

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：32601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06773

研究課題名（和文）心臓進化に着目した前適応の分子メカニズムの解析

研究課題名（英文）Study of the pre-adaptation mechanism underlying the evolution of heart outflow tract

研究代表者

守山 裕大（Moriyama, Yuuta）

青山学院大学・理工学部・助教

研究者番号：40646212

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究課題では真骨魚類心臓に見られる進化的新規形質である“動脈球”の発生と進化に着目することで、前適応の分子メカニズムの解明に迫ることを目的としている。動脈球の形態形成に重要な役割を果たしているelastin bについて、相互作用する因子を複数同定することができた。また、動脈球を含む心臓各部位における細胞外環境の硬さを定量化する方法を確立し、その結果動脈球では心室などの他の心臓部位と比べて細胞外環境が有意に柔らかいことが明らかとなった。さらに胚発生過程における硬さの変化、また非真骨魚類における心臓各部位の細胞外環境の硬さ測定から、elastin bの発現（有無）と硬さに相関を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題は心臓がどのように進化したか、タンパク質の相互作用や細胞外環境の硬さなどによる細胞運命制御の側面から迫るものであり、生物学のみならず化学、物理学的側面も含む、独創性の高いものである。また、心臓の進化は中学校の理科において学習する、広く一般にも知られている生物現象であり、本研究課題によって得られる知見も一般の方にもわかりやすい、好奇心を刺激するものになることが期待できる。

研究成果の概要（英文）：This project aims to elucidate the molecular mechanisms of preadaptation by focusing on the development and evolution of "bulbus arteriosus," an evolutionary novelty found in the heart of teleost. We have identified several interacting factors for Elastin b, which plays an important role in the morphogenesis of bulbus arteriosus. We also established a method to quantify the stiffness of the extracellular environment in various cardiac regions and found that the extracellular environment in bulbus arteriosus was significantly softer than these of other cardiac regions. Furthermore, we found a correlation between the expression (presence/absence) of elastin b and stiffness by measuring changes in stiffness during embryogenesis and the stiffness of the extracellular environment of various cardiac regions in non-teleost fish.

研究分野：発生生物学、進化発生生物学、生物物理学

キーワード：心臓 進化 前適応 elastin

1. 研究開始当初の背景

地球上に存在する全ての生物は生息する環境に適応するようにその形態や生理機能を変化させてきた。なかでも特徴的なものは、鳥類にみられる羽毛や植物にみられる花卉といった、進化的に新規な形質（以下、進化的新規形質と記す）の獲得である。進化的新規形質の獲得メカニズムについては、その多くが単一事象の変化（一遺伝子の獲得など）ではなく、複数の形質の変化や転用によってもたらされると考えられている。この際の、進化的新規形質の獲得や形成に転用される形質の、その転用される以前の状態や機能、またその転用されるプロセスを“前適応 (pre-adaptation)”といい、進化学における重要な概念となっている。しかし、その多くは理論的、生物哲学的な議論に留まっており、前適応の具体的な分子メカニズムについては、不明な点が多く残されていた。

2. 研究の目的

本研究課題では、真骨魚類心臓に見られる進化的新規形質である“動脈球”の発生と進化に着目することで、前適応の分子メカニズムの解明に迫る。

3. 研究の方法

脊椎動物において最も種数が多く、繁栄を遂げた系統である真骨魚類では、心臓の一部である心臓流出路と呼ばれる部位を“動脈球”と呼ばれる進化的新規形質へと変化させている。動脈球の特徴はエラスチンと呼ばれる細胞外マトリックスに富み、主に平滑筋から構成されていることで、真骨魚類以外の全ての脊椎動物では心臓流出路は主に心筋から構成されている。動脈球はエラスチン、平滑筋から構成されることで弾性を有し、心室から拍出された血液の血圧・血流量を適切な値に調節し、血液循環系を洗練されたものになっている。申請者はこれまでに、真骨魚類に至る進化の過程でエラスチンをコードする *elastin* 遺伝子がゲノム重複により重複していること、また重複したうちの一方の姉妹遺伝子である *elastin b* が心臓流出路構成細胞の細胞運命を心筋から平滑筋へと変化させることで動脈球が進化の過程で獲得され、胚発生の過程で形成されることを明らかにした (Moriyama *et al.*, *Nat Commun.* 2016, 図1)。

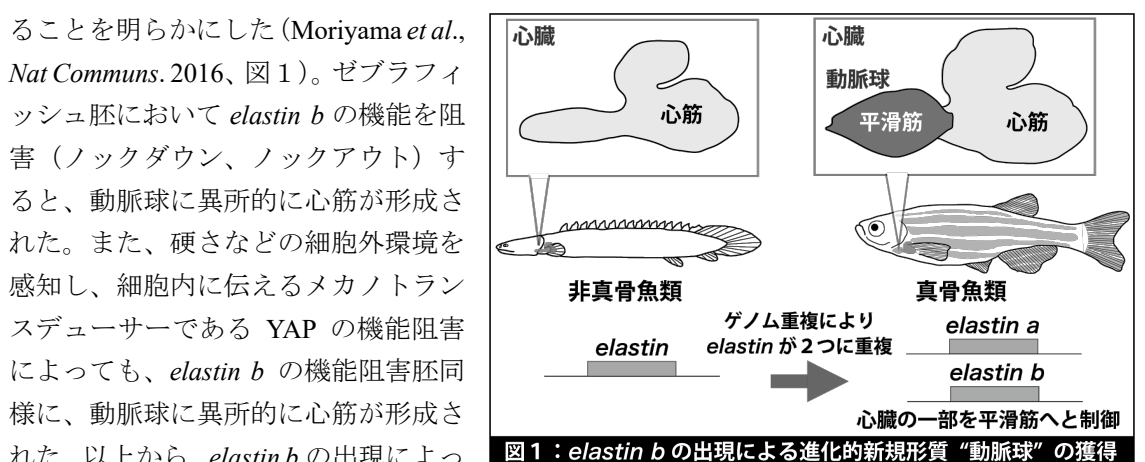


図1: *elastin b* の出現による進化的新規形質“動脈球”の獲得

以上から、*elastin b* の出現によって弾性力や粘弾性といった細胞外環境が変化し、それによって動脈球が獲得されたことが示唆された。しかし、エラスチンは単量体それだけでは機能しないことが知られている。マウスにおいては、LTBP4 (Latent TGF- β Binding Protein 4) が Fibulin5 存在下において *elastin* タンパク質（以下 Elastin と記す）に結合し、その凝集・沈着に必須な役割を果たしていることが報告されている (Noda *et al.*, *PNAS.* 2013)。このように Elastin は単量体では機能せず、上記因子などの相互作用がその凝集・沈着と機能に必要なが、真骨魚類においてみられる Elastin b がどのような因子と相互作用し、その機能を発揮するかはこれまでに全く明らかとなっていない。そこで本研究課題では Elastin b と相互作用する因子の探索と、その機能を評価することで動脈球獲得における前適応の分子メカニズムに迫る。

方法①： Elastin b と相互作用する因子の探索

Elastin b と相互作用し、その凝集・沈着、機能に必須な因子の探索と同定をおこなう。具体的には、先行研究においてゼブラフィッシュ心臓の各部位（心房、心室、動脈球）における RNA シークエンスが遂行されそのデータが公開されているので（Singh *et al.*, *PLoS One*. 2016）、このデータを参照して動脈球において強く発現する候補因子を探索し、それら因子の発現パターンをゼブラフィッシュ 胚を用いた *in situ hybridization* 法により確認する。動脈球において発現が確認できた因子については、さらにアンチセンスモルフォリノオリゴ（MO）による翻訳阻害（ノックダウン）、また CRISPR/Cas9 システムを用いた遺伝子変異導入（ノックアウト）実験をおこない、動脈球に異所的に心筋が形成されるかを確認する。ここで異所的に心筋が形成された場合には、Elastin b と相互作用する可能性が考えられるので、さらに共免疫沈降法やプルダウンアッセイをおこなうことでタンパク質間相互作用をより直接的に検証する。また、Elastin b の機能としてはタンパク質としての硬さが保たれることが重要なのではないかと考え、候補因子の機能阻害胚動脈球における細胞外マトリックスの硬さの変化を指標として評価する。

方法②： 動脈球領域における細胞外環境の硬さを定量化する方法の確立

Elastin b の機能としてはタンパク質としての硬さが保たれることが重要なのではないかと考え、①において同定した真骨魚類動脈球の発生において Elastin b と相互作用する因子群について、動脈球領域における細胞外マトリックスの硬さを定量化することでその機能を評価する。そのために脱細胞化という細胞成分を取り除く操作と、原子間力顕微鏡による生体試料の硬さの低評価法を組み合わせ、心臓各部位における細胞外環境の硬さの定量化法を確立する。

方法③： Elastin b と相互作用する因子の、非真骨魚類における発現パターンと機能の解析

①において同定した、真骨魚類動脈球の発生において Elastin b と相互作用する因子群について、次は非真骨魚類における発現パターンと機能を解析する。本研究課題では非真骨魚類として採卵が比較的容易であり、*in situ hybridization* 法やマイクロインジェクション法が確立されているポリプテルス（*Polypterus senegalus*）を用いる。まずポリプテルスにおける候補因子群をクローニングし、*in situ hybridization* による発現パターンの確認をおこなう。ポリプテルス胚はゼブラフィッシュ胚と比べて透明度が低いので、薄切による切片作成を組み合わせることで精査する。次に MO や gRNA のマイクロインジェクションによるノックダウン、ノックアウトをおこなうことでその表現型を確認する。ポリプテルス胚は性成熟に時間が掛かり継代することが難しいため、MO 注入胚の表現型か、または gRNA 注入胚の表現型によりその機能を調べる【CRISPR/Cas9 によるノックアウト実験は、G0（gRNA 注入胚）でその表現型が得られることが報告されている（Jao *et al.*, *PNAS*. 2013）】。また、上記①において挙げた候補因子群、*ltbp3*, *fibulin5*, *itga8*, *rgs5a* について、ポリプテルスを含む非真骨魚類のゲノム上に存在することを確認している。

4. 研究成果

研究成果①： Elastin b と相互作用する因子の探索

ゼブラフィッシュ心臓の各部位（心房、心室、動脈球）における RNA シークエンスデータ（Singh *et al.*, *PLoS One*. 2016）から動脈球において発現する候補因子を複数同定し、さらにそれらのいくつかについては MO によるノックダウン、また CRISPR/Cas9 システムによるノックアウトをおこない、動脈球において異所的に心筋が形成されることを見出した。

研究成果②： 動脈球領域における細胞外環境の硬さを定量化する方法の確立

まず、脱細胞化の条件検討をおこなった。これまでに脱細胞化の方法としては凍結融解法や界面活性剤を用いるものなど、様々な方法が報告されている。これら方法を試し、試料組織の形態や細胞外環境の保持状態を検討した。その結果、デオキシコール酸ナトリウム（Sodium Deoxycholate,

SDC) を用いる方法が試料組織や細胞外マトリックスが良い状態で保たれ、また細胞成分を効率良く取り除くことができると判明した。さらに原子間力顕微鏡による生体試料の硬さの定量化についても条件検討をおこない、用いるカンチレバーのばね定数、カンチレバー先端に付加するビーズの半径、またフォースカーブ（生データ）から硬さを導出するフィッティングモデルの選択などをおこない、最適化した。次にゼブラフィッシュ成魚から心臓を摘出し、心臓各部位における細胞外マトリックスの硬さを定量化した。その結果、動脈球領域では $8.98 (\pm 0.43)$ kPa、心室領域では $27.04 (\pm 2.24)$ kPa と、動脈球領域における細胞外環境は心室のものとは有意に柔らかいことが明らかとなった。さらに、*elastin b* をノックダウンしたゼブラフィッシュ成魚動脈球の異所的に心筋が形成された領域における細胞外環境は $23.73 (\pm 2.28)$ kPa であり、また *elastin b* をノックアウトしたゼブラフィッシュ成魚動脈球の異所的に心筋が形成された領域における細胞外環境では $23.73 (\pm 1.85)$ kPa と、どちらもコントロールと比べて有意に硬くなっていた。さらに非真骨魚類であるポリプテルス成魚の動脈球と心室の細胞外環境の硬さを定量化したところ、それぞれ $26.22 (\pm 1.25)$ kPa と、 $26.33 (\pm 1.75)$ kPa であり、両者の間に有意な差は認められなかった。次にゼブラフィッシュ胚における動脈球領域の硬さを定量化したところ、*elastin b* の発現開始（受精後 3 日）前の、受精後 2 日胚では動脈球領域の細胞外環境は $25.13 (\pm 1.89)$ kPa であり、*elastin b* の発現開始後の、受精後 4 日胚では動脈球領域の細胞外環境は $14.69 (\pm 1.18)$ kPa であった。以上から、*elastin b* の発現と動脈球領域における細胞環境の硬さ（特徴的な柔らかさ）に相関がみられた。

研究成果③： *Elastin b* と相互作用する因子の、非真骨魚類における発現パターンと機能の解析
本研究期間中では①、②の研究方法に多くの時間を費やし、③で挙げた非新骨魚類における発現パターンと機能の解析まではおこなえなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 守山裕大
2. 発表標題 脊椎動物心臓の多様性をもたらした細胞外環境の変化
3. 学会等名 第93回 日本動物学会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 守山裕大
2. 発表標題 細胞外環境の硬さから紐解く真骨魚類心臓流出路の発生と進化
3. 学会等名 生理研心血管研究会（招待講演）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------