

松本雄二論文内容の要旨

主 論 文

Functional analysis of titin/connectin N2-B mutations found in cardiomyopathy
(特発性心筋症に見出されたタイチン[コネクチン]遺伝子変異の機能解析)

松本 雄二 林丈晴 稲垣夏子 高橋めぐみ 広井知歳 中村剛之
有村卓朗 中村一文 芦澤直人 安波道郎
大江透 矢野捷介 木村彰方

(Journal of Muscle Research and Cell Motility 2005; 26(6-8): 367-374)

長崎大学大学院医学研究科内科系専攻
指導教授：矢野捷介教授

緒 言

特発性心筋症は、臨床的に肥大型心筋症 (HCM) と拡張型心筋症 (DCM) に大別されるが、近年の分子遺伝学の進歩により、心筋サルコメア構成タンパク遺伝子の変異が HCM や DCM の原因となることが明らかになって来ている。タイチン (コネクチン) はサルコメアの主要な構成蛋白であるが、我々はこれまで特発性心筋症患者においてタイチン遺伝子の変異を見出し、いくつかの変異においてはタイチン結合タンパクに対する機能変化を報告した。我々はタイチンの N2-B 領域において HCM 関連変異 (Ser379Tyr) と DCM 関連変異 (Gln4053ter) を報告しているが、これらの変異による機能変化はまだ明らかにできていない。最近、タイチンの N2-B 領域に FHL2 が結合することが報告され、心筋症関連 N2-B 変異が FHL2 との結合を変化させることが推測される。FHL2 はクレアチニンキナーゼなどの代謝酵素と結合することより、これら代謝酵素をサルコメアに分布させる機能を有すると考えられる。また、FHL2 はタイチンの is2 領域とも結合することが報告されている。そこで本研究では、心筋症患者を対象としてタイチン遺伝子 (*TTN*) is2 領域の変異検索を行うとともに、酵母 2 ハイブリッド (Y2H) 法を用いてタイチン N2-B および is2 領域変異による FHL2 結合能変化を検討した。

対象と方法

TTN is2 領域の変異解析；これまでに判明している心筋症原因遺伝子に変異がない HCM 患者 96 例および DCM 患者 92 例を対象とし、*TTN* 変異検索を行った。対照は健常日本人 288 人とした。末梢血由来のゲノム DNA を用いて PCR 法で *TTN* is2 領域を増幅

し、SSPC 法で変異を検索した。異常 SSPC パターンを認めた場合は、直接シーケンシングでヌクレオチド変化を決定した。Y2H 法による機能解析；ヒト *TTVN2-B* および *is2*、*FHL2* の cDNA をそれぞれ RT-PCR 法で全心臓 RNA より増幅し、心筋症関連の各変異はプライマー変異導入法にて作成した。cDNA は pCR2.1 にクローニングし、*TTV* および *FHL2* の cDNA を、それぞれ pGADT7、pGBKT7 (Matchmaker two-hybrid system 3) へ挿入した。*TTV N2-B* および *is2* の各正常型/変異型と *FHL2* をそれぞれ Y187 株へ同時形質転換させ、 β ガラクトシダーゼ活性によって結合能を評価した。

結 果

TTV is2 領域の変異解析；遺伝子多型ではない変異を 1 種類認めた。その変異は Arg25618Gln で DCM の親子発症例に認めた。同変異は進化の過程でよく保存されたアミノ酸の置換であり、電荷変化を伴い、また健常者 288 名には認められず、DCM 病因に関連する変異である可能性が考えられた。*TTV* 変異による *FHL2* 結合性変化；*TTVN2-B* 領域と *FHL2* の結合能に関しては、HCM 関連 Ser3799Tyr 変異では β ガラクトシダーゼ活性は 46.1 ± 12.7 単位で、正常型での 36.7 ± 8.4 単位に比較し有意な増加を認めた ($p < 0.01$)。一方、DCM 関連 Gln4053ter 変異での同活性は 24.9 ± 12.7 単位と有意な低下を認めた ($p < 0.002$)。 *TTV is2* 領域と *FHL2* の結合能に関しても検討したが、非常に弱い結合であり、DCM 関連 Arg25618Gln 変異の有無で有意な差は認められなかった (WT; 0.88 ± 0.01 単位 v. s. Arg25618Gln; 0.89 ± 0.01 単位)。

考 察

本研究において、DCM 患者に *TTV is2* 領域に新たな変異を見出し、*TTVN2-B* 領域の心筋症関連変異は、*FHL2* との結合異常を来すことを明らかにした。このことは、*TTVN2-B* 領域変異が *FHL2* を介する代謝性酵素のサルコメア分布異常を招来し、心筋症の原因となることを示唆する。すなわち、これまでの研究で HCM や DCM はサルコメアタンパク異常による筋収縮における Ca 感受性異常、あるいはストレッチ反応異常に起因するとされていたが、本研究は従来の説明とは異なる機序による心筋症発症メカニズムの可能性を提起した。