

新規長鎖非コード RNA と RNA 結合タンパク質の結合に着目した心不全の病態解明

桑原康秀

京都大学大学院医学研究科 地域医療システム学講座
京都大学大学院医学研究科 循環器内科学

【研究の背景】

全ゲノム解析により、多くのタンパク質をコードしない RNA (非コード RNA) が DNA から転写されていることが報告された。その数は、進化と共に爆発的に増加しており、疾患の複雑性に繋がっている可能性がある。既知の 2 つのタンパクコード遺伝子の中から転写される長鎖非コード RNA は、long intergenic non-coding RNA (lincRNA) に分類されるが、個々の長鎖非コード RNA の機能はほぼ未知である。我々は心肥大・心不全における長鎖非コード RNA の機能を解明するため、マウス圧負荷モデルを用いて、心肥大と心不全時に有意に上昇する新規 lincRNA を同定し、**L**ong **i**ntergenic-**o**ri**n** **n**oncoding RNA in the **h**ea**r**t (*Lionheart*) と名付け、その機能解析を行うこととした。

【目 的】

新規 lincRNA である *Lionheart* と、その RNA 結合タンパク質の機能解析を通して、心肥大や心不全の新規の病態解明を行う。

【方法 と 結果】

1) *Lionheart* 欠損マウスの表現型解析

我々は独自に *Lionheart* 欠損マウスを作成し、その表現型を解析することで、生体における *Lionheart* の機能解析を試みた。エコーによる Baseline の評価では、心機能に差は認められなかったが、このマウスの心重量を測定したところ、野生型マウスと比較し、有意な低下を認め、また cross-sectional area の有意な縮小を認めた。更に遺伝子発現を評価したところ、非常に興味深いことに、マウスの心臓の主な収縮蛋白である・ミオシン重鎖 (*Myh6*) の mRNA レベルが、*Lionheart* のアリル数に依存して有意に低下していた。

Lionheart は圧負荷モデルで有意に持続上昇する lincRNA として同定したため、*Lionheart* 欠損マウスに圧負荷を行い、エコー検査によりその心機能を評価したところ、*Lionheart* 欠損マウスでは野生型マウスと比較し、早期に心機能低下が認められ、*Myh6* の mRNA、タンパク質レベル共に有意な低下を認めた。

2) *Lionheart* と RNA 結合タンパク質の解析

Lionheart の分子機能を同定するため、ビオチン化 *Lionheart* と圧負荷心の核蛋白を結合させ、ストレプトアビジンビーズで回収、その後質量分析を行うことにより、*Lionheart* 結合核内タンパク質を網羅的に同定した。コントロールとして *Lionheart* の相補鎖を用いたところ、最も *Lionheart* に特異的に結合する RNA 結合タンパク質は Purine-rich element-binding protein A (PURA) であった。PURA は RNA/DNA 結合タンパク質として報告されており、*Myh6* の発現を負に制御すると報告されている。そこで、*Myh6* 遺伝子座への PURA 結合をクロマチン免疫沈降により定量したところ、圧負荷 *Lionheart* 欠損マウスでは圧負荷野生型マウスと比較し、有意に PURA が *Myh6* 遺伝子座に結合していた。これらのデータは、*Lionheart* が PURA と結合し、その機能を抑制することで、*Myh6* を正に制御していることを示唆している。

3) *Lionheart* のヒトの心臓における発現

Lionheart がヒトにおいても発現しているかを評価するため、未分化ヒト iPS 細胞とヒト iPS 細胞由来心筋細胞における *Lionheart* の発現量を評価したところ、分化心筋細胞では *Lionheart* の有意な上昇を認めた。

またヒト左室生検サンプルを用いて *Lionheart* の発現量を qPCR にて定量し、臨床パラメーターとの相関を評価した。興味深いことに *Lionheart* の発現量と心機能は正の相関を示し、このことは *Lionheart* 欠損マウスの表現型と類似する結果であった。

【考 察】

以上の結果は、新規 lincRNA である *Lionheart* が、マウス心臓において PURA と特異的に結合することにより、収縮タンパク質である MYH6 を正に制御し、圧負荷から心臓を保護していることを示唆するものである。一方、*Lionheart* の過剰発現により MYH6 が心臓において上昇するか、またその時に心機能が維持されるかを評価する必要があると考えている。

また、我々の検討では *Lionheart* は筋特異的に発現しており、骨格筋でも発現していることを確認している。そのため、骨格筋での機能も解明したいと考えている。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

ヒトにおいても *Lionheart* 発現が認められ、心機能との正の相関が認められたことから、*Lionheart* は心不全における一つの治療標的になる可能性があると考えられる。また *Lionheart* がマウスからヒトまで保存されていることを考慮すると、ヒトの様々な病態において、多くの lincRNA がダイナミックに発現変動し、疾患に関与していることが予想される。