

令和 3 年 5 月 21 日現在

機関番号：32663

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06268

研究課題名(和文) 真骨魚類の動脈球獲得におけるエラスチンの機能

研究課題名(英文) The function of elastin for the formation of bulbus arteriosus in teleost

研究代表者

小柴 和子 (Koshiba-Takeuchi, Kazuko)

東洋大学・生命科学部・教授

研究者番号：30467005

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)：多くの脊椎動物の心臓流出路が心筋から構成されているのに対し、ゼブラフィッシュなどの真骨魚類はエラスチンに富んだ平滑筋からなる心臓流出路(動脈球)を有する。これまでの研究から動脈球の獲得にはトロポエラスチン遺伝子の重複と新規機能の獲得が重要であることが分かってきた。本研究では、エラスチン重合に関与するltbpやファイブリンに着目し、ゼブラフィッシュの心臓発生における発現パターンを詳細に観察するとともに、トロポエラスチン遺伝子も含めこれら遺伝子が動脈球に発現する制御機構を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エラスチンは脊椎動物にのみ存在する細胞外基質で、哺乳類では皮膚や肺、動脈に存在し、マウスでエラスチン遺伝子をノックアウトすると血管平滑筋が異常増殖し血管が閉塞する。一方、真骨魚類は2種類のエラスチン遺伝子(eIna、eInb)を有し、このうち動脈球に発現するeInbを機能阻害すると動脈球に異所的に心筋が分化するという心筋・平滑筋分化制御に関連した機能を示す。動脈球エラスチンの特殊性や発現制御メカニズムを解明することは、進化学的、発生学的に意味があるだけでなく、エラスチンの生体材料としての新規利用法につながる。

研究成果の概要(英文)：Teleost such as zebrafish have the unique outflow tract called as bulbus arteriosus, which is composed from smooth muscle and rich in elastin, whereas the outflow tract of many vertebrates is composed from myocardium. The previous study has indicated that the duplication and sub/neofunctionalization of elastin gene is critical for the formation of bulbus arteriosus. In this study, I focused on ltbp and fibulin which promote the elastin synthesis, and found that the expression patterns of these genes were identical to that of elastinb gene in zebrafish heart development. Moreover, I revealed that the expressions of these elastin-related genes in the outflow tract are regulated by TGFbeta signaling.

研究分野：発生生物学

キーワード：ゼブラフィッシュ 動脈球 エラスチン 心筋 平滑筋

## 1. 研究開始当初の背景

脊椎動物の心臓は大きく4つの区画からなり、血液が流れ込む側から流入路(静脈洞)心房、心室、流出路と呼ばれる。脊椎動物の心臓は、進化の過程で心房心室の数を増やし、形を大きく変えていったが、流出路もまた進化とともに形が変化している。軟骨魚類や肺魚、両生類の流出路は心筋からなり動脈円錐と呼ばれるが、ゼブラフィッシュなどの真骨魚類は球状の平滑筋からなるエラスチンに富んだ流出路(動脈球)をもつ。真骨魚類は3回目の全ゲノム重複(3round Whole-Genome Duplication; 3R-WGD)を経験しているという点で他の魚類と大きく異なるが、3R-WGDと動脈球の獲得との関連性は不明であった。

エラスチンは脊椎動物にのみ存在する細胞外基質で、哺乳類では皮膚や肺、動脈などに存在し、それらの構造を保つ重要な役割を担っている。エラスチンはトロポエラスチンが重合することにより形成される。ヒトやマウスは1種類のトロポエラスチン遺伝子を有するが、真骨魚類はe1naとe1nbの2種類のトロポエラスチン遺伝子を有し、そのうちe1nbが流出路特異的に発現している。動脈球のエラスチンは血管のエラスチンよりも弾性に富むなど、特別な性質をもっていることが報告されており、e1naとe1nbは異なった機能を有することが考えられた。そこで動脈球形成におけるe1na、e1nbの機能を調べるために、ゼブラフィッシュを用いて機能障害実験を行ったところ、e1nbの機能を障害すると動脈球に異所的に心筋が誘導されることが見出された。このことは、動脈球を構成する平滑筋の分化にe1nbが重要な役割を担っていることを示す。さらに、e1naとe1nbが重複したタイミングを分子系統学的に調べたところ、3R-WGDの際にe1n遺伝子が重複したことが示され、進化的に重要なイベントである3R-WGDによるe1n遺伝子の重複、e1nbの新規機能の獲得が真骨魚類特有の器官である動脈球をもたらしたことが示唆された。

## 2. 研究の目的

e1nbの機能障害による異所的な心筋形成は、本来心筋に分化する心臓前駆細胞が、動脈球のエラスチンによって平滑筋へと分化誘導されていることを示唆する。このようなエラスチンによる心筋・平滑筋の分化制御は、エラスチンの機能としてこれまでに報告されていないものである。エラスチンが心筋・平滑筋の分化制御機能をもつようになった背景にはトロポエラスチンに生じた分子進化の影響が考えられるが、エラスチンの合成にはトロポエラスチンだけではなく重合を促進する因子の働きも重要である。そこで、動脈球エラスチン合成に関与する分子メカニズムを明らかにすることにより、合成タンパク質として動脈球エラスチンを効率良く作製する方法が確立できるのではないかと考えた。動脈球エラスチンを合成することができれば、培養系への利用が簡便になり、多能性幹細胞からの平滑筋分化誘導実験に用いるなど、生体材料としての応用性が期待できる。また、脊椎動物の進化から考えると、真骨魚類は動脈球を獲得することにより運動能力を高め、それによって繁栄したと考えられる。なぜ流出路に特殊な性質をもつエラスチンが合成されるに至ったか、エラスチン合成に関連する一連の遺伝子を流出路に発現させる機構について明らかにすることにより動脈球形成メカニズムを理解することは、進化生物学的に非常に意味のある研究となる。トロポエラスチンが重合し、エラスチンとなる過程にはミクロフィブリル等様々な因子の関与が報告されている。真骨魚類の流出路においてもエラスチン合成に関わる因子が発現していることが予想され、候補因子を探索したところ、エラスチン合成のオーガナイザーとしての作用が知られているファイブリンファミリーのうち、fbln5遺伝子が流出路に特異的に発現していることを見出した。流出路にはこの他に、エラスチン合成を促進する作用のあるltbp3も発現しており、これら因子の相互作用により、流出路でのエラスチン合成がなされていると考えられた。本研究では、トロポエラスチン重合におけるファイブリン、ltbpの機能を明らかにするために、ファイブリンファミリー因子およびltbpファミリー因子とe1nbとの詳細な発現比較や機能障害実験を行い、真骨魚類流出路におけるエラスチン合成の分子メカニズムを明らかにすることを目的とする。さらに、これらエラスチン合成に関わる因子が真骨魚類の流出路に特異的に発現していることは、これらの遺伝子の発現制御領域に流出路への発現を誘導するエンハンサーが存在すると予想され、そのようなエンハンサーの獲得が動脈球の獲得につながったと考えられる。本研究においては、e1nb、fbln5、ltbp3の発現制御領域を比較することにより、真骨魚類の進化において重要なイベントとなる動脈球の獲得をもたらした、「動脈球エンハンサー」を見出すことを目指す。また、これまでの研究から、流出路における心臓前駆細胞の平滑筋への分化誘導にはメカニカルストレスが関与していることが分かっている。メカニカルストレスを細胞内に伝えるyapを機能障害すると、e1nbの機能障害と同様に動脈球に異所的に心筋が形成される。本研究ではエラスチンとyapとの関係を明らかにし、メカニカルストレスが平滑筋分化を誘導する分子メカニズムを明らかにすることも目的とする。細胞外基質による多能性幹細胞の分化誘導はこれまでも報告されているが、心筋・平滑筋分化に特化したものや、メカニカルストレスと心筋・平滑筋分化制御に関する研究はほとんどなされていない。従って、本研究で得られる成果は新たな心筋・平滑筋分化制御メカニズムの発見に繋がると期待できる。エラスチンによる心筋・平滑筋分化制御メカニズムを明らかにすることは、動脈球獲得という真骨魚類の進化的イベントに対する説明だけでなく、動物の進化において大

きな課題とされている心臓（心筋）と血管（平滑筋）の分離がどのように進んだかについての知見も得られることが期待される。

### 3. 研究の方法

本研究では、真骨魚類流出路におけるエラスチン形成の分子メカニズムを明らかにするために、*fbln5*、*ltbp3* を含めたファイブリンファミリー、*ltbp* ファミリー、フィブリリンファミリー因子の詳細な発現解析とともに機能障害実験を行う。機能障害実験はモルフォリノアンチセンスオリゴ(MO)を作製し、ゼブラフィッシュ受精卵にインジェクションした際に、動脈球形成に与える影響を調べる。エラスチン染色によるエラスチン合成の確認と、動脈球での異所的な心筋分化の誘導について *eInb* MO 投与の結果と比較しながら行う。*eInb* MO の投与では動脈球の一部に心筋の形成が認められたが、*fbln5*、*ltbp3* といったエラスチン重合に関与する因子と組み合わせることで機能障害した際の心筋分化効率を調べ、エラスチン形成に必要な因子を明らかにする。*eInb*、*fbln5*、*ltbp3* の発現様式が似通っていることから、これら遺伝子上流に真骨魚類に動脈球をもたらし「動脈球エンハンサー」が存在するとの仮説に基づき、発現制御領域を比較する。

### 4. 研究成果

*ltbp*、ファイブリン、フィブリリンファミリー因子のうち、他の脊椎動物において循環器系に発現しているものに着目し、ゼブラフィッシュ遺伝子のクローニングと、*in situ* ハイブリダイゼーションによる発現解析を行った。その結果、動脈球形成時に流出路に発現する *ltbp* 因子、ファイブリン因子をいくつか見出すことができた。さらに、それぞれについて機能障害実験を行ったところ、心臓流出路を含む心臓発生の異常が認められた。解析した *ltbp*、ファイブリン、フィブリリンファミリー因子のうち、*eInb* と発現のタイミングおよび発現領域が良く似通っているものは *fbln5*、*ltbp3* であったことから、*fbln5* 遺伝子、*ltbp3* 遺伝子上流配列と *eInb* 遺伝子上流配列とを比較解析したところ、*fbln5* 遺伝子、*eInb* 遺伝子上流には *smad* の結合配列が存在していることが分かった。実際に、心臓発生時における発現においても、*ltbp3* は *fbln5* や *eInb* よりも早いタイミングで流出路領域に発現し始める一方で、*fbln5* と *eInb* はほぼ同じタイミングで発現し、発現領域もオーバーラップすることから、*fbln5* と *eInb* には共通の転写制御がはいらしていることが考えられた。

次いで、*fbln5* と *eInb* が *smad* によって制御されているか調べるために、*smad* のアンチセンスモルフォリノオリゴによる機能障害実験を行った。その結果、*smad* の機能障害胚では流出路における *eInb* と *fbln5* の発現が減少していることが分かり、*fbln5* と *eInb* は TGF- $\beta$  シグナルによる制御を受けている可能性が考えられた。そこで、ゼブラフィッシュ胚に対して、TGF- $\beta$  シグナルの阻害剤を投与して遺伝子の発現変化を調べたところ、*fbln5* と *eInb* とともに発現が減少していた。さらに、*fbln5* 遺伝子と *eInb* 遺伝子上流領域をクローニングし、ルシフェラーゼベクターに組み込み、ルシフェラーゼアッセイによる解析を行った。培養系に TGF- $\beta$  を投与し、転写活性を調べたところ、*eInb* では転写が活性化していた。生体を用いた解析では TGF- $\beta$  シグナルにより *fbln5* の発現変化が認められたことから、*fbln5* については今回解析に用いた部位とは別の部位が手転写制御に関わっていることが考えられた。

今回の一連の研究により、ゼブラフィッシュの心臓流出路にはエラスチン合成に関わる複数の因子が発現していること、また、それらの一部は TGF- $\beta$  シグナルによって発現が制御されていることが明らかになった。次の課題として、TGF- $\beta$  シグナルによる制御が動脈球のエラスチン合成に関与しているか、心筋・平滑筋分化制御に与える影響を調べる必要がある。さらには、魚類の進化における動脈球の獲得と関連して、動脈球をもたない魚類でのエラスチン合成関連因子の発現様式、また、TGF- $\beta$  シグナルによる発現制御機構が存在するか調べることにより、動脈球獲得のより詳細な分子メカニズムを明らかにできると考えられる。

当初はメカニカルストレスとの関連、および、エラスチン合成関連因子の強制発現による心筋・平滑筋分化に与える影響を調べる予定であったが、上流解析とその発現制御機構の解明に時間が取られてしまい、メカニカルストレスとの関連を調べることはできなかった。今後は、動脈球におけるエラスチン合成に関与する因子が明らかになってきたことから、これら因子の機能とも関連させて、メカニカルストレスと心筋・平滑筋分化について解析を進めたい。また、エラスチン合成関連因子については、発現ベクターへのクローニングに問題があり、*eIna* については合成ができ性質の解析ができているが、*eInb* については現在進行中である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hori Yutaro, Tanimoto Yoko, Takahashi Satoru, Furukawa Tetsushi, Koshiba-Takeuchi Kazuko, Takeuchi Jun K.	4. 巻 19
2. 論文標題 Important cardiac transcription factor genes are accompanied by bidirectional long non-coding RNAs	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 BMC Genomics	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12864-018-5233-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Katano Wataru, Moriyama Yuuta, Takeuchi Jun K., Koshiba Takeuchi Kazuko	4. 巻 61
2. 論文標題 Cardiac septation in heart development and evolution	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Development, Growth & Differentiation	6. 最初と最後の頁 114-123
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/dgd.12580	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Moriyama Yuuta, Koshiba-Takeuchi Kazuko	4. 巻 17
2. 論文標題 Significance of whole-genome duplications on the emergence of evolutionary novelties	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Briefings in Functional Genomics	6. 最初と最後の頁 329 ~ 338
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/bfpg/ely007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Koshiba-Takeuchi Kazuko	4. 巻 1752
2. 論文標題 Whole-Mount and Section In Situ Hybridization in Mouse Embryos for Detecting mRNA Expression and Localization	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 123-131
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-1-4939-7714-7_12	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計21件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 大牧 創, 古川 大雅, 守山 裕大, 小柴 和子
2. 発表標題 魚類におけるhand遺伝子の機能解析
3. 学会等名 日本動物学会 第90回 大阪大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大牧 創, 古川 大雅, 守山 裕大, 小柴 和子
2. 発表標題 真骨魚類におけるhand遺伝子の多様化と機能
3. 学会等名 第18回日本心臓血管発生研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kazuko Koshiha-Takeuchi
2. 発表標題 Molecular mechanisms of cardiovascular development through the studies of cardiac evolution
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会 ワークショップ：心臓大血管形成研究の最先端（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤環、植竹正憲、小柴和子
2. 発表標題 ゼブラフィッシュ心臓流出路におけるエラスチン重合因子の発現解析
3. 学会等名 日本動物学会第89回札幌大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大牧創、古川大雅、守山裕大、小柴和子
2. 発表標題 魚類におけるhand遺伝子の機能解析
3. 学会等名 日本動物学会関東支部第71回大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 公益社団法人日本動物学会	4. 発行年 2018年
2. 出版社 丸善出版	5. 総ページ数 800
3. 書名 動物学の百科事典 第7章「動物の生理と神経系－心循環器の多様性－」	

1. 著者名 一般社団法人日本魚類学会	4. 発行年 2018年
2. 出版社 丸善出版	5. 総ページ数 756
3. 書名 魚類学の百科事典 第3章「形態－循環器－」	

〔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
---------	---------