

90. 心不全における新規の機能的遺伝子ネットワークの解析

久場 敬司

秋田大学 大学院医学系研究科 分子機能学・代謝機能学講座

Key words : 心不全, ゲノム編集, RNA, CNOT1

緒言

高血圧、動脈硬化、虚血性心疾患など心不全の原因疾患の研究が精力的に進められてきた一方で、心不全病態そのものの発症、増悪の分子機構には未だ不明な点が多い。私達は、以前に大規模なショウジョウバエの心筋特異的 RNAi ノックダウンライブラリーを用い、8,000 遺伝子について *in vivo* 心不全スクリーニングを行うことにより、ショウジョウバエ心負荷ストレス応答に重要な遺伝子 490 個を抽出し、バイオインフォマティクス解析により哺乳類の心機能調節にかかわる遺伝子の機能的なネットワークマップを作製した¹⁾。さらに、このショウジョウバエ RNAi スクリーニングで見出された新規の機能的遺伝子ネットワークをマウスで解析するために、これまでに独自に樹立した ES 細胞を用いた G0 遺伝子欠損マウス作製系を立ち上げ、CRISPR ゲノム編集技術を導入することにより、高速かつ効率良く遺伝子改変マウスを作製、機能解析を行うことができるシステムを確立してきた。本研究では、ショウジョウバエ RNAi スクリーニングで見出された新規の機能的遺伝子ネットワークの生理機能、役割をマウス心臓で解析することにより、心不全発症、増悪化の分子病態を解明することを目指して研究を行った。

方法、結果および考察

1. 心不全病態における心不全関連の候補遺伝子の *in vivo* 機能解析

ゲノム編集による遺伝子変異マウスについて、G0 世代での心エコーによる心機能スクリーニングの解析を行い、8 系統の遺伝子変異マウスについて、さらに交配を進めて F1 世代ならびに F2 世代以降での心機能の解析を行った。G0 世代のマウスは、私達が独自に樹立した ES 細胞を用いてゲノム編集細胞を作製し、胚盤胞へのインジェクションにより 100 %ES 細胞由来のマウスを作製した (図 1)。8 系統の遺伝子改変マウスについて、Taqman プローブによる遺伝子型タイピングの条件設定を行いながらマウスの交配、繁殖を進め (図 2A)、Western blot により実際に蛋白の発現が欠失していることを確認した (図 2B)。3~6 か月齢の成体マウスで、心エコーによる心収縮能の検討ならびに心電図による伝導系のスクリーニングを行った。Taqman プローブによりゲノム編集マウスの遺伝子型を判定し (図 2A)、Western Blot により標的遺伝子の蛋白発現を解析した (図 2B)。Gene 'G' は野生型マウスの心臓のみならず肺、肝、腎においても蛋白発現が認められたが、ゲノム編集により完全に欠損していることが確認された。G0 世代のマウスで、8 系統のうち 6 系統で有意な心機能の低下を認めたが、2 系統 (遺伝子 'C'、'D') では心機能の変化は明らかではなかった。F1 世代、F2 世代と交配を進めて、心エコーの解析を行ったところ、8 系統のうち、遺伝子 'A'、'B'、'F'、'G' の 4 系統で、交配を重ねても心機能低下の表現型が維持されることが分かった。また、遺伝子 'H' についても、F1 世代のヘテロ変異で心機能低下の傾向が認められた。一方で、意外なことに心電図の QT 時間延長など心電図での変化は検出されなかった。いずれにしても、F2 世代でも、G0 世代と同様に心機能低下の表現型が確認され、G0 マウスでのスクリーニングの有効であることが分かった (図 3)。現在、これらの表現型を認めたマウスで大動脈縮窄による圧負荷心不全モデル (TAC モデル) で機能解析を進めている^{2,3)}。

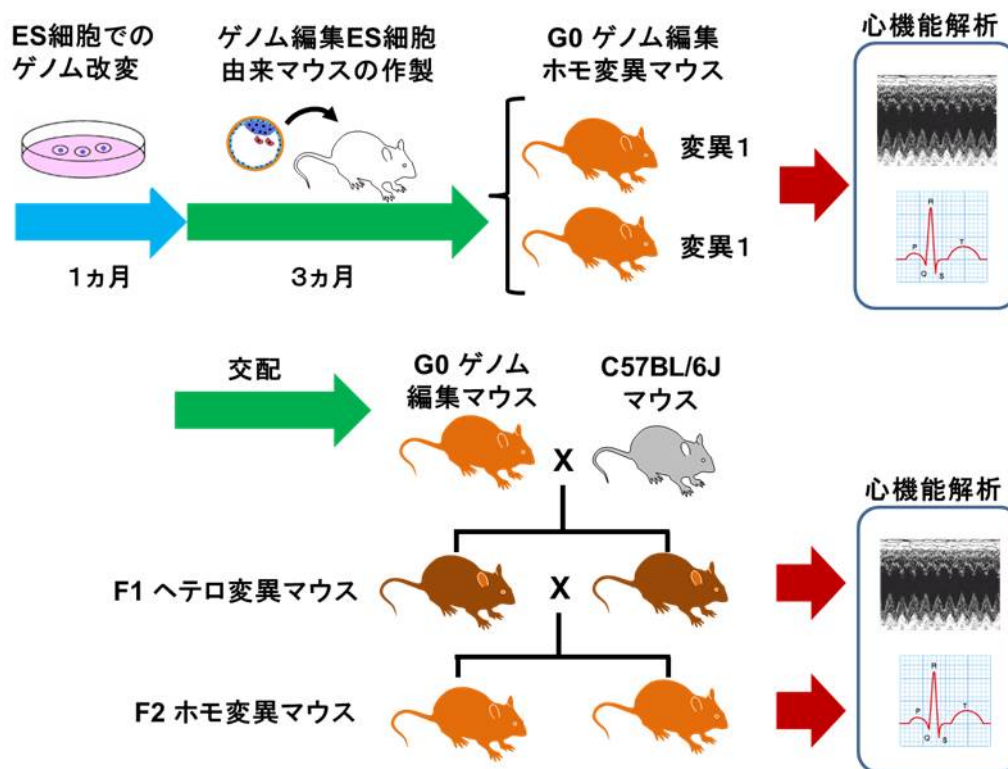


図1. 心不全関連候補遺伝子のマウス心機能スクリーニング

ES細胞でCRISPR/Cas9によりゲノム編集を行い、ホモ変異のES細胞を個体化し、G0世代のマウスで心機能解析を行い、同時に交配を進め、得られたF1、F2世代のマウスで順次表現型の確認を行っていく。

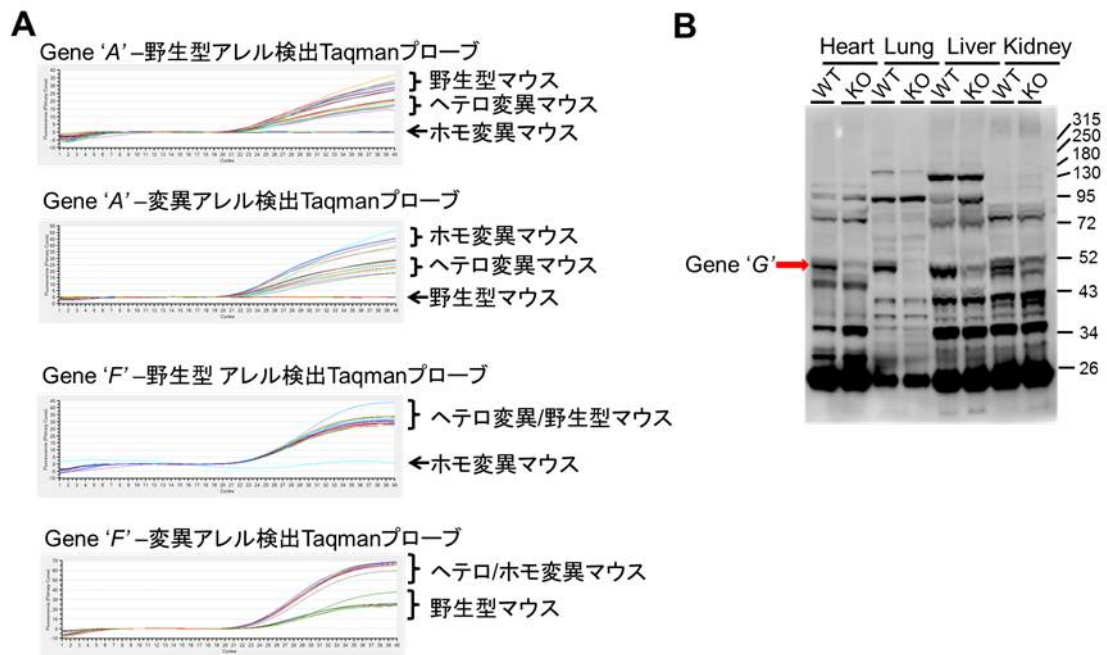


図2. 作製したゲノム編集マウスの遺伝子型判定ならびに遺伝子発現検討結果の例

Taqman プローブによりゲノム編集マウスの遺伝子型を判定し (A)、Western Blot により標的遺伝子の蛋白発現を解析した (B)。Gene'G'は野生型マウスの心臓のみならず肺、肝、腎においても蛋白発現が認められたが、ゲノム編集により完全に欠損していることが確認された。

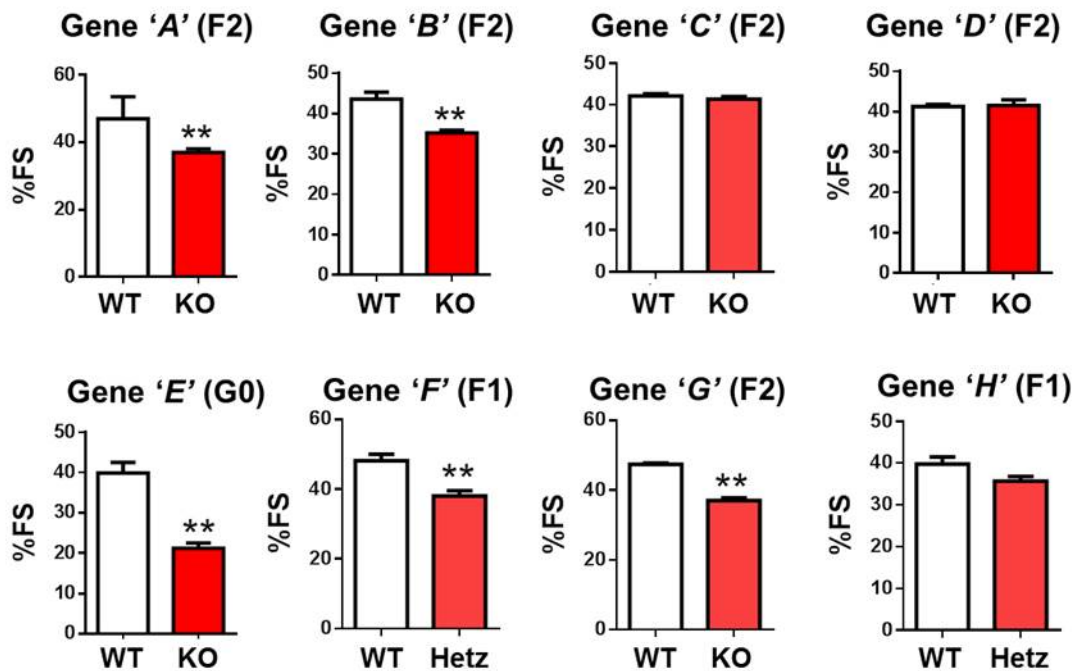


図3. 心エコーによる心不全関連候補遺伝子のゲノム編集マウスの心機能評価

ゲノム編集により作製された遺伝子 'A' ~ 'H' の変異マウスについて、G0 世代のホモ変異マウスの心エコーで心機能測定を行い、その後、交配で F1 世代、F2 世代を準備して、6 か月齢の時点で再度心機能測定を行った (n = 3-6, ** $P < 0.01$, unpaired t-test)。%FS: %Fractional shortening.

2. 細胞内における RNA 代謝因子複合体の解析

ゲノム編集技術により、ES 細胞で心機能調節にかかわる RNA 代謝因子複合体のサブユニット CNOT1 の内因性蛋白の N 末端に FLAG タグの配列を相同組み換えにより両アレルに挿入することにより、CNOT1 を FLAG 標識し、内因性蛋白の相互作用因子について解析を行った。その結果、ES 細胞において、CNOT1 は CNOT3 と 1:1 対応で相互作用していることが分かった。一方で、CNOT6L や CNOT7 は、一部は CNOT1 と結合しているものの、結合していない状態のフリーの蛋白が比較的多いことが分かった (図 4)。現在、心臓における蛋白間相互作用の解析を行う目的で、FLAG 標識された ES 細胞を個体化することを進めている。

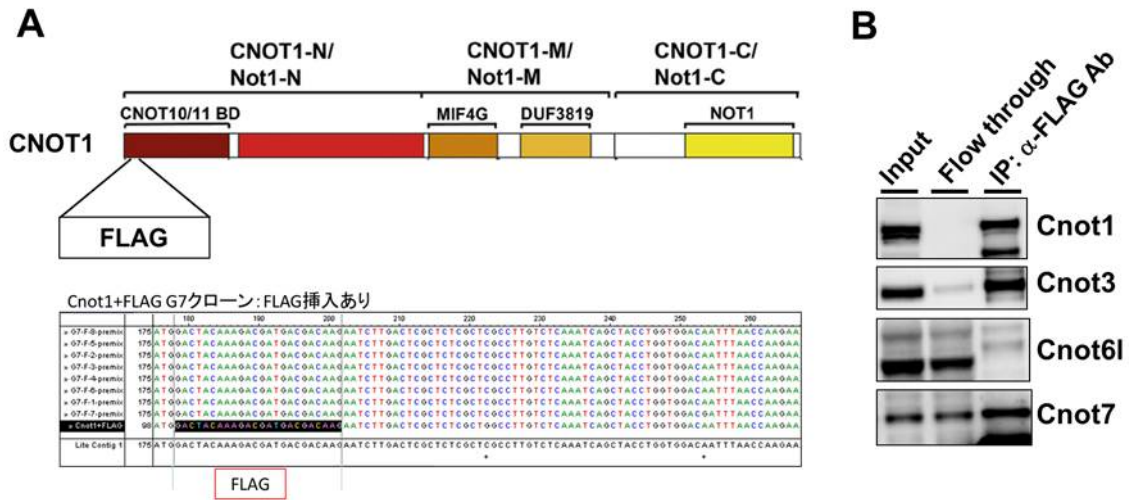


図4. 内因性の CNOT1 蛋白の N 末端の FLAG 標識ならびに免疫沈降による相互作用因子の解析
ゲノム編集による内因性蛋白の FLAG 標識 (A) と標識蛋白の抗 FLAG 抗体による相互作用因子の免疫沈降 (B) から、複合体構成因子の stoichiometry が異なることが示唆された。

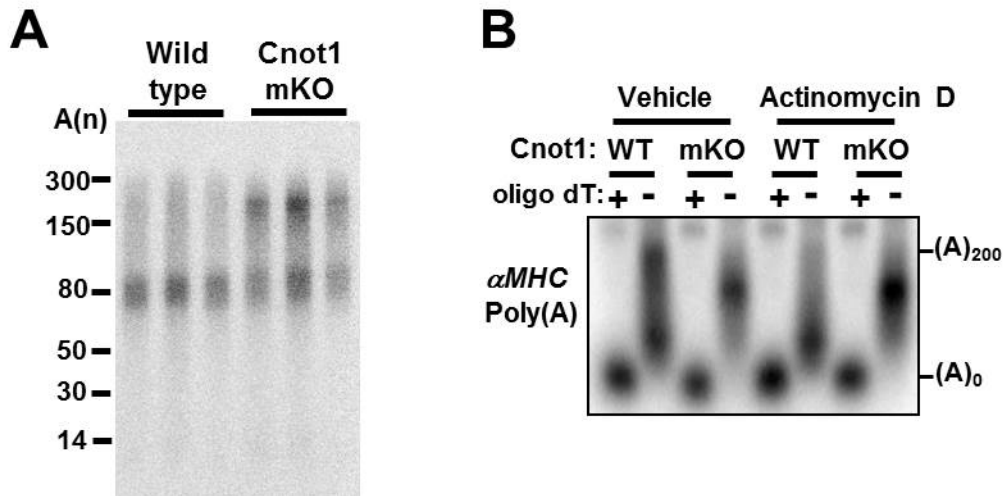


図5. *Cnot1* 遺伝子欠損による mRNA poly(A)鎖の伸長
Bulk poly(A) 鎖長 (A) と α MHC mRNA の poly(A) 鎖長 (B) が *Cnot1* 欠損により顕著に伸長していた。

3. mRNA 代謝制御機構の解析

新規遺伝子ネットワーク群には、mRNA 代謝にかかわることが予測されている遺伝子が多く含まれるので、mRNA の分解、安定性について解析を行った。脱アデニル化と呼ばれる mRNA poly(A) 鎖の 3'末端からの分解は、mRNA 分解開始の鍵となるステップであることから、まずは既知の RNA 代謝因子複合体についての解析を行った。*Cnot1* 遺伝子欠損マウスにおいて、poly(A) ラベリング、RNaseH ノーザンプロットにより poly(A) の長さを測定した。その結果、*Cnot1* 遺伝子欠損により bulk mRNA poly(A) 鎖が伸長していた (図 5A)。また、特定の遺伝子についても、*Cnot1* 遺伝子欠損で α MHC 遺伝子の mRNA の poly(A) 鎖が伸長しており、転写阻害剤の Actinomycin D 投与により poly(A) 鎖が顕著に伸長した (図 5B)。

以上の結果から、既知の mRNA 代謝因子複合体について、mRNA poly(A) 鎖長を検定できる実験系を構築することができた。今後、新規の遺伝子群についても遺伝子発現解析などと組み合わせて mRNA の分解、安定性について検討を進めていく予定である。また、ショウジョウバエ RNAi スクリーニングで見出された 8 個の候補遺伝子に着目した解析において、5 個の遺伝子がマウスの心機能調節に重要であることが分かったことから、種間で保存された心機能調節因子はまだ多く隠されている可能性が示唆された。今後さらなる検討を進めていく予定である。

共同研究者

本研究の共同研究者は、秋田大学大学院医学系研究科 情報制御学・実験治療学講座の今井由美子である。最後に、本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Neely GG, Kuba K, Cammarato A, Isobe K, Amann S, Zhang L, Murata M, Elmén L, Gupta V, Arora S, Sarangi R, Dan D, Fujisawa S, Usami T, Xia CP, Keene AC, Alayari NN, Yamakawa H, Elling U, Berger C, Novatchkova M, Koglugruber R, Fukuda K, Nishina H, Isobe M, Pospisilik JA, Imai Y, Pfeufer A, Hicks AA, Pramstaller PP, Subramaniam S, Kimura A, Ocorr K, Bodmer R, Penninger JM. A global in vivo *Drosophila* RNAi screen identifies NOT3 as a conserved regulator of heart function. *Cell*. 2010 141(1):142-53. doi: 10.1016/j.cell.2010.02.023. PMID: 20371351
- 2) Sun Y, Guo F, Zou Z, Li C, Hong X, Zhao Y, Wang C, Wang H, Liu H, Yang P, Han Z, Liu K, Kuba K, Song B, Gao J, Mo Z, Li D, Li B, Li Q, Zhong N, Wang C, Penninger JM, Jiang C. Cationic nanoparticles directly bind angiotensin-converting enzyme 2 and induce acute lung injury in mice. *Part Fibre Toxicol*. 2015;12:4. doi: 10.1186/s12989-015-0080-x, PMID: 25890286
- 3) Demetz E, Schroll A, Auer K, Heim C, Patsch JR, Eller P, Theurl M, Theurl I, Theurl M, Seifert M, Lener D, Stanzl U, Haschka D, Asshoff M, Dichtl S, Nairz M, Huber E, Stadlinger M, Moschen AR, Li X, Pallweber P, Scharnagl H, Stojakovic T, März W, Kleber ME, Garlaschelli K, Uboldi P, Catapano AL, Stellaard F, Rudling M, Kuba K, Imai Y, Arita M, Schuetz JD, Pramstaller PP, Tietge UJ, Trauner M, Norata GD, Claudel T, Hicks AA, Weiss G, Tancevski I. The arachidonic acid metabolome serves as a conserved regulator of cholesterol metabolism. *Cell Metab*. 2014;20(5):787-98. PMID: 25444678