

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25年5月20日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590803

研究課題名（和文）心筋転写因子の翻訳後修飾と心臓発生におけるその役割

研究課題名（英文） Posttranscriptional modification of cardiac transcriptional factors and its role in cardiac development

研究代表者

廣井 透雄（HIROI YUKIO）

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：30311624

研究成果の概要（和文）：心筋転写因子 Tbx5 は DNA 障害時に活性化されるリン酸化酵素 DNA-PK の蛋白複合体 (Ku 70, Ku80, DNA-PKcs) と会合し、Ser289, Ser301 のリン酸化を受けた。培養細胞において、DNA-PK の阻害薬 (NU7026) により Tbx5 の ANP プロモーター活性化が低下し、Ku70, Ku80, DNA-PKcs の過剰発現により上昇した。S289A、S301A ならびに二重変異体は ANP の活性化能、Nkx2-5 との協調能が低下していた。

研究成果の概要（英文）： Tbx5 associates with DNA-PK complex (Ku70, KU80, and DNA-PKcs) and it is phosphorylated at Ser289 and Ser301. A DNA-PK inhibitor suppresses the activation of ANP promoter-luciferase and overexpression of either Ku70, Ku80, or DNA-PKcs increases. The mutation of S289A, S301A, and S289A/S301A decreases its ability to activate ANP promoter and synergistic effect with Nkx2-5.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：分子心臓病学

1. 研究開始当初の背景

心臓の発生過程において、様々な転写因子が段階的に発現し心臓特異的な遺伝子等の発現を調節している。Tbx5, Nkx2.5, GATA4, Mef2c などは比較的心臓に限局して発現する転写因子であり、それらの遺伝子異常は先天性心疾患の原因として同定されてきている。が協調して働く事が重要である。その中でも Tbx5 は Nkx2.5, GATA4 と会合することにより、協調的に心臓特異的遺伝子である心房性利

尿ペプチド (ANP) やコネキシン (Cx40) を活性化し、心臓と上肢に奇形を生じる常染色体優性遺伝の Holt-Oram 症候群の原因遺伝子であり、Haploinsufficiency が疾患の原因と考えられている。このように重要な Tbx5 であるが、研究開始当初は、Tbx5 蛋白の翻訳後の修飾についてはあまり検討されていなかった。

2. 研究の目的

Tbx5 蛋白を翻訳後に修飾する酵素を同定し、その修飾部位を明らかにするとともに、修飾酵素の過剰発現、酵素阻害薬、または修飾を受けない変異体の Tbx5 による、心筋特異的遺伝子の活性化能、他の転写因子との協調能を明らかにし、さらに心臓発生における役割をアフリカツメガエル卵を用いて、検討し、Tbx5 の翻訳後修飾と心臓疾患との関連を探索する。

3. 研究の方法

Tbx5 を発現していないヒト細胞株 (HEK293) に FLAG のタグをつけた野生型ヒト Tbx5 (WT-Tbx5) と、Holt-Oram 症候群の中で上肢にはあまり異常を起さず、心臓特異的に形態異常を引き起こす点変異 Tbx5 (G80R) を別々に過剰発現する。細胞を弱い条件の界面活性剤 (Cell lysis buffer, Cell Signaling) で溶解し、ビーズに結合した FLAG に対する抗体にて FLAG のタグ付き蛋白とそれに会合する蛋白を免疫沈降する。得られた蛋白を洗浄し、非特異的会合を出来る限り除去した後に、SDS-PAGE により電気泳動し、ゲルの染色を行い、比較する。WT-Tbx5 と G80R の各々に結合する蛋白を比較し、WT-Tbx5 のみ結合する蛋白を切り出す。質量分析法によりアミノ酸配列を決定し、遺伝子データベースから蛋白を同定する。得られた蛋白の cDNA を合成し、GST 蛋白との融合蛋白を作るベクターにサブクローニングして GST 融合蛋白を合成し、in vitro translation kit により [³⁵S] でラベルした Tbx5 を合成したものと、GST-プルダウンアッセイを行い、会合を検討する。さらに、得られた蛋白の cDNA と FLAG-Tbx5 を Tbx5 を発現しない COS7 細胞に過剰発現して、免疫沈降法を行い、会合を確認する。

得られた蛋白の機能を遺伝子データベースより Tbx5 の修飾能を推測し、in vitro の系において、合成した Tbx5 を基質とする修飾反応の系を立ち上げる。さらに Tbx5 のドメインごとの欠失変異体を作成し、修飾部位をしばらくこみ、修飾アミノ酸を同定する。同定が出来ない時は、修飾のコンセンサス配列から、変異候補のアミノ酸を推定し、1 カ所ずつに変異をいれることにより、Tbx5 の心筋特異的遺伝子活性化機能や他の転写因子との協調作用に障害がでるかを検討する。

心筋に分化する培養細胞系であるマウス奇形腫由来の P19CL6 細胞株に、Tbx5、変異 Tbx5 を過剰発現することにより、それらの変異による蛋白修飾が起らないことにより、P19CL6 細胞の分化が起こりにくくなるか否かを検討する。

また、アフリカツメガエルの発生期の卵を用いて、内因性の Tbx5 をアンチセンスでノックアウトして、心臓の発生を抑制する系を立

ち上げる。アフリカツメガエルの Tbx5 の cDNA (xTbx5) を RT-PCR によりクローニングし、アンチセンスではブロックされないように点変異を導入し、これで心臓の発生がレスキューできるかどうかを検討する。さらに、これらに修飾できないような点変異を導入し、心臓の発生のレスキュー能を検討し、発生における Tbx5 修飾の役割を明らかにする。

4. 研究成果

心臓の転写因子である Tbx5 の翻訳後修飾を明らかにするため、Tbx5 を発現していないヒト細胞株 HEK293 に FLAG のタグをつけたヒト野生型 Tbx5 (WT-Tbx5) と変異体 G80R を過剰発現し、それぞれ FLAG 抗体による免疫沈降を行い、得られた蛋白質を SDS-PAGE により分離し、染色を行い比較したところ、WT-Tbx5 に会合するが、G80R に会合しない蛋白が約 80kDa と 300kDa 以上の 2 本のバンドが検出できた。2 つのバンドを切り出して、質量分析法により複数のアミノ酸配列をえることができた。これらをもとにヒト遺伝子データベースを検索すると、大きいサイズのバンドが 4129 アミノ酸残基からなる 470kDa の、放射線障害などによる DNA 二重螺旋の切断における nonhomologous end-joining (NHEJ) の修復やリンパ球における V(D)J recombination に関与するリン酸化酵素の一つである DNA-dependent protein kinase (DNA-PK) の catalytic subunit (DNA-PKcs) であり、小さいバンドが 732 アミノ酸残基からなる、DNA-PK の制御蛋白 (X-ray repair cross-complementing protein 5, XRCC5, Ku80) であった。DNA-PK は上記の DNA の修復機能だけではなく、DNA-PKcs 自身や、FOXO2, Hoxc4, Pou2f1, p53, SRF, IRF3, I β , I β 、エストロゲン受容体、グルココルチコイド受容体などをリン酸化することにより、機能を調節する他の機能も報告されていたため、さらに解析を行うこととした。Ku80 (XRCC5) はもう一つの制御蛋白である X-ray repair cross-complementing protein 6 (XRCC6, Ku70) とともに DNA-PKcs を制御し、DNA-PK のリン酸化を調整することが知られている。DNA-PKcs はあまりに巨大であるため、in vitro translation による合成は無理であり、GST との融合蛋白を作成しても、完全な形で精製することは困難であると考えられ、さらに酵素活性を持つ部分が直接 Tbx5 と会合する可能性は低いと考えられた。そこで、GST-WT-Tbx5 と GST-G80R の発現ベクターを作成し、精製することとした。そして、609 アミノ酸残基からなる Ku70 と Ku80 を [³⁵S]-メチオ

ニンでラベルして、GST-プルダウンアッセイを行った。Ku70とKu80はG80Rとの会合は認められず、Tbx5と会合していた。

さらにTbx5を発現しない細胞内に別々に過剰発現したFLAG-WT-Tbx5とFLAG-G80Rを抗FLAG抗体で免疫沈降し、得られた蛋白をSDS-PAGEで電気泳動し、Ku70、Ku80、DNA-PKcsとWestern blotすることにより、WT-Tbx5が内在性のKu70、Ku80、DNA-PKcsとTbx5の会合するのに対し、G80Rとはほとんど会合しないことを確認することができた。Tbx5に会合する蛋白を同定するための最初の免疫沈降からSDS-PAGEの実験でKu70に相当するバンドを同定できなかったのは、Ku70が609アミノ酸残基で実験に用いたFLAG-WT-Tbx5が15+513アミノ酸残基と近いこと、FLAG-WT-Tbx5の過剰発現によりKu70が隠れてしまったものと考えられた。

Ku80の心筋での発現をマウスのin situ hybridizationで確認してみたが、普遍的発現を示すという既知の報告とおり、すべての組織で発現がみられた。

DNA-PKcsをその制御蛋白(Ku70とKu80)の機能はリン酸化であると推定されたため、Tbx5のリン酸化反応の有無をみることにした。最初から細胞内において、リン酸化反応を見ることは困難が伴うと考えられたため、市販されている合成された組換えDNA-PKcs蛋白と精製したGST-Tbx5、 $[^{32}\text{P}]\text{-}\gamma\text{ATP}$ を用いて、in vitroでDNA断片により反応を活性化させた。反応生成物をSDS-PAGEにより、蛋白を泳動し、シグナルを増強して、オートグラフィーを撮影したところ、Tbx5は速やかにリン酸化反応を受けていた。次に、Tbx5をいくつかのドメインに分割した部分欠損とGSTの融合蛋白を用いてリン酸化反応を行ったが、非特異的と思われるリン酸化のため、DNA-PKによるリン酸化候補部位を絞り込むことができなかった。そこで文献をあたり、DNA-PKのリン酸化コンセンサスシーケンスと報告されている配列(S/TQ)をTbx5で検索したところ、リン酸化候補部位が5つのアミノ酸残基(T47, T223, S289, S301, S318)と考えられた。それぞれのスレオニン残基とセリン残基をアラニンに置換した変異体を作成したところ、S289AとS301Aはリン酸化が半分程度になり、S289A/S301Aの二重変異体はほとんどリン酸化されなかった。

COS細胞にて、DNA-PK阻害薬(NU7026)を用いると、 $1\times 10^{-6}\text{M}$ 、 $3\times 10^{-6}\text{M}$ と用量依存的に、Tbx5による心筋特異的遺伝子である心房性利尿ペプチド、ANP(600)-luciferaseの活性化が抑制された。逆に、Ku70、Ku80、DNA-PKcsをそれぞ

れのcDNAにより過剰発現すると、Tbx5によるANP-luciferaseの活性化がさらに上昇した。S289A、S301A変異体は野生型Tbx5と比較し、ANPの活性化能、Nkx2-5との協調能が低下していた。

P19CL6細胞に野生型、変異型Tbx5を過剰発現する系の作成は、大元のP19CL6細胞株のDMSO刺激による心筋細胞への分化の効率効率が低く、マイコプラズマ等の感染も疑われたため、Tbx5変異体の機能解析には不適切と考え、細胞株の作成は中断した。

一方、アフリカツメガエルのTbx5のcDNAのクローニングには成功し、遺伝子配列もシーケンスにより確認することができた。受精卵を用いたTbx5のノックダウンによる心臓発生の抑制とTbx5ならびにその変異体によるレスキューの機能解析実験の準備を進めていたが、途中で分担実験者が熊本大学薬理学教室に異動したために実験の継続が困難となり、中断している。

やむを得ず、慶応大学循環器内科の池田から発現ベクターを入手して、マウス線維芽細胞にTbx5、GATA4、Mef2cを発現して、心筋細胞に形質転換を行う系を検討しているが、変異体の機能を見るまでにはいたっていないこと、他の因子を加えた方が心筋細胞への形質転換の効率がよいことが報告されたため、今後の検討が必要である。

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0件)

[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0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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

廣井 透雄 (HIROI YUKIO)
東京大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：30311624

(2) 研究分担者

鯉渕 信孝 (KOIBUCHI NOBUTAKA)
熊本大学・医学系大学院・助教

研究者番号：30456131

(3) 連携研究者

()

研究者番号：