

## 研究テーマ

In vivoショウジョウバエスクリーニングによる新規循環器疾患関連遺伝子の単離、機能解析

### 1. はじめに

生活習慣病において動脈硬化や虚血性心疾患といった循環器疾患は未だに死因の第1位であり、疾患メカニズムの理解ならびに新しい治療法の開発が求められている。基礎研究のアプローチでは、さまざまな in vitro細胞モデルを用いたスクリーニングにより新規疾患関連候補遺伝子が単離され、生体動作原理の理解ならびに疾患病態解明に貢献してきた。一方で、in vivoモデル生物を用いた疾患関連遺伝子の検索は、あまりなされていない。本研究では、ショウジョウバエの心原基形成においてアンジオテンシン変換酵素2 (ACE2)が重要な役割を担うことを見出し、ACE2ノックアウトマウスを用いた解析から、ACE2が心機能の恒常性維持や重症呼吸不全に対する肺保護作用を持つことを明らかにしてきた。すなわち、ショウジョウバエやゼブラフィッシュの変異体ライブラリーを用いた遺伝学的スクリーニングは、強力な疾患関連遺伝子の同定のツールであることを強く支持する。モデル生物で得られた知見が実際のヒト疾患でどれほどの意味があるのかは未知数である。そこで、本研究では、これらモデル生物で得られた知見が実際の心筋症、心筋梗塞患者の診断、治療に応用できるかを統括的に評価することを目指して、ショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*)のゲノムワイドのRNAiトランスジェニックライブラリーを用いて、in vivo成体での心不全の機能的スクリーニングを行い、新しい心機能調節因子の単離を試み、ヒト循環器疾患との相関を調べた。

### 2. 方法

ショウジョウバエのP-element挿入変異体1200ラインのライブラリーを用いて、心血管(heart tube)の形成の異常を指標に遺伝学的スクリーニングを行ったところ、心血管形成に不可欠な97の遺伝子を見出した。その結果に基づき、IMBAとの共同研究によりgenome-wide RNAi transgenic fly libraryを用いた心不全のスクリーニングを行った。心筋特異的-Gal4ドライバーラインとUAS-RNAiラインをそれぞれ交配し、心筋特異的に遺伝子をノックダウンしたショウジョウバエを作製し、心負荷のモデルにおける生存率を指標としてショウジョウバエの成体in vivo RNAi心不全スクリーニングを行った。得られたスクリーニングヒットについて、GO analysis, KEGG pathway analysis, C2 gene set analysisなどを組み合わせたin silicoの解析により、心機能調節因子のグローバルマップを構築した。とりわけこれらの遺伝子群の中で、CCR4-NOT転写調節複合体のうちの4つの構成因子が新規に同定されたことから、その中のNOT3に着目し、遺伝子欠損マウスを作製し、解析を行った。

### 3. 研究成果

#### ①ショウジョウバエin vivo RNAi心不全スクリーニング

IMBAにて開発されたゲノムワイドのRNAiトランスジェニックライブラリー(Dietzl, et al. Nature 2007)の各UAS-RNAiラインを心筋特異的(TinC  $\Delta$  4)-Gal4発現ラインと次々に交配し、心筋特異的に各遺伝子をノックダウンしたショウジョウバエのラインを作製した。一方で、本ライブラリーは、ショウジョウバエ全遺伝子13,890

個の88%をカバーする22,247ラインから成ることから、簡便なアッセイ系でハイスループットにスクリーニングを行わねばならない。通常25°Cで飼育するハエを29°Cの高温の環境下におくことで心拍数の増加などを伴う心負荷の状態を誘導できることから、29°C高温環境下の心負荷ストレスにより死亡するラインを選別するというアッセイを採用した。哺乳類で保存されているハエ遺伝子8417個についてスクリーニングを行い、498個の遺伝子を単離した。データベースからこれらのハエ遺伝子と相同のヒト、マウスの遺伝子を抽出し、KEGG、C2 gene setsを組み合わせた解析により、心機能調節遺伝子のグローバルマップを構築し(図1)、CCR4-NOT複合体が新規の心機能調節因子であることを明らかにした(発表論文 1)。実際、構成因子のNOT3のRNAiラインは、ビデオイメージングM-mode測定で著しい心機能の低下を認めた(発表論文 1)。

## ②哺乳類の心臓におけるNOT3の役割の解明

ショウジョウバエで単離されたCCR4-NOTがマウスにおいても重要であるかを検討するためにNOT3遺伝子欠損マウスを作製したところ、ホモ欠損は胎生致死であったが、ヘテロ欠損の成体において心エコーによるin vivo心機能を測定したところ加齢に伴い心収縮能が低下することを見出し、ex vivoの単離心のLangendorff心灌流モデルで明らかな心収縮能の低下を認めた。また、左心室に圧負荷を誘導する心不全モデル(Transverse aortic constriction:TAC)において、著しい心機能低下や線維化の亢進など心不全症状の増悪を認めた(図2)。さらに、マイクロアレイ発現解析などの結果から、NOT3がヒストン修飾に関与していることが示唆されたので、心筋組織のヒストンH3K9のアセチル化状態を調べたところNOT3欠損マウスで有意に低下していた。そこで、HDAC阻害剤をNOT3欠損マウスに投与したところ、ヒストンアセチル化レベルが回復し、心機能低下の表現型はレスキューされた。したがって、NOT3による心機能制御には、エピジェネティックな遺伝子発現制御に関与していることがわかった(発表論文 1)。最後にヒトSNP(遺伝子多型)の大規模な網羅的解析(Genome-wide association study: GWAS)において、NOT3のプロモーター領域に心電図のQT時間の長さと同相するSNPを見出し、NOT3が実際のヒト不整脈や心不全の病態発症や増悪にも関与している可能性が示唆された(発表論文 1)。

図1

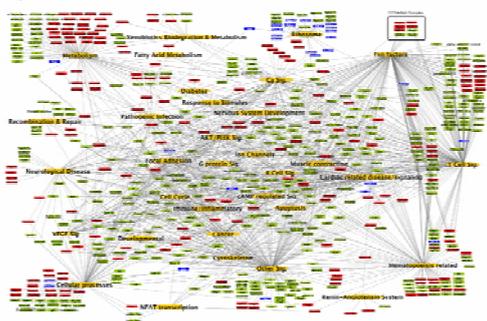
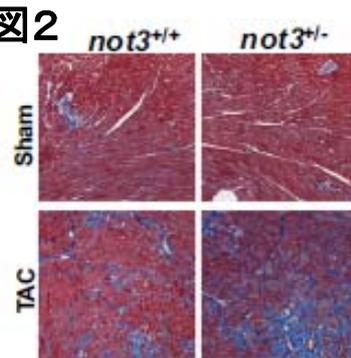


図2



種間で保存された心機能調節因子NOT3の同定

図1: 心機能調節のシステムマップ 図2: 左心室圧負荷(TAC)後のNOT3遺伝子欠損マウスの心組織像。線維化の亢進を認める。

## 4. 考察

CCR4-NOT複合体が、種間で保存された新しい心機能調節因子であることがわかった。CCR4-NOT複合体は、グローバルな遺伝子発現調節因子であり、エピジェネティックな遺伝子発現制御に加えて、RNA代

謝など多彩な機能を発揮することから、システムレベルでの解析が必要である。重要なことに、今回行ったモデル生物(ショウジョウバエ)での機能的スクリーニングにより初めてCCR4-NOTがヒト循環器疾患の感受性遺伝子であることが見出された。ヒト遺伝子多型の大規模網羅的検索(Genome-wide association study: GWAS)のみでは、明らかに見逃されていた因子であったことから、モデル生物が疾患病態解明に重要であることを改めて再認識させる結果であるといえる。今後、CCR4-NOT複合体の解析研究は、心機能調節機構のシステムレベルでの理解ならびに心疾患の新しい分子病態の解明につながることを期待される。

## 5. 発表論文

1. #Neely GG, #\*[Kuba K](#), #Cammarato A, Isobe K, Amann S, Zhang L, Murata M, Elmen L, Gupta V, Arora S, Sarangi R, Dan D, Fujisawa S, Usami T, Xia CP, Keene AC, Alayari NA, Yamakawa H, Elling U, Berger C, Novatchkova M, Kogglgruber R, Fukuda K, Nishina H, Isobe M, Pospisilik JA, Imai Y, Pfeufer A, Hicks A, 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*, in press (#; equal contribution, \*; shared correspondence).
2. Haubner BJ, Neely GG, Voelkl JG, Damilano F, [Kuba K](#), Imai Y, Komnenovic V, Mayr A, Pachinger O, Hirsch E, Penninger JM, Metzler B.: PI3Kgamma protects from myocardial ischemia and reperfusion injury through a kinase-independent pathway. *PLoS One*. 5(2):e9350, 2010.
3. Imai Y, [Kuba K](#), Ohto-Nakanishi T, Penninger JM.: Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) in disease pathogenesis. *Circ J*. 74(3):405-10, 2010.
4. Isobe K, [Kuba K](#), Maejima Y, Suzuki J, Kubota S, Isobe M.: Inhibition of endostatin/collagen XVIII deteriorates left ventricular remodeling and heart failure in rat myocardial infarction model. *Circ J*. 74(1):109-19, 2010.
5. Singer D, Camargo SM, Huggel K, Romeo E, Danilczyk U, [Kuba K](#), Chesnov S, Caron MG, Penninger JM, Verrey F: Orphan Transporter SLC6A18 Is Renal Neutral Amino Acid Transporter B0AT3. *J Biol Chem*. 284(30):19953-60, 2009.
6. Kishi Y, [Kuba K](#), Nakamura T, Wen J, Suzuki Y, Mizuno S, Nukiwa T, Matsumoto K, Nakamura T.: Systemic NK4 gene therapy inhibits tumor growth and metastasis of melanoma and lung carcinoma in syngeneic mouse tumor models. *Cancer Sci*. 100(7):1351-8, 2009.
7. Oudit GY, Imai Y, [Kuba K](#), Scholey JW, Penninger JM: The role of ACE2 in pulmonary diseases--relevance for the nephrologist. *Nephrol Dial Transplant*. 24(5):1362-5, 2009.
8. Camargo SM, Singer D, Makrides V, Huggel K, Pos KM, Wagner CA, [Kuba K](#), Danilczyk U, Skovby F, Kleta R, Penninger JM, Verrey F: Tissue-specific amino acid transporter partners ACE2 and Collectrin differentially interact with Hartnup mutations. *Gastroenterology*. 136(3):872-82, 2009.