

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09149

研究課題名(和文) 成熟心筋細胞の恒常性維持に対するポリコム遺伝子群の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of Polycomb group proteins in adult heart

研究代表者

白井 学 (Shirai, Manabu)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・創薬オミックス解析センター・室長

研究者番号：70294121

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：成熟心筋細胞の恒常性維持に対するポリコム遺伝子群の機能を解明するために、ホモ個体の多くが生後1年で心不全症状を示すPcgf5 KOマウスについて解析を行った。その結果、Pcgf5が成体心臓でもPRC1.5複合体を形成する事、構成タンパク質としてCK2 α 1、HDAC2を新たに確認した。Pcgf5 KOマウス心臓ではタンパク質のリン酸化状態が変化していた。RNA-seq解析により、生後12週令で変化なく、12ヶ月令のPcgf5 KOマウス心臓で特異的に変動している遺伝子を確認した。これらから、成熟心筋細胞の恒常性維持に対してPcgf5がタンパク質のリン酸化等を介して関与する可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：To understand the molecular mechanisms of Polycomb group (PcG) proteins in maintaining the cardiac functions, we analyzed Pcgf5 (PcG ring finger 5) functions at adult stage. As reported previously, Pcgf5 formed PRC1.5 complex with Ring1b and RYBP in adult mouse left ventricle (LV). We also found casein kinase 2 alpha 1 (CK2 α 1) and histone deacetylase 2 (HDAC2) associated with Pcgf5 and other PRC1.5 components. In several phosphoproteins, significant alterations were observed in young and aged Pcgf5-deficient LV. We also compared gene expressions in young and aged LV by RNA-seq analysis and defined specific expression changes in aged Pcgf5-deleted LV. These findings revealed that Pcgf5 plays a pivotal role in maintaining the cardiac function in aged mice.

研究分野：循環器疾患

キーワード：ポリコム遺伝子 心筋細胞 恒常性維持

1. 研究開始当初の背景

心臓は、血圧などの血行動態の変化に応じて、その形状や収縮力を変化させてポンプとしての機能を一定に保つ能力を有する。成体の心臓は常にメカニカルストレスをはじめとする様々なストレスにより、障害を受ける危険にさらされているため、その恒常性を維持するためには高度な分子機構が存在すると考えられる。ポリコム遺伝子 *Pcgf5* は発生期から成熟した心臓で一貫して強く発現し、*Pcgf5* 遺伝子ノックアウト (KO) マウスの多くは、生後1年余りで心不全症状を示して死亡することから、*Pcgf5* タンパク質を含むポリコム遺伝子群が成熟心筋細胞の恒常性維持機構を制御している可能性が示唆された。

2. 研究の目的

Pcgf5 KO マウスの解析を元に、成熟心筋細胞の恒常性維持を制御する分子機構解明を目指し、更に、様々なストレスによるこの分子機構の破綻がヒトにおける心不全を生じさせ、ポリコム遺伝子群がその原因遺伝子の一つである可能性について探索することを目的とした。本目的のために、*Pcgf5* KO マウスが心不全を発症する時期を詳細に解析するとともに、成体心臓において *Pcgf5* と複合体を形成するタンパク質を同定し、RNA-seq 解析により、*Pcgf5* KO マウス心臓で発現量が変化する遺伝子について、網羅的に解析を行った。

3. 研究の方法

(1) *Pcgf5* KO マウスの表現型解析。

小動物用超音波画像診断装置を用いて、*Pcgf5* KO マウスの心機能を様々な週令において計測するとともに、12 週令の *Pcgf5* KO マウスに対して浸透圧ポンプを用いてイソプロテレノールを連続投与し、心臓にストレスを負荷して心機能の変化を計測、また、解剖学的、組織学的手法により、心筋細胞の状態を解析した。

(2) ポリコム複合体の解明。

生後 12 週令のマウス左心室組織片より核内タンパク質を抽出し、共免疫沈降法を用いて *Pcgf5* と結合しているタンパク質を解析した。

(3) リン酸化タンパク質解析。

生後 12 週令、12 ヶ月令の野生型、*Pcgf5* KO マウス左心室より核内タンパク質を抽出し、各組織におけるタンパク質のリン酸化状態をプロテオーム解析により比較した。

(4) 遺伝子発現解析。

生後 12 週令、12 ヶ月令の野生型、*Pcgf5* KO マウス左心室組織片より total RNA を抽出、poly A 選抜により得られた mRNA

からイルミナ次世代シーケンサー用の cDNA ライブラリー調整を行い、HiSeq3000 を用いて *Pcgf5* KO マウス左心室における遺伝子発現変化を網羅的に解析した。

4. 研究成果

(1) *Pcgf5* KO マウスの表現型解析。

Pcgf5 KO マウスにおける心不全がいつの時期から生じるのかを明らかにするために小動物用超音波画像診断装置を用いて詳細な解析を行った。その結果、生後 12 週令で心機能のわずかな低下が確認されたが、個体差が大きく、優位差が確認できるのは生後 6 ヶ月以降であった。心機能の低下は老化に伴って増悪した。次に 12 週令の野生型マウス、*Pcgf5* KO マウスに対して浸透圧ポンプを用いてイソプロテレノールを連続投与することにより、心臓にストレスを与えたが、心機能の低下、心筋細胞の形態は、野生型と大きな差は確認されなかった (図 1)。

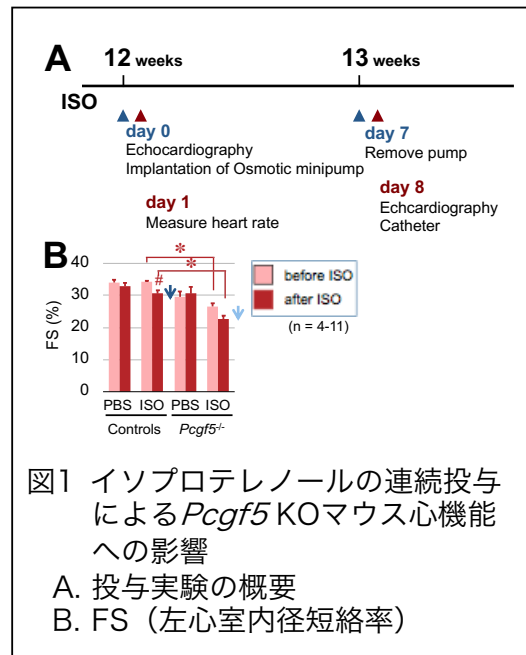


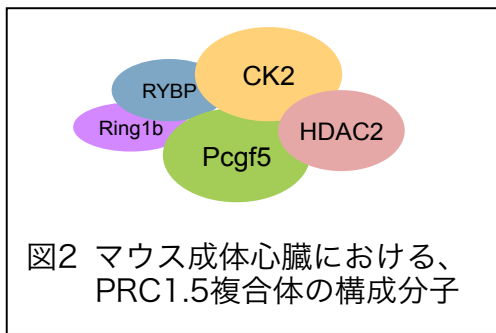
図1 イソプロテレノールの連続投与による *Pcgf5* KO マウス心機能への影響

A. 投与実験の概要

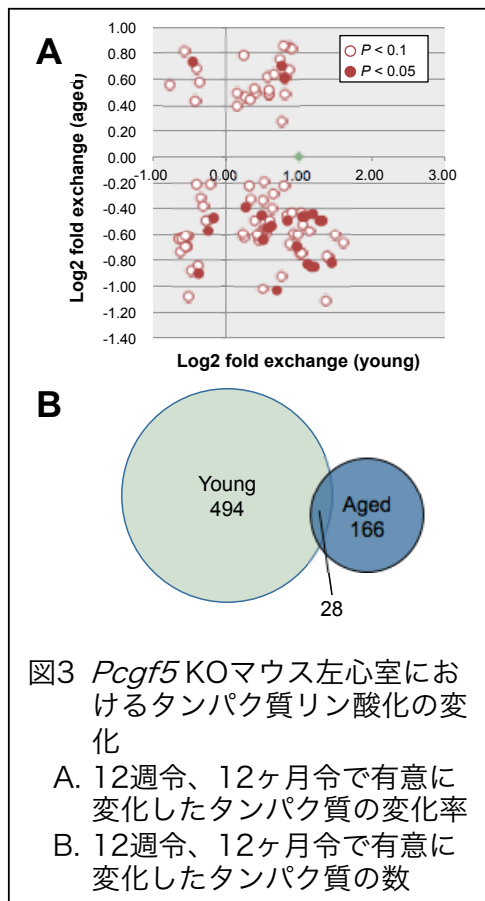
B. FS (左心室内径短絡率)

(2) ポリコム複合体の解明。

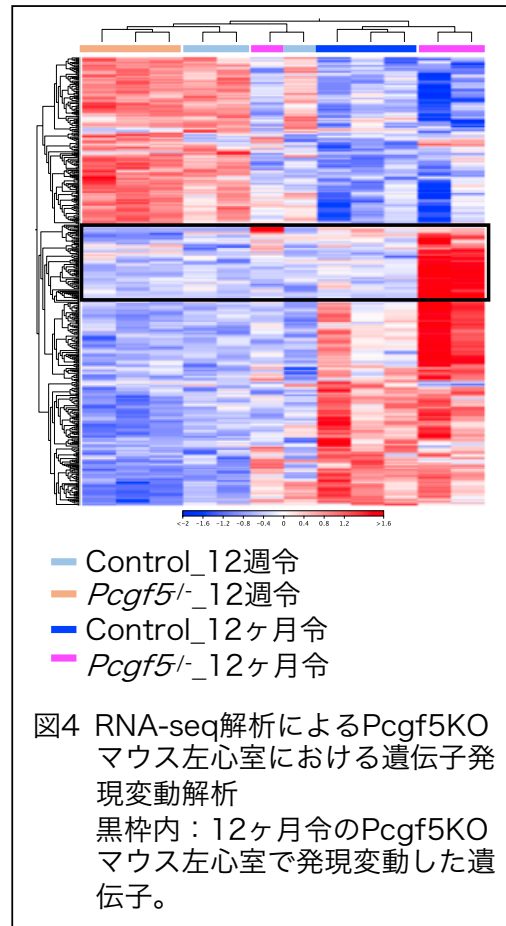
ポリコムタンパク質は複合体を形成して機能することが知られている。マウス成体心臓における *Pcgf5* を含むポリコム複合体について共免疫沈降法を用いて解析したところ、心臓でも *Pcgf5* が含まれた、PRC1.5 複合体が存在し、casein kinase 2 alpha 1 (CK2 α 1) が *Pcgf5* と直接結合していることが確認された。また新たに *Pcgf5* と histone deacetylase 2 (HDAC2) の結合が確認された (図 2)。



- (3) リン酸化タンパク質解析
 心臓における PRC1.5 複合体に CK2 α 1 が含まれることから、心筋における核内タンパク質のリン酸化状態について、プロテオーム解析を行った。その結果、生後 12 週令、12 ヶ月令ともに、*Pcgf5* KO マウス左心室においてリン酸化状態が変化したタンパク質が確認された (図 3)。



- (4) 遺伝子発現解析。
Pcgf5 KO マウスが生後数ヶ月で心不全症状を示すことから、12 週令と 12 ヶ月令の *Pcgf5* KO マウス特異的な遺伝子発現を RNA-seq 法を用いて解析した。その結果、12 週令よりも 12 ヶ月令の *Pcgf5* KO マウスで特に発現が変化する遺伝子が確認された (図 4)。



5. 主な発表論文等
 (研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 3 件)

- (1) Shirai, M., Kim, M., Otani, K., Tsuchimochi, H., Takihara, Y., and Morisaki, T. 「Functional analysis of Polycomb ring finger 5 (*Pcgf5*) in the heart of adult mice.」
 第38回日本分子生物学会 (2015)
- (2) Shirai, M., Kim, M., Tsuchimochi, H., Otani, K., Takihara, Y., and Morisaki, T. 「Functional analysis of Polycomb repressive complex 1.5 (PRC1.5) in adult mouse heart」
 第 39 回日本分子生物学会 (2016)
- (3) 白井 学、錦織 充広、若林 真樹、高橋 篤、金 美花、大谷 健太郎、土持 裕胤、瀧原 義宏、森崎 隆幸、南野 直人
 「成体心臓の機能維持に対するポリコム遺伝子 *Pcgf5* (*Polycomb ring finger 5*) の機能解析」
 2017 年度生命科学系学会合同年次大

会 (ConBio2017)

[図書] (計 1件)

Shirai M, Takihara Y, Morisaki T. Pcgf5
Contributes to PRC1 (Polycomb Repressive
Complex 1) in Developing Cardiac Cells.
*Etiology and Morphogenesis of Congenital
Heart Disease*. 2016. pp. 305-312.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

白井 学 (SHIRAI MANABU)

国立循環器病研究センター・創薬オミックス
解析センター・室長

研究者番号：70294121

(2) 研究分担者

なし

研究者番号：

(3) 連携研究者

森崎 隆幸 (MORISKI TAKAYUKI)

元：国立循環器病研究センター・研究所・
部長

現：東京大学医科学研究所・特任教授

研究者番号：30174410

森崎 裕子 (MORISKI HIROKO)

元：国立循環器病研究センター・研究所・
室長

現：榊原記念病院・医長

研究者番号：40311451