

令和 3 年 6 月 5 日現在

機関番号：32686

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06269

研究課題名(和文) 心臓の組織再生に関わるIslet-1の転写制御機構の解析

研究課題名(英文) Transcriptional regulation of Islet-1 in tissue regeneration of Xenopus heart

研究代表者

木下 勉 (KINOSHITA, Tsutomu)

立教大学・理学部・教授

研究者番号：30161532

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：成体になっても心筋再生が可能なツメガエルと心筋を再生できないマウスの間で、心筋前駆細胞の制御遺伝子Islet1の転写調節機構を比較解析した。ツメガエルでは心筋切除術後1日目にIslet1とHIF1の遺伝子発現が上昇した。Islet1の転写制御に関わるHIF1の作用点は、Islet1遺伝子上流に存在する8番目の保存領域(MCR8)に存在していた。マウスやヒトではMCR8に存在しているHIF1結合モチーフが失われていた。

以上の結果から、HIF1結合モチーフの位置や方向における動物種間の違いがIslet1の転写機能の違いの原因である可能性が示唆される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、心筋損傷により誘導されるHIF1がIslet1遺伝子の転写誘導に必須であることが明らかになった。また、マウスでもカエルと同様に、心筋の損傷直後にHIF1の発現誘導が起こるものの、HIF1が作用すると考えられるIslet1のプロモーター領域からHIF1の結合モチーフが欠失していることがわかった。

これらの研究結果により、哺乳動物の成体心臓にはIslet1細胞が存在しているものの、分裂能を失っている理由の一つが明らかになったといえる。これらの結果は、今後、哺乳類の心筋において組織再生への糸口を与える重要な知見と思われる。

研究成果の概要(英文)： We compared and analyzed the transcriptional regulatory mechanism of the myocardial progenitor cell regulatory gene Islet1 between Xenopus, which can regenerate myocardium even in adults, and mice, which cannot regenerate myocardium. In Xenopus, the gene expression of Islet1 and HIF1 increased on the first day after myocardial resection. The binding site of HIF1 in the transcriptional regulation of Islet1 was located in the 8th conserved region (MCR8) located upstream of the Islet1 gene. In mice and humans, the HIF1-binding motif was lost in MCR8 region.

From these results, it is suggested that the difference between animal species in the position and direction of the HIF1-binding motif may be the cause of the difference in the transcription function of Islet1.

研究分野：発生生物学

キーワード：心筋再生 心筋前駆細胞 Islet-1遺伝子 転写制御 HIF1 種間比較

1. 研究開始当初の背景

islet1 (*isl1*)は心臓前駆細胞マーカーとして知られる。哺乳類の成体心臓には心臓前駆細胞である *islet1* 陽性細胞が存在するものの分裂能を失っている。一方我々は、アフリカツメガエルの成体の心臓において、*islet1* 陽性細胞が分裂能を有し、心筋再生能を示すことを見出した。こうした哺乳類と両生類の心筋再生能の違いは、*islet1* 遺伝子の転写制御の違いにあることが予想される。

2. 研究の目的

アフリカツメガエルの *isl1* 遺伝子について転写調節領域を解析し、心筋再生時に働く *isl1* のエンハンサー領域と転写制御因子を特定することを目的とする。また、同定されたエンハンサー領域を脊椎動物の種間で比較し、哺乳類とツメガエルの心筋再生において *isl1* の転写調節に違いが生まれる機構を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) アフリカツメガエル *isl1* 遺伝子上流において動物種間で保存性の高い領域の探索
ヒト、マウス、オポッサム、カモノハシ、トカゲ、ネッタイツメガエル、アフリカツメガエル(L型・S型)、シーラカンス、ゼブラフィッシュの *isl1* 遺伝子領域のゲノム情報を取得し、ゲノムアラインメントツール VISTA を用いて比較し、保存性が75%以上である保存性の高い multiple conserved region (MCR) を特定した。

(2) *isl1* 転写調節因子の絞り込み

isl1 の転写を調節する遺伝子候補について転写因子データベース JASPAR を用いて絞り込んだ。これらの遺伝子群の結合モチーフの中から高頻度に MCR に配列が存在し、初期心臓形成あるいは心筋再生時に発現する遺伝子を *isl1* 転写調節候補遺伝子とした。更に、アニマルキックアッセイを用いて、*isl1* の遺伝子発現量へ影響を及ぼす転写調節遺伝子の絞り込みを行った。

(3) MCR における *hif1* の結合モチーフの探索

(2) のスクリーニングにより絞り込まれた *hif1* に着目し、*isl1* の MCR に存在する *hif1* の結合配列を検索し、*hif1* の結合が実験的に証明されている 5' -RCGTG-3' または 5' -ACGTV-3' の配列を含む MCR を推定エンハンサー領域とした。また、*hif1* が結合する推定エンハンサー領域を複数箇所単離してルシフェラーゼアッセイを行い、*hif1* に応答性を示した MCR8 を特定した。更に ChIP アッセイを行って、*Hif1* が MCR8 に直接結合するか、また MCR8 領域に存在する複数の結合モチーフのうち、どのモチーフに結合するのかを解析した。

(4) *hif1* 阻害が *isl1* 転写とその機能に与える影響の解析

hif1 の転写と機能阻害をする PX-478 を投与し続けた個体から心臓を単離し、*isl1* の遺伝子発現および心筋形成に及ぼす影響を解析した。

(5) マウス心筋損傷における *hif1* と *isl1* 遺伝子の発現量解析

マウス心筋にドライアイスを用いて凍結損傷を与え、損傷後における *isl1* 及び *hif1* の遺伝子発現量の変化を解析した。

(6) *isl1* 上流の遠位エンハンサー領域の動物種間の比較

ヒト、マウス、オポッサム、カモノハシ、ニワトリ、トカゲ、ネッタイツメガエル、アフリ

カツメガエル(L/S)、シーラカンス、ゼブラフィッシュのゲノム情報を用いて、*is11* 遺伝子の MCR8 に存在する *hif1* 結合モチーフの保存性を比較した。

4. 研究成果

(1) アフリカツメガエル *is11* 遺伝子上流における保存領域の探索

is11 の転写開始点から近接するコーディング遺伝子までのゲノム配列をヒト、マウス、オポッサム、カモノハシ、トカゲ、ネッタイツメガエル、アフリカツメガエル(L型・S型)、シーラカンス、ゼブラフィッシュの10種で比較したところ、もっとも近位の保存領域(MiniP)以外に、8つのMCRが存在し、近接コーディング遺伝子までの領域に広く分布していることがわかった。

(2) *is11* 遺伝子の転写調節候補因子の絞り込み

ヒト・マウス *is11* 遺伝子の転写因子として JASPAR に登録されている 522 遺伝子を解析し、細胞運命決定、及び細胞分化に関連する遺伝子として 146 個を絞り込んだ。更にこれらの中から、心筋関連遺伝子群に分類され、(1)で定義した各 MCR に結合モチーフが存在し、初期心臓発生、または、未分化性維持に関連する遺伝子を選別した。その結果、*is11* 転写調節候補遺伝子として *pou5f3.2*, *nkx2.5*, *gata4*, *mef2c*, *tbx5*, *hoxa5*, *hif1* を特定した。

(3) アフリカツメガエルの心筋再生過程における転写調節候補遺伝子の発現解析

変態後 3 か月齢のアフリカツメガエルの心室を切除し、切除後の遺伝子発現変化を解析した。その結果、*is11* が心筋切除 1 日後に一時的に上昇するとともに、*hif1* 及び *mef2c* も *is11* の発現変化と同様のパターンを示すことがわかった(図1)。また、*nkx2.5* 及び *hoxa5*

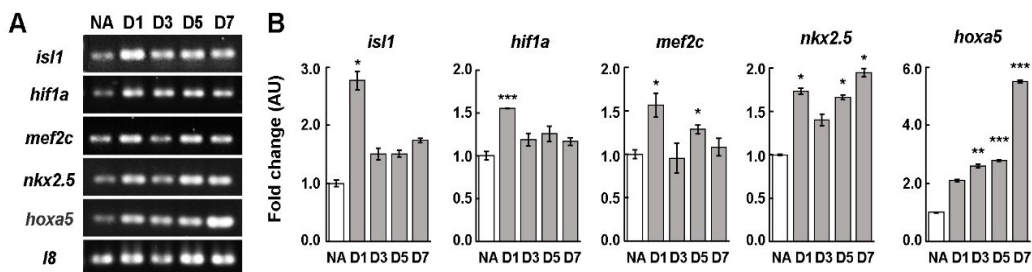


図1. アフリカツメガエル3カ月齢個体の心室切除後の mRNA の変化

(A) PCR産物のアガロース電気泳動図。切除後1日(D1)から7日(D7)まで。(B) 定量的PCRの解析結果。未切除における発現量を1とした時の相対値。

は、切除後7日まで発現が上昇していた。*pou5f3.2*, *gata4*, *tbx5*の発現には有意な変化は見られなかった。ツメガエルの心筋では、*nkx2.5*は *hif1* の標的遺伝子として知られているため、*nkx2.5* の mRNA の上昇は、*hif1* の下流遺伝子として動いていると考えられる。また、*mef2c* は *islet1* の標的遺伝子として知られており、この遺伝子の上昇も矛盾しない。また、創傷反応における低酸素環境は、心筋細胞への損傷および虚血のために引き起こされると考えられる。

(4) 転写調節候補遺伝子の過剰発現が *is11* mRNA 発現量に与える影響の解析

アニマルキャップアッセイにより、各候補遺伝子の過剰発現が *is11* 転写に与える影響を解析した。GR-*gata4* の核移行がデキサメタゾン (DEX) によって誘導された場合に、心臓中胚葉マーカーである *nkx2.5* の発現が、誘導されなかった場合よりも増加した。この誘導系に、候補遺伝子の mRNA を共注入し、*is11* 転写量の変化を解析した。その結果、*gata4* 及び *hoxa5*

は抑制的に、*mef2c* と *hif1* は促進的な作用を示した(図 2)。特に *hif1* は濃度依存的に *isl1* の転写を促進した。

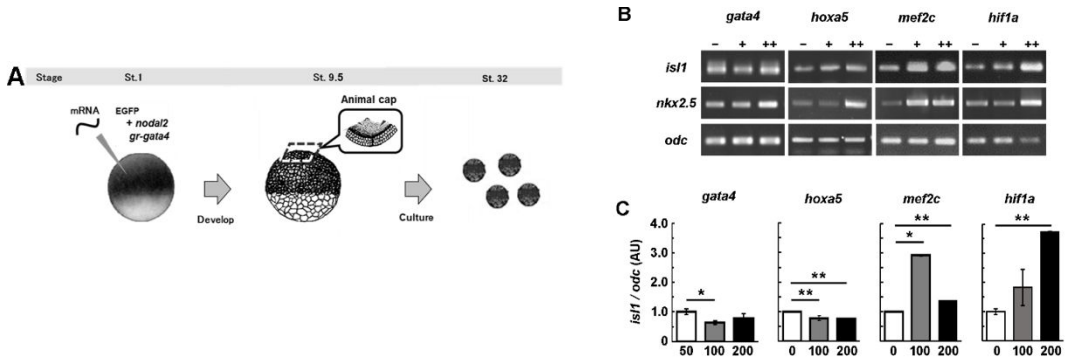


図 2. *isl1* 転写調節候補遺伝子の過剰発現が *isl1* 転写に与える影響の解析

(A) アニマルキャップアッセイの流れ。 *gr-gata4* と *nodal2* 注入により心筋を誘導した培養系に候補遺伝子の mRNA を共注入して遺伝子発現を解析。(B) qPCR の電気泳動図。候補遺伝子の mRNA 量を変化させた(胚あたり 0、100、および 200 pg をそれぞれマイナス、プラス、およびダブルプラスとして表記)。(C) qPCR の定量的解析結果。遺伝子発現は *odc* 発現量を 1 とした相対値。

(5) MCR における *hif1* の結合モチーフ探索

hif1 に着目し、*isl1* 転写促進の作用点を解析した。JASPAR を用いて *isl1* 遺伝子の 3' 下流領域における *hif1* 結合モチーフを検索した結果、5'-RCGTG-3' および 5'-ACGTV-3' のようなコア配列を含むモチーフは存在しなかった。これに対して 5' 上流側では、推定 *hif1* のモチーフは MCR6 を除く全ての MCR に存在していた。しかし、5'-RCGTG-3' または 5'-ACGTV-3' のコア配列を持つのは MiniP、MCR4、7、および 8 であることが明らかになった。

(6) ルシフェラーゼレポーターアッセイによる Hif1 の作用領域の解析

MiniP、MCR4、7、および 8 のそれぞれの配列を含むルシフェラーゼコンストラクトを作製してレポーター活性を解析した。その結果、miniP は単独ではルシフェラーゼ活性を示さないのに対し、miniP と組み合わせた MCR8 はエンハンサー活性を示すことがわかった(図 3)。

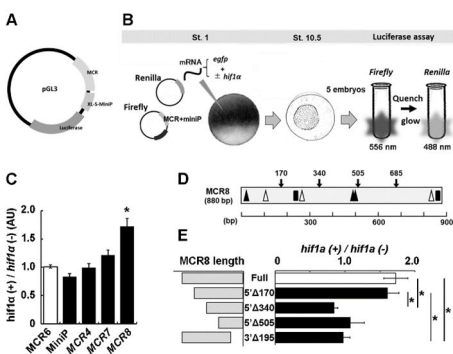


図 3. *hif1* 存在下での MCR8 特異的なルシフェラーゼ活性

(A) 用いたレポーターコンストラクトの模式図。(B) ルシフェラーゼレポーターアッセイの流れ。(C) レポーター活性の相対値。(D) MCR8(880 bp) における推定 *hif1* 結合モチーフの位置。forward 向きの配列。reverse 向きの配列。forward/reverse 両方向の配列。(E) MCR8 部分欠失によるルシフェラーゼ活性の変化。

次に MCR8 の部分欠損コンストラクトを用いて、MCR8 に存在する全てのモチーフの活性を調べた結果、MCR8 の 170-340 bp および 685-880 がルシフェラーゼ活性を示すために不可欠であり、*hif1* が作用する有力候補であることがわかった。

(7) ChIP-PCR による Hif1 と遠位エンハンサー領域の作用点の解析

hif1 が MCR8 に直接結合するかを評価するために、MT-*hif1* の過剰発現によるクロマチン免疫沈降を行った結果、MCR8 の 1-170 および 170-340 領域への結合は検出された一方で、*hif1* モチーフ配列を含まない 505-685 領域への結合は認められなかった。更に、1-170 お

よび 170-340bp の領域に含まれる推定 *hif1* 結合モチーフのみを欠損した MCR8 レポーターコンストラクトを用いてルシフェラーゼ活性を解析した結果、これらの結合モチーフを欠損するとレポーター活性を失うことがわかった。

(8) *hif1* 阻害が *isl1* 転写とその機能に与える影響の解析

in vivo における *hif1* 阻害の効果を評価するために、転写レベルで *hif1* を阻害する PX-478 の存在下でアフリカツメガエル胚を発生させた。その結果、*Phif1* の転写抑制とともに、*isl1* とその転写標的である *mef2c* の転写レベルも減少することがわかった。また PX-478 で処理されたオタマジャクシの心臓を観察したところ、心拍数の低下と心室の心筋層の発達不良が認められた。

(9) マウス心筋損傷における *hif1* と *isl1* 遺伝子の発現量解析

成体哺乳動物の心筋細胞の大部分は分裂せず休止状態であるため、マウスの心筋では心臓損傷に *isl1* が応答しないと仮定しマウス心臓の低温損傷実験を行った。その結果、*hif1* の mRNA は、損傷後数日間、発現が上昇していたが、*isl1* の発現は検出されなかった(図4)

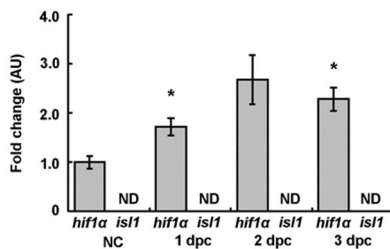


図4.成体マウス心筋損傷後の mRNA 変化の解析
8 週齢の雄マウスの心室に凍結損傷を与えた後に、*isl1* および *hif1* 遺伝子発現の変化を解析した。遺伝子の発現量は *gapdh* の発現量を1とした時の相対値。

ツメガエルの成体心筋では、低レベルに発現が維持された *isl1* が損傷に応じて上昇することから、哺乳類とツメガエルにおける *isl1* の転写調節には違いがあることが示唆される。

(10) *isl1* 上流の遠位エンハンサー領域の動物種間の比較

レポーター活性のために必須であったツメガエル MCR8 に存在する *hif1* 結合モチーフが動物種間でどの程度保存されているかを解析した結果、*Xenopus tropicalis* と *Xenopus laevis* (L/S) の MCR8 には完全に保存された 5'-ACGTC-3' 配列が存在することが分かった(図5)。ツメガエルに共通の *hif1* 結合モチーフをニワトリと比較すると、塩基置換や挿

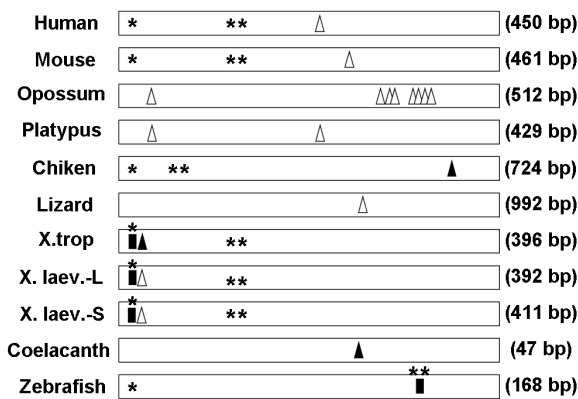


図5.動物種間の MCR8 における推定 *hif1* 結合モチーフの位置及び向き

、forward 向きの配列。、reverse 向きの配列。、forward/reverse 両方向の配列。MCR8 の長さを右に記述。*、アフリカツメガエルに共通の *hif1* モチーフの位置、または、それに対応する他種の MCR8 における位置。**、ゼブラフィッシュの *hif1* モチーフの位置、または、それに対応する他種の MCR8 における位置。

入により、このコア配列が変異していることがわかった。マウスやヒトでは、ニワトリよりも変異が顕著であり、コア配列の破壊が進んでいることがわかった。マウスの成体心筋では損傷が起きても *isl1* の転写誘導が起きないのは、*isl1* の転写誘導に働く *hif1* の結合モチーフがマウスの MCR8 領域に存在しないことが原因の一つであることが示唆される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hasegawa S, Nakao I, Ootani Y, Ogawa A, Takano M, Kinoshita T.	4. 巻 27
2. 論文標題 Identification and characterization of POU class V family genes in Japanese red bellied newt, <i>Cynops pyrrhogaster</i> .	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Zygote	6. 最初と最後の頁 329-336
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1017/S0967199419000339.	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 Casco-Robles, RM, Watanabe A, Eto K, Takeshima K, Obata S, Kinoshita T, Ariizumi T, Nakatani K, Nakada T, Tsonis PA, Casco-Robles MM, Sakurai K, Yahata K, Maruo, F, Toyama F, Chiba C.	4. 巻 8
2. 論文標題 Novel erythrocyte clumps revealed by an orphan gene <i>Newtic1</i> in circulating blood and regenerating limbs of the adult newt.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Sci. Repo.	6. 最初と最後の頁 7455-7469
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-25867-x	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 該当する
1. 著者名 Umezawa Saki, Miyakawa Miho, Yamaura Takashi, Kubo Hideo, Kinoshita Tsutomu	4. 巻 155
2. 論文標題 Derivation of proliferative islet1-positive cells during metamorphosis and wound response in <i>Xenopus</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Histochemistry and Cell Biology	6. 最初と最後の頁 133 ~ 143
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00418-020-01929-y	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 Ezawa Minami, Kouno Fumika, Kubo Hideo, Sakuma Tetsushi, Yamamoto Takashi, Kinoshita Tsutomu	4. 巻 72
2. 論文標題 <i>Pou5f3.3</i> is involved in establishment and maintenance of hematopoietic cells during <i>Xenopus</i> development	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Tissue and Cell	6. 最初と最後の頁 101531 ~ 101531
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.tice.2021.101531	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 Miyakawa Miho, Katada Tomohisa, Numa Yunosuke, Kinoshita Tsutomu	4. 巻 255
2. 論文標題 Transcriptional regulatory elements of hif1 in a distal locus of islet1 in <i>Xenopus laevis</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 110598 ~ 110598
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cbpb.2021.110598	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10件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 金川芽衣、木下勉
2. 発表標題 アフリカツメガエルの心筋再生におけるpou5f3.2発現細胞の役割
3. 学会等名 日本動物学会第90回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋くるみ、木下勉
2. 発表標題 アフリカツメガエルの心筋形成におけるIslet1.LおよびIslet1.Sの遺伝子発現解析
3. 学会等名 日本動物学会第90回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮川美保、木下勉
2. 発表標題 アフリカツメガエルにおけるislet1転写調節機構の解析
3. 学会等名 日本動物学会第90回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋くるみ、木下勉
2. 発表標題 アフリカツメガエルの心筋形成における islet1の機能の解析
3. 学会等名 日本分子生物学会第42回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮川美保、木下勉
2. 発表標題 アフリカツメガエルにおける islet1転写調節機構の解析
3. 学会等名 日本分子生物学会第42回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Saki Umezawa, May Kanagawa, Tsutomu Kinoshita
2. 発表標題 Role of Islet-1-expressing cells during heart regeneration in <i>Xenopus laevis</i>
3. 学会等名 日本発生生物学会 第51回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 M.Kanagawa, S.Umezawa, T.Kinoshita
2. 発表標題 Islet-1 expressing cells contribute to the creation of new cardiomyocytes at the initial stage of heart regeneration
3. 学会等名 17th International <i>Xenopus</i> Conference (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮川美保、椋澤早紀、木下勉
2. 発表標題 アフリカツメガエルの心筋再生におけるIslet1の遺伝子発現の解析
3. 学会等名 日本動物学会第89回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 金川芽衣、佐藤実夏、木下勉
2. 発表標題 アフリカツメガエルの心筋再生におけるpou5f3.2発現細胞の役割
3. 学会等名 日本動物学会第89回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮川美保、木下勉
2. 発表標題 アフリカツメガエルの心臓再生におけるIslet1転写調節機構の解析
3. 学会等名 日本分子生物学会第41回大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔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
研究分担者	堅田 智久 (Katada Tomohisa) (10527229)	杏林大学・医学部・助教 (32610)	

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
---------	---------