母 two-hybrid 法自体に内在する非特異性がその原因として考えられる。

一般的に拡張型心筋症の原因遺伝子はサルコメアタンパク、Z 帯タンパク、細胞骨格構成タンパク、イオンハンドリングタンパク、ミトコンドリアタンパクなど、きわめて多岐にわたるが、転写因子、転写制御因子の遺伝子異常が拡張型心筋症の原因になるという報告は現在でもきわめて限られている。心筋の発生分化や代謝制御にかかる遺伝子の発現に影響を与える転写因子・転写制御因子に変異がもたらされると胎児期や出生直後に心臓死が招来されてしまう可能性がある。

転写制御因子の異常は、圧負荷による心肥大、虚血後の心筋リモデリングにも大いに関わっている。すなわち、本研究で解明されたメカニズムは心筋症発症機序を理解するのに役立つだけでなく、ひろく一般の心筋リモデリング、心不全にも敷衍することができる。事実、マウス上行大動脈縮窄心圧負荷モデルでは心臓での HOP 発現が低下しているというデータを得ている。今後も HOP タンパクが心筋リモデリング、心不全発症に及ぼす影響に関して解析を進めたい。さらにメカニズム解明にとどまらず、小分子調節タンパク HOP の発現制御による心筋リモデリング制御、心不全治療へと研究を発展させたいと考えている。

#### 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14件)

- ①Sakamoto A, Ishizaka N, Saito K, Imai Y, Morita H, Koike K, Kohro T, Nagai R. Serum levels of IgG4 and soluble interleukin-2 receptor in patients with coronary artery disease. Clin Chim Acta. 2012; 413: 577-581. 査読有  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22146599>
- ②Ogawa N, Imai Y, Takahashi Y, Nawata K, Hara K, Nishimura H, Kato M, Takeda N, Kohro T, Morita H, Taketani T, Morota T, Yamazaki T, Goto J, Tsuji S, Takamoto S, Nagai R, Hirata Y. Evaluating Japanese patients with the Marfan syndrome using high-throughput microarray-based mutational analysis of fibrillin-1 gene. Am J Cardiol. 2011; 108: 1801-1807. 査読有  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0002914911024350>
- ③Kimura K, Takenaka K, Ebihara A, Uno K, Iwata H, Sata M, Kohro T, Morita H, Yatomi Y, Nagai R. Reproducibility and diagnostic accuracy of three-layer speckle tracking echocardiography in a swine chronic ischemia model. Echocardiography 2011; 28: 1148-1155. 査読有  
[DOI: 10.1111/j.1540-8175.2011.01517](https://doi.org/10.1111/j.1540-8175.2011.01517)
- ④Morita H, Nagai R. Vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. New England Journal of Medicine 2011; 365: 1448. 査読有  
<http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMc1108651>
- ⑤森田啓行  
循環器疾患の遺伝子診断  
呼吸と循環 2011; 59(8): 817-823. 査読無
- ⑥小室一成、竹村元三、森田啓行、山岸正和  
心筋症 発症原因から新しい治療法を考え
- る  
Cardiac Practice 2011; 22(3):243-251. 査読無
- ⑦Kimura K, Takenaka K, Pan X, Ebihara A, Uno K, Fukuda N, Kohro T, Morita H, Yatomi Y, Nagai R. Prediction of coronary artery stenosis using strain imaging diastolic index at rest in patients with preserved ejection fraction. J Cardiol. 2011; 57: 311-315. 査読有  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0914508711000116>
- ⑧森田啓行  
心筋症  
内科 2010; 106(6): 1007-1010. 査読無
- ⑨Morita H, Nagai R. Retinopathy progression in type 2 diabetes. New England Journal of Medicine 2010; 363: 2171. 査読有  
<http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMc1009236>
- ⑩Ogawa N, Imai Y, Morita H, Nagai R. Genome-wide association study of coronary artery disease. Int J Hypertens. 2010, Article ID 790539 査読有  
[DOI:10.4061/2010/790539](https://doi.org/10.4061/2010/790539)
- ⑪Morita H, Nagai R, Seidman JG, Seidman CE. Sarcomere gene mutations in hypertrophy and heart failure. J Cardiovasc Transl Res. 2010; 3: 297-303. 査読有  
[DOI:10.1007/s12265-010-9188-4](https://doi.org/10.1007/s12265-010-9188-4)
- ⑫Morita H, Nagai R. MMP12, lung function, and COPD in high-risk populations. New England Journal of Medicine 2010; 362: 1241. 査読有  
<http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMc1000959>
- ⑬森田啓行、永井良三  
世界における高血圧の現況と心血管疾患  
制圧への取り組み

日本臨床 2009; 67(Suppl 7): 36-44. 査読無

⑭ 森田啓行、永井良三

高血圧・循環器疾患

日本臨床 2009; 67(6): 1095-1102. 査読無

[学会発表] (計6件)

① 森田啓行

心筋症～遺伝子解析から病態を考える

第1回Translational Research Conference in Saitama

2011.12. 13. (埼玉)

② 森田啓行

医学における科学的方法論

第6回医療の質・安全学会学術集会 シンポジウム

2011.11. 19. (東京)

③ 森田啓行

メラトニンの血管保護作用～ラメルテオンへの期待～

第10回 Metropolitan Interventional Cardiovascular Conference

2010.6.5. (東京)

④ 森田啓行

遺伝子多型(SNP)と遺伝子変異(mutation)

第4回 Young Researchers Conference

2010.5.18. (東京)

⑤ 森田啓行

心肥大・心筋症の遺伝疫学的検討

第8回高知県心筋症ネットワーク

2010.5.14. (高知)

⑥ Hiroyuki Morita

Sarcomere gene mutations as a common cause of “unexplained” pediatric cardiac hypertrophy

XXth World Congress of the International Society for Heart Research 2010 Kyoto

2010.5.13. (京都)

[図書] (計3件)

① 森田啓行

遺伝子疾患としての循環器病

カラー版 循環器病学 基礎と臨床 (西村書店)

2010、pp. 121-134.

② 森田啓行、永井良三

動脈硬化

循環器疾患のサイエンス (南山堂)

2010、pp. 190-198.

③ 森田啓行、永井良三

循環器疾患と遺伝子異常

内科学書改訂第7版 (中山書店)

2009、pp. 289-292.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森田 啓行 (MORITA HIROYUKI)

東京大学・医学部附属病院・特任准教授

研究者番号: 60323573

(2) 研究分担者

永井 良三 (NAGAI RYOZO)

東京大学・医学部附属病院・教授

研究者番号: 60207975