

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670096

研究課題名(和文) Gemininによる心筋細胞を維持する分子機構の解析

研究課題名(英文) Molecular role for Geminin in maintaining cardiac muscles

研究代表者

灌原 義宏 (Takahara, Yoshihiro)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・教授

研究者番号：60226967

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：ポリコム遺伝子群はNkx2.5の発現維持機能を介して心臓の発生を制御するだけでなく、細胞の増殖と分化を同時に制御するGemininに対するE3ユビキチンリガーゼとして機能することを見つけた。一方で、ポリコム遺伝子群であるRae28の心筋特異的高発現またはPcgf5の欠損によっては拡張型心筋症を発症する。従って、心臓発生だけでなく、心筋維持にもポリコム遺伝子群が重要な役割を果たしている。Geminin-EYFPノックインマウスを作製して、心筋の中にGemininの高い発現を示す細胞を見つけた。これはS/G2/M期にある心筋、あるいは心臓幹細胞の可能性が考えられ興味深い。

研究成果の概要(英文)：Polycomb-group of (PcG) genes maintain expression of Nkx2.5 gene, a developmental regulator for cardiac development and further act as an E3 ubiquitin ligase for Geminin. On the other hand, overexpression of Rae28 and Pcgf5 deficiency gave rise to dilated cardiomyopathy. Thus, PcG genes are not only involved in cardiac development but also in maintenance of cardiac muscle. We visualized a Geminin molecule by generating Geminin-EYFP knock-in mice. Curiously, we identified cardiac muscles with high Geminin expression in the adult, indicating that these are corresponding with cycling cardiac muscles or cardiac stem cells.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：ポリコム遺伝子群 Geminin 心筋

1. 研究開始当初の背景

研究申請者は哺乳動物の発生を制御する分子基盤の解明を目指して、ポリコーム複合体 1 の欠損マウス (Rae28/Phc1 欠損マウス) を作製し、研究分担者である白井とともに Rae28 の心臓発生における役割について解析を進めてきた。ポリコーム複合体 1 はヒストン H2A に対する E3 ユビキチンリガーゼとして機能し、モノユビキチン化を介したエピジェネティックな転写制御を担う。しかし、一方で、ポリコーム複合体 1 は Geminin に対する E3 ユビキチンリガーゼとしても機能し、ユビキチン-プロテアソーム系を介して Geminin タンパク質の安定性を制御していることを独自に明らかにしている。そこで、Rae28 の心筋に対する影響を調べるため ミオシン重鎖のプロモーターを用いて心筋特異的に Rae28 を高発現するトランスジェニックマウス (MHC-Rae28 tg) を作製した。MHC-Rae28 tg は出生後に心筋細胞でアポトーシスが誘導され、心筋が脱落するために拡張型心筋症を発症する。つまり、Rae28 の高発現は心筋維持を損なうことが解った。このことからポリコーム複合体 1 が心臓発生だけでなく心筋維持をも担うことが考えられる。しかし、どのような分子メカニズムによって Rae28 の高発現でアポトーシスが誘導され心筋が脱落するのかについては明らかではない。

Geminin は DNA 複製とクロマチンリモデリングを抑制することにより細胞増殖と分化の両方を調節している。そして、S 期においては新たな DNA 複製の開始を抑制し、1 細胞周期において 2 度目の DNA 複製が開始されないように制御している。研究室では Rae28 を含んだポリコーム複合体 1 が Geminin に対する E3 ユビキチンリガーゼとして機能し、ユビキチン-プロテアソーム系を介して Geminin タンパク質を直接制御し、造血幹細胞の活性を支持していることを明らかにし

た。つまり、造血幹細胞においては Geminin が高発現することによって静止期に誘導されるとともに未分化性が維持されるが、前駆細胞になる Geminin の発現が低下し活発な増殖と分化が誘導される。しかし、Geminin が低下し過ぎると DNA 再複製が起こりチェックポイントが誘導されることによって細胞周期が停止するか、またはアポトーシスが引き起こされることから、MHC-Rae28 tg の心筋にも同様なメカニズムでアポトーシスが誘導されていることが推測される。

以上の独自の解析結果から、心筋においてはポリコーム複合体 1 により Geminin タンパク質の安定性が制御され、Geminin の発現レベルが心筋細胞を維持するために重要な役割を果たしているという仮説を得るに至った。そこで、本研究ではポリコーム複合体 1 とその直接的標的の一つ Geminin に注目して心筋維持の分子機構の解析を進めた。

2. 研究の目的

成体で心筋細胞は分裂することはなく、高度の心筋傷害による重症心不全の患者に対しては心臓移植しか救命の手立てがない。先端的治療法として、iPS/ES 細胞、さらには線維芽細胞から誘導した心筋を用いる方法に期待が寄せられている。しかし、これらの *in vitro* で誘導した心筋細胞を移植しても長期的に生体内で維持されることはなく、また心筋維持の分子機構についてもほとんど解っていない。研究室ではポリコーム遺伝子群の一つ Rae28 を成体心筋で発現させると、心筋が脱落し拡張型心筋症を発症することを明らかにしているが、本研究ではこの独自に開発したモデルマウスやポリコーム遺伝子群の一つ Psgf5 のノックアウトマウスを作製して、心筋維持の分子基盤を明らかにし、心筋を生体内で安定に維持させるための理論的根拠を見いだすことを計画した。

3. 研究の方法

心筋維持の機能を有するポリコーム複合体 1 の新たな構成因子の一つ Pcg5 のノックアウトマウスを作製し、解析を進めるとともに、Geminin 遺伝子の終止コドンの直前に黄色蛍光色素タンパク質 enhanced yellow fluorescence protein (EYFP) 遺伝子を in frame に挿入した Geminin-EYFP ノックインマウスを作製し、Geminin を可視化することによって心筋における Geminin の発現動態を追跡した。さらに、Geminin の分子機能の中で特にクロマチンリモデリングの制御機能に焦点を当て、クロマチン構造を介して Geminin がどのようにして転写制御機能を発揮するのかについて解析を勧め、心筋維持における Geminin の役割を分子レベルで明らかにすることを目指した。

4. 研究成果

Rae28 に加えて、ポリコーム複合体 1 の一つ Pcg5 のノックアウトマウスを作製し、解析することによって心臓発生は正常に起こるが生後 1 年経過後、拡張型心不全を発症し、致死となることが解った。これは Rae28 の心筋特異的トランスジェニックマウスと良く似た表現型であり、心筋維持におけるポリコーム複合体 1 の役割を反映しているものと考えられた。

次に、黄色蛍光タンパク質 EYFP の遺伝子を Geminin 遺伝子のコーディング領域に融合したノックインマウス (Geminin-EYFP KI) を作製し Geminin の発現を可視化した。そこで、心筋における Geminin の発現動態を追跡し、心筋維持における Geminin の発現動態を明らかにした。その結果、多くの心筋細胞では Geminin の発現は認められなかった。Geminin の発現は G_0/G_1 期において低く、 $S/G_2/M$ 期において高いという細胞周期の各相における Geminin の発現動態を考えると恐らく成体においてはほとんどの心筋細胞が細胞周期の G_0/G_1 期にあることを反映しているものと考えられた。一方で、心臓の流出路周辺領域に

において Geminin が高発現している心筋細胞が散見された。これらの細胞は心筋細胞が細胞周期に入っている可能性、あるいは Geminin は造血幹細胞においては G_0/G_1 期において Geminin の発現が比較的高く保たれていることから心臓幹細胞である可能性も推測される。今回の研究では十分に解析を進めることができなかったが、今後、MHC-Rae28 tg や Pcg5 ノックアウトマウスの心筋における Geminin の発現を解析する等によって、ポリコーム複合体 1 による心筋維持機構の解析を更に進める必要がある。

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 2 件)

1. Prickaerts P, Niessen HEC, Dahlmans VEH, Salvaing J, Vanhove J, Spaapen F, Geijselaers C, Partouns I, Bartels SJJ, Neumann D, Speel EJ, Takahara Y, Wouters BG, Voncken JW. MK3 modulation affects BMI1-dependent and independent cell cycle check-points. PLoS ONE 10, 査読有, 2015, e0118840, doi:

10.1371/journal.pone.0118840. 査読有り

2. Ohno Y, Saeki K, Yasunaga S, Kurogi T, Suzuki-Takedachi K, Shirai M, Mihara K, Yoshida K, Voncken JW, Ohtsubo M, Takahara Y. Transcription of the Geminin gene is regulated by a negative-feedback loop. Mol. Bio. Cell 25, 2014, pp1374-1383, doi:

10.1091/mbc.E13-09-0534. 査読有り

[学会発表](計 5 件)

国際学会 (招待)

1. Takahara Y. Molecular role for Geminin in governing hematopoietic stem cell activity.

Views into nuclear function: A See Drug Workshop.

11-13 September, 2014, Patras, Greece

国内の学会

2. Shirai M, Otani K, Tsuchimochi H,
Takahara Y, Morisaki T.

Functional roles of Polycomb ring finger 5
(Pcgf5) in the heart of adult mice.

第37回日本分子生物学会年会

2014年11月25日-27日、パシフィコ横浜(横浜)

3. Shirai M, Takahara Y, Morisaki T. Pcgf5
contributes to PRC1 (Polycomb repressive
complex 1) in the developing heart. 第 36
回日本分子生物学会年会

2013年12月3-6日、神戸ポートアイランド
(神戸)

4. Kurogi T, Ohno Y, Yasunaga S,
Suzuki-Takedachi K, Shirai M., Ohtsubo M,
Takahara Y. Negative feed-back loop
regulates E2F-mediated transcriptional
activation of the Geminin gene. 第 36 回
日本分子生物学会年会

2013年12月3-6日 神戸ポートアイランド
(神戸)

5. Shirai M, Takahara Y, Morisaki T.
Pcgf5 contributes to PRC1 (Polycomb
repressive complex 1) in developing
cardiac cells.

The 7th TAKAO International Symposium on
Etiology and Morphogenesis of Congenital
Heart Disease.

13-15 July, 2013, National Olympic
Memorial Youth Center (Tokyo)

〔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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホ - ム ベ - ジ 等
<http://home.hiroshima-u.ac.jp/dscb/>

5. 研究組織

(1) 研究代表者

瀧原 義宏 (Takahara Yoshihiro)
広島大学・原爆放射線医科学研究所・教授
研究者番号：60226967

(2) 研究分担者

安永 晋一郎 (Yasunaga Shin'ichiro)
広島大学・原爆放射線医科学研究所・准教授
研究者番号：50336111

大野 芳典 (Ohno Yoshinori)
広島大学・原爆放射線医科学研究所・助教
研究者番号：10548986

白井 学 (Shirai Manabu)
独立行政法人国立循環器病研究センター・研
究所・室長
研究者番号：70294121

(3) 連携研究者：なし