

令和元年6月10日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07254

研究課題名(和文)クロマチン構造変換因子ARIP4による心筋細胞分化制御機構の解明

研究課題名(英文)Chromatin remodeling factor ARIP4 regulates the cardiomyocyte differentiation

研究代表者

土屋 恵 (TSUCHIYA, Megumi)

大阪大学・生命機能研究科・特任助教(常勤)

研究者番号：00390691

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：心筋細胞の分化過程においては様々な分化誘導因子の発現を伴うことが知られているが、それらはクロマチン上でエピジェネティックな遺伝子発現制御により厳密に制御されると予想される。本研究ではマウスES細胞の心筋分化過程において、クロマチンリモデリング因子ARIP4が分化誘導因子群の発現や分化の進行に影響を及ぼすことを明らかにした。また発生時期の胎児心臓組織においてARIP4がp62と結合することから、ARIP4のタンパク量およびクロマチンへの結合がp62により制御されていると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究による心筋分化過程の分子レベルでの解明は、心筋再生医療の発展に大きく貢献する。このような、細胞内のエネルギー状態をモニターするエピジェネティックなプロモーター制御の分子メカニズムの解明は、細胞内エネルギー代謝の変化に関わる遺伝子発現制御機構を理解するだけでなく、代謝経路が大きく変化する癌化のメカニズム解明のための極めて重要な手掛かりとなると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we demonstrate that the chromatin remodeling factor, ARIP4 played an essential role for cardiomyocyte differentiation of mouse embryonic stem (ES) cells. The reducing of protein levels of ARIP4 or an ectopic expression of ATPase mutant of ARIP4 suppressed the ES differentiation to the cardiomyocyte. Interestingly, genome-wide analysis clearly showed that ARIP4 mainly localized near the promoter region and the region was inactivated through the ATPase activity of ARIP4. Furthermore, endogenous ARIP4 interacted with p62 in mice embryonic hearts. Since p62 is well known as a selective autophagy receptor, it is suggested that p62 monitors the cellular energy levels and regulates the protein levels of ARIP4 during the cardiomyocyte differentiation. These data strongly suggest that ARIP4 acts as a key regulator for the cardiomyocyte differentiation through the modulation of chromatin structure with monitoring the energy level during cell differentiation.

研究分野：分子生物学

キーワード：心筋分化誘導 心筋細胞 クロマチン変換因子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

心筋細胞では恒常的な拍動を維持する必要があるため、その分化過程で未分化細胞での嫌氣的解糖系代謝から ATP を効率よく産生する酸化的リン酸化へと代謝経路が移行することが必須となる。効率の良いエネルギー産生系へと移行するための細胞内の急激な変化には、細胞分化に伴うエピジェネティックな遺伝子発現制御が関与していると考えられる。ARIP4 (AR interaction protein 4) は ATP 依存的クロマチンリモデリング因子様の SNF2 ドメインを有し、核内受容体に結合しその標的遺伝子の発現を抑制する機能を持つ。我々の作製した心臓特異的 ARIP4 欠損マウスは心室中隔欠損、心室心筋の肉柱形成異常、心筋層の菲薄化など、ヒトの遺伝性疾患である心筋緻密化障害に類似した特徴を示す。これらの知見から、ARIP4 が心筋細胞の分化、特にエネルギー代謝経路の確立及び心筋組織の構築に極めて重要な因子であると予測された。

2. 研究の目的

心筋細胞の分化過程では、拍動の維持に必要なエネルギーを効率良く獲得するために、代謝経路の急激な変化が起こっている。本研究ではこの分化過程に関与する ARIP4 を中心としたクロマチン上でのエピジェネティックな制御に注目し、その分子制御機構を解明する。

3. 研究の方法

本申請研究では以下の方法で心筋分化過程で起こるエピジェネティックな変化とそれに関わる ARIP4 を中心とした分子制御機構について実験を進めた。

〔平成 28 年度〕 マウス野生型 ES 細胞 (129 系統由来 EB3 ES cells) を心筋分化誘導し、経時的に RNA を抽出し、ARIP4 および心筋分化マーカー群の発現の時間的変化を qPCR にて検出した。次に野生型 ES 細胞に ARIP4 shRNA ベクターを導入し、ARIP4 ノックダウン ES 細胞株 (ARIP4 KD) の樹立を行い、心筋分化誘導を行い拍動開始までの時間、心筋の発生・分化に関与する関連因子の発現変動について野生型 ES 細胞と比較を行った。さらにマウス ES 細胞の ROSA26 遺伝子座に薬剤誘導性発現ベクターを簡便に導入できる細胞株 (EBRTcH3 cells) および ARIP4 発現ベクターを使用し、ARIP4 過剰発現誘導細胞株の樹立を行なった。ARIP4 の機能欠損変異体としてクロマチン構造変換に必要な ATPase 変異体を用い、野生型 ARIP4 発現誘導細胞株と同時に作製を行った。

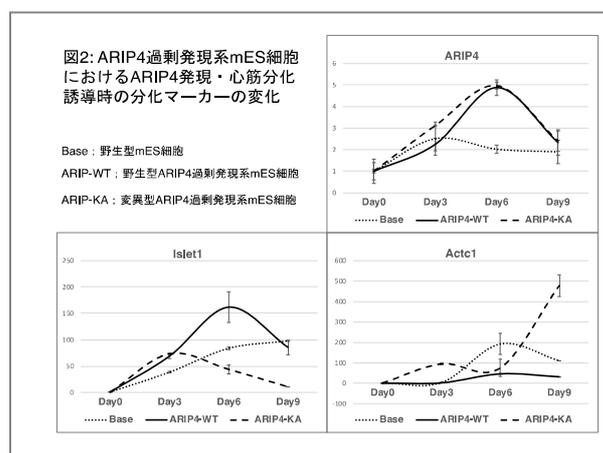
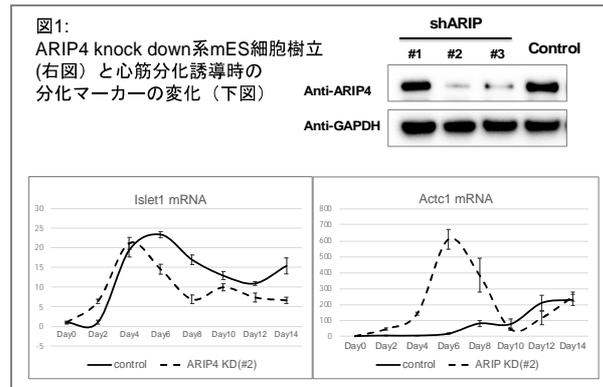
〔平成 29 年度〕 これまでの心筋分化誘導法では内胚葉・中胚葉・外胚葉すべての細胞系列が誘導され、心筋細胞へ分化する割合は全体の 10% 程度であり、効率のばらつきも大きいことが問題であった。心筋分化誘導の効率を安定化のために、クロマチン構造変換因子 ARIP4 と核内で協調的に働くと予測される心臓主要転写因子群 (心筋幹細胞分化誘導因子) に着目し、竹内純准教授の協力でそれら因子群を心筋幹細胞で強制発現できる細胞系の構築を行った。また ARIP4 がオートファジーレセプター p62 と核内で結合し機能することから、E10.5 のマウス胎児心臓組織を用いた ARIP4 抗体で免疫沈降を行い vivo での p62 との結合を確認した。

〔平成 30 年度〕 ARIP4 のクロマチン上での制御機構を明らかにするために、まず初めにヒト培養細胞を用いた ChIP-seq によりゲノムワイドな結合を検索した結果、プロモーター領域で ARIP4 が心筋分化に関わる転写因子と共に発現制御を行っていることが予測された。次に心筋特異的 ARIP4 ノックアウトマウス胎児心臓組織を用いて RNA の抽出を行い、心筋分化過程に関わると推測される遺伝子の発現量の変化を qPCR にて確認し、更に RNA-seq によりクロマチン構造の変化を検討した。個々の因子については免疫染色で組織での発現を確認した。

4. 研究成果

野生型 ES 細胞において、心筋前駆細胞マーカー因子である Islet1 及び心筋細胞マーカー因子である Actc1 の発現は分化誘導開始から 12 日目までの間に急激に上昇することが確認された。一方樹立した ARIP4 KD ES 細胞 では embryoid body の拍動開始までの時間が遅延または拍動が見られないものが多く観察され、心筋分化に異常が生じていると考えられた。また ARIP4 KD ES 細胞では Islet1 の発現のピークが野生型と比べ 2 日程早く、また Actc1 のピーク時の発現量が 2～4 倍程度上昇した(図 1)。この結果から、本来複数の段階を経る未分化細胞の分化過程において、ARIP4 欠損がもたらすエピジェネティックな制御異常により、順序立った分化の進行が妨げられたのではないかと推測された。次に野生型 ARIP4 発現誘導株及び ATPase 変異体 (ARIP-KA) 発現誘導株を心筋分化誘導させたところ変異体の発現誘導により拍動が顕著に妨げられ、心筋前駆細胞マーカーの発現は野生型における発現時期と大きく異なることが確認された(図 2)。これらの結果から、ATPase 変異体過剰発現系では ARIP4 の機能が転写の制御に影響し、心筋の分化が抑制されたと考えられた。またこれまで知られている心筋分化誘導因子群は個々が中胚葉誘導に関与するが、それぞれは他の中胚葉系分化細胞の誘導も促進するため心筋特異的な分化を促す因子としては不十分であると考えられてきた。しかし連携研究者と構築した細胞系を用いた分化誘導の観察から、特定の因子の協調的な働きにより心筋分化を促進するだけでなく他の分化系統を抑制することが明らかになった。培養細胞を用いたゲノムワイドの研究から、ARIP 4 は全ゲノムに対して約 5000 カ所の結合が見られ、その 80%以上がプロモーター近傍に結合することがわかっており、今後この新たな分化誘導系を用いた ChIP-seq により、ARIP4 が標的とする分化誘導因子群の制御領域や各因子の分化段階におけるクロマチンへの結合時期を明らかにする予定である。

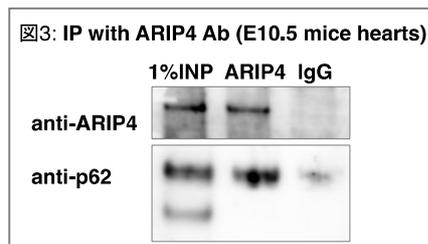
野生型 ES 細胞において、心筋前駆細胞マーカー因子である Islet1 及び心筋細胞マーカー因子である Actc1 の発現は分化誘導開始から 12 日目までの間に急激に上昇することが確認された。一方樹立した ARIP4 KD ES 細胞 では embryoid body の拍動開始までの時間が遅延または拍動が見られないものが多く観察され、心筋分化に異常が生じていると考えられた。また ARIP4 KD ES 細胞では Islet1 の発現のピークが野生型と比べ 2 日程早く、また Actc1 のピーク時の発現量が 2～4 倍程度上昇した(図 1)。この結果から、本来複数の段階を経る未分化細胞の分化過程において、ARIP4 欠損がもたらすエピジェネティックな制御異常により、順序立った分化の進行が妨げられたのではないかと推測された。次に野生型 ARIP4 発現誘導株及び ATPase 変異体 (ARIP-KA) 発現誘導株を心筋分化誘導させたところ変異体の発現誘導により拍動が顕著に妨げられ、心筋前駆細胞マーカーの発現は野生型における発現時期と大きく異なることが確認された(図 2)。これらの結果から、ATPase 変異体過剰発現系では ARIP4 の機能が転写の制御に影響し、心筋の分化が抑制されたと考えられた。またこれまで知られている心筋分化誘導因子群は個々が中胚葉誘導に関与するが、それぞれは他の中胚葉系分化細胞の誘導も促進するため心筋特異的な分化を促す因子としては不十分であると考えられてきた。しかし連携研究者と構築した細胞系を用いた分化誘導の観察から、特定の因子の協調的な働きにより心筋分化を促進するだけでなく他の分化系統を抑制することが明らかになった。培養細胞を用いたゲノムワイドの研究から、ARIP 4 は全ゲノムに対して約 5000 カ所の結合が見られ、その 80%以上がプロモーター近傍に結合することがわかっており、今後この新たな分化誘導系を用いた ChIP-seq により、ARIP4 が標的とする分化誘導因子群の制御領域や各因子の分化段階におけるクロマチンへの結合時期を明らかにする予定である。



野生型 ES 細胞において、心筋前駆細胞マーカー因子である Islet1 及び心筋細胞マーカー因子である Actc1 の発現は分化誘導開始から 12 日目までの間に急激に上昇することが確認された。一方樹立した ARIP4 KD ES 細胞 では embryoid body の拍動開始までの時間が遅延または拍動が見られないものが多く観察され、心筋分化に異常が生じていると考えられた。また ARIP4 KD ES 細胞では Islet1 の発現のピークが野生型と比べ 2 日程早く、また Actc1 のピーク時の発現量が 2～4 倍程度上昇した(図 1)。この結果から、本来複数の段階を経る未分化細胞の分化過程において、ARIP4 欠損がもたらすエピジェネティックな制御異常により、順序立った分化の進行が妨げられたのではないかと推測された。次に野生型 ARIP4 発現誘導株及び ATPase 変異体 (ARIP-KA) 発現誘導株を心筋分化誘導させたところ変異体の発現誘導により拍動が顕著に妨げられ、心筋前駆細胞マーカーの発現は野生型における発現時期と大きく異なることが確認された(図 2)。これらの結果から、ATPase 変異体過剰発現系では ARIP4 の機能が転写の制御に影響し、心筋の分化が抑制されたと考えられた。またこれまで知られている心筋分化誘導因子群は個々が中胚葉誘導に関与するが、それぞれは他の中胚葉系分化細胞の誘導も促進するため心筋特異的な分化を促す因子としては不十分であると考えられてきた。しかし連携研究者と構築した細胞系を用いた分化誘導の観察から、特定の因子の協調的な働きにより心筋分化を促進するだけでなく他の分化系統を抑制することが明らかになった。培養細胞を用いたゲノムワイドの研究から、ARIP 4 は全ゲノムに対して約 5000 カ所の結合が見られ、その 80%以上がプロモーター近傍に結合することがわかっており、今後この新たな分化誘導系を用いた ChIP-seq により、ARIP4 が標的とする分化誘導因子群の制御領域や各因子の分化段階におけるクロマチンへの結合時期を明らかにする予定である。

野生型 ES 細胞において、心筋前駆細胞マーカー因子である Islet1 及び心筋細胞マーカー因子である Actc1 の発現は分化誘導開始から 12 日目までの間に急激に上昇することが確認された。一方樹立した ARIP4 KD ES 細胞 では embryoid body の拍動開始までの時間が遅延または拍動が見られないものが多く観察され、心筋分化に異常が生じていると考えられた。また ARIP4 KD ES 細胞では Islet1 の発現のピークが野生型と比べ 2 日程早く、また Actc1 のピーク時の発現量が 2～4 倍程度上昇した(図 1)。この結果から、本来複数の段階を経る未分化細胞の分化過程において、ARIP4 欠損がもたらすエピジェネティックな制御異常により、順序立った分化の進行が妨げられたのではないかと推測された。次に野生型 ARIP4 発現誘導株及び ATPase 変異体 (ARIP-KA) 発現誘導株を心筋分化誘導させたところ変異体の発現誘導により拍動が顕著に妨げられ、心筋前駆細胞マーカーの発現は野生型における発現時期と大きく異なることが確認された(図 2)。これらの結果から、ATPase 変異体過剰発現系では ARIP4 の機能が転写の制御に影響し、心筋の分化が抑制されたと考えられた。またこれまで知られている心筋分化誘導因子群は個々が中胚葉誘導に関与するが、それぞれは他の中胚葉系分化細胞の誘導も促進するため心筋特異的な分化を促す因子としては不十分であると考えられてきた。しかし連携研究者と構築した細胞系を用いた分化誘導の観察から、特定の因子の協調的な働きにより心筋分化を促進するだけでなく他の分化系統を抑制することが明らかになった。培養細胞を用いたゲノムワイドの研究から、ARIP 4 は全ゲノムに対して約 5000 カ所の結合が見られ、その 80%以上がプロモーター近傍に結合することがわかっており、今後この新たな分化誘導系を用いた ChIP-seq により、ARIP4 が標的とする分化誘導因子群の制御領域や各因子の分化段階におけるクロマチンへの結合時期を明らかにする予定である。

また、心臓発生時期のマウス胎児心臓組織からの抽出液を用い ARIP4 抗体にて免疫沈降を行なった結果、ARIP4 が心臓発生時期に p62 と結合していることが明らかとなった(図 3)。p62 は細胞内のエネルギー状態を感知して ARIP4 の蛋白量を調節する因子であることから、心臓発生時期のエネルギー代謝経路が大きく変化する時期に ARIP4 の核内タンパク量は p62 により調節され ARIP4 のクロマチン上での機能を制御することが予想された。さらに ARIP4 欠損マウスの心臓組織から RNA を抽出し、qPCR にて ARIP4 標的遺伝子の候補を検索したところ、優位に Notch1 シグナル経路の複数の因子の変動がみられ、Notch1 のプロモーター領域に ARIP4 が結合する可能性が



見出された。また心臓特異的 ARIP4 欠損マウス心筋組織の免疫染色で、Notch1 関連因子の局在に変化が見られることも確認された。このマウス心筋では特に肉柱心筋の増殖が大きく障害されていることから、ARIP4 の欠失により肉柱形成に重要な心内膜と心筋間の情報伝達を担う Notch1 および Notch1 関連因子の機能に異常が生じた結果であると考えられた。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

1) p62/SQSTM1 promotes rapid ubiquitin conjugation to target proteins after endosome rupture during xenophagy

Tsuchiya M, Ogawa H, Koujin T, Mori C, Osakada H, Kobayashi S, Hiraoka Y, Haraguchi T
FEBS Open Bio. 2018 Mar; 8(3): 470–480.

doi: 10.1002/2211-5463.12385.

査読あり

2) Ess2 bridges transcriptional regulators and spliceosomal complexes via distinct interacting domains.

Takada I, Tsuchiya M, Yanaka K, Hidano S, Takahashi S, Kobayashi T, Ogawa H, Nakagawa S, Makishima M

Biochem Biophys Res Commun. 2018 Mar 4;497(2):597-604.

doi: 10.1016/j.bbrc. 2018.02.110.

査読あり

3) Ad4BP/SF-1 regulates cholesterol synthesis to boost the production of steroids

Baba T, Otake H, Inoue M, Sato T, Ishihara Y, Moon JY, Tsuchiya M, Miyabayashi K, Ogawa H, Shima Y, Wang L, Sato R, Yamazaki T, Suyama M, Nomura M, Choi MH, Ohkawa Y, Morohashi K

Communications Biology volume1, Article number: 18 (2018)

doi:10.1038/s42003-018-0020-z.

査読あり

4) Syu JS, Baba T, Huang JY, Ogawa H, Hsieh CH, Hu JX, Chen TY, Lin TC, Tsuchiya M, Morohashi K, Huang BM, Lu FL.

Lysosomal activity maintains glycolysis and cyclin E1 expression by mediating Ad4BP/SF-1 stability for proper steroidogenic cell growth.

Scientific Reports, Mar 21, 7(1):240,2017. doi: 10.1038/s41598-017-00393-4.

査読あり

5) Tsuchiya M, Karim M. R, Matsumoto T, Ogawa H, Taniguchi H.

A protein preparation method for the high-throughput identification of proteins interacting with a nuclear cofactor using LC-MS/MS analysis.

Journal of visualized experiments, Jan 24, (119), 2017.

doi: 10.3791/55077.

査読あり

6) Tsuchiya M, Ogawa H, Koujin T, Kobayashi S, Mori C, Hiraoka Y, Haraguchi T
Depletion of autophagy receptor p62/SQSTM1 enhances the efficiency of gene delivery in mammalian cells.

FEBS letter, Jun 18, 590(16):2671-80, 2016.

doi: 10.1002/1873-3468.12262.

査読あり

7) Nakamura R, Koshiba-T K, Tsuchiya M, Kojima M, Ogawa H, and Takeuchi-K J
Expression analysis of Baf60c during heart regeneration in axolotls and neonatal mice.

Development Growth and Differentiation, Apr 29, 58(4):367-382, 2016.

doi: 10.1111/dgd.12281.

査読あり

〔学会発表〕(計7件)

1) クロマチンリモデリング因子 Arip4 は Notch シグナルを介した心筋緻密化障害の発症を抑制する

柳 のど香、小川英知、森田唯加、土屋 恵、浅野哲也、白井 学、Schwartz RJ、諸橋憲一郎、古川哲史、小柴和子、竹内 純

東京医科歯科大学難治疾患研究所研究発表会(2019年3月14日)

東京医科歯科大学難治疾患研究所、東京都

2) Functional roles of nuclear receptor binding protein Arip4 during early trabeculation of cardiomyocyte

柳 のど香、小川英知、森田唯加、土屋 恵、浅野哲也、白井 学、Schwartz RJ、諸橋憲一郎、古川哲史、小柴和子、竹内 純

第17回日本心臓血管発生研究会(2018年12月6日)

慶應義塾大学医学部、東京都

3) オートファジーレセプターp62/SQSTM1 を標的とした効果的な遺伝子導入法の確立

土屋 恵、小川英知、渡邊賢人、荒神尚子、小林昇平、森 知栄、小坂田裕子、平岡 泰、原口徳子

第41回日本分子生物学会年会(2018年11月28-30日)

パシフィコ横浜、横浜市

4) Depletion of autophagy receptor p62/SQSTM1 enhances the efficiency of gene delivery in mammalian cells

Megumi Tsuchiya, Hidesato Ogawa, Takako Koujin, Shouhei Kobayashi, Chie Mori, Yasushi Hiraoka, Tokuko Haraguchi

第70回 日本細胞生物学会大会(2018年6月5-8日)

タワーホール船堀、東京都

5) オートファジーレセプターp62/SQSTM1 の細胞内タンパク質量の調節による効果的な遺伝子導入法の確立とその分子機構の解明

小川英知、土屋 恵、荒神尚子、小坂田裕子、森 知栄、小林昇平、平岡 泰、原口徳子

第 40 回日本分子生物学会年会 (2017 年 12 月 6-9 日)

神戸ポートアイランド、神戸市

6) オートファジーレセプターp62/SQSTM1 の細胞内タンパク質量の調節による効果的な遺伝子導入法の確立とその分子機構

小川英知、土屋 恵、荒神尚子、小坂田裕子、森 知栄、小林昇平、平岡 泰、原口徳子

第 69 回 日本細胞生物学会大会 (2017 年 6 月 13-15 日)

仙台国際センター、仙台市

7) Depletion of autophagy receptor p62/SQSTM1 enhances the efficiency of gene delivery in mammalian cells

Megumi Tsuchiya, Hidesato Ogawa, Takako Koujin, Shouhei Kobayashi, Chie Mori, Yasushi Hiraoka, Tokuko Haraguchi

第 39 回日本分子生物学会年会 (2016 年 11 月 30 日-12 月 2 日)

パシフィコ横浜、横浜市

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/labs/hiraoka/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者 なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：竹内 純

ローマ字氏名：TAKEUCHI, jun

研究協力者氏名：小川 英知

ローマ字氏名：OGAWA, hidesato

研究協力者氏名：平岡 泰

ローマ字氏名：HIRAOKA, yasushi

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。