

ラミニン遺伝子結合転写因子 Smarce-1 r の
機能解析、病態発症に関する研究

【研究成果】 ラミニンは、高血圧症、拡張型心筋症、糖尿病で増加し、組織の硬化を招くと報告されている。申請者らは、その病因の解明に、ラミニン γ 1 鎖プロモーターの転写を活性化する bcn-1 element を見出し、および、結合転写因子 S m a r c e 1 r をクローニングした (J. Biol. Chem. 271, 1996. Genebank AF072836, H. Suzuki)。

そこで、本研究事業では、S m a r c e 1 r の機能、ならびに、心臓疾患との関連を明らかにすることを目的に研究事業計画書に沿って研究を開始検討した。

【研究計画】

柱1. S m a r c e 1 r の機能解析

- (A) S m a r c e 1 r 遺伝子の調節、発現についての検討
- (B) S m a r c e 1 r の疾患との因果関係についての解明
- (C) ノックアウトマウスおよびトランスジェニックマウスの作製
- (D) ノックアウトおよびトランスジェニックマウスにおける心機能の評価

を計画し、平成15年度事業において、

- (1) S m a r c e 1 r 転写因子の 分子間相互因子見出すために、ハイブリッドシステムを用い心筋由来の新規蛋白 SMAR P (Smarce1r-related protein)をクローニングした。
- (2) さらに、SMAR Pを用いて、スクリーニングを繰り返し、トロポニン I の新しいアイソフォームをクローニングした。そこで、16年度助成事業からこれらの新規蛋白についての検討を合わせて行うこととし、

柱1. 上記 S m a r c e 1 r の機能解析に加え

柱2. SMAR P の機能解析

- (A) SMAR P 遺伝子の調節、発現についての検討
- (B) SMAR P の疾患との因果関係についての解明
- (C) SMAR P の分子間相互因子のクローニング

柱3. トロポニン I r の機能解析

- (A) トロポニン I r 遺伝子の調節、発現についての検討
- (B) トロポニン I r の疾患との因果関係についての解明

SMAR P、トロポニン I r の検討を加え、心臓疾患との因果関係を明らかにする事を目的とし検討した。

【研究実績】

柱1. Smarce1rの機能解析

(A) Smarce1r遺伝子の調節、発現についての検討

1. 先述のように、Smarce1r転写因子の分子間相互因子見出すために、イーストのツーハイブリッドシステムを用いスクリーニングを施行した。最初にSmarce1rcDNAをイーストシャトルベクターPBKT7にサブクローニングし、選択培地を用いてイースト内にベクターを取り込んだコロニーを選別した。そこで、心筋細胞由来のcDNAライブラリーとMating methodにより培養し、当初16個の初期陽性クローンを得た。次に、16個のクローンをさらに培地の選択を加えた条件で培養、ならびに

LacZにより陽性クローンを選別したところ、最終10個の二次陽性コロニーを得た。そこで、陽性クローンのcDNAをプラスミドに転換しシークエンスしたところ、coding lesionの全長1263bpの蛋白が得られ、ロイシンジッパー構造を有する新規蛋白であったためSMARP(Smarce1r-related protein)と命名した。

2. Smarce1rについては、GFP融合Smarce1rならびにDsRed融合Smarce1rを作製し、HeLaならびにCOS-7培養細胞にトランスフェクトし、強制発現してConfocal Microscopyにて細胞内局在を調べ、GFP-Smarce1r融合タンパクは核に局在して強く発現することが判明した。

(B) Smarce1rの疾患との因果関係についての解明

Smarce1rと心筋症の関連を明らかにする目的で、心筋症患者数名と心筋症ハムスターJ2Nk、J2Ncを用いてmRNAからcDNAを合成しシークエンスを行ないcoding lesionにおけるSNPsを見つける仕事を行っている。今後、症例数を重ねる必要があり、継続して観察していく予定である。

(C) Smarce1rノックアウトマウスの作製に関しては、先にクローニングしていたHuman-Smarce1rcDNAが部分長であったため、RacePCRおよび部分長DNAをプローベに用いマウスライブラリーのスクリーニングを施行した。その結果、完全長マウスcDNAが平成15年度事業にて得られた。平成16年度は、129/svマウスSmarce1rをプローベに、マウスゲノムライブラリーのスクリーニング及びPCR、サザンプロットを繰り返した結果、Smarce1r遺伝子領域をクローニングした。特に、2箇所のイントロン領域については、PCRを繰り返し施行し、また、一部分はマウスクローンを購入し得て作製した結果、Smarce1r遺伝子領域完全長のクローニングが終了した。ノックアウトマウスについては、現在作製中であり、期間中には終了できなかったが、成果については、論文等にて発表でき次第、追って御

報告する予定である。

柱2. SMAR Pの機能解析

(A) SMAR P遺伝子の調節、発現についての検討

1. 新規タンパク SMAR Pの組織発現を調べるために、SMAR P mRNAの発現をノーザンブロットにて検討した。脳、心臓、肺、肝臓、腎臓、精巣の Total RNA を用いて、ブロットしたところ、心臓に強く発現し、また、精巣にも発現することが判明した。

2. 次に、SMAR Pの細胞内局在を調べたところ、SMAR Pは核内には Speckled に存在するが、核小体により強く発現がすることが判明した。さらに、SMAR Pの deletion mutant を作製し、N末端の核小体移行シグナルの存在を見出した。

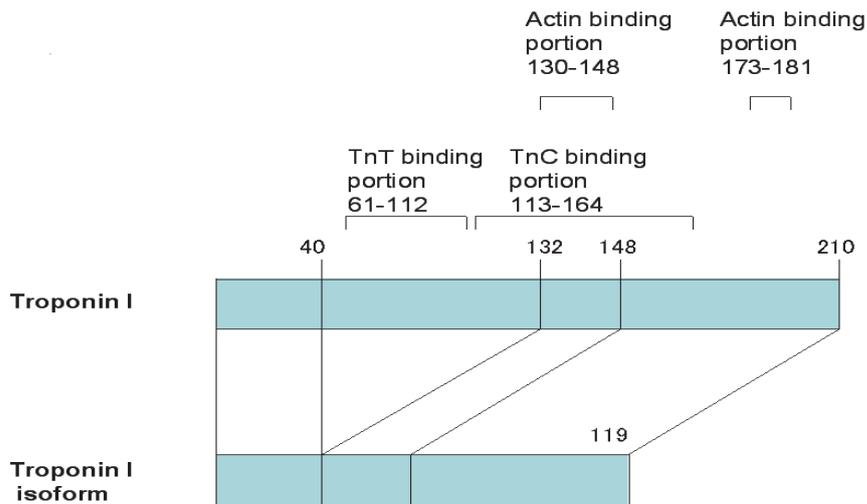
この結果を合わせて論文投稿中である。

(B) SMAR Pの疾患との因果関係についての解明

Sm a r c e 1 rと同様に、心筋症の関連を明らかにする目的で、心筋症患者数名と心筋症ハムスター J 2 N k、J 2 N cを用いてSNP sを見つける仕事を行っている。

(C) SMAR Pの分子間相互因子のクローニング

SMAR Pの分子間相互因子見出すために、同様にイーストのツーハイブリッドシステムを用いスクリーニングを施行した。SMAR P cDNAをB a i tに、選択培地を用いてイースト内にベクターを取り込んだコロニーを選別した。そこで、心筋細胞由来のcDNAライブラリーから2個のクローンを得たのでシーケンスしたところ、129個アミノ酸の蛋白が得られ、図のようにTroponin I類似構造(アイソフォーム)を認めていたため、Troponin I-related (Troponin Ir)とした。



柱3. トロポニン Ir の機能解析

(A) トロポニン Ir 遺伝子の調節、発現についての検討

SMARPの分子間相互作用因子を見出すために、同様にイーストのツーハイブリッドシステムを用いスクリーニングを施行したところ、トロポニン I の新しいアイソフォームトロポニン Ir がクローニングされた。図に示したように、トロポニン Ir は、119個のアミノ酸から構成され、トロポニン I に含まれるアミノ酸42-132の領域を欠損するため、構造上では、とりわけトロポニンC、トロポニンTとの結合領域のC末端を欠損し、また、アクチン結合部位のN末端の一部を欠損することになる。そこで、本来トロポニン I の機能として認める、トロポニンC、トロポニンT、アクチンとの結合する機能を有するかを検討した。ところ、GST-融合蛋白を用いた、Pull-down assay, *In vitro* の免疫沈降反応を施行し、ルシフェラーゼベクターを用い、*In cell* での分子間結合力を測定したところ、トロポニンTとの結合は認めず、アクチンの結合能も低下していた。現在では心筋細胞にて発現し、免疫沈降反応を施行する段階である。

(B) トロポニン Ir の疾患との因果関係についての解明

Smarcelr、SMARPと同様に、心筋症の関連を明らかにする目的で、心筋症患者数名と心筋症ハムスター J2Nk、J2Nc を用いてSNPsを見つける仕事を合わせて行っている。

以上の過程にて研究を進めた。

【研究事業の成果の国内外での位置付けについて】

- (a) 本研究を進め、2種の新規蛋白 Smarcelr、SMARPを見いだす成果を得た。いずれも国内外で報告はない。
- (b) また、本研究事業によりクローニングしたトロポニンIのアイソフォームは国内外で報告がなく、論文にて報告した。
- (c) 平成16年度までの検討により、SMARPのN末端に核小体移行シグナルの存在が示唆され、新たな核小体移行シグナルを論文にて投稿している。ナルが存在することを見出した。

【発表論文】

1. Suzuki H, Imanishi A, Shikata C, Nishiyama A, Takeda N.
Potential of screening for cardiac myosin-binding protein C gene mutations. Trends in Cell & Molecular Biology 2005; in press.
2. Suzuki H, Ito M, Arakawa M, Seki S, Yamada J, Takeda N, and H Yamada.
Cloning of a newly identified troponin I isoform, which lacks troponin T binding portion using the yeast two hybrid system. Experimental and clinical cardiology 9(2); in press, 2005.
3. 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); 2006.
4. Suzuki H, et.al(4). Cloning of two factors, Smarcelr and SMARP, using yeast two hybrid systems. Experimental and clinical cardiology 9(2); 142, 2004.
5. Ohata M, Suzuki H, et.al(7). Pioglitazone prevents acute liver injury induced by ethanol and lipopolysaccharide through the suppression of tumor necrosis factor-alpha. Clinical and experimental research 28(8); 139-44, 2004.
6. Kitamura T, Itoh M, Noda T, Matsuura M, and Wakabayashi K. Combined effects of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 selective inhibitors on intestinal tumorigenesis in adenomatous polyposis coli gene knockout mice. Int J Cancer 109; 576-80, 2004.
7. Nagai M, Horikoshi K, Seki S, et. al (4). Cardioprotective action of an ACE inhibitor and an angiotensin receptor blocker in renovascular hypertensive rats. (J Cardiovasc

Drug Thera 2005, in press)

8. Tanaka T, Nagai M, Seki S, et. al (6). Effects of bradykinin on cardiovascular remodeling in renovascular hypertensive rats. (Hypertens Res 2005 in press)
9. 伊藤正紀. 消化管腫瘍モデルマウス。細胞工学、24(2), 167-70, 2005.
10. 伊藤正紀. Wnt シグナル、APC, β -カテニンと癌。G. I. Research, 11(4), 2003.

現在作成中論文

1. Suzuki H, Arakawa Y, Ito M, Saito S, Mochizuki S, Takeda N, Yamada H, Yamada JH. A novel nucleolar localization signal of MLF1-interacting protein. FEBS letter, submitted.
2. Suzuki H, Ito M, Arakawa M, Yamada J, Takeda N, and H Yamada. Cloning of Smarcelr and SMARP intra-cellular proteins using yeast hybrid system. 本研究における Smarcelr and SMARP のクローニング成果につき投稿予定である。

事業成果の公表について 本研究成果については、計画書の予定に沿い、厚生労働省特発性心筋症に関する調査研究班 平成15年度第2回会議 (平成16年2月札幌)、
同 平成16年度第1回会議 (平成16年10月 札幌)、
同 平成16年度第2回会議 (平成17年2月 札幌)、
同 平成17年度第1回会議 (平成17年7月 大阪)、
同 平成17年度第2回会議 (平成17年12月大阪)、
にて演者にて発表した。(次頁抄録1、3、5、8、10、12)

ならびに、

心筋代謝研究会 27th Annual Meeting of the Japanese Working Group Cardiac Structure and Metabolism (平成16年7月 大阪)
同 28th Annual Meeting of the Japanese Working Group Cardiac Structure and Metabolism (平成17年7月 浜松)
にて演者にて発表した (次頁抄録4、9)。

学会発表抄録

1. **Suzuki H** and Takeda N. Activation of the laminin gamma 1 chain gene promoter through the BCN-1 element. The international symposium of cardiology frontiers, cardiomyopathy and heart failure, suppl 19, 2003,

2. Abe Y, Okada T, Nagai M, **Seki S**, Mochizuki S et.al : The effect of angiotensin receptor antagonist against cardiac hypertrophy in renovascular hypertensive rat. Circ J 67 Suppl I: 550 2003.

3. 鈴木英明, 武田信彬: ラミニン $\gamma 1$ 鎖プロモーター遺伝子の転写発現調節における検討. 厚生労働省 特発性心筋症に関する調査研究班 平成15年度第2回会議(平成16年2月 札幌)

4. H Suzuki, Ito M, Arakawa Y, Yamada J, and Yamada H. Cloning of two factors, Smarcelr and SMARP, using yeast hybrid systems. 心筋代謝研究会 27th Annual Meeting of the Japanese Working Group Cardiac Structure and Metabolism (平成16年7月 大阪)

5. 鈴木英明, 武田信彬, 荒川泰弘, 伊藤正紀: ラミニン $\gamma 1$ 鎖プロモーター遺伝子の転写発現調節における検討. 厚生労働省 特発性心筋症に関する調査研究班 平成16年度第1回会議(平成16年10月 札幌)

6. Seki S, Nagai M, Takeda S, Taniguchi M, Mochizuki S : Effect of Beta-Blocker on Sarcoplasmic Reticulum Ca Handling and Contractility in Ca-Force-Frequency Relationship in Perfused Rat Heart. (Circ J 68 Suppl I: 188 2004)

7. Seki S, Koga A, Miyazaki H, Kanae K, Mochizuki S 他5名 : Clinical significance of brain natriuretic peptide level in essential hypertensive patients. (Circ J 68 Suppl I: 630 2004)

8. 鈴木英明, 武田信彬: ラミニン $\gamma 1$ 鎖プロモーター遺伝子の転写発現調節における検討. 厚生労働省 特発性心筋症に関する調査研究班 平成16年度第2回会議(平成17年2月 札幌)

9. H Suzuki, Arakawa Y, Yamada J, and Yamada H. Cloning of a newly identified heart-specific troponin I isoform, which lacks troponin T binding portion using theyeast hybrid system. 心筋代謝研究会 28th Annual Meeting of the Japanese Working Group Cardiac Structure and Metabolism (平成17年7月 浜松)

10. 鈴木英明, 武田信彬: ラミニン γ 1 鎖プロモーター遺伝子の転写発現調節における検討. 厚生労働省 特発性心筋症に関する調査研究班 平成17年度第1回会議(平成17年7月 大阪)

11. 鈴木英明, 武田信彬: ラミニン γ 1 鎖プロモーター遺伝子の転写発現調節における検討. 厚生労働省 特発性心筋症に関する調査研究班 平成17年度第2回会議(平成17年12月 大阪)

以上