

cGMP系関連遺伝子多型に基づいた循環器疾患遺伝的要因の解明とその医療への応用

●齊藤 能彦

京都大学臨床病態医科学第二内科

研究の目的

心血管保護効果が報告されている2つのcGMPをセカンドメッセンジャーとするeNOSとGC-A系に注目してその遺伝子多型と循環器疾患との関連研究を遂行することが、本研究の最終目標である。

検討結果と考察

邦人に多発する冠攣縮性狭心症の成因を研究する上で、この成因にeNOS遺伝子異常が関与しているとの仮説に基づき、冠攣縮性狭心症と健常対象者それぞれ10名のDNAを用いて、eNOS遺伝子全エクソンと5'転写調節領域1.6Kbpにわたり、SSCP法で点変異を検索した。その結果、エクソン7のミスセンス変異(Glu298Asp変異)と、5'転写調節領域に、3カ所の点変異(T-786C, G-922C, T-1468A変異)を見つけた。

5'転写調節領域の3つの変異は同一対立遺伝子上に存在していたが、ゲルシフトアッセイによると-786C変異プローブのみでシフトバンドが認められ、変異型の非標識プローブではバンドは消失したが、野生型の非標識プローブでは競合せず、変異型の配列により親和性が高く結合する蛋白質の存在が示唆された。さらに、T-786C変異部位を11bp欠失させた変異リポーターを作製してルシフェラーゼアッセイを行ったところ、この欠失クローンは野生型クローンと同等までルシフェラーゼ活性が回復した。これらの結果より、T-786C変異にサプレッサー蛋白質が結合していることが示唆された。T-786C変異近傍は既知の転写調節配列と相同性が認められず、このサプレッサーを精製することにした。この蛋白質を精製するにあたりHela細胞の核蛋白質を300mg調整し、2段階のイオン交換クロマトグラフィー、アフィニティービーズにて、SDS-PAGE上50Kdのシングルバンドに精製することに成功した。この蛋白質をゲルより抽出し、アミノ酸配列を決定した。この決定されたアミノ酸配列はreplication protein A (RPA)の部分配列と100%一致した。さらに

ゲルシフトのシフトバンドはRPAに対する抗体でスーパーシフトし、また、リコンビナントRPAを用いても同様のゲルシフトが確認された。さらに、RPAの転写開始点付近の塩基配列を基にしたアンチセンスをHUVECに導入すると変異型リポーター活性が有意に回復することが確認された。これらの一連の結果より変異型eNOS遺伝子の転写はRPAを介して抑制されていることが証明された。

成果公表リスト

1. Y. Miyamoto, Y. Saito, M. Nakayama, Y. Shimasaki, T. Yoshimura, M. Yoshimura, M. Harada, N. Kajiyama, I. Kishimoto, K. Kuwahara, J. Hino, E. Ogawa, I. Hamanaka, S. Kamitani, N. Takahashi, R. Kawakami, K. Kangawa, H. Yasue, K. Nakao. Replication protein A1 reduces transcription of the endothelial nitric oxide synthase gene containing a T-786→C mutation associated with coronary spastic angina. *Hum. Mol. Genet.* 9:2629-2637, 2000.
2. M. Yoshimura, H. Yasue, M. Nakayama, Y. Shimasaki, H. Ogawa, K. Kugiyama, Y. Saito, Y. Miyamoto, Y. Ogawa, T. Kaneshige, H. Hiramatsu, T. Yoshioka, S. Kamitani, H. Teraoka, K. Nakao. Genetic risk factors for coronary artery spasm: significance of endothelial nitric oxide synthase gene T-786→C and missense Glu298Asp variants. *J. Invest. Med.* 48:367-74, 2000.
3. M. Nakayama, H. Yasue, M. Yoshimura, Y. Shimasaki, H. Ogawa, K. Kugiyama, Y. Mizuno, E. Harada, S. Nakamura, T. Ito, Y. Saito, Y. Miyamoto, Y. Ogawa, K. Nakao. A T-786→C Mutation in the 5' -flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with myocardial infarction, especially without coronary organic stenosis. *Am. J. Cardiol.* 86:628-34, 2000.
4. M. Yoshimura, M. Nakayama, Y. Shimasaki, H. Ogawa, K. Kugiyama, S. Nakamura, T. Ito, Y. Mizuno, E. Harada, H. Yasue, Y. Miyamoto, Y. Saito, K. Nakao. AT-786→C Mutation in the 5' -flanking Region of the Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene and Coronary Arterial Vasomotility. *Am. J. Cardiol.* 85:710-714, 2000.
5. M. Nakayama, H. Yasue, M. Yoshimura, Y. Shimasaki, K. Kugiyama, S. Sugiyama, H. Sumida, H. Ogawa, Y. Saito, Y. Ogawa, Y. Miyamoto and K. Nakao. T-786 C mutation in the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm: reduction in promoter activity. *Circulation* 99:2864-2870, 1999.

