

令和 2 年 6 月 17 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08527

研究課題名(和文) 新たな心機能調節シグナル経路としてのCaMKキナーゼIV：遺伝子欠損マウスを用いて

研究課題名(英文) Involvement of Calcium/ Calmodulin-Dependent Protein Kinase IV in the sympathetic nerve regulation in the heart

研究代表者

村上 学 (murakami, manabu)

弘前大学・医学研究科・教授

研究者番号：80302090

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：心筋収縮には心筋細胞内のカルシウムイオン濃度の変化が重要である。本研究ではCa/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼIV(CaMKIV)の心筋における機能の解明を、その遺伝子欠損マウスを用いて解析した。CaMKIV欠損マウスではカルシウムチャネルの発現が有意に低下していた。プロプラノロールによる心拍数低下反応が有意に減弱していた。そのほか、心房筋収縮においても、1-アドレナリン受容体刺激に対する反応性の低下が認められた。以上の結果から、CaMKIVは交感神経に関与するカスケードを介し、心機能を調節することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心肥大形成におけるカルシウム(Ca)の役割が注目されている。細胞内Caレベルの上昇により、Ca/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ(CaMK)が活性化し、心肥大関連遺伝子を活性化する。本研究では心筋細胞内のカルシウムによる情報伝達に着目し、遺伝子欠損マウスを用い、Ca/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼタイプIVの心筋収縮における重要性を検討した。マウス個体、単離心筋、培養心筋などにおいて、CaMKIV欠損により交感神経刺激に対する反応性の低下が認められた。本研究によりCaMKIVを標的とする心筋保護治療への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：CaMKIV is a multifunctional, serine-threonine protein kinase that is activated with intracellular calcium (Ca<sup>2+</sup>). On the other hand, importance of CaMKIV in the sympathetic nerve regulation still remains obscure. In the present study, we examined cardiovascular system and sympathetic nerve control to carefully dissect the effects of CaMKIV deficiency. RT-PCR and immunostaining revealed decreased expression of voltage-dependent calcium channels (CaV1.2) in the CaMKIVko heart. ECG analysis revealed decreased baro-reflex responses in the mutant mice. In the inotropic atrial contraction analysis, CaMKIVko heart showed decreased responsiveness to isoproterenol. Taken together, our analysis revealed modulatory role of CaMKIV kinase in the sympathetic nerve control.

研究分野：循環薬理学

キーワード：カルシウム マウス 遺伝子

### 1.研究開始当初の背景

高齢化社会の進行に伴い、近未来的な心不全パンデミックが危惧されている。高血圧などの機械的負荷や交感神経刺激などが細胞内 Ca レベルを上昇させる。細胞内 Ca レベルの上昇により、Ca/カルモデュリン依存性プロテインキナーゼ (CaM キナーゼ:CaMK)が活性化し、転写因子である myocyte enhancer factor 2(MEF2)を活性化し、骨格筋アクチンなどの心肥大関連遺伝子を活性化する。心筋収縮力の低下は、心不全の主要な原因である。心筋収縮には心筋細胞内のカルシウムイオン濃度の変化が重要である。研究代表者はこれまで主に細胞外からのカルシウム流入機構に携わって来た。本研究では心筋細胞内のカルシウムによる情報伝達に着目し、Ca/カルモデュリン依存性プロテインキナーゼの心筋収縮における重要性を検討することとした。従来、心筋において主要なCa/カルモデュリン 依存性プロテインキナーゼはタイプIIと考えられて来たが、他に心筋におけるタイプIVの存在も知られている。しかし、心筋におけるCa/カルモデュリン依存性プロテインキナーゼタイプIVの重要性は不明である。そこで、本研究では本研究ではCa/カルモデュリン依存性プロテインキナーゼIV( CaMKIV )遺伝子欠損マウスを用い、個体、組織、細胞の各レベルで、重要な心不全進行因子である交感神経刺激に対する反応を精査することとした。

### 2.研究の目的

本研究ではCa/カルモデュリン依存性プロテインキナーゼIV( CaMKIV ) の心筋における機能の解明を目指した。「CaMKIVがL型電位依存性 Ca チャネル発現を誘導する。かつ、心筋における交感神経制御にも関与する。」という仮説を着想し、本研究ではCaMKIV欠損マウスを用い、1遺伝子発現、2個体(心電図、血圧、超音波)、3組織(心筋収縮、活動電位)、4細胞( Ca 濃度)における交感神経刺激に対する反応を精査し、仮説を検証することとした。

### 3.研究の方法

遺伝子改変により作製した CaMKIV欠損マウスを用い、心筋収縮における CaMKIV の重要性を検討した。下記項目を行なった。a.心肥大、心収縮に関与する遺伝子発現の変化( CREB、MEF2、Caチャンネルなど) b.個体における交感神経制御機構(交感神経刺激と心電図、超音波、血圧変動) c.組織レベルでの交感神経刺激に対する応答性(心筋の活動電位や収縮) d.心筋の初代培養細胞を用いる実験系:野生型、および CaMKIV 欠損マウスから心筋細胞を単離・培養し、遺伝子過剰発現系等を用い、CaMKIV の重要性を検定する。 e.細胞レベルにおける変化(電位依存性 Ca チャネル特性を細胞内 Ca 濃度測定)

### 4.研究成果

RT-PCRにおいて、CaMKIV欠損マウスではCaMKIVの発現がないこと、カルシウムチャンネルCaV1.2のmRNA発現レベルの低下が見られた。免疫染色においても、CaV1.2が有意に低下していた。HE染色では形態上の変化は認められなかった。心電図上、CaMKIV欠損マウスでは、心拍数に違いを認めなかった。頸動脈反射では 心拍数の上昇が有意に減弱していた。また、プロプラノロールによる心拍数低下が 有意に減弱していた。さらに、QT、QTcが有意に短縮していた。そのほか、心房筋収縮、CREB活性においても、1-アドレナリン受容体刺激に対する反応性の低下が認められた。

以上の結果から、CaMKIV は 1-アドレナリン受容体が関与するカスケードを介し、心機能を調

節する重要な因子であることが示唆された。本研究は現在論文投稿中である。本研究により CaMKIV を標的とする心筋保護治療への応用・展開が期待される。

本研究を施行する過程で心電図測定、遺伝子発現などに関しても、相応の研究発表を行うことができた(論文、学会発表参照)。新規遺伝子発現系を確立し、大腸菌レベルで目的遺伝子のタンパク発現や解析を短期間で行うことも可能とした。哺乳類細胞への応用も可能であり、新たな応用・展開が期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yonekura M, Kondoh N, Han C, Toyama Y, Ohba T, Ono K, Itagaki S, Tomita H, Murakami M.	4. 巻 137
2. 論文標題 Medaka as a model for ECG analysis and the effect of verapamil.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Pharmacol Sci.	6. 最初と最後の頁 55-60
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jphs.2018.04.003.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Murakami M, Murakami AM, Ohba T.	4. 巻 68
2. 論文標題 A comparative study of the internal ribosome entry site-containing expression system	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Hirosaki Medical Journal	6. 最初と最後の頁 44-51
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kuwasaki K, Kitamura K, Nagata S, Sekiguchi T, Danfeng Z, Murakami M, Hattori Y, Kato J.	4. 巻 487
2. 論文標題 beta-arrestins negatively control human adrenomedullin type 1-receptor internalization	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 438-443
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2017.04.083. Epub 2017 Apr 17.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ohba T, Watanabe H, Murakami M, Iino K, Adachi T, Baba Y, Kurosaki T, Ono K, Ito H.	4. 巻 12
2. 論文標題 Stromal interaction molecule 1 haploinsufficiency causes maladaptive response to pressure overload.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 1-14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0187950. eCollection 2017.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Toyama T, Yonekura M, Arakawa Y, Higuchi S, Tomita H, Murakami AM, Itagaki S, and Murakami M	4. 巻 70
2. 論文標題 Establishment of cardiac action potential recording using a membrane potential indicator in the mouse sinoatrial node	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Hirosaki Medical Journal	6. 最初と最後の頁 163-171
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 中山晋介、大場貴喜、村上アグニェシュカ、板垣 史郎、村上 学
2. 発表標題 大腸菌、および真核細胞における遺伝子発現プラスミドの開発、およびカルシウムチャネル研究への応用
3. 学会等名 日本平滑筋学
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 村上 学、大場 貴喜、村上 アグニェシュカ、板垣 史郎
2. 発表標題 大腸菌、および真核細胞における遺伝子発現プラスミドの開発、およびカルシウムチャネル研究への応用
3. 学会等名 日本薬理学会 北部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 村上 学、大場貴喜、村上アグニェシュカ、板垣 史郎
2. 発表標題 大腸菌、および真核細胞での遺伝子発現システム (pgMAX) の開発とカルシウムチャネル研究への応用
3. 学会等名 東北生理談話会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Murakami M, Ohba T, Murakami AM, Itagaki S.
2. 発表標題 A simple and dual expression plasmid system in prokaryotic (E. coli) and mammalian cells.
3. 学会等名 日本薬理学会年会 (誌上開催)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Han C, Yoneyama T, Toyama Y, Yonekura M, Ohyama C, Murakami M.
2. 発表標題 Anti-tumor growth effect of STIM1 suppression
3. 学会等名 日本薬理学会年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	尾野 恭一 (Ono Kyoichi)  (70185635)	秋田大学・医学系研究科・教授  (11401)	
研究分担者	大場 貴喜 (Ohba Takayoshi)  (80431625)	秋田大学・医学系研究科・講師  (11401)	
研究分担者	阪上 洋行 (Sakagami Hiroyuki)  (90261528)	北里大学・医学部・教授  (32607)	