

機関番号：32202

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20300141

研究課題名 (和文) 心臓洞房結節特異的チャネル HCN4 の発現制御機構の解明と再生心筋への応用

研究課題名 (英文) Transcriptional mechanisms of sino-atrial node specific channel HCN4 in the heart.

研究代表者

鷹野 誠 (Makoto Takano)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：30236252

研究成果の概要 (和文)：

HCN4 チャネルは心臓洞房結節に特異的に発現する。この発現制御機構を明らかにするために、HCN4 遺伝子座の非翻訳領域の中から、種を超えて配列が保存されている部位を 16 箇所同定した。その転写活性を検討したところ、第一イントロンに極めて強いエンハンサーを発見した。この領域には筋特異的転写因子 MEF2 が結合することを EMSA、CHIP により証明した。MEF2 の優性抑制変異体はこのエンハンサー活性を抑制すると共に、培養胎仔心筋細胞において HCN4 の mRNA 発現量、蛋白質発現量および電流量を有意に減少させた。これらの結果から MEF2 は HCN4 の転写を直接制御する転写因子であると結論した。このエンハンサーを使って LacZ 遺伝子を発現するトランスジェニックマウスを作製した。しかし洞房結節特異的な発現パターンは再現できず、他の転写因子の関与が示唆された。そこで次にマイクロアレイを使って洞房結節で発現量が高い転写因子 (Shox2, Tbx3, Isl1 等 25 個) と低い転写因子 (NRSF, Nkx2.5, Irx5 等 16 個) を同定した。培養心筋において NRSF ノックダウンと Shox2 過剰発現をおこなった場合のみ、Hcn4 の発現が顕著に上昇した。このように、本研究では培養心筋細胞等からバイオ・ペースメーカー細胞を作成する上で欠かせない重要な知見を得ることができた。

研究成果の概要 (英文)：

We aimed to clarify the transcriptional mechanism of hyperpolarization activated, cyclic nucleotide sensitive channel Hcn4, which is specifically expressed in cardiac sinoatrial node (SAN). We identified 16 conserved non coding sequences (CNS1-16) in the genomic locus of Hcn4. CNS13 possessed enhancer activity on the minimal promoter of Hcn4. CNS13 possessed MEF2- and AP1 binding motif. The binding activity was confirmed using chromatin immunoprecipitation and electrophoresis mobility sift assay. Hcn4 expression was inhibited when dominant negative MEF2 was overexpressed in fetal cardiac myocyte. We therefore concluded that Hcn4 was a direct transcriptional target of MEF2. However, transgenic mouse carrying CNS13-lacZ failed to reproduce SAN specific expression pattern, suggested that multiple CNSs are required for SAN specific expression. We next identified 25 transcription factors highly expressed in SAN including Isl1, Shox2, and Tbx3 with microarray. Overexpression of Shox2 in cultured cardiomyocytes increased Hcn4 expression, only when NRSF expression was simultaneously knocked down, stimulating Hcn4 minimal promoter activity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
20 年度	2,900,000	870,000	3,770,000
21 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
22 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
総計	7,200,000	2,160,000	9,360,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経・筋肉生理学

キーワード：心臓、洞房結節、Hcn4、チャネル、発現制御

1. 研究開始当初の背景

心臓の細胞は自動能をもつ刺激伝導系と自動能を持たない固有心筋とに大別される。この細胞機能分化のメカニズム解明は、心臓生理学・分子生物学の中でも極めて重要な課題である。とりわけ洞房結節にのみ存在するペースメーカー細胞の分化メカニズムを解明することは、再生心筋などを使ったバイオペースメーカーを作成する上でも欠かせない。そのためには洞房結節領域に限局して発現する分子の転写制御機構を解明することが必須である。我々が最初にクローニングに成功した過分極誘発陽イオンチャネル Hcn4 は心臓洞房結節領域に限局して発現しており、心臓ペースメーカー細胞の最も良い分子マーカーとして注目を集めている。しかしながら、Hcn4 遺伝子の発現を制御する分子メカニズムは全く解明されていなかった。

2. 研究の目的

そこで本研究では、①洞房結節ペースメーカー細胞の特異的マーカー＝Hcn4 チャネル遺伝子の発現を制御する転写因子を同定すること、②Hcn4 チャネルの洞房結節特異的な発現パターンを決定するエンハンサー配列を同定すること、③これらの知見を応用し、培養心筋細胞や再生心筋細胞を対象として細胞機能をペースメーカー細胞型へと再プログラミングすること、を目的とした。

3. 研究の方法

バイオインフォマティクスを使った転写調節領域の絞り込み：一般に、遺伝子の部位特異的な発現は複数の転写調節領域に様々

な転写因子が結合することによって調節されている。Hcn4 遺伝子の場合、転写調節領域は百数十万塩基にも及ぶ膨大な非翻訳領域の中に散在している。近年、比較ゲノム学の進歩により、これら非翻訳領域の中にも数百塩基に渡って種を超えて配列が保存されている領域＝CNS (conserved non-coding sequence) が存在し、その中に転写調節領域が集中して存在している可能性が高いことが明らかになってきた。そこで Vista Genome Browser を用いて HCN4 遺伝子座を網羅的に解析し、CNS の同定を行った。

ルシフェラーゼリポーターアッセイ：Hcn4 遺伝子の転写開始点上流領域ならびに CNS のもつ転写活性を測定するために、これらの配列を PCR により増幅し、Promega 社の pGL4.10 vector にサブクローニングした。新生仔 Wister ラットの心筋細胞を培養し、lipofectamine LTX 試薬を用いて pGL4.10 vector を遺伝子導入した。転写活性の測定は、遺伝子導入の 3 日後に、同じく Promega 社のデュアル・ルシフェラーゼリポーターアッセイシステムを使用して実施した。

トランスジェニックマウスによる部位特異的な発現の検討：CNS-Hcn4 最小プロモーターによって-lacZ 遺伝子の転写を活性化するコンストラクトを作成した。これをマウス受精卵に注入し、トランスジェニックマウスを作成した。妊娠 18 日目に胎仔を摘出・固定し、X-gal 染色を行った。

Hcn4 最小プロモーター結合因子の検索：Hcn4 最小プロモーター内に存在する保存領域を bait としてクローンテック社製キットを用いて yeast-one hybrid 法を実施した。

マイクロアレイによる洞房結節特異的転写因子の同定と再プログラミング：50 匹の C57BL6 マウス右心房および洞房結節から total RNA を抽出した。これらを対象として、アジレント社マイクロアレイを用いて洞房結節と右心房とで遺伝子発現プロファイルを比較した。洞房結節で発現量の高い転写因子を RT-PCR によりクローニングし、CAG プロモーターによって発現させることができるプラスミドベクターならびにアデノウイルスベクターを作成した。これらを培養心筋細胞に感染させ、Hcn4 発現量の変化および Hcn4 遺伝子のプロモーター活性の変化を検討した。右心房よりも洞房結節において発現量が低い転写因子については、siRNA を使ってノックダウンして同様の実験を行った。また洞房結節において発現量が低い転写因子の優勢抑制性変異体を作成し、心臓特異的に過剰発現したトランスジェニックマウスを入手し、単離心筋細胞を使ってその機能解析を実施した。

4. 研究成果

Vista Genome Browser を使った解析の結果、Hcn4 遺伝子座全体の中から 16 ヶ所の CNS (CNS1~16) を同定した。Hcn4 遺伝子最小プロモーターにこれらの配列を連結して転写活性を測定したところ、CNS13 は非常に強いエンハンサー活性を有することを発見した。

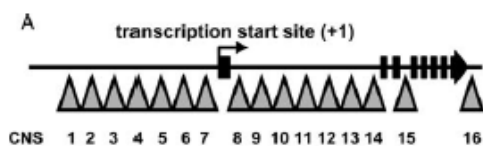


図1 Hcn4 遺伝子座における CNS1~16 の位置

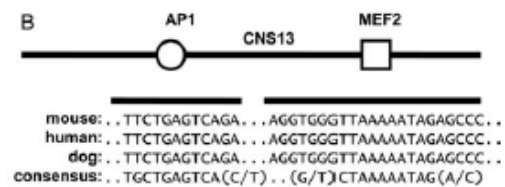


図2 CNS13 内の MEF2 結合モチーフ

この CNS13 領域には、筋特異的遺伝子を活性化する転写因子 MEF2 の結合配列が存在しており、エンハンサー活性はこの結合モチーフに依存していた。さらにゲルシフトアッセイ、クロマチン免疫沈降の結果から、MEF2 は実際に心筋細胞内でこの領域に結合していることを証明した。

次に MEF2C の優勢抑制性変異体 dnMEF2C をアデノ随伴ウイルスベクターによって培養心筋細胞に発現させた。total RNA を採取し、real time PCR により Hcn4 の発現量変化を測定したところ、dnMEF2C によって Hcn4 の発現量は約 1/8 に減少した。また、過分極誘発陽イオン電流 (I_h) が高密度に記録することができる胎児心筋細胞を使い、パッチクランプ法により I_h 電流の密度を測定したところ、dnMEF2C 過剰発現によって I_h 電流は約 1/16 に低下することを発見した。これらの結果から、筋特異的転写因子 MEF2 は、心筋細胞において Hcn4 遺伝子の発現を直接制御していると結論した (**Cardiovascular Research** 83,682-687. 2009)。

上記の結果に基づき、CNS13-Hcn4 minimal promoter-LacZ コンストラクトを発現するトランスジェニックマウスを作成した。下図は受精後 18 日目に摘出して固定した胎仔を X-gal 染色したものである。8 例の X-gal 陽性の胎仔において、その発現部位を検索したが、心臓内、とりわけ洞房結節に局限したシグナルを確認することはできなかった。おそらく複数の CNS を組み合わせることや、より長い

近位プロモーター配列を使って同様の実験をおこなうことが必要であると思われた。



図3 CNS13-Hcn4 最小プロモーター-LacZ を発現するトランスジェニックマウス胎仔

その予備実験として複数の CNS を組み合わせてエンハンサー活性を測定したところ、CNS2+CNS13 は、Hcn4 最小プロモーターの活性を 300 倍近く増強することが判明している。このコンストラクトを使って同様のトランスジェニックマウスの作成を再度試みる予定である。

次に Hcn4 最小プロモーター内に存在する保存領域をつかって yeast one hybrid 法による転写因子の検索をおこなった。

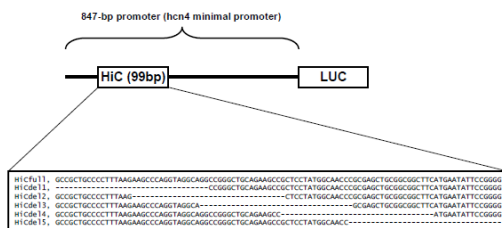


図4 Hcn4 最小プロモーター内の保存領域。

図4に示す99塩基からなる保存領域全体と、より転写活性の高い前半50塩基をタンデムに繋いだ配列を対象として、クロンテック社のキット (MatchMaker Gold) を使って一次スクリーニングを実施した。その結果、それぞれ200個以上の陽性クローンを得た。これ

らの陽性クローンの塩基配列を全て解読した。しかしながら現在までのところ、有意な結果は得られていない。この領域の転写活性は単独では必ずしも強くはないため、yeast one hybrid 法でのスクリーニングは困難である可能性が高い。今後、クロマチン免疫沈降等の方法を使って最小プロモーターへ結合する転写因子の同定を試みる予定である。

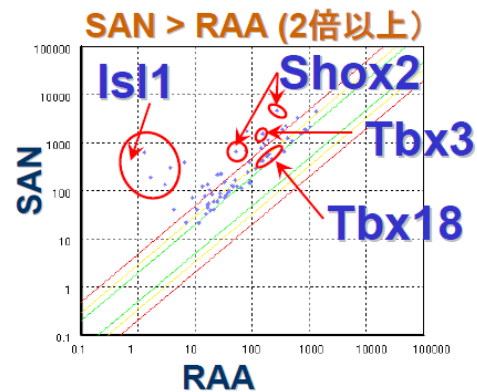


図5 マイクロアレイによる洞房結節特異的な転写因子のスクリーニング

続いてアジレント社のマイクロアレイを使用して、洞房結節で有意に発現量の高い転写因子を28種、洞房結節で有意に発現量が低い転写因子を16種同定した。このうち洞房結節で特に発現量が多い上位5種類の転写因子 X (未発表データ)、Is11、Tbx3、Tbx18、Shox2 の cDNA を RT-PCR によりクローニングした。これらの分子の C 端に蛍光蛋白質を融合したコンストラクトを作成した。これを Adenovirus vector によって培養ラット心筋細胞に遺伝子導入した。その後 mRNA を採取し、real time PCR によって Hcn4 遺伝子の発現量の変動を測定した。上記の転写因子を単独で培養心室筋細胞に発現させた場合、Hcn4 の発現量は増加しないか、逆に低下することが明らかになった。培養心筋細胞でも同様

の結果であった。これらの転写因子を全て、ないし複数を組み合わせて共発現させた場合も *Hcn4* の発現量に有意な変化はなかった。

次に洞房結節での発現量が低い転写因子 *Nkx2.5* と *NRSF* について遺伝子ノックダウンを実施した。その結果、*Nkx2.5* のノックダウンでは、*Hcn4* の発現量に有意な変化は *NRSF* ノックダウンにおいてのみ、*Hcn4* の発現量は 2 倍程度上昇した。この状態で *Shox2* ならびに転写因子 *X* を過剰発現させると、*Hcn4* の発現量はそれぞれ 6 倍、8 倍、上昇することを発見した。現在は *NRSF* コンディショナルノックアウトマウスを使って、RNA ノックダウンの off target effect のない状態で、この実験結果を再確認中である。また *Hcn4* 近位プロモーター活性に対するこれらの転写因子の影響をデュアルルシフェラーゼレポーターアッセイにより検討した結果、*Shox2* はプロモーター活性を数倍程度、上昇させることが明らかになった（投稿準備中）。

また *Hcn4* の転写を抑制することが知られている抑制性転写因子 *NRSF* の優性抑制変異体を心臓特異的に発現するトランスジェニックマウス (*dnNRSF*) を作成し、その心臓の生理学的機能および分子生物学的変化を解析した。*dnNRSF* は不整脈により突然死する。その原因を解明するため、*NRSF* の結合配列をその遺伝子座にもつイオンチャネルの発現量をマイクロアレイにより網羅的に解析した。その結果、胎児心臓で発現が高いことが知られている *Hcn1, 2, 4* の発現が、成獣の心室においても上昇していることが明らかになった。さらに同じく胎児型心臓イオンチャネルである *caena1h*、*caena1d* の発現も上昇していた。

生理学的機能の解析をおこなったところ、*dnNRSF* では静止膜電位の軽度の脱分極側へ

のシフトの外、活動電位持続時間の延長、早期後脱分極の発生、細胞内 *Ca* 濃度の異常な振動が観察された。

さらに *dnNRSF* に T 型カルシウムの阻害剤であるエフォニジピンの投与を行ったところ、生存率が有意に上昇した。単離心筋細胞レベルでも、エフォニジピン投与群では静止膜電位の減少という生理学的リモデリングが改善していることが判明した。

dnNRSF から単離した心室筋では、 -90mV から -60mV 付近へ脱分極した際に持続性の内向き *Na* 電流が活性化されることが明らかになった。エフォニジピンはこの持続性 *Na* 電流を抑制した。これらの薬理的機構により、エフォニジピンは *dnNRSF* の生存率を改善していることが示唆された (**Circulation** 120, 743-752. 2009 ; **Circulation Journal** 74, 2712-2719, 2010)。

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 6 件)

Kuratomi, K., Ohmori, Y., Shimazaki, K., Muramatsu, S., Mizukami, H., Uosaki, H., Yamashita, JK., Arai, Y., Kuwahara, K., and Takano, M.: The cardiac pacemaker specific channel *Hcn4* is a direct transcriptional target of MEF2. **Cardiovascular Research** 83,682-687. 2009

Okuno, T., Nakayama, T., Michibata, H., Wakimoto, K., Suzuki, Y., Nito S., Inaba T., Nakano I., Muramatsu, S., Takano, M., Kondo Y., Inoue N. Self-contained induction of neurons from human embryonic stem cells. **Plos-One** 4, e6318. 2009

Kinoshita, H., Kuwahara, K., Takano, M., Ara,

Y., Kuwabara, Y., Yasuno, S., Nakagawa, Y., Nakanishi, M., Harada, M., Fujiwara, M., Murakami, M., Ueshima, K., Nakao, K. T-type Ca^{2+} channel blockade prevents sudden death with heart failure. **Circulation** 120, 743-752. 2009

Nakagawa, Y., Kuwahara, K., Takemura, G., Akao, M., Kato, M., Arai, Y., Takano, M., Harada, M., Murakami, M., Nakanishi, M., Usami, S., Yasuno, S., Kinoshita, H., Fujiwara, M., Ueshima, K., Nakao, K. : p300 plays a critical role in maintaining cardiac mitochondrial function and cell survival in postnatal hearts. **Circulation Research** 105, 746-754. 2009

Kimura, M., Murakami, T., Kondoh, SK., Itoh, M., Yamamoto, K., Hojo, Y., Takano, M., Kario, K., Shimada, K., Kobayashi, E. : Functional molecular imaging of ILK-mediated Akt/PKB signaling cascades and the associated role of beta parvin. **Journal of Cell Science** 123, 747-755. 2010

Takano, M., Kinoshita, H., Shioya, T., Ito, M., Nakao, K., Kuwahara, K. Pathophysiological remodeling of mouse cardiac myocytes expressing dominant negative REST/NRSF. **Circulation Journal** 74, 2712-2719, 2010

[学会発表] (計 2 件)

鷹野 誠 心臓ペースメーカー特異的チャネル HCN4 の転写制御機構 第 13 回 Molecular Cardiovascular Conference キーノートレクチャー (北海道, 2009)

Takano, M. Transcriptional regulation of pacemaker specific channel HCN4. The 87th Annual meeting of Physiological Society of Japan, Symposia, S-48, Ion channels and gene

expression in the SA node: toward regeneration of pacemaker cells. (Morioka, 2010).

[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◇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
なし

6. 研究組織
(1) 研究代表者
鷹野 誠 (Makoto Takano)
自治医科大学・医学部・教授
研究者番号：30236252

(2) 研究分担者
伊東政之 (Masayuki Ito)
自治医科大学・医学部・ポストドクター
研究者番号：20442535