The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	ゼブラフィッシュとマウスを用いた低酸素誘導タンパク質G0/G1 switch gene 2(G0s2)の機能解析
Author(s)	寺元, 健
Citation	大阪大学, 2019, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/72226
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　　寺元　健　　）	
論文題名	ゼブラフィッシュとマウスを用いた低酸素誘導タンパク質G0/G1 switch gene 2(G0s2)の機能解析

【背景】

心臓は多くのATPを消費する臓器であり、大部分のATPはミトコンドリアでの酸化的リン酸化によって産生されている。すでに培養心筋細胞を用いた実験において、低酸素誘導タンパク質G0/G1 switch gene 2（G0s2）はATP合成酵素と結合する事により、ミトコンドリアでのATP産生を増強する事が示されている。

【目的】

G0s2ノックアウトゼブラフィッシュおよび心筋特異的G0s2コンディショナルノックアウトマウスを作成し、生体内でのG0s2の機能解析を目的とした。

【実験方法】

TALENを用いたG0s2ノックアウトゼブラフィッシュ（G0s2 KOフィッシュ）の作成

G0s2第2エクソン内のコーディング領域を標的としたTALEN mRNAを合成し、１細胞期の受精卵にマイクロインジェクションし、ファウンダーフィッシュ（F0）を作成した。F0と野生型との交配により得られたF1フィッシュからゲノムDNAを抽出し、標的領域の配列をサンガーシーケンス法で決定した。F1フィッシュの中から13bp欠失によりフレームシフトを起こし、欠失部位の直後に未成熟終止コドンを来す変異アリルをもつ個体を同定し、ノックアウトラインを確立した。

低酸素条件下におけるG0s2 KOフィッシュの心拍数測定および遺伝子型確認

ヘテロG0s2ノックアウトゼブラフィッシュ同士の交配により産まれた受精後4日目の稚魚を用いた。稚魚をトリカイン含有低融点アガロースゲルを用いてガラスベースディッシュに固定した。そのディッシュを倒立顕微鏡に配置し、酸素濃度3%の低酸素負荷50分後の心拍の有無を確認した。心拍確認後にゼブラフィッシュをゲルから取り出し、ゲノムDNAを抽出し、制限酵素断片長多型（RFLP）法により遺伝子型を確認した。

心筋特異的G0s2コンディショナルノックアウトマウス（心筋特異的G0s2 cKOマウス）の作成

マウスモデルはCre-loxPシステムを応用して作成した。心筋特異的プロモーター（αMHC promotor）の下流にDNA組換えタンパク質（Cre）とエストロゲン変異受容体（Mer）との融合タンパク質（MerCreMer）をコードするDNA配列をもつマウス、および、G0s2コーディング領域を含む第2エクソンをfloxアリルで持つマウスを交配させた。交配により得られた8～11週齢のマウスに、タモキシフェンを1日1回20μg/g（体重）を6日間連続腹腔内投与し、心筋特異的G0s2ノックアウトを誘発した。

心筋特異的G0s2 KOマウスの遺伝子ノックアウトの確認

タモキシフェン最終投与後7日目にマウスを安楽死させ心臓と骨格筋を回収し、タモキシフェン投与群および非投与群のG0s2 mRNAをRT-PCRを用いて定量した。さらに、ウエスタンブロッティング法を用いて、心臓、肝臓および骨格筋での両群のG0s2タンパク質の発現を確認した。

心エコー図を用いた心筋特異的G0s2 cKOマウスの心機能評価

小動物用高周波超音波エコーを用いて、タモキシフェン投与群および非投与群の心機能を比較した。タモキシフェン最終投与後7日目のマウスを用いた。指標として、左室拡張末期径（LVDd）、左室収縮末期径（LVDd）、左室内径短縮率（%FS）、心拍数（HR）を測定し、心機能を評価した。

心筋梗塞（Myocardial Infarction：MI）モデルの作成

タモキシフェン最終投与後7日目のマウスを用いて、麻酔開胸下で左前下行枝を結紮し、MIモデルを作成した。

MIモデルの生存率比較および心機能評価

MI手術後14日間飼育し、タモキシフェン非投与群および投与群での生存率を比較した。さらに術後14日目まで生存し得たマウスを用いて、心エコーによる心機能評価を行った。

【結果】

G0s2 KOフィッシュの樹立

TALENを用いたゲノム編集技術により、G0s2 KOフィッシュを作成した。TALEN標的配列内に制限酵素StyI認識部位があり、13bp欠失したG0s2ノックアウトアリルはStyIにより切断されないことから、StyIを用いたRFLP法により遺伝子型を判定した。野生型（WT）・ヘテロG0s2ノックアウト変異体（Hetero KO）・ホモG0s2ノックアウト変異体（Homo KO）の存在比はメンデルの法則に従い、G0s2ノックアウトによる初期胚性致死は認めなかった。

ホモG0s2 KOフィッシュの心臓は低酸素刺激の耐性が弱い

G0s2の低酸素状態における臓器保護効果について検討した。低酸素負荷50分後、WTは20匹/39匹（51%）、Hetero KOは38匹/70匹（54%）、Homo KOは10匹/39匹（26%）に心拍を認めた。Homo KO fishの心臓は3群の中で有意に低酸素刺激に対する耐性が弱かった（$p < 0.05$ by χ^2 test）。

心筋特異的G0s2 cKOマウスの遺伝子ノックアウトの確認と心機能評価

mRNAレベルでの心筋G0s2 KOを確認するため、タモキシフェン投与群と非投与群のG0s2 mRNAをRT-PCRを用いて定量した。タモキシフェン投与群の心臓G0s2 mRNAは非投与群に比して約85%減少したが、骨格筋G0s2 mRNAは両群に有意差を認めなかった（両群ともn=4; ±S.E.M.; ***,$p < 0.001$; by Student’s t test）。次にウエスタンブロッティング法にてG0s2タンパク質の発現を確認した。心臓においてタモキシフェン非投与群は発現を認めたが、投与群では認めなかった。一方、肝臓および骨格筋では両群とも発現を認めたことから、心筋特異的なG0s2のノックアウトが確認された。心機能評価としてタモキシフェン投与群と非投与群のLVDd、LVDs、%FS、HRを比較し、いずれも両群に有意差を認めなかった（両群ともn=12; ±S.E.M.; by Student’s t test）。

MIモデルの生存率比較および心機能評価

低酸素モデルを模倣したMIモデルを作成し、タモキシフェン非投与群および投与群のMI手術後の生存率比較を行った。両群ともMI手術後の生存率に有意差を認めなかった（by Log-rank test）。心機能評価も両群に有意差を認めなかった（タモキシフェン非投与群:n=4 ;タモキシフェン投与群:n=6; ±S.E.M.; by Student’s t test）。

【考察】

本研究では、ゼブラフィッシュおよびマウス G0s2 ノックアウトモデルを作成し、生体内での G0s2 の機能解析を行った。Homo KO の心臓は低酸素刺激の耐性能が低いことを示し、G0s2 の低酸素状態における心機能保護作用を明らかにした。また、心筋特異的な G0s2 のノックアウトは正常酸素下では心機能に影響を与えなかったため、低酸素負荷モデルを模倣した MI モデルを作成した。しかしながら MI モデルにおいても cKO は野生型と同様の心機能であった。この結果の一因として、MI モデルでは冠動脈血流の完全かつ永続的な途絶のよる酸素供給の遮断により心筋細胞壊死が生じ、G0s2 の発現が誘導されなかったためと考えられる。今後、心筋細胞壊死を伴わない虚血プレコンディショニングモデルマウスを作成し、更なる検討を予定している。低酸素状態はミトコンドリア機能不全を招き、狭心症や心筋梗塞といった虚血性心疾患および心不全の原因となる。G0s2 の発現を増加させ、ミトコンドリアでの ATP 産生が維持できれば、G0s2 はこれらの疾患の治療標的となる可能性も考えられる。現在我々は G0s2 の発現量を上昇させ、ミトコンドリアでの ATP 産生を促進する創薬候補化合物の探索を行っている。

【結語】

本研究より、ゼブラフィッシュでは低酸素状態における G0s2 の心機能保護作用を明らかにした。マウスにおいては、今後虚血プレコンディショニングモデルを作成し、更なる G0s2 の機能解析を進める予定である。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　寺元　健　）			
論文審査担当者		（職）	氏　名
	主 査	教授	古郷幹彦
	副 査	教授	吉田　篤
	副 査	准教授	豊田博紀
	副 査	講師	山下元三

論文審査の結果の要旨

本研究は、in vitro でミトコンドリアでの ATP 産生能を増強させることが示されている低酸素誘導タンパク質 G0/G1 switch gene 2(G0s2)の生体内機能について遺伝子改変動物を用いて検討した。低酸素ストレス下における G0s2 の心機能保護作用を示した。本研究により、G0s2 は in vivo においてもミトコンドリアでの ATP 産生能を高める可能性が示唆された。本研究は G0s2 の機能を解明した点で評価され、よって博士（歯学）の学位論文として価値のあるものと認める。