

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 19 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18964

研究課題名(和文) 心臓において力学シグナルを核へと伝える転写コファクターの解析

研究課題名(英文) Gene regulatory mechanisms by mechanical forces in cardiovascular system

研究代表者

久保 純 (Kubo, Atsushi)

東北大学・加齢医学研究所・助教

研究者番号：50638830

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：臓器の発生や恒常性の維持において、力学的な刺激は重要なシグナルとして働いている。しかし、力学刺激伝達の分子メカニズムについてはほとんど理解されていない。そこで、本研究では、その細胞内局在が力学刺激によって制御される転写因子に注目し、伸展刺激やせん断応力負荷システムを用いて解析を行った。またトランスジェニック・マウス、ゼブラフィッシュを用いた解析により、生体内でも力学刺激に応答した局在変化があること、またこの遺伝子を欠損したマウスでは心臓血管系をはじめ、筋骨格系においても異常が観察されることを明かにした。

研究成果の概要(英文)：The mechanical forces are new important signals for development and homeostasis. But the mechanisms underlying the mechanotransduction are poorly understood. In this study, I focused on the novel transcriptional factor, which localization is mechanically regulated. I identified the protein domain which is responsible for nuclear shuttling by using in vitro stretch system and shear stress system. Once cells receive the shear stress, this protein translocates to the nucleus immediately. Unexpectedly, this rapid translocation is dependent on the cellular Ca²⁺ increase. In vivo localization of this protein is also analyzed in transgenic animals. the localization is dependent on the heartbeat. The knockout mice also revealed that this protein is necessary for cardiovascular homeostasis.

研究分野：発生生物学

キーワード：力学的刺激 伸展刺激 せん断応力 心筋 血管内皮 アクチン動態 Hippo経路

1. 研究開始当初の背景

力学的な刺激が遺伝子発現制御、さらには臓器の発生や恒常性の維持に重要なシグナルとして働いていることが明らかになりつつある(例: 魚類胚における血流依存的な心臓発生)。一方で、力学的なシグナルが細胞内でどのように変換され、遺伝子発現の制御や形態形成・細胞分化の制御につながるのかといった分子メカニズムについては不明な点が多く、より詳細な解析が必要であった。

研究開始当時、力学的な伸展刺激にตอบสนองして細胞質から核へと局在を変化させる転写制御因子を同定していたため、この遺伝子の局在制御機構に注目することで、力学的な刺激が遺伝子発現へと変換される分子メカニズムを解明し、また生体内での機能についても心臓発生や恒常性の観点から明らかにすることを目的として研究を行なった。

2. 研究の目的

(1) 力学的刺激を核に伝える分子機構の解析

力学刺激がどのようにこの力学応答因子の局在を制御しているのかを明らかにすることを目的として研究を行なった。(*in vitro* での伸展刺激の他、研究開始当初は予定していなかった「せん断応力負荷システム」も用いて解析を行った。)

またタンパク質ドメインを欠損した発現コンストラクトを用いて、力学刺激にตอบสนองする責任ドメインを同定し、検証することも目的とした。さらに、力学刺激に応じて、変化することが知られている、(a) アクチン動態、(b) Hippo 経路との関わりについても明らかにすることを目的とした。

(2) 生体心臓における力学応答因子の局在解析とその機能解析

in vitro で観察されたような力学刺激にตอบสนองする局在変化が、実際に生体内でも起こっているかどうかを確認することは極めて重要である。そこで、力学刺激にตอบสนองする責任ドメインを含むタンパク質領域に LacZ が付加されたトランスジェニックマウスを用いて、詳細に組織内での局在パターンを解析した。また、こちらも研究開始当初は予定していなかったが、心臓の拍動を容易に操作できる魚類胚に注目し、トランスジェニック zebrafish を作成して、研究を行なった。

(3) 生体における機能と標的遺伝子の同定

研究開始当初の予備実験では、この遺伝子をヘテロに欠損するマウスに対して、TAC手術(大動脈を結紮する手術)を行って左心室を高圧状態にしたところ、心肥大の程度が野

生型よりも亢進するという結果が得られていた。また組織切片を作成したところ、軽微ながらサルコメアの異常も見られた。しかし、この遺伝子をホモで欠損するマウスは、胎生致死によって死亡することから、心臓特異的コンディショナル・ノックアウトマウス(cKOマウス)を作成し、解析を行うことを目的とした。(ただし、研究の進展により、マウスバックグラウンドを変えることで、ホモ欠損でも胎生致死にならないことが分かった。)

加えて、この遺伝子の標的遺伝子を明らかにするために、マイクロアレイ解析やクロマチン免疫沈降法による解析も予定していた。

3. 研究の方法

(1) 核移行メカニズムの解明

このタンパク質の様々なドメインを発現するコンストラクト/レトロウイルスを作製し、培養細胞において発現させた。この培養細胞をストレッチチャンパー上に播種し、伸展刺激やせん断応力を加えることで、核移行に必要な十分なタンパク質ドメインを同定する。またアクチンの動態が力学刺激に応じて、変化することが知られていることから、共焦点顕微鏡を用いたタイムラプス撮影によって、アクチン動態との関係についても可視化を行った。(ストレスファイバーの可視化にはLifeact-eGFP、eGFP-ActinB 融合タンパク質を用いる)研究の後半においては、力学的刺激、アクチン動態、この力学応答タンパク質の細胞質-核シャトリングの関係性が、自律的に拍動する心筋細胞においても成り立つかを検証する。候補としては、心筋分化誘導可能なEC細胞であるP19CL6細胞やマウスES細胞からの心筋分化誘導系を用いる。

また、生体心臓においてこのタンパク質が、血流、心拍などの力学的シグナルを実際に核に伝えているかどうかを、トロポニンT(TnT)遺伝子ノックアウトマウス(胎仔)を用いて明らかにする。(トロポニンは骨格筋や心筋の収縮に必須のタンパク質であり、TnT KOマウスでは心臓の自発的な拍動が阻害される)

また力学刺激にตอบสนองする別の因子として、Hippo 経路の因子が知られている。そこで、この力学応答タンパク質とHippo 経路との関係を明らかにするために、YAP、TAZ、TEAD1~4 との遺伝子発現における相互作用をルシフェラーゼアッセイを行い検証する。またこのタンパク質をヘテロに欠損するマウスでは、TAC手術において心肥大が認められること、またT-boxファミリーの転写因子と相互作用することから、心臓において重要なTbx5と結合するかどうかを共免疫沈降法により調べる。

(2) 生体心臓における機能解析

生体心臓におけるこの力学応答転写因子の機能を明らかにするために、心筋特異的にこの遺伝子を欠損するコンディショナルマウスを用いて解析を行う。心筋特異的なコンディショナルマウスの作成には、MHC-MerCreMer マウスを用いる。cK0 マウス及び野生型マウス（同腹仔）が 10 週齢に達した時点でタモキシフェンの投与を行い、成体心臓での効果を解析する。

また、10 週齢の cK0 マウスに対し、TAC 手術を行い、術後 4 週間時点で解剖し、心肥大の程度や組織的な異常を比較する。また心肥大のマーカーなど（Anf 遺伝子、Bnp 遺伝子など）の発現量についても qRT-PCR 法、切片 in situ ハイブリダイゼーションなどを用いて定量的な比較を行う。

(3) 標的遺伝子群の同定

この遺伝子をノックアウトすることによって、発現量に変化がみられる遺伝子をマイクロアレイを用いて網羅的に同定する。さらに解析の結果、重要と考えられる遺伝子については、クロマチン免疫沈降法を用いて直接の制御であるかどうかを明らかにする。

4. 研究成果

(1) 核移行メカニズムの解析

まずこのタンパク質の力学刺激依存的な局在変化について、その詳細な分子メカニズムを明らかにするために、解析を行った。予備実験から、伸展刺激負荷時に ROCK 阻害剤である Y-27632 を添加しておくことで核移行が抑制されること、また伸展刺激を負荷せずともリソフォスファチジン酸（LPA）添加によって核移行が引き起こされることから、力学刺激、アクチンダイナミクス、そしてこのタンパク質の局在変化の間には何らかの関係があることを予測していた。そこで、アクチン変異体（S14C、R62D）を過剰発現させ、細胞内のアクチンダイナミクスを直接的に操作したところ、G アクチン増加が核移行に抑制的に働く一方、G アクチン減少は核移行を促進させることが分かった。このタンパク質の部分ドメインに eGFP タグを負荷した発現コンストラクトと、アクチン変異体を用いた実験から、局在変化を担っていると考えられるタンパク質ドメインを同定した。

次にこのタンパク質ドメインが伸展刺激以外の力学刺激にも応答するかどうかを調べるために、ヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）に流れ刺激（せん断応力）を負荷する実験を行った。プラスミド DNA のトランスフェクションにより、この力学応答タンパク質を eGFP タグ付きで細胞内に発現させた。最も応答の速い細胞では、せん断応力を負荷後 2、3 分で細胞核への蓄積が認められた。

せん断応力に対するこのタンパク質の核移行が極めて迅速であったことから、単純な

アクチンのダイナミクス以外のメカニズムが存在していると考えた。血管内皮細胞にせん断応力を負荷した場合に、引き起こされる生化学変化のうち、細胞内カルシウム濃度の変化に注目した。実際、イオノマイシンや A23187 といったカルシウムイオノフォアで細胞を処理したところ、このタンパク質の核移行が極めて迅速かつ強力に引き起こされた。

予想外の結果であったため、本来の研究計画にはなかったものの、このタンパク質とカルシウムとの関係について詳しく検討を行った。まず、バキュロウイルス発現系によって、このタンパク質の組み換えタンパク質を作成し、カルシウムと直接結合するかどうかの検討を行った。等温滴定型熱量測定（ITC）によって、このタンパク質とカルシウムとの結合を解析したものの、直接的に結合するという結果は得られなかった（組み換えタンパク質作成においては、加齢医学研究所 分子腫瘍学研究分野の池田真助教にご協力を、またカルシウムとの直接結合の有無については、多元物質科学研究所 生体分子構造研究分野の渡部聡助教、稲葉謙次教授にご協力をいただいた）。その一方、カルシウム結合タンパク質であるカルモジュリンがこのタンパク質に結合することが分かり、現在、カルモジュリンを介した制御があるかどうかについても検討を進めている。

次に、生体の心臓においてこのタンパク質が力学刺激依存的に核移行するかどうかを調べた。このタンパク質の局在制御領域を含むタンパク質ドメインに LacZ を負荷したトランスジェニックマウスを用いて、生体組織における局在を観察した。このタンパク質はマウス新生仔において、心筋、脳、骨格筋、網膜など様々な臓器において発現が観察されたが、その細胞内局在（核/細胞質）は組織ごとにまちまちであった。特に新生仔の心筋では、7 割程度の心筋細胞においてこのタンパク質が核に局在していた一方、成体（19 週齢）のマウスでは、細胞核に局在していた割合は 3 割以下であった。力学刺激への応答性は成長・加齢に従って、低下することを示唆している。

また Tnnt2 ノックアウトマウスの心筋を用いて解析を行ったところ、心臓拍動が失われたマウスにおいては、F アクチンのシグナルが弱く、このタンパク質の局在にも影響を与えている可能性が示唆された。しかし、マウスでは心臓の拍動を自由に操作することが難しく、心臓拍動とアクチン動態、タンパク質局在との関係を詳細に明らかにすることが難しかった。一方、魚類胚では、エピネフリンや BDM といった薬剤の添加/洗い流しによって心臓拍動の増強、抑制、回復を行うことが可能である。そこで、急速、トランスジェニック・ゼブラフィッシュを作成し、心筋におけるアクチン動態、このタンパク質の局

在についてイメージングを行った。ゼブラフィッシュ胚の心臓において、エピネフリンを用いた心臓拍動の活性化によって、細胞核への移行が促進されること、また逆にBDMを用いた心臓拍動の抑制によって、F アクチンシグナルが減少することが確認された。以上のマウス、ゼブラフィッシュモデルを用いた実験から、このタンパク質は生体の心臓においても力学刺激依存的に細胞内局在を変化させることが明らかとなった。

Hippo 経路との関わりについて、心臓特異的な遺伝子である *Anf* のプロモーターを用いたルシフェラーゼアッセイを行った。*Anf* 遺伝子の活性化において、*Yap* とは相乗効果的に働いて、*Anf* を活性化させる一方、*Tead* との間にはそのような活性化効果が見られないことが分かった。また、これらのタンパク質との物理的な相互作用についても NanoBiT (ルシフェラーゼタンパクの補完アッセイ) によって調べたところ、*Yap*、*Tbx5* などとの間に物理的な相互作用があることが分かった。

(2) 生体心臓における機能解析

生体心臓におけるこのタンパク質の役割を解析するために、心筋特異的な *cKO* マウス (MHC-MerCreMer マウスとの交配による) を作成し、解析を行った。10 週齢のマウスに対してタモキシフェン投与を行い、心臓においてノックアウトしたところ、一部の個体において、心臓の肥大や循環障害が観察された。

またマウスのバックグラウンドを変更することで、胎生致死を回避できることが分かった。全身でこの遺伝子をノックアウトしたマウスでは、筋骨格系の低形成がみとめられた。このことは心臓のみならず、力学的な刺激を受容する筋肉や骨においても重要な役割を担っていることを示唆している。

(3) 標的遺伝子の同定

この力学刺激に応答するタンパク質は転写制御因子として働くため、その標的遺伝子の同定を試みた。E12.5、E13.5 のノックアウトマウス胚から心臓を単離し、qRT-PCR によって発現解析を行った (*Tbx5* と物理的な相互作用を行うことが分かったため、*Tbx5* の標的遺伝子として報告のある遺伝子について調べた)。予想に反し、これらの調べた遺伝子のなかで発現量が有意に変化するものは認められなかった。一方で、並行して進めていたゼブラフィッシュ胚の解析から、血管内皮において、このタンパク質が直接制御している遺伝子を同定することができた。この遺伝子の血管内皮 (特に弁形成) での役割を明らかにするために、CRISPR/Cas9 システムを用いてノックアウトゼブラフィッシュを作成した。F0 作成後、野生型である Tubingen 系統と交配して F1 世代を得たが、ヘテロ欠損し

たゼブラフィッシュ全てがメスであったため、その血管内皮細胞における役割はまだ観察できていない。現在交配をさらに進め、F2 世代を作成しており、今後、詳細なフェノタイプを観察する予定である。

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2件)

Yusuke Watanabe, Kota Y. Miyasaka, Atsushi Kubo, Yasuyuki S. Kida, Osamu Nakagawa, Yoshikazu Hirate, Hiroshi Sasaki, Toshihiko Ogura, Notch and Hippo signaling converge on Strawberry Notch1(Sbno1) to synergistically activate Cdx2 during specification of the trophoctoderm, Scientific Reports, 査読有, 7巻, 2017年
DOI:10.1038/srep46135

Izumi Oda-Ishii, Atsushi Kubo, Willi Kari, Nobuhiro Suzuki, Ute Rothbacher, Yutaka Satou, A Maternal System Initiating the Zygotic Developmental Program through Combinatorial Repression in the Ascidian Embryo, PLOS GENETICS, 査読有, 12(5), 2016年
DOI:10.1371/journal.pgen.1006045

[学会発表](計6件)

久保純、新井田隆宏、山中祐樹、木村正人、宮坂恒太、渡邊裕介、小椋利彦、A mechano-transduction in zebrafish heart development, Mechanobiology of Disease, 2016年9月27日、シンガポール(シンガポール)

久保純、心臓血管系において、力学刺激が制御する遺伝子発現メカニズム、第30回がんエピゲノム研究会、2016年9月7日、民衆会館(宮城県・仙台市)

久保純、新井田隆宏、吉野大輔、小椋利彦、血管内皮細胞においてせん断応力を核に伝える因子の解析、第2回血管生物若手研究会、2016年3月05日、東北大学(宮城県・仙台市)

久保純、Hearbeat regulates cardiac gene expression via nuclear shuttling, 第32回国際心臓研究学会日本部会シンポジウム、2015年12月10日、神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)

久保純、心臓拍動に依存した遺伝子発現制御メカニズムの解析、第38回分子生物学会、2015年12月01日、神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)

久保純、Heartbeat regulates cardiac gene expression via nuclear shuttling、第 48 回日本発生生物学会大会、2015 年 6 月 2 日、つくば国際会議場(茨城県・つくば市)

〔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 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

久保 純 (Atsushi Kubo)

東北大学・加齢医学研究所・助教

研究者番号：50638830

(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

()