

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 28 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26830133

研究課題名(和文)新規心房特異的遺伝子の転写メカニズム解析と、心房筋精製方法への応用

研究課題名(英文)transcriptional regulatory elements of a novel atrial specific gene

研究代表者

扇野 泰行(OHGINO, YASUYUKI)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：20598916

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：新規心房特異的遺伝子を発見するために、新生仔ラットの心房筋を精製した上で遺伝子発現の解析を行った。すると、既知の心房特異的遺伝子とは異なる遺伝子が見つかった。当該遺伝子の心房特異性をもたらす転写調節領域を同定するためにリポーター遺伝子を用いた実験を行い、一つの調節領域を同定した。また、当該遺伝子のノックアウトマウスを用いて機能解析を行った。

研究成果の概要(英文)：To find a novel atrial specific gene, we conducted comparable gene array analysis between neonatal rat atrial and ventricular cardiomyocytes. To conduct gene array analysis, we purified cardiomyocytes. Then, we successfully discovered a new atrial specific gene. To identify the transcriptional regulatory elements of the gene, we conducted a reporter gene assay and find an one of the transcriptional regions. In addition, we investigated the function of the gene by using KO mice.

研究分野：循環器内科

キーワード：心房特異的遺伝子

1. 研究開始当初の背景

臓器特異的遺伝子は、当該臓器の精製やトラッキングなど、遺伝工学分野に多大な利益をもたらす。心房特異的遺伝子についてはこれまで Sarcoplipin や Myosin Light Chain 2a などが知られていた。

我々は旧知のものよりも正確な心臓の、腔別の遺伝子プロファイルを得るために以前我々が確立した心筋精製技術(Nat Methods, 2010 Jan;7(1):61-6.)を用いて、ラットの心房・心室の遺伝子プロファイルを作成することにした。

2. 研究の目的

新規心房特異的遺伝子を探索し、またその遺伝子の心房特異性をもたらす転写調節領域を同定すること。

それに加えて、当該遺伝子の機能を同定すること。

3. 研究の方法

ラット新生仔の心臓を剖出し、心房と心室に分けた。これを細胞単離させたうえで、ミトコンドリア法(Nat Methods, 2010 Jan;7(1):61-6.)を用いて心筋精製を行った。心筋精製後の心房・心室筋をそれぞれマイクロアレイに供して遺伝子発現を比較した。

マウス・ラットの胎仔期から成獣期に至る各ステージにおいて、各臓器での代表的な遺伝子発現量を RT-PCR や qPCR を用いて解析した。また、同様に代表的なタンパク質の発現量をウェスタンブロット法を用いて解析した。

次いで、lacZ ノックインマウスを用いて新規心房特異的遺伝子の発現を in vivo で確認した。

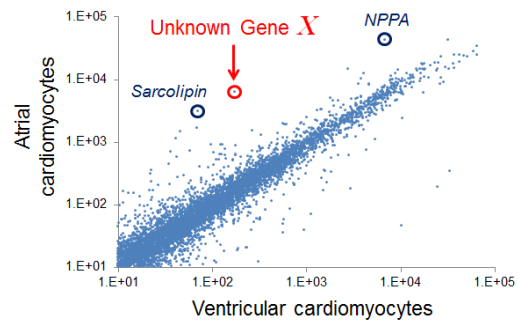
また、当該遺伝子の心房特異性をもたらす転写調節領域を同定するため、バイオインフォマティクスを利用して予想転写調節領域を定め、当該配列をレポーター遺伝子と結合させ、ラット新生仔由来の心室筋・心房筋(上記の手法にて精製済み)に遺伝子導入実験を行った。

当該遺伝子のノックアウトマウスを用いて遺伝子の機能解析を行った。

4. 研究成果

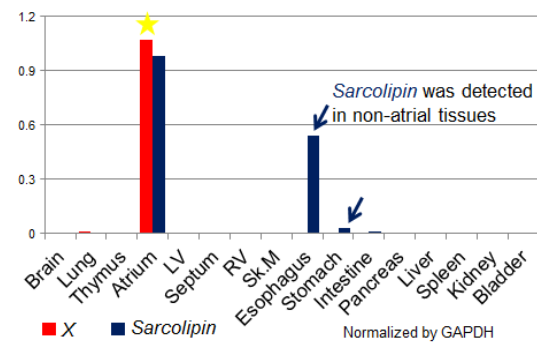
我々はまず、既存の報告よりも高精度な解析を実現するため、心房、心室筋細胞をそれぞれ精製した上で、遺伝子発現プロファイルを比較した。この結果、幸運にも心房筋細胞に特異的に発現している新規遺伝子を発見した(図1)。

図1)



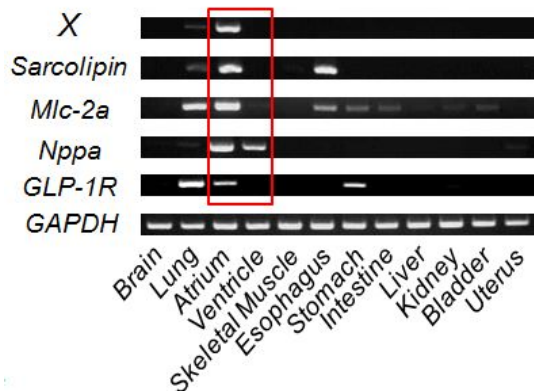
そして、マウス・ラットの胎仔期から成獣期に至る各ステージにおいて、当該遺伝子が全身の中で一貫して心房に特異的に発現していることを確認した(図2)。これは mRNA レベルでもタンパク質レベルでも同様であった。

図2)



また、その心房特異性は既知の心房特異的遺伝子(Sarcoplipin, Mlc-2a, Nppa など)に比べて全身の中でより特異性の高い発現パターンを示していた。

図3)



lacZ ノックインマウスを用いた in vivo での発現確認実験を行った。この実験では、発生期～成獣に至る各ステージにおいて全身の中で心房特異性を確認することができた。(図4)。

図4)

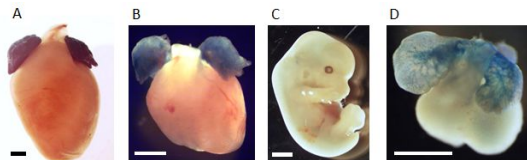
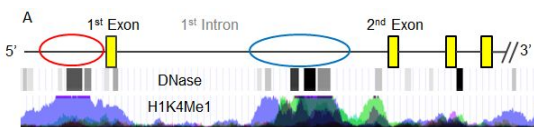


Figure3. Staining pattern of lacZ knock-in mouse.

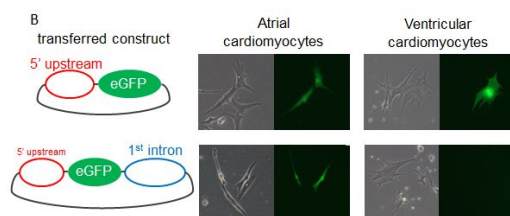
また、当該遺伝子の心房特異性をもたらす転写調節領域を同定するため、バイオインフォマティクス(UCSC Genome Browser on Human Dec.2013 (GRCh38/hg38)Assembly)を利用して予想転写調節領域を探索した。すると当該遺伝子の 1st. intron の一部に DNase, H1K4Me1 のシグナルが強く出ている箇所を発見した(図5)。

図5)



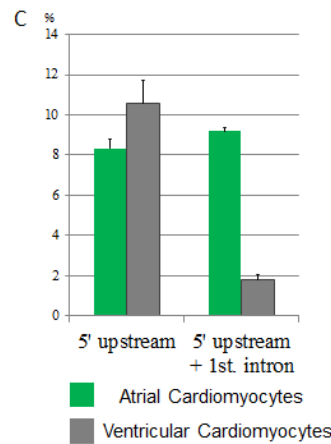
当該遺伝子のプロモーター領域があると考えられる 5' 上流とレポーター遺伝子(eGFP)を結合させたコンストラクトを心筋細胞に導入した場合、心室筋・心房筋ともにレポーター遺伝子の発現が認められたが、当該遺伝子のプロモーター領域があると考えられる 5' 上流と、この intron の一部領域をレポーター遺伝子と結合させたコンストラクトを導入した場合は心房筋においてのみレポーター遺伝子の発現が認められた。この遺伝子導入実験により、当該箇所により心房特異性がもたらされることを確認した(図6)。

図6)



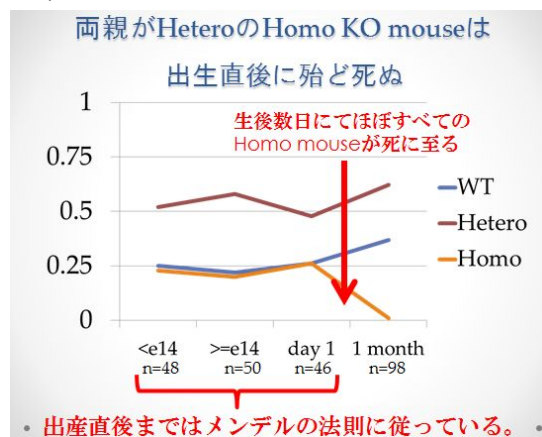
レポーター遺伝子の発現量については遺伝子導入細胞を FACS 解析することで有意な発現量の差を確認した(図7)。

図7)



また、当該遺伝子のノックアウトマウスを用いて表現型の確認を行った。ノックアウトマウスについては、心房・心室ともに明らかな形態異常を来していなかったが、ホモ欠損個体については有意に出産直後に死亡することが確認された(図8)。このため、当該遺伝子が、乳幼児突然死症候群の原因遺伝子の一つである可能性も示唆された。

図8)



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 1 件)

2014/7/4-6 Frontiers in CardioVascular Biology, Barcelona, Spain, "A novel atria specific gene and its transcriptional regulatory elements" Yasuyuki Ohgino, Fumiuyuki Hattori, Yusuke Satoh,

Masayuki Yoichi, Shugo Tohyama, Hiromi Yamashita, Kentaro Yamabe, Keiichi Fukuda

〔図書〕(計 0 件)

〔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 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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

扇野 泰行 (OHGINO Yasuyuki)
慶應義塾大学・医学部 循環器内科 助教
研究者番号：20598916

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()