

新規ASB family 分子の心臓形成・心機能における役割の解明

[1] 組織

代表者：川上 浩一

(国立遺伝学研究所)

対応者：小椋 利彦

(東北大学加齢医学研究所)

分担者：

福田 隆一

(国立遺伝学研究所)

研究費：物品費 36万8千7百円

旅費 2万8千3百円

[2] 研究経過

高齢化社会により心疾患の患者は増加し、日本人の死亡原因の上位をしめる。慢性的に心臓にかかる Mechanical stress は心筋肥大や拡張機能の低下を引き起こし、加齢にともない重篤な心疾患の発症確立を高めると考えられているが、そのメカニズムは明らかにされてない。一方、発生過程においても、循環器や運動器は適切な Mechanical stress に応答することで正常な器官形成が行われると考えられる。実際、心機能の低下により心臓にかかる Mechanical stress の減少は、心臓形態や弁形成、血管の配向に奇形を生じることが知られている。

Ankyrin repeat and SOCS box (ASB) family 分子は、Ankyrin repeat と SOCS box という特徴的な機能 domain をもつ新規分子 family として同定された。Ankyrin repeat は機械的な張力を発生させるバネとしての特性を持ち、細胞内において Mechanical stress を感知できる可能性が報告されている。ASB family には心臓や骨格筋で特異的に発現を示す分子があることや、ASB2 が筋収縮を担うアクチン繊維と相互作用することが報告されていることから、私たちは、ASB family 分子の中には、心筋や骨格筋において Mechanical stress に応答して機能するものがあるという仮説を考えた。

そこで、本共同研究では、この仮説を検証し、ASB family 分子の機能を解明することで、心臓組織が Mechanical stress に応答する分子メカニズムの解明を目的とした。

まず始めに、共同研究者の小椋教授と打ち合わせを行い、ASB family 分子を研究する意義と研究目

的を明確にした。そして、国立遺伝学研究所が Zebrafish を用いた解析を行い、そこで得られた知見をもとに、小椋教授がマウスを用いた詳細な解析を行うという方針を決めた。

以下、本共同研究の目的を具体的に記す。

(1) Zebrafish では ASB family 分子についての解析がほとんどされていないため、Zebrafish のゲノムデータベースをバイオインフォマティクスの手法を用いて解析を行い、ASB family 遺伝子の全体像を明らかにする。

(2) 同定した ASB family 遺伝子全ての cDNA クローニングを行なう。これら遺伝子の発現を RT-PCR と in situ hybridization により解析し、ASB family の中で心臓、骨格筋で特異的に発現を示す分子を同定する。

(3) 心臓、骨格筋で発現を示す ASB について、Morpholino antisense oligo を用いて遺伝子機能の阻害を行い、心臓組織に対する影響を解析する。

(4) 心機能への関連が推測される分子が同定された場合には、LC-MS/MS を用いて特異的に結合する分子を明らかにする等の解析を進める。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

本年度は、以下に示す研究成果を得た。

(1) これまでに報告されている Zebrafish ASB 分子の SOCS box 領域のアミノ酸配列と Zebrafish の NCBI ゲノムデータベースを用いて、遠縁のファイミリー遺伝子産物を発見するための PSI-BLAST プログラムを用いた解析を行った。新規に同定された遺伝子も含めて全 17 遺伝子のゼブラフィッシュ ASB ファミリー遺伝子を同定した。

(2) 同定された全遺伝子について cDNA のクローニングに成功した。これらをプローブとして in situ hybridization を行い、発現部位の解析を行なった。ASB5、ASB2b、ASB12b が心臓と骨格筋に特異的に発現することを明らかにした。

(3) 心臓、骨格筋に発現する ASB5 について、Morpholino antisense oligo を用いて機能阻害を行ったところ、心筋の組織構造であるサルコメアの構造異常が認められた。また、心室の縮小と心拍の低下を引き起こし、血液循環がほとんど起こらない表

現型を示すことがわかった。

(4) ASB5 に特異的に結合する分子を解析するため、Flag tag 融合 ASB5 蛋白質を発現するプラスミドを作製した。それを HEK293T 細胞に導入した後、抗 Flag 抗体を用いて免疫沈降を行い、共沈してきたタンパク質をトリプシン消化したのち、ペプチド断片を逆相クロマトカラムを用いた LC-MS/MS を用いて網羅的に同定する解析を行った。この解析により、解糖系に関わる PKM2、ミトコンドリア膜上でカルシウムのチャネル分子である VDAC やプロテアソーム複合体分子が ASB5 と結合することを明らかにした。

(3-2) 波及効果と発展性など

脊椎動物にひろく存在する ASB family に属する遺伝子について、その機能についてはまだよくわかっていない。細胞に加わる伸展や圧迫などの Mechanical stress は、発生、加齢、循環器や運動機の維持など幅広い局面で重要なパラメーターであることが知られるが、Mechanical stress が生命現象に反映される分子メカニズムは今の段階ではなにもわかっていない。

本共同研究により、心臓で発現する ASB5 の結合分子が明らかになった。今後、ASB5 と mechanical stress の関係を明らかにしたいと考えている。具体的には、zebrafish 胚は、薬剤処理により心拍を停止させ（薬剤処理によって心拍を停止させても体表から酸素を取り込む事によって数日間生存し発生する。）、心臓にかかる Mechanical stress を軽減させた条件で ASB5 が標的分子へ及ぼす作用を解析することで、ASB5 と Mechanical stress との関係を明らかにすることができると考えている。

ASB5 と Mechanical stress の関係を解析することで、研究の更なる発展が期待され、他分野の研究者との活発な議論や更なる共同研究への発展が期待される。

[4] 成果資料

本共同研究による成果はまだない。