

令和元年6月17日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08605

研究課題名(和文) 心筋分化過程における転写因子複合体と標的遺伝子の変化

研究課題名(英文) Transcriptional complex and target genes during myocardial differentiation

研究代表者

渡邊 裕介 (Watanabe, Yusuke)

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：20562333

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では二次心臓形成領域の発生における必須転写因子であるIslet1の相互作用因子の同定により、心筋分化過程におけるIslet1の転写調節機構の分子基盤の解明を目指した。研究代表者らはエピトープタグ融合Islet1ノックインマウス系統を樹立した。このノックインマウス胚を用いて抗エピトープタグ抗体による免疫沈降および質量分析を行い、既知のIslet1結合タンパク質および複数のIslet1相互作用因子候補を同定することができた。以上の結果から、二次心臓形成領域からの心筋分化過程において、Islet1因子との相互作用により標的遺伝子に対する転写活性を制御していることが示唆される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

二次心臓形成領域は心筋、平滑筋、血管内皮細胞への分化能を持つ心血管前駆細胞を含む。また、二次心臓形成領域の発生異常に関連する先天性心疾患は約30%を占める。以上のことから二次心臓形成領域発生の分子的理解は重要である。本研究で得られた二次心臓形成領域発生における必須転写因子であるIslet1の相互作用因子の同定は、Islet1の転写活性および遺伝子発現制御機構を分子的に理解することに貢献する。さらに将来的には、in vitroでの効率的な心筋作製や、先天性心疾患の原因究明に役立つ可能性も含む上で意義がある。

研究成果の概要(英文)：Islet1 is a key transcription factor for the second heart field development. In this study, we aimed to identify interacting proteins of Islet1 to understand molecular mechanism of Islet1 transcriptional activity. First, we succeeded to establish epitope-tag fused Islet1 knock-in mouse lines, which recapitulated endogenous Islet1 expression pattern. Second, immunoprecipitation of Islet1 with anti-epitope tag antibodies from the knock-in mouse embryonic lysates followed by mass-spectrometry identified several candidates of Islet1-interacting proteins. Among them, Ldb1, Ssbp2 and Ssbp3, which are known Islet1 and Ldb1-binding proteins, respectively, were listed. Co-immunoprecipitation assay also verified the interaction between Islet1, Ldb1, Ssbp2 and Ssbp3. During myocardial differentiation from the second heart field, Islet1 possibly interacts with those factors to regulate its transcriptional activity for target gene expression.

研究分野：発生生物学

キーワード：二次心臓形成領域 転写調節 Islet1

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

1. 研究開始当初の背景

心臓発生において左右の心臓中胚葉細胞は胚前方部へ移動して融合し、馬蹄形の心原基を形成する。この心原基は「一次心臓形成領域 (First Heart Field; FHF)」と呼ばれ、主に心房と左心室へと分化する。一方、心原基の内側、原始心筒の後側に位置する臓側中胚葉は心臓流出路・右心室領域の前駆細胞を含み、「前方二次心臓形成領域 (anterior Second Heart Field; aSHF)」と呼ばれる。aSHF は心筋細胞のみならず、平滑筋、血管内皮細胞への分化能も保持する多能性の心血管前駆細胞である (Moretti A et al., Cell 2006, Watanabe Y & Buckingham M, Ann N Y Acad Sci. 2010)。

研究代表者はこれまでに aSHF に由来する心臓前駆細胞の分化・遊走・増殖の制御機構と、その先天性心奇形における意義の研究を行ってきており、特にシグナル伝達系や転写因子による aSHF からの心筋分化制御機構について注目してきた (Park EJ & Watanabe Y et al., Development 2008, Watanabe Y et al., Circ Res 2010, Watanabe Y et al., PNAS 2012)。本研究では特に Islet1 の転写制御機構に着目した。Islet1 は流出路・右心室や心房形成に必須の因子であり、分子構造として N 末に 2 つの LIM ドメイン、中央部にホメオドメイン、C 末に LBD ドメインを含む。神経系発生において Islet1 は単独では標的 DNA 配列に結合できないが、LIM ドメインを含む N 末領域に Ldb1 因子が結合することにより、中央部-ホメオドメインが DNA に結合し転写活性化に機能することができるといわれている (Thaler JP et al., Cell 2002)。また、Islet1 は aSHF に存在する多能性心血管前駆細胞に発現しており、心臓前駆細胞の維持や心筋分化を制御する点から、心臓形態形成のみならず、再生医療における心筋分化の効率化の観点からも重要な因子となっている。

研究代表者は以前に、aSHF 心臓前駆細胞の心筋分化過程において Islet1 が aSHF で発現する Fibroblast Growth Factor 10 (Fgf10) 遺伝子の発現を正に制御することにより、流出路・右心室形成に必須の役割を有することを報告している (Watanabe Y et al., PNAS 2012)。しかしながら、心臓前駆細胞と分化心筋において Islet1 をはじめとする心臓転写因子がどのような転写複合体を構成して標的 DNA に作用し、転写制御を行うのかは未解明課題である。

2. 研究の目的

哺乳類胚の心臓背部に存在する「前方二次心臓形成領域 (anterior Second Heart Field; aSHF)」には心臓前駆細胞が含まれており、先天性心疾患の病因解明や再生医療における効率的な心筋分化誘導法の確立といった臨床的な見地から注目すべき組織である。本申請研究では、心筋分化過程における Islet1 の転写複合体構成因子を同定し、Islet1 による転写調節機構の分子基盤を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) エピトープタグ融合ノックイン Islet1 マウスの樹立。

免疫沈降、ChIP 解析においてエピトープタグの使用は高親和性の抗原抗体反応を保証するため非常に有用である。そこで、CRISPR/Cas9 ゲノム編集法を用いて、マウス受精卵に CRISPR/Cas9 と gRNA、ドナー DNA を導入し、エピトープタグが融合した Islet1 ノックイン (Islet1-FLAG、Islet1-HA) マウスを樹立する。

(2) マウス胚心臓における Islet1 の転写複合体構成因子の同定。

Islet1-FLAG および Islet1-HA マウス胎生 9.5 日胚を用いて、抗 FLAG または抗 HA 抗体による免疫沈降および沈降タンパク質の質量分析を行い、Islet1 と相互作用している因子を同定する。

(3) Islet1 転写複合体による転写制御機構の解明。

Islet1 と Islet1 相互作用因子が、Islet1 標的遺伝子の転写調節領域における転写活性にどのように影響を及ぼすかを解析する。

4. 研究成果

(1) Islet1-FLAG および Islet1-HA ノックインマウスの樹立。

CRISPR/Cas9 ゲノム編集法を用いて Islet1-FLAG および Islet1-HA ノックインマウスを樹立した。マウス胚における抗 FLAG 抗体および抗 HA 抗体による免疫染色の結果、FLAG、HA 発現と Islet1 発現パターンは一致しており、同マウス系統で内在性の Islet1 発現を再現できていることを確認した。

(2) マウス胚における Islet1 の転写複合体構成因子の同定。

Islet1-FLAG および Islet1-HA マウス胎生 9.5 日胚を用いて、それぞれ抗 FLAG または抗 HA 抗体による免疫沈降を行った。その結果、両マウス系統において Islet1 の高効率での免疫沈降および既知の Islet1 結合タンパク質である Ldb1 (LIM-domain binding 1) の共沈が確認できた。さらに Islet1-FLAG マウス系統の免疫沈降サンプルの網羅的な質量分析を行い、複数の Islet1 結合タンパク質の候補を得た。なかでも、Ldb1 の結合タンパク質として知られる Ssbp2 (single strand DNA binding protein 2) および Ssbp3 が同定されており、両因子については培養細胞を用いた共免疫沈降実験でも Islet1 との結合が確認できた。以上の結果は、マウス胚において Islet1 と Ldb1、Ssbp2・Ssbp3 が相互作用している結果を示している。

(3) Islet1、Ldb1、Ssbp2・Ssbp3 の Fgf10、Mef2c 転写調節領域における転写活性。

aSHFにおけるIslet1の標的遺伝子であるFgf10およびMef2cの転写調節領域におけるIslet1、Ldb1 および Ssbp2・Ssbp3 の影響を培養細胞でのルシフェラーゼアッセイにより検討した。その結果、上記因子の導入によるFgf10 および Mef2c の転写調節領域の有意な変化は認められなかった。Islet1 の DNA への結合に対して Islet1-LIM ドメインは阻害的に機能していることが知られていることから、上記アッセイ系において Islet1 の DNA 結合および転写活性化を再現できていない可能性が高いと考えた。そこで Islet1-LIM ドメインを欠失した Islet1-delta-LIM を導入したところ、Fgf10 および Mef2c の転写調節領域の活性化が認められた。Islet1 と Ldb1 および Ssbp2・Ssbp3 の転写活性化における相互作用については、今後のさらなる検討課題である。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2 件)

Araki M, Hisamitsu T, Kinugasa-Katayama Y, Tanaka T, Harada Y, Nakao S, Hanada S, Ishii S, Fujita M, Kawamura T, Saito Y, Nishiyama K, Watanabe Y, Nakagawa O.

Serum/glucocorticoid-regulated kinase 1 as a novel transcriptional target of bone morphogenetic protein-ALK1 receptor signaling in vascular endothelial cells. *Angiogenesis*. 21(2):415-423 (2018)

Watanabe Y, Miyasaka KY, Kubo A, Kida YS, Nakagawa O, Hirate Y, Sasaki H, Ogura T. Notch and Hippo signaling converge on Strawberry Notch 1 (Sbno1) to synergistically activate Cdx2 during specification of the trophectoderm.

Sci Rep. 7:46135. doi: 10.1038/srep46135 (2017)

[学会発表](計 33 件)

Dai Ihara, Yusuke Watanabe, Daiki Seya, Yoshie Isomoto, Teruhisa Kawamura, Osamu Nakagawa. 心臓発生における Hey2 の心室緻密化層領域の発現制御メカニズム解明 (ポスター) 第 41 回日本分子生物学会年会 2018 年 11 月 30 日 横浜市

原田恭弘、田中亨、渡邊裕介、荒井勇二、磯本祥恵、中野厚史、川村晃久、中川修。血管形成期における新規 ALK1 ターゲット遺伝子 SGK1 の血管内皮細胞特異的発現機構 (ポスター) 第 41 回日本分子生物学会年会 2018 年 11 月 29 日 横浜市

西谷-中村友重、渡邊裕介、瀬谷大貴、田中亨、中川修。Hey 転写調節因子ファミリーの胎生期血管形成における細胞特異的意義の解析 (口演) 第 26 回日本血管生物医学学会学術集会 2018 年 12 月 8 日 東京都

Osamu NAKAGAWA, Yusuke WATANABE, Yumi KINUGASA-KATAYAMA, Tomoe NAKAMURA-NISHITANI, Yukihiro HARADA, Norika Liu, Toru TANAKA, Daiki SEYA, Dai IHARA, Teruhisa KAWAMURA. Transcriptional regulation and physiological significance of BMP-ALK1 signal target genes in embryonic vascular endothelial cells (口演) 12th International BMP Conference 2018 2018 年 10 月 24 日 東京都

Yusuke WATANABE, Tomoe NAKAMURA-NISHITANI, Daiki SEYA, Dai IHARA, Teruhisa KAWAMURA, Osamu NAKAGAWA. Significance of Hey transcriptional factors in endothelial cells during cardiovascular development (ポスター) 日本循環器学会 第 2 回 Basic Cardiovascular Research Conference 2018 年 9 月 22 日 奈良市

Yusuke WATANABE, Tomoe NAKAMURA-NISHITANI, Daiki SEYA, Dai IHARA, Teruhisa KAWAMURA, Osamu NAKAGAWA. Significance of Hey transcriptional factors in endothelial cells during cardiovascular development (ポスター) 日本血管生物医学学会 第 16 回 Korea-Japan Joint Symposium 2018 年 9 月 14 日 吹田市

Yusuke WATANABE, Shuhei ISHII, Taiki Uemoto, Masahide FUJITA, Yoshie ISOMOTO, Yuji ARAI, Atsushi KUBO, Hiroyuki YAMAGISHI, Osamu NAKAGAWA. Significance of Hey1 transcription factor in pharyngeal arch artery formation and regulatory mechanisms of its expression during embryonic development (ポスター) Joint Annual Meeting of Japanese Society of Cell Biology (70th) and Japanese Society of Developmental Biology (51st) 2018 年 6 月 7 日 東京都

Yusuke WATANABE, Shuhei ISHII, Taiki UEMOTO, Tomoe NAKAMURA-NISHITANI, Daiki SEYA, Dai IHARA, Teruhisa KAWAMURA, Osamu NAKAGAWA. Significance of the Hey family of transcription factors during cardiovascular development (口演・ポスター) International Vascular Biology Meeting 2018 2018 年 6 月 5-6 日 Helsinki, Finland Yumi KINUGASA-KATAYAMA, Yukihiro HARADA, Toru TANAKA, Koichi NISHIYAMA, Teruhisa KAWAMURA, Yusuke WATANABE, Osamu NAKAGAWA. Transcriptional regulation and physiological significance of novel BMP-ALK1 signal target genes in vascular endothelial cells (ポスター) International Vascular Biology Meeting 2018 2018 年 6 月 5 日 Helsinki, Finland

Yukihiro Harada, Yusuke Watanabe, Toru Tanaka, Dai Ihara, Osamu Nakagawa, Teruhisa Kawamura. SGK1 as a novel transcriptional target of BMP-ALK1 signaling in vascular endothelial cells (ポスター) 23rd Annual Scientific Meeting of International Society

of Cardiovascular Pharmacology 2018 年 5 月 26 日 京都市
Dai IHARA, Yusuke WATANABE, Daiki SEYA, Yukihiro HARADA, Osamu NAKAGAWA, Teruhisa KAWAMURA. The mechanism of Hey2 expression in cardiac development (ポスター) 23rd Annual Scientific Meeting of International Society of Cardiovascular Pharmacology 2018 年 5 月 26 日 京都市

Yusuke WATANABE, Toshiharu FUKAYAMA, Shuhei ISHII, Taiki Uemoto, Masahide FUJITA, Yoshie ISOMOTO, Yuji ARAI, Atsushi KUBO, Hiroyuki YAMAGISHI, Osamu NAKAGAWA. Significance of Hey1 transcription factor in pharyngeal arch artery formation and regulatory mechanisms of its expression during embryonic development(口演) Weinstein Cardiovascular Development and Regeneration Conference 2018 2018 年 5 月 17 日 奈良市

Osamu NAKAGAWA, Yusuke WATANABE, Yumi KINUGASA-KATAYAMA, Yukihiro HARADA, Toru TANAKA, Takashi HISAMITSU, Ayaka TOMIMATSU, Koichi NISHIYAMA, Teruhisa KAWAMURA, Yoshihiko SAITO. Transcriptional regulation and physiological significance of novel downstream target genes of BMP-ALK1 signaling in embryonic vascular endothelial cells (ポスター) Weinstein Cardiovascular Development and Regeneration Conference 2018 2018 年 5 月 17 日 奈良市

中川修、原田恭弘、田中亨、久光隆、片山由美、川村晃久、渡邊裕介。BMP-ALK1 シグナル伝達系の新しい下流遺伝子としての Serum/glucocorticoid regulated kinase 1 (SGK1) の意義 (ポスター) 第 22 回日本心血管内分泌代謝学会学術総会 2018 年 4 月 28 日 宮崎市

Osamu NAKAGAWA, Yumi KINUGASA-KATAYAMA, Ayaka TOMIMATSU, Yusuke WATANABE. Regulatory mechanisms of endothelial-specific expression of Tmem100 encoding a transmembrane protein essential for embryonic development (ポスター) Keystone Symposium: Vascular Biology and Human Disease, From Molecular Pathways to Novel Therapeutics 2018 年 2 月 27 日 Santa Fe, U.S.A.

Osamu NAKAGAWA, Yukihiro HARADA, Toru TANAKA, Takashi HISAMITSU, Yumi KINUGASA-KATAYAMA, Teruhisa KAWAMURA, Yusuke WATANABE. SGK1 kinase as a novel transcriptional target of BMP-ALK1 signaling in vascular endothelial cells (ポスター) 日本循環器学会 第 1 回 Basic Cardiovascular Research Conference 2018 年 1 月 6 日 東京都

深山俊治、渡邊裕介、瀬谷大貴、井原大、荒井勇二、磯本祥恵、川村晃久、中川修。胎生期血管内皮細胞における Hey1 遺伝子の発現制御機構 (口演) 第 21 回日本心血管内分泌代謝学会学術集会 2017 年 12 月 10 日 大阪市

荒木睦、渡邊裕介、久光隆、田中亨、原田恭弘、片山由美、川村晃久、中川修。BMP-ALK1 シグナル伝達系の新しい下流遺伝子としての Serum/glucocorticoid regulated kinase 1 (SGK1) の意義 (ポスター) 第 25 回日本血管生物医学会学術集会 2017 年 12 月 8 日 大阪市

片山由美、富松彩佳、渡邊裕介、久光隆、瀬谷大貴、荒井勇二、磯本祥恵、斎藤能彦、中川修。胎生期血管内皮遺伝子 Tmem100 の心血管形成における発現制御機構 (ポスター) 第 25 回日本血管生物医学会学術集会 2017 年 12 月 8 日 大阪市

②1 渡邊裕介、石井修平、深山俊治、上本泰生、井原大、西谷友重、荒井勇二、中川修。Hey1 expression in pharyngeal arch and presomitic mesoderm is regulated by a distal enhancer(口演・ポスター) 第 40 回日本分子生物学会年会・第 90 回日本生化学会大会 2017 年 12 月 8-9 日 神戸市

②2 深山俊治、渡邊裕介、瀬谷大貴、井原、荒井勇二、磯本祥恵、中川修。胎生期血管内皮細胞における Hey1 遺伝子の発現制御機構 (口演・ポスター) 第 40 回日本分子生物学会年会・第 90 回日本生化学会大会 2017 年 12 月 8-9 日 神戸市

②3 片山由美、富松彩佳、渡邊裕介、瀬谷大貴、荒井勇二、磯本祥恵、斎藤能彦、中川修。胎生期血管内皮遺伝子 Tmem100 の心血管形態形成における発現制御機構の解析 (ポスター) 第 40 回日本分子生物学会年会・第 90 回日本生化学会大会 2017 年 12 月 7 日 神戸市

②4 Yusuke WATANABE, Masahide FUJITA, Shuhei ISHII, Toshiharu FUKAYAMA, Dai IHARA, Daiki SEYA, Teruhisa KAWAMURA, Osamu NAKAGAWA. Significance of Hey1 transcription factor in pharyngeal arch artery formation and regulatory mechanisms of its expression during embryonic development (ポスター) The 8th TAKAO International Symposium on Molecular Mechanism of Cardiopulmonary Disease 2017 年 10 月 7 日 松江市

②5 Mutsumi ARAKI, Yusuke WATANABE, Takashi HISAMITSU, Yumi KINUGASA-KATAYAMA, Toru TANAKA, Yukihiro HARADA, Teruhisa KAWAMURA, Osamu NAKAGAWA. Serum/glucocorticoid regulated kinase 1 as a novel transcriptional target of bone morphogenetic protein-ALK1 signaling in vascular endothelial cells (ポスター) The 8th TAKAO International Symposium on Molecular Mechanism of Cardiopulmonary Disease 2017 年 10 月 7 日 松江市

②6 渡邊裕介、中川修。咽頭弓に存在する二次心臓領域発生の分子機構 (シンポジウム口演)

- 第 122 回日本解剖学会総会全国学術集会 2017 年 3 月 28 日 長崎市
- ⑳ 石井修平、渡邊裕介、上本泰生、井原大、久光隆、深山俊治、中川修。Hrt1/Hey1 遺伝子の血管内皮発現制御機構における Notch および ALK1 シグナリングによる協調的転写調節メカニズム (口演) 第 20 回日本心血管内分泌代謝学会学術総会 2016 年 12 月 17 日 東京都
 - ㉑ 片山由美、渡邊裕介、富松彩佳、佐藤玄基、岩田裕子、荒井勇二、斎藤能彦、中川修。胎生期血管内皮遺伝子 TMEM100 の心血管形態形成における発現制御機構の解析 (口演) 第 24 回日本血管生物医学学会学術集会・日韓血管生物合同シンポジウム 2016 年 12 月 9 日 長崎市
 - ㉒ 久光隆、荒木睦、渡邊裕介、中尾周、藤田匡秀、片山由美、荒井勇二、中川修。ALK1 シグナル伝達系の新規標的遺伝子の探索と発現制御メカニズムの解析 (口演) 第 24 回日本血管生物医学学会学術集会・日韓血管生物合同シンポジウム 2016 年 12 月 9 日 長崎市
 - ㉓ 渡邊裕介、石井修平、深山俊治、上本泰生、井原大、久光隆、荒井勇二、中川修。Synergistic regulatory mechanisms of endothelial Hrt1/Hey1 gene transcription by Notch and ALK1 signaling pathways (口演) 第 24 回日本血管生物医学学会学術集会・日韓血管生物合同シンポジウム 2016 年 12 月 9 日 長崎市
 - ㉔ 片山由美、岩田裕子、富松彩佳、渡邊裕介、斎藤能彦、中川修。胎生期血管内皮遺伝子 Tmem100 の心血管形態形成における発現制御機構と分子機能の解析 (ポスター) 第 39 回日本分子生物学会年会 2016 年 12 月 1 日 横浜市
 - ㉕ 久光隆、荒木睦、渡邊裕介、片山由美、藤田匡秀、中尾周、中川修。内皮細胞における ALK1 シグナル伝達系の新規下流因子の同定と発現調節機構の解析 (ポスター) 第 39 回日本分子生物学会年会 2016 年 12 月 1 日 横浜市
 - ㉖ 石井修平、渡邊裕介、上本泰生、井原大、久光隆、深山俊治、中川修。Hrt1/Hey1 遺伝子の血管内皮発現制御機構における Notch および ALK1 シグナリングによる協調的転写調節メカニズム (ポスター) 第 39 回日本分子生物学会年会 2016 年 11 月 30 日 横浜市

〔図書〕(計 1 件)

深山俊治、瀬谷大貴、井原大、川村晃久、渡邊裕介、中川修：“心臓・大血管の形態形成と転写調節因子” 生体の科学 68 巻 6 号、p531-535 (2017)

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：中川修

ローマ字氏名：Nakagawa Osamu

所属研究機関名：国立研究開発法人・国立循環器病研究センター

部局名：研究所

職名：部長

研究者番号 (8 桁)：40283593

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。