

新規 ASB family 分子の心臓形成・心臓機能における 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：物件費75万2千円，旅費4万8千円

[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いない。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。

遺伝学研究所川上研と加齢医学研究所小椋研では、昨年度から Mechanical stress に反応する因子の単離と解析に関する共同研究を進めてきた。そして、Ankyrin repeat and SOCS box (ASB) family 分子を見いだした。ASB タンパク質群は、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。なかでも、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、昨年度から解析を続けてきた。

昨年度に続いて、以下の4点を重要課題として研究を行ってきた。

(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、以下の成果を得た。

(1) ヒト、マウス、ゼブラフィッシュの全ゲノムデータベースをもとに、遠縁のファイミリー遺伝子産物を検索するための PSI-BLAST プログラムを用いて SOCS box を有するすべての遺伝子を同定し、それぞれの塩基配列から詳細な系統樹を作成した。この系統樹は、異なる3種の生物種を網羅したもので、極めて正確な系統樹となった。

(2) 同定したゼブラフィッシュの ASB1、ASB2b、ASB3、ASB4、ASB5、ASB6、ASB7、ASB8、ASB10、ASB11、ASB12a、ASB12b、ASB13、ASB14、ASB15、ASB16、ASB18 の17遺伝子について、in situ hybridization 用のプローブを取得した。この17プローブを用いて、1日胚、2日胚を用いて in situ hybridization を行い、発現様式を解析した。その結果、心臓で強い発現を示すものは、ASB2b、ASB5、ASB12b の3つであった。また、心臓以外にも、消化管と肝臓に発現する ASB8、中枢神経系に特徴的な発現パターンを示す ASB7、ASB16 などが見つけ出された。

(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。加えて、体節に形成される骨格筋繊維の配向も大きく乱れ、ラミニンの配向も不規則に変化していた。また、ASB5 に対する抗体を作製し、培養 HEK293 細胞でのタンパク質局在を見た所、filopodia に位置することがわかった。(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 や AldolA、ミトコンドリア膜上でカルシウムのチャンネル分子である VDAC、プロテアーム複合体分子群が ASB5 と結合することを明らかにした。これらの結合は、培養細胞を用いた in vitro の共沈系でも確認された。また、pkm2、vdac3 遺伝子の発現は心臓に強く、ASB5 との関連が示唆された。

(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。その中でも、ASB5 と結合する分子として、解糖系の酵素、ミトコンドリア膜に存在する電位依存性アニオンチャンネル Vdac が同定できたことは大きな意義をもつ。小椋研では、Mechanical stress による代謝調節に関して新しい知見があり、今回の ASB5 と解糖系の酵素の関係は新しい研究の方向性を決定するものと思われる。代謝の解析に関して、ゼブラフィッシュはモデル生物として不向きなこともあり、今後、ノックアウトマウスの作製も考慮する必要がある。循環動態の変化による心筋への機械的刺激負荷の増加は、収縮力の増大など、ATP 産生を必要とするが、ASB などの分子がこのシグナル伝達系の新たな仲介者である可能性が指摘できる。

[4] 成果資料

本共同研究による成果はまだない。