

課題番号 19

血管内皮における膜貫通型タンパク質 Tmem100 の発現制御機構

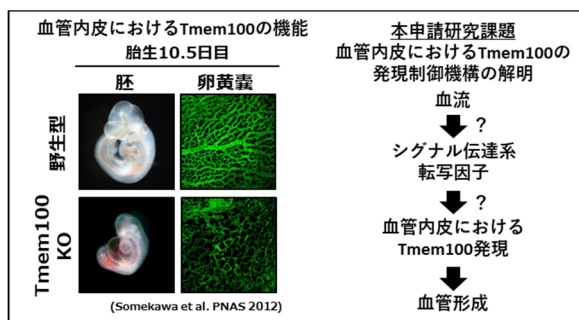
[1] 組織

代表者：渡邊 裕介
(国立循環器病研究センター、研究所)
対応者：久保 純
(東北大学加齢医学研究所)
分担者：
中川 修
(国立循環器病研究センター、研究所)
劉 孟佳
(国立循環器病研究センター、研究所)

研究費：物品費 15 万円

[2] 研究経過

胎生期の血管内皮で発現する膜貫通型タンパク質・Tmem100 は血管系形成において必須の因子である。しかしながら、血管内皮における Tmem100 遺伝子の発現制御機構については不明な点が多い (図)。



本申請研究では、申請者がマウスをモデル動物として、受け入れ教員である久保純助教が培養内皮細胞をモデルとして、それぞれの技術的利点を活かしながら血管内皮における Tmem100 の発現制御機構についての解明を目指している。

以下、研究活動状況の概要を記す。

研究代表者は当初、加齢医学研究所を訪問して受け入れ先教員と打ち合わせ・実験を行う予定であったが、新型コロナウイルス感染拡大に伴い、研究所訪問を避けた。代わりに、互いの進捗状況についてメールを通じて密

に連絡を取り合い、データ交換を行うことにより実験を遂行した。

申請者および研究協力者の中川修部長・劉孟佳研究員らは、LacZ レポーターを用いたトランスジェニックマウス解析により、マウス胚において Tmem100 の血管内皮細胞発現を制御するエンハンサー (Tmem100 内皮エンハンサー) を同定している (未発表データ)。今年度はさらに Tmem100 内皮エンハンサーの転写活性を制御する因子とシグナル伝達経路の検索を行った。また、久保純助教は、培養血管内皮細胞において流れ刺激を負荷する実験系を用いて、Tmem100 内皮エンハンサーの転写活性と流れ刺激の関係について解析を行った。

[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. Tmem100 内皮エンハンサーの転写活性を制御する因子の同定

Tmem100 の血管内皮細胞発現を制御するエンハンサー (Tmem100 内皮エンハンサー) の制御因子の探索を、ルシフェラーゼレポーター解析、LacZ レポーター Tg マウス解析を用いて行った。エンハンサー内の主要内皮転写因子および内皮シグナル伝達経路を仲介する転写因子の結合配列に変異を導入した結果、*in vitro* およびマウス胚において、エンハンサー活性化が抑制された。

2. 流れ刺激負荷による Tmem100 内皮エンハンサー活性化に関与するシグナル伝達経路の同定

培養内皮細胞に Tmem100 内皮エンハンサー-ルシフェラーゼレポーターを導入して、流れ刺激負荷実験した結果、エンハンサー活性の上昇が観察された。一方、成果 1 より同定したシグナル伝達経路の仲介転写因子の結合配列に変異を導入したエンハンサーでは、流れ刺激負荷に対する応答が減弱した。

以上の 1、2 の結果より、血管内皮細胞における Tmem100 遺伝子の転写を制御する転写因子とシグナル伝達経路を同定し、さらに流れ刺激に対するエンハンサー活性化に対しては上記シグナル伝達経路が関与している可能性が示された。

(3-2) 波及効果と発展性など
血管内皮での Tmem100 発現は胚における血管形成において必須である。本申請研究により血管内皮細胞における Tmem100 遺伝子の発現制御機構の一端を明らかにできたことで、正常な血管形成やその破綻の分子機構の理解に繋がることが期待される。

[4] 成果資料

英文原著論文

1. Importance of endothelial Hey1 expression for thoracic great vessel development and its distal enhancer for Notch-dependent endothelial transcription.

Watanabe Y, Seya D, Ihara D, Ishii S, Uemoto T, Kubo A, Arai Y, Isomoto Y, Nakano A, Abe T, Shigeta M, Kawamura T, Saito Y, Ogura T, Nakagawa O. J Biol Chem. 295(51):17632-17645. doi: 10.1074/jbc.RA120.015003. (2020)

2. A role of Hey2 transcription factor for right ventricle development through regulation of Tbx2-Mycn pathway during cardiac morphogenesis.

Seya D, Ihara D, Kawamura T, Watanabe Y, Nakagawa O. Dev Growth Differ. doi: 10.1111/dgd.12707. in press. (2021)

3. Tmem100-BAC-EGFP mice to selectively mark and purify embryonic endothelial cells of large caliber arteries in mid-gestational vascular formation.

Kinugasa-Katayama Y, Watanabe Y, Hisamitsu T, Arima Y, Liu MN, Tomimatsu A, Harada Y, Arai Y, Urasaki A, Kawamura T, Saito Y, Nakagawa O. Genesis. in press. (2021)

学会等発表

一般講演 (口頭発表)

1. Osamu NAKAGAWA, Yusuke WATANABE, Akihiro URASAKI, Toru TANAKA, Daiki SEYA, Norika LIU, Shoko TAMURA, Dai IHARA, Yukihiro HARADA, Teruhisa KAWAMURA

Transcriptional regulation and physiological significance of ALK1 signal target genes in embryonic vascular endothelial cells (Oral, Internet Recording)

International Vascular Biology Meeting 2020 2020年9月9日 Seoul, Korea

2. Yusuke WATANABE, Daiki SEYA, Dai IHARA, Yuki TANAKA, Teruhisa KAWAMURA, Osamu NAKAGAWA

A role of Hey2 transcription factor for right ventricle development during cardiac morphogenesis and regulatory mechanisms of its ventricular-specific expression

心血管内分泌代謝学会 2021年3月13日 オンライン開催

一般講演 (ポスター発表)

3. 原田恭弘、田中亨、荒井勇二、浦崎明宏、劉孟佳、渡邊裕介、川村晃久、中川修

胎生期血管形成におけるリン酸化酵素遺伝子 SGK1の内皮特異的発現機構 (ポスター)

第43回日本分子生物学会年会 2020年12月3日 オンライン開催

4. 渡邊裕介、瀬谷大貴、井原大、田中裕樹、川村晃久、中川修

胎生期心室筋における Hey2 転写因子の機能と発現制御機構 (ポスター)

第43回日本分子生物学会年会 2020年12月3日 オンライン開催

5. Norika LIU, Yumi KINUGASA-KATAYAMA, Yusuke WATANABE, Yuji ARAI, Yoshie ISOMOTO, Atsushi NAKANO, Mami UEMURA-KAMATA, Yoko FUKUSHIMA, Yoshiaki KUBOTA, Akiyoshi UEMURA, Yoshiakira KANAI, Osamu NAKAGAWA

A Novel Transmembrane Protein Tmem100: Regulatory Mechanisms of Endothelial-Specific Expression and Cellular Functions During Vascular Formation (E-Poster)

International Vascular Biology Meeting 2020 2020年9月9日 Seoul, Korea