

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 14 日現在

機関番号： 84404  
研究種目： 基盤研究(C)  
研究期間： 2009～2011  
課題番号： 21591405  
研究課題名（和文） 新規ポリコーム遺伝子 *Pcgf5* の心臓形態形成に対する機能解析  
研究課題名（英文） Functional analysis of Polycomb-group gene, *Pcgf5* in cardiac morphogenesis.  
研究代表者  
白井 学 (SHIRAI MANABU)  
独立行政法人 国立循環器病研究センター・分子生物学部・室長  
研究者番号： 70294121

## 研究成果の概要（和文）：

新規ポリコーム遺伝子 *Pcgf5* の心臓形態形成に対する機能を明らかにし、先天性心疾患の原因遺伝子としてのポリコーム遺伝子群の可能性を探索する為に、発生初期のマウス胎仔における *Pcgf5* 遺伝子の詳細な発現パターン解析を行い、更に Cre-loxP システムを利用した、*Pcgf5* 遺伝子欠損マウスを作製した。その結果、*Pcgf5* 遺伝子の特に強い発現が、形態形成中の胎仔心臓で確認され、*Pcgf5* 遺伝子の心臓発生における重要性が示唆された。また、幾つかの既知のポリコーム遺伝子タンパク質 (*Bmi1*、*Ring1b*、*Rae28/Phc1*) との相関関係を知るために、*Pcgf5* タンパク質に対する抗体を作製し、Western blotting 法、免疫組織学法を用いて、発生中の心臓における各タンパク質の発現分布を詳細に解析した上で、抗 *Ring1b* 抗体、抗 *Pcgf5* 抗体を用いて共免疫沈降法、*in situ* PLA (proximal ligation assay) 法を行った。その結果、*Bmi1*、*Ring1b*、*Rae28* タンパク質は共に心筋細胞、心内膜細胞両方の核に分布し、発生初期の心臓で発現量が高く、周産期に減少することが確認された。抗 *Ring1b* 抗体を用いて共免疫沈降法を行った結果、これまで知られてきた幾つかの細胞同様、胎仔心臓においても *Rae28*、*Bmi1* 各タンパク質が *Ring1b* タンパク質と結合していることが確認された。それに対し *Pcgf5* タンパク質は *Ring1b* とは結合するものの、*Rae28* とは結合せず、別の複合体を形成している可能性が示唆された。

## 研究成果の概要（英文）：

To define the functions of one of the *Polycomb* group (*PcG*) protein, *Pcgf5* for cardiac morphogenesis and know whether mutations of *PcG* genes are associated with human congenital heart disease, detail analysis of *Pcgf5* expression in mouse embryos was performed, and conditional *Pcgf5* knockout mice were generated using Cre-loxP system. In the whole-mount *in situ* hybridization analysis, strong *Pcgf5* expression was observed in the developing heart at early stages, meaning *Pcgf5* could be involved in cardiac development. The results of western blotting analysis and immunohistochemical analysis showed that some *PcG* protein, *Bmi1*, *Ring1b* and *Rae28/Phc1* distributed in the nuclei of embryonic cardiomyocytes and endocardial cells. Expression levels of these proteins were higher at early stages and decreased at the perinatal period. Physical interaction between *Ring1b* and *Bmi1*, *Ring1b* and *Rae28/Phc1* in the developing hearts was confirmed with co-immunoprecipitation analysis (Co-IP) and *in situ* proximal ligation assay (PLA), indicating that *Bmi1*, *Ring1b* and *Rae28/Phc1* make a *Polycomb* complex in the embryonic hearts as shown in other tissues. On the other hand, *Pcgf5* interacted with *Ring1b* but not with *Rae28/Phc1*. These findings suggest that some kinds of *Polycomb* complex work in the developing hearts.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学・

キーワード：ポリコム遺伝子・形態形成・発生医学

1. 研究開始当初の背景

ポリコム遺伝子群は、ショウジョウバエや脊椎動物においてホメオボックス遺伝子の発現を制御し、体の前後軸の形成（前後軸に沿った領域の決定）に重要な働きを示す事がすることは良く知られ、心臓も体軸同様、前後軸を形成し、領域決定がなされると考えられている。実際、ポリコム遺伝子の一つ *Rae28/Phc1* 遺伝子 KO マウスは、心臓及びその周辺組織に、ヒト先天性心疾患の一つである、CATCH22 (DiGeorge) 様の形態形成異常を生じ、ポリコム遺伝子群が心臓形態形成に関与する事が示唆されているが、詳しい解析はまだほとんどなされていない。

2. 研究の目的

新規ポリコム遺伝子 *Pcgf5* の心臓形態形成に対する機能を明らかにし、先天性心疾患の原因遺伝子としてのポリコム遺伝子群の可能性を探索する研究基盤を確立するために、基礎的研究として、(1) 遺伝子発現パターンの詳細な解析、(2) *Pcgf5* ノックアウト (KO) マウスの作製及び表現型の解析、(3) 他のポリコム遺伝子タンパク質との相関関係解析、臨床研究への展開として、(4) *Pcgf5* 遺伝子の変異解析、以上の研究項目を計画し、遂行する。

3. 研究の方法

(1) Whole-mount *in situ* hybridization

(WISH) 法を用いた、マウス胎仔における *Pcgf5* 遺伝子の発現パターン解析

胎令 7.0 日～9.5 日のマウス胎仔を実体顕微鏡下において取り出し、4% PFA を用いて 4°C、一晩固定後、メタノール系列で脱水した。WISH は常法に則って行い、染色後のサンプルを観察、撮影後、凍結切片を作製した。

(2) *Pcgf5* KO マウスの作製

個体レベルで *Pcgf5* の機能解析を行うために、常法に則って *Pcgf5* 遺伝子欠損マウスを作製した。この際の工夫として、組織特異的に遺伝子を欠損できるように、Cre-lox システムを用いた (図 2)。

(3) 既知のポリコム遺伝子タンパク質との相関関係解析

① 抗 *Pcgf5* 抗体の作製

マウス *Pcgf5* タンパク質の 98-131 アミノ酸に相当するペプチドを合成し、ウサギポリクローナル抗体を作製した。

② Western blotting 法による、発生中の心臓におけるポリコム遺伝子タンパク質の発現解析。

胎令 8.5～12.5 日、14.5 日、18.5 日のマウス心臓及びその周辺組織を摘出し、組織抽出液を作成後、既知のポリコム遺伝子 (*Bmi1*, *Rae28/Phc1*, *Ring1b*) 及び作製した *Pcgf5* に対する抗体を用いて Western blotting を行った。

③ 共免疫沈降法 (Co-IP) を用いた相関関係解析

各発生段階のマウス胎仔心臓を摘出、組織抽出液を作成後、抗 *Ring1b* 抗体を用いて、*Ring1b* タンパク質と複合体を形成するタンパク質を免疫沈降した。その後、Western blotting 法を用いて、免疫沈降したタンパク質中に *Bmi1*、*Rae28/Phc1*、*Pcgf5* タンパク質が存在するかどうかを解析した。

④ *in situ* PLA (proximal ligation assay) 法による、組織切片中におけるタンパク質相関関係の解析

各発生段階のマウス胎仔凍結切片を作製し、*in situ* PLA 法により、発生中の心臓におけるポリコム遺伝子タンパ

ク質間の相互関係をより詳細に解析した。

#### 4. 研究成果

##### (1) *Pcgf5* 遺伝子の詳細な発現パターン

*Pcgf5* 遺伝子の発現は、体節形成が始まったマウス胎仔の cardiac crescent で最初に確認された (図 1A)。発生の進行とともに *Pcgf5* 遺伝子の発現量は増加し、胎令 8.5 付近の胎仔 (6-9 体節時) では、ルーピングを開始した心臓、及び二次心臓領域で特に強い発現が確認された。胎令 9.5 日のマウス胎仔では、心臓以外の組織における発現量も増加した。

胎仔心臓では、発生中の心筋、心内膜細胞両方で *Pcgf5* 遺伝子の発現が確認された (図 1B)。

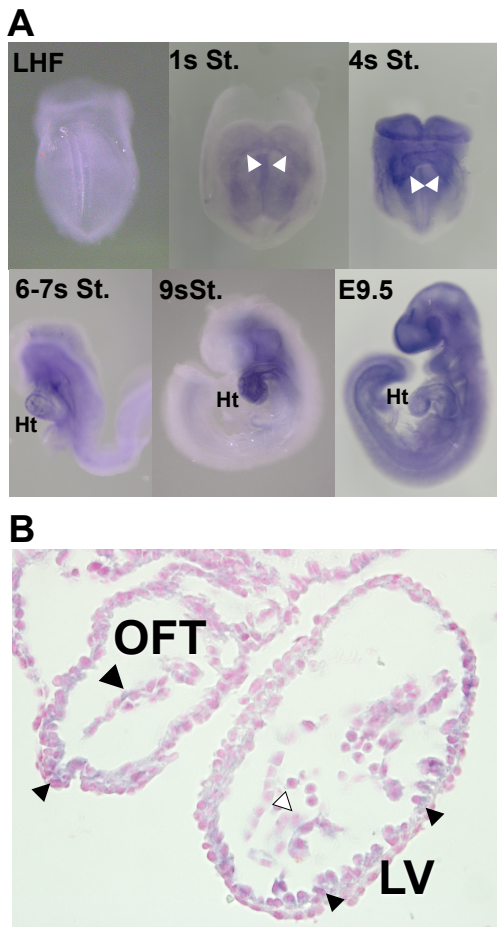


図 1 マウス胎仔における、*Pcgf5* 遺伝子の発現パターン。

- A. LHF (Late head fold)、体節形成初期 (1-4s St.)、胎令 8.5 日 (6-7s、9s)、胎令 9.5 日における *Pcgf5* 遺伝子の発現パターン。
- B. 9 体節時のマウス胎仔心臓における、*Pcgf5* 遺伝子の発現パターン。*Pcgf5* 遺伝子の発現は、心筋細胞、心内膜細胞両方で確認された (黒矢頭)。  
Ht, 心臓、LV, 左心室、OFT, 心臓流出路

##### (2) *Pcgf5* KO マウスの作製

組織特異的に *Pcgf5* 遺伝子を欠損できるように、*Pcgf5* exon1 を loxP 配列で挟んだ (図 2A)。相同組換えが起きた ES 細胞及び、マウス個体は、Southern blotting 法、PCR 法により確認した (図 2B、C)。

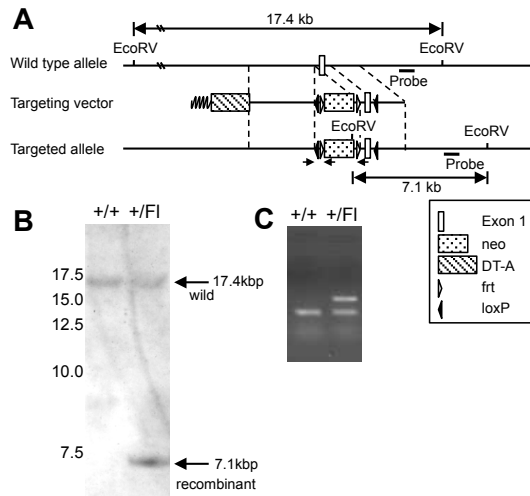


図 2 *Pcgf5* 遺伝子ノックアウトマウスの作製。

- A. *Pcgf5* 遺伝子ノックアウトマウス作製法。
- B. Southern blotting 法による、相同組換えの確認。
- C. PCR 法による確認。

##### (3) 抗 *Pcgf5* 抗体の作製

マウス *Pcgf5* タンパク質の 98-131 アミノ酸に相当するペプチドを合成し、ウサギポリクローナル抗体を作製した。

作製した抗体が *Pcgf5* タンパク質を認識するかどうか確かめるために、*Pcgf5* 遺伝子発現 vector を CV-1 細胞に導入し、細胞抽出液を作製した後、Western blotting を行った (図 3)。

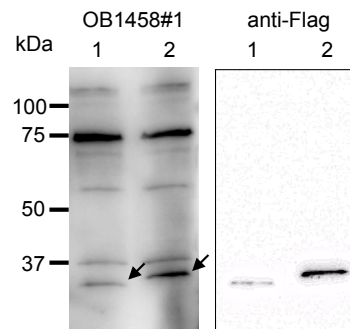


図 3 Western blotting 法による、抗 *Pcgf5* 抗体の確認。

CV-1 細胞中に Flag 標識した *Pcgf5* タンパク質を発現させ、抗 *Pcgf5* 抗体及び、抗 Flag 抗体を用いて Western blotting を行った。抗 Flag 抗体と同じ位置にバンドが確認された (矢印)。

(4) 発生中の心臓における、既知のポリコム遺伝子タンパク質の発現分布及び、相互関係。

既知のポリコム遺伝子の内、Ring1b、Bmi1、Rae28 タンパク質に対する抗体を用いて、発生中の心臓における発現分布を解析した。Western blotting 法を行った結果 (図 4A)、Ring1b は胎令 8.5 日から 14.5 日の胎仔心臓で強く発現し、周産期に減少することが確認された。Rae28 の心臓における発現は胎令 8.5 日に最も高く、Ring1b 同様、周産期に減少することが確認された。一方、Bmi1 は全体的に発現量が低かった。これらのポリコム遺伝子タンパク質は、胎令 8.5、9.5 日の二次心臓領域でより強い発現が確認された。

それぞれの発生時期の心臓におけるポリコム遺伝子タンパク質の分布を免疫組織学法により確認した結果 (図 4B)、心筋細胞、心内膜細胞両方の核に分布していることが確認された。

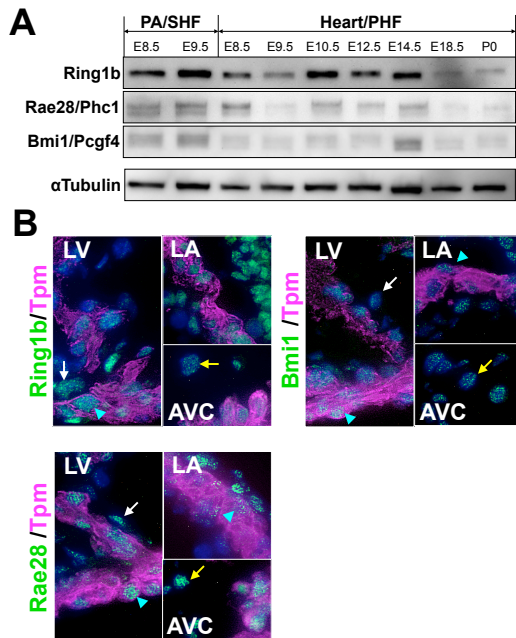


図 4 マウス胎仔心臓におけるポリコム遺伝子タンパク質 (Ring1b, Rae28/Phc1, Bmi1) の発現分布。  
A. Western blotting 法による、ポリコム遺伝子タンパク質の発現量解析。  
B. 免疫組織学法による、ポリコム遺伝子タンパク質の発現分布解析。胎仔心筋細胞 (青矢頭)、心内膜細胞 (白矢印)、房室管間充織細胞 (黄矢印) において、発現を確認。  
AVC, 房室管、LA, 左心房、LV, 左心室、PA, 咽頭弓

Ring1b、Rae28、Bmi1 は血球細胞をはじめとする幾つかの細胞で PRC1 複合体を形成する事が知られている。同様に発生中の心臓において複合体を形成するかどうかを確認するために、各発生時期の心臓からの組織抽出液を抗 Ring1b 抗体により共免疫沈降した。Western blotting 法を行った結果、発生中の心臓においても Rae28、Bmi1 各タンパク質が Ring1b タンパク質と結合していることが確認された。(図 5A)。更に、心筋細胞、心内膜細胞両方の核内で Rae28-Ring1b、Bmi1-Ring1b、Rae28-Bmi1 タンパク質間の相互作用が *in situ* PLA 法を用いて確認する事ができた (図 5B)。

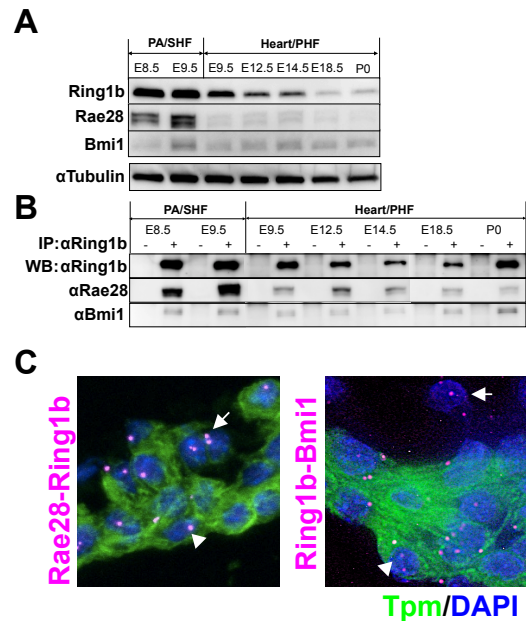


図 5 マウス胎仔心臓におけるポリコム遺伝子タンパク質 (Ring1b, Rae28/Phc1, Bmi1) の複合体形成。  
A-B. Co-IP 法による、Ring1b-Rae28、Ring1b-Bmi1 相互関係解析。  
A. 3% input  
B. Co-IP 後の Western blotting 解析。  
C. In situ PLA 法を用いた、胎令 9.5 日、胎仔左心室におけるポリコム複合体の確認。心筋細胞 (矢頭)、心内膜細胞 (矢印)。

Pcgf5 タンパク質が PRC1 複合体に含まれるかどうかを確認するために、抗 Ring1b 抗体及び、抗 Pcgf5 抗体を用いて共免疫沈降した結果、Pcgf5 は Ring1b とは結合するが、Rae28 とは結合せず、PRC1 複合体とは別の複合体を形成している可能性が示唆された (図 6)。

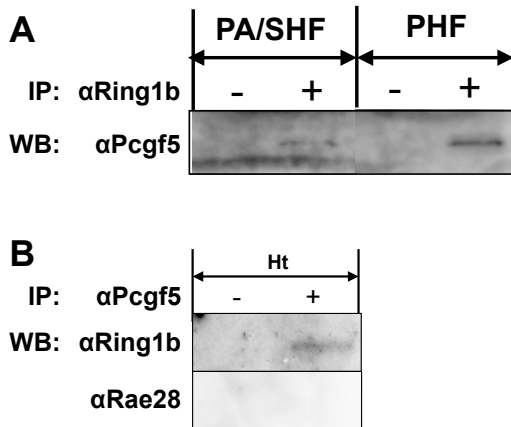


図 6 マウス胎仔心臓における Pcgf5 とたのポリcomb 遺伝子タンパク質との相互関係。

- A. 抗 Ring1b 抗体を用いた共免疫沈降。  
B. 抗 Pcgf5 抗体を用いた共免疫沈降。

### 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 0 件)

〔学会発表〕 (計 2 件)

- (1) Manabu Shirai, Yoshihiro Takihara, Takayuki Morisaki, 「Distribution of Polycomb-group proteins in the developing heart」、第 34 回 日本分子生物学会、2012 年 12 月 13 日、横浜
- (2) 白井 学、瀧原義宏、森崎隆幸、「ポリcomb 遺伝子群の心臓形態形成に対する発現・機能解析」、第 10 回 心臓血管発生研究会、2012 年 10 月 7 日、福島

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

なし

### 6. 研究組織

#### (1) 研究代表者

白井 学 (SHIRAI MANABU)

独立行政法人 国立循環器病研究センター・分子生物学部・室長

研究者番号：70294121

#### (2) 研究分担者

なし

#### (3) 連携研究者

森崎 隆幸 (MORISAKI TAKAYUKI)

独立行政法人 国立循環器病研究センター・分子生物学部・部長

研究者番号：30174410

森崎 裕子 (MORISAKI HIROKO)

独立行政法人 国立循環器病研究センター・分子生物学部・室長

研究者番号：40311451

本多 賢彦 (HONDA MASAHIKO)

独立行政法人 国立循環器病研究センター・分子生物学部・室員

研究者番号：10455545