

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15018

研究課題名(和文) Gemininの可視化による増殖心筋細胞の新たな同定法の開発と心筋再生

研究課題名(英文) Detection of cell-cycling cardiac muscle cells by visualizing Geminin, and regeneration of cardiac muscle cells

研究代表者

灌原 義宏 (Takahara, Yoshihiro)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・教授

研究者番号：60226967

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：ポリコム遺伝子群が、心臓発生だけでなく心筋維持にも重要な役割を果たしていることを見つけるとともに、分子レベルではポリコム遺伝子群がエピジェネティックに転写を維持するだけでなく、細胞増殖分化を制御するGemininに対するE3ユビキチンリガーゼとして機能することを見つけた。そこで、本研究ではGeminin-EYFPノックインマウスとタンパク質を直接細胞内に導入できるCell-penetrating Gemininを開発し、心筋内のGemininの発現を追跡することによって分裂心筋細胞あるいは心臓幹細胞の候補細胞を同定するとともに、Gemininの発現量を操作できる新しい方法の開発を行った。

研究成果の概要(英文)：Polycomb-group (PcG) genes play an important role in cardiac development as well as in maintenance of cardiac muscle. Molecularly PcG genes regulate gene transcription through an epigenetic mechanism and also act as an E3 ubiquitin ligase for Geminin, which regulates cellular proliferation and differentiation. In this study we generated Geminin-EYFP knock-in mice to directly trace Geminin expression in vivo and detected a candidate for cell-cycling cardiac muscle or cardiac stem cells. We also generated cell-penetrating Geminin, which is transduced directly into cells, to manipulate expression levels of Geminin protein in cells. We anticipate that these technologies are helpful for analyzing cell cycling of cardiac muscle and also function of cardiac stem cells.

研究分野：幹細胞生物学 再生医学

キーワード：心筋 細胞周期 幹細胞 ポリコム遺伝子群 Geminin

1. 研究開始当初の背景

研究申請者らはポリコーム複合体の欠損マウス (Rae28/Phc1 及び Pcgf5 欠損マウス) を作製し、ポリコーム複合体がヒストンの修飾を介したクロマチン制御やユビキチン-プロテアソーム系を介した Geminin タンパク質の安定性制御を介して高等哺乳動物の発生制御だけでなく幹細胞制御にも重要な役割を果たしていることを明らかにしてきた。心臓においては Rae28 が心臓発生のセクター遺伝子 Nkx2.5 の転写制御を介して心臓発生において重要な役割を果たしていることを明らかにするだけでなく、Rae28 の心筋における役割を調べるため ミオシン重鎖のプロモーターを用いて心筋特異的に Rae28 を高発現するトランスジェニックマウス (MHC-Rae28 tg) を作製した。MHC-Rae28 tg は出生後に心筋細胞でアポトーシスが誘導され、心筋が脱落するために拡張型心筋症を発症する。つまり、Rae28 の高発現は心筋維持を損なうことが解った。一方で、ポリコーム複合体の一つ Pcgf5 が欠損すると、心臓は正常に発生するが、心筋の維持が損なわれるために成体において拡張型心筋症を発症することを見つけた。これらのことから、心筋を維持するための分子機構があることが示唆される。しかし、成体における心筋の分裂や心臓幹細胞の心筋維持における役割については現在のところほとんど解っていない。

Geminin は DNA 複製と Brahma/Brg1 を介したクロマチンリモデリングを抑制することにより細胞増殖と分化の両方を調節している。Geminin タンパク質は APC/C を介したユビキチン-プロテアソーム系によって安定性制御がなされており、細胞周期においてサイクリン同様の発現動態を示す。一方で、造血幹細胞において Geminin の発現は高く、幹細胞制御において重要な役割を果たしていることを独自に見つけている。

2. 研究の目的

成体で心筋細胞は分裂することはなく、高度の心筋傷害による重症心不全の患者に対しては心臓移植しか救命の手立てがないと信じられて来た。そこで本研究では Geminin を個体レベルで可視化することによって心筋における細胞周期制御と心臓幹細胞の動態制御について解析を進めるための新たな手立てを確立することを目指すとともに、直接細胞内に Geminin タンパク質を導入することの出来る新しい方法の開発を行った。

3. 研究の方法

独自に作製したポリコーム複合体 1 の新たな構成因子の一つ Pcg5 のノックアウトマウスについて解析を進めるとともに、Geminin 遺伝子の終止コドンの直前に黄色蛍光色素タンパク質 enhanced yellow fluorescence protein (EYFP) 遺伝子を in frame に挿入した Geminin-EYFP ノックインマウスを作製し、個体レベルで Geminin を可視化することによって心筋における Geminin の発現動態を追跡した。さらに、FGF 4 の膜透過性モチーフを組込んだ遺伝子組換え型 Geminin タンパク質 CP-Geminin を独自に開発し、Geminin を直接細胞内に導入可能な実験系の構築を目指した。

4. 研究成果

本研究では Geminin 遺伝子に EYFP の遺伝子を Geminin 遺伝子のコーディング領域に融合したノックインマウス (Geminin-EYFP KI) を作製し Geminin 分子を可視化した。そして、心筋における Geminin の発現動態を in vivo で追跡し、Geminin の発現動態を明らかにし、心筋維持における心筋の細胞周期制御と心臓幹細胞の役割について解析を進めた。その結果、多くの心筋細胞では Geminin の発現は認められなかった。Geminin の発現は G₀/G₁ 期において低く、S/G₂/M 期において高いという細胞周期の各相における Geminin の発現動

態を考えると、恐らく成体においてはほとんどの心筋細胞が細胞周期の G_0/G_1 期にあることを反映しているものと考えられた。一方で、心臓の流出路周辺領域においては Geminin が高発現している心筋細胞が散見された(図1)。これらの細胞は心筋細胞が細胞周期に入っている可能性、あるいはほとんどの細胞が G_0/G_1 期にある造血幹細胞においては Geminin は発現が高く保たれていることから心臓幹細胞である可能性も推測される。今回の研究ではこれらの Geminin 陽性細胞の心筋維持における機能的な役割についてまで、十分な解析を進めるまでには至らなかったが、本研究によって得られた知見は心筋維持を担うことが予想される心筋細胞周期と心臓幹細胞制御について解析を進めるために重要な切っ掛けを提供することが期待される。

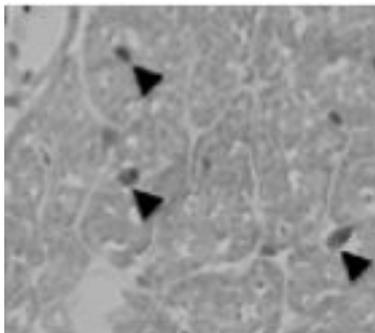


図1. Geminin 陽性細胞

一方で、Geminin タンパク質を直接細胞内に導入してその発現量を操作することを目指して Geminin に FGF4 の膜透過性モチーフを組み込んだ遺伝子組換え型 Geminin タンパク質 CP-Geminin を独自に開発した。大腸菌で発現させ精製した CP-Geminin を用いて培養細胞レベルで Geminin を細胞内に直接導入して Geminin 発現量を変化させ、細胞周期とクロマチン構造を操作することに成功した。従って、CP-Geminin は心筋細胞をはじめとして生体細胞の細胞周期を人工的に操作するための新しい方法の開発に寄与することが期待される。

本研究成果は、今後、生体心筋の細胞周

期制御や心筋幹細胞の心機能維持における役割を明らかにすることに役立つことが期待される。

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 1 件)

1. Ohno Y, Suzuki-Takedachi, K., Yasunaga, S., Kurogi, T., Santo, M., Masuhira, Y., Hanazawa, S., Ohtubo, M., Naka, K., Takahara, Y. Manipulation of cell cycle and chromatin configuration by means of cell-penetrating Geminin. PLoS ONE 11(5):e0155558, 2016 10.1371/journal.pone.0155558 査読有

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 白井学、金美花、土持 裕胤、大谷 健太郎、瀧原 義宏、森崎 隆幸 マウス成体心臓における Polycomb repressive complex 1.5 (PRC1.5) の機能的解析 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)

2. 白井学、金美花、大谷健太郎、土持裕胤、瀧原義宏、森崎隆幸 成体心臓における Pcgf5(Polycomb ring finger 5)遺伝子の機能的解析 第38回日本分子生物学会年会 第88回日本生化学会大会 合同大会 2015年12月1-4日神戸ポートアイランド(神戸)

〔図書〕(計 1 件)

1. Shirai, M., Takahara, Y., Morisaki, T. Pcgf5 contributes to PRC1 (Polycomb repressive complex 1) in developing cardiac cells. Etiology and morphogenesis of congenital heart disease, pp. 1-383, Chapter 3, Springer, 2016

〔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

6．研究組織

(1) 研究代表者

瀧原 義宏 (Takahara Yoshihiro)
広島大学・原爆放射線医科学研究所・教授
研究者番号：60226967

(2) 研究分担者

安永 晋一郎 (Yasunaga Shin'ichiro)
福岡大学・医学部・教授
研究者番号：50336111

大野 芳典 (Ohno Yoshinori)
広島大学・原爆放射線医科学研究所・助教
研究者番号：10548986

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・研究所・室長
研究者番号：70294121

(3) 連携研究者：なし