



Title	Lamr1 functional retroposon causes right ventricular dysplasia in mice
Author(s)	朝野, 仁裕
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/45229">https://hdl.handle.net/11094/45229</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名 <sup>あさ</sup>朝 <sup>の</sup>野 <sup>よし</sup>仁 <sup>ひろ</sup>裕

博士の専攻分野の名称 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 第 18438 号

学 位 授 与 年 月 日 平成 16 年 3 月 25 日

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第 4 条第 1 項該当

医学系研究科情報伝達医学専攻

学 位 論 文 名 *Lamr1* functional retroposon causes right ventricular dysplasia in mice  
(不整脈源性右室心筋変性症責任遺伝子のポジショナルクローニングとその機能解析)

論 文 審 査 委 員 (主査)

教 授 堀 正二

(副査)

教 授 金田 安史 教 授 荻原 俊男

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 【背景と目的】

ヒト ARVD は若年者を中心に、心臓突然死を引き起こす遺伝性心筋変性症として知られている。しかしながらその発症前診断は非常に困難であり、またヒト家系解析においてすでにゲノム上の 6 か所にその候補領域が報告されているが、責任遺伝子のクローニングに成功したものは一つしかなく、未だ病態形成機序を明らかにするには至っていない。本研究において ARVD モデルマウスを発見・単離し、その責任遺伝子のクローニングに成功し、機能解析を行ったので、ここに報告する。

### 【方法ならびに成績】

#### 1) ARVD 責任遺伝子の同定

糖尿病モデルマウス・KK-Ta に由来するある系統に、常染色体劣性の遺伝形式をとり、右室に限局した心筋変性および石灰化を認めるマウス系統を発見し、ARVD モデルマウス (以下 KK/Rvd) として単離した。ポジショナルクローニング法を用いてマウス ARVD 責任遺伝子の同定を行うために、野生型マウス (PWK) と戻し交配を行い、QTL 解析を行った。その結果 Chr. 7 に有意に (LOD score 4.67) 相関する 3 Mb の候補領域を認めたため、Celera 社のゲノムデータベースを用いてさらなる genotyping を行った。最終的に候補領域を 0.5 Mb にまで狭めることに成功し、同領域の配列を比較検討した結果、KK/Rvd ゲノム上に約 1 kb におよぶ挿入配列を認めた。homology 解析により、同挿入配列は Chr. 9 に存在する laminin receptor 1 (*Lamr1*) 遺伝子のイントロンがプロセッシングを受けた retropseudogene (以下 *Lamr1-tp1*) であることが判明した。コード配列の全長に差は無く、相同配列比較により計 26 の核酸塩基に変異を認め、計 13 のアミノ酸残基に変異が生じていることが判明した。また、*Lamr1-tp1* の前後 1 Mb に mapping されている遺伝子は他に存在しなかった。

#### 2) *Lamr1-tp1* の発現解析

各組織から抽出した mRNA を用いて *Lamr1-tp1* の発現を確認したところ、心臓、肝臓および骨格筋においてその

発現を認めた。Lamr1 および Lamr1-tp1 をマウス心筋に強制発現させたところ、Lamr1-tp1 発現部位において心筋組織変性像を認めた。さらにアデノウイルス発現ベクター (Ad-Lamr1、Ad-Lamr1-tp1) を作成し、ラット培養心筋細胞を用いて解析を行ったところ、MTS assay において Ad-Lamr1-tp1 は有意に強い心筋細胞死を誘導した ( $p < 0.005$ )。

次に免疫組織学的検討において、培養心筋細胞に Ad-Lamr1 と Ad-Lamr1-tp1 を感染させたところ両者間で核染色像に有意な違いを認めた。Lamr1 に対して作成したペプチド抗体を用いて発現蛋白質の局在を確認したところ、LAMR1 蛋白質は核内 DAPI 濃染性ヘテロクロマチンに対して顕著な鏡面増を呈する一方、LAMR1-TP1 蛋白質はクロマチン形態および発現の局在ともに明らかな変化を認めた。

### 3) LAMR1-TP1 の細胞内機能解析

クロマチン形態に変化を来す LAMR1-TP1 による、細胞内機能の変化について検討するために、LAMR1 および LAMR1-TP1 に対する共沈蛋白質の有無を調べた結果、LAMR1-TP1 にのみ共沈する 27 KDa の蛋白質 (以下 RVAP 27) があることが判明した。RVAP 27 の精製を行い、Edman Degradation N-terminal Sequencing 法および Nano electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry 法を用いて同定したところ、同蛋白質は、核内ヘテロクロマチン領域に局在し、ヒストンメチル化などのクロマチンリモデリングに関わる、Heterochromatin Protein 1  $\alpha$  (HP1  $\alpha$ ) であることが判明した。また、逆に HP1  $\alpha$  発現ベクターを用いて共沈する蛋白質を検討したところ、LAMR1 は共沈せず、一方 LAMR1-TP1 は共沈することが確認された。

### 4) LAMR1-TP1 導入による遺伝子発現変化

クロマチン構造変化を来す Lamr1-tp1 による遺伝子発現制御の変化について、培養心筋細胞を用いて DNA マイクロアレイ法、Northern blot 法により検討を行ったところ、Lamr1-tp1 を発現させた心筋細胞は、対照群および Lamr1 発現細胞に比べて遺伝子発現に明らかな変化を認めることを確認した。

### **【総括】**

今回の研究において

- 1) ヒト Arrhythmogenic Right Ventricular Dysplasia (ARVD) に類似した、遺伝性の病態を示す ARVD モデルマウスを単離した。
- 2) positional cloning によりその原因遺伝子は retroposon として染色体 7 番に挿入された変異型 Lamr1 遺伝子であることが明らかとなった。
- 3) ARVD モデルマウスの心臓において変異型 Lamr1 遺伝子の発現が確認された。
- 4) 変異型 LAMR1 蛋白質の発現により、in vivo で同様の心筋変性が観察された。
- 5) 変異型 LAMR1 蛋白質の発現により、心筋細胞のクロマチンの構造変換が誘導された。
- 6) 変異型 LAMR1 蛋白質に特異的に結合する蛋白として Heterochromatin Protein 1  $\alpha$  が単離された。
- 7) 変異型 Lamr1 遺伝子を導入することにより心筋細胞の遺伝子発現が大きく変化することが確認された。

単離された ARVD モデルマウスにおいては、ゲノム中に挿入された変異型 Lamr1 遺伝子が偶然心筋で発現して、その病因となっていることが明らかとなった。またその病態メカニズムとして、心筋細胞で発現した変異型 LAMR1 蛋白質が、Heterochromatin Protein 1  $\alpha$  と相互作用することにより核内クロマチン構造に影響を及ぼし、epigenetic な遺伝子発現制御を修飾し、心筋変性を引き起こした可能性があると推定された。

## 論文審査の結果の要旨

本論文において、ヒトと同様の表現型を示す自然発症型遺伝性心筋症（不整脈源性右室心筋変性症：ARVD）モデルマウスが発見されたこと、その遺伝学的解析により責任遺伝子（変異型 Laminin receptor 1）が新規に同定されたこと、そしてその機能解析が行われたことが発表された。

変異型 Laminin receptor 1 遺伝子についてゲノム、転写産物、および蛋白質の各レベルにおける、原因遺伝子としての詳細な検証が行われ、本遺伝子がモデルマウスの心臓において発現していること、発現により心筋組織障害が生じることが証明された。さらに、核内ヘテロクロマチン領域をダイナミックに制御する Heterochromatin Protein 1  $\alpha$  が本蛋白質と相互作用することや、本遺伝子が発現することにより心筋細胞における他の遺伝子発現を変化させる事実などを見出した。以上の結果に考察を加えることにより、本遺伝子が発現して心筋細胞におけるクロマチン構造の変換が生じる結果、epigenetic な遺伝子発現が変化し、心筋細胞死が惹起されるという、循環器病の領域においてこれまでに報告をみない、新しい疾患概念を提示するに至った。

ARVD は若年者を中心に心臓突然死を来す遺伝性心筋症として有名であるが、その原因は未だ明らかではなく、病態解明へ向けて国内外の研究力が注がれている。本論文は、1) ヒトではまだ明らかではない遺伝性心筋疾患の責任遺伝子を同定し、そのメカニズムを解明した新知見に加え、2) クロマチン構造の変換に由来する epigenetic な変化が心筋細胞変性を導くという独創的な着想と先進性、さらに 3) retroposon が発現し疾患原因遺伝子となったという遺伝学的な重要性など、非常に大きなインパクトを多数備えている。これら一連の研究成果は世界の ARVD に対する診断・治療のみならず、広く心筋症の病態にも関わる可能性を有することから、新たな病態メカニズムの解明に大きく貢献するものと考えられる。

以上に示す通り、審査を行った結果、本論文を博士（医学）の学位授与に値するもの判断し、ここに認める。