

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K09583

研究課題名(和文) PKG1 ロイシンジッパーを介した動態制御の解明と心不全治療の応用

研究課題名(英文) Therapeutic application of PKG-1α redox modulation and the disparate cGMP regulation in heart failure

研究代表者

中村 太志 (Nakamura, Taishi)

熊本大学・病院・准教授

研究者番号：60582947

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)：本研究は、PKG1 の特異的なシステイン(C42)酸化を介す細胞内局在化と基質相互作用変化の分子機序およびその意義について解析した。ジスルフィド酸化型は、PKG1 の疎水性変化に関わり、リン酸化機序によりホスホジエステラーゼ5阻害薬の反応性を制御することがわかった。また、チュベリン(TSC2)上に同定したPKGリン酸化部位がTSC2を正に制御し、病的肥大を抑制する新規経路を共同で報告し、同リン酸化部位がC42酸化により抑制されるレドックス依存性mTORC1シグナルを明らかにした。本研究の遂行により、サイクリックGMPシグナルの層別化と心不全治療におけるPKG1 の標的有用性を示すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞内サイクリックGMPとプロテインキナーゼ(PKG1)の活性化は、超高齢社会で蔓延する心不全の治療標的として期待されている。本研究は、活性レベルとは独立し、PKG1 の機能を制御することがわかってきた特異的なシステインレドックス調節機構に焦点をあてた研究であり、C42酸化による細胞内局在化と基質相互作用変化の分子機序の解明により、その標的有用性と治療応用としての発展性を示すトランスレーショナルな臨床的意義の高い研究である。

研究成果の概要(英文)：Intracellular cGMP and the main effector PKG1 prevent pathological hypertrophy and heart failure. PKG is principally activated by cGMP binding to the regulatory site, but it can be stimulated with oxidation at C42 where is located near N-terminal dimerization domain. We found the redox modulation controls subcellular localization and protein-protein interaction to the substrates, independently of kinase activity. C42 oxidation resulted in enhancing colocalization with PDE5 and thus phosphorylate S92, which explains PDE5 inhibitor is responsive as the disease severity goes worse. Moreover, we found anew phosphorylation site in tuberin (TSC2) which negatively regulates the downstream mTORC1 signaling and thereby leads to suppress maladaptive hypertrophy. We also uncovered the phosphorylation site at TSC2 can be hampered by C42 oxidation. Our research works successfully contribute to provide a new concept into heart failure therapy leveraging cGMP/PKG signaling.

研究分野：循環器内科

キーワード：プロテインキナーゼG 心不全 システインレドックス サイクリックGMPシグナルの層別化 病的肥大

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

超高齢社会において、蔓延が予想される心不全に対し最適な治療法の確立は急務である。従来の標準治療と比べ、優越性が示された心不全治療戦略として、細胞内セカンドメッセンジャーであるサイクリック GMP(cGMP)を介す心血管保護効果が期待されている。心血管組織に発現する PKG1 α は、cGMP の結合で惹起される構造変化によって活性化するホモ二量体のリン酸化酵素であり、cGMP シグナルの主要なエフェクターとして中心的な役割を果たしている。そのため、cGMP レベルの増加戦略だけでなく、PKG1 α の活性化は心不全に対する有用な治療戦略として期待されているが、未だ標的とはされていない。近年、cGMP の共存がなくても、PKG1 α のタンパク質二量体ドメインを構成するロイシンジッパーの近傍で N 端側から 42 番目のシステイン残基(C42)が特異的に酸化されるだけでも、分子内ジスルフィド架橋(SS 結合)を介す二量体化により機能が変化することが報告された¹。マウスから単離された腸管膜動脈において、過酸化水素による血管弛緩反応が C42 の酸化を予防すると抑制されることから、この cGMP 非依存性の活性調節は細小血管レベルの血管弛緩に寄与し、僅かだが C42 の酸化が降圧作用に関与することがわかってきた²。一方、申請者は、心臓における C42 酸化が PKG 本来の抗肥大作用を減弱させる(Loss-of-function)ことを明らかにし³、キナーゼ活性のレベルに依らない機構として、①細胞膜への移行(細胞内局在化)、ならびに②伸展刺激によりカルシウムを流入させる受容体活性型カルシウムチャネル(TRPC6)との基質相互作用(リン酸化)が変化するなど、PKG1 α レドックス制御を心臓で初めて報告した(図 1)。本研究では、PKG1 α が疎水性や立体構造を変えながら基質標的を空間制御する機構について解析することで、cGMP シグナルの層別化と PKG の標的有用性の確立を目指す研究である。

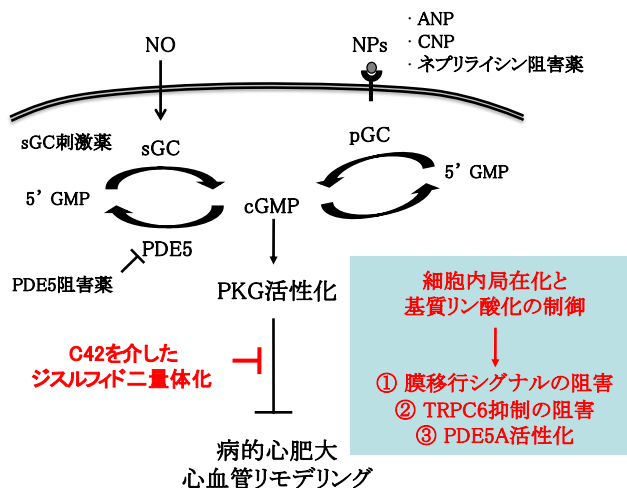


図1 PKG1 α レドックス制御機構の概要

2. 研究の目的

以下の研究計画より、PKG1 α レドックス制御機構を介す心不全での標的有用性を明らかにする。

- (1) PKG1 α 上の N 端の基質相互作用を介した空間制御を解明する。
- (2) 基質を含めた細胞内局在化(膜移行)シグナルを蛍光可視化し、動態制御を明らかにする。
- (3) ラット心筋培養細胞やマウス心筋において、薬剤の反応性や基質リン酸化制御を解析し、抗肥大作用における cGMP シグナルの格差を明らかにする。
- (4) PKG1 α レドックス制御のバイオマーカーとしての確立と心不全治療への応用を目指す。

3. 研究の方法

(1) リコンビナント PKG1 α の作製

細胞内局在化への PKG1 α レドックス制御の関与を検討するため、ヒトの野生型 PKG1 α および C42 をセリンに置換したレドックス非感受性(C42S)の PKG1 α コンストラクトを作製した。さらに、N 端の構造変化に起因した局在性変化を検討するため、二量体ドメインのロイシンジッパーを変異させた PKG1 α を作製した。作製した遺伝子を導入した培養心筋細胞を用い、PKG1 α の局在化シグナルの可視化と動態

制御を解析した。

(2) 単離心筋細胞を用いた免疫染色

ランゲンドルフ灌流装置でアダルトマウスの心臓から単離した心筋細胞を用い、圧負荷誘導心肥大などの病態モデルや活性刺激有無による内在性 PKG の局在変化と PDE5 との共局在について、レーザー共焦点顕微鏡で観察評価した。

(3) PDE5 のリン酸化と活性レベルの解析

野生型およびレドックス非感受性マウスの心筋組織および単離心筋細胞を用い、PKG1α レドックス制御による PDE5 リン酸化への影響をウエスタンブロッティングで比較検討した。同様の心筋および心筋細胞で PDE5 の活性レベルを ELISA で測定し、C42 酸化の有無で比較評価した。また、PDE5 阻害薬および可溶性グアニル酸シクラーゼ活性化薬間での cGMP/PKG シグナル格差を PKG1α レドックス制御の観点から比較検討した。

(4) ラット心筋細胞を用いた網羅的リン酸化プロテオーム解析

野生型およびレドックス非感受性 PKG1α を発現させたラット心筋細胞を用い、PKG 基質のリン酸化修飾を質量分析計で網羅的に解析し、新規基質の同定とPKG1αレドックス制御による基質相互作用の応用研究のための資料とした。

(5) 細胞内シグナル伝達の格差評価と表現型解析

上記(4)で同定した PKG 基質の中で、PKG1αレドックス制御によりリン酸化修飾に格差を認めた基質については、胎児ラット心筋細胞での予備検討を経て、リン酸化変異マウスを作製し機能解析を進めた。

4. 研究成果

(1) PKG1α の細胞内局在の変化

PKG は細胞質内に存在するリン酸化酵素として知られている。しかし、外的な刺激により一過性に膜へ移行することが報告されている。申請者らの研究により、この細胞内局在の変化には、C42 を介すレドックス制御機構が密接に関与していることがわかってきた³。膜に移行した PKG は還元型のみである一方、PKG 上の C42 が特異的に酸化されジスルフィド二量体化した PKG は細胞質内に安定化しており、酵素活性レベルとは独立した細胞内局在化の機序を明らかにした^{3,4}。

(2) PKG と PDE5 の共局在とリン酸化修飾

サイクリック GMP を加水分解する PDE5 は PKG の基質であり、PKG のリン酸化機序により酵素活性が調整されている。申請者は、C42 を介すジスルフィド PKG 二量体が、PDE5 における S92 のリン酸化を増強することを明らかにした。また、この親和性の増加は、レドックス制御性に变化する PKG との共局在が増加することに起因することを明らかにした(図 2)。PKG 酸化による PDE5 リン酸化増強は、肺高血圧症の治療薬である PDE5 阻害薬の反応性を変えることがわかり、今後の薬物治療への影響が予想される⁴。

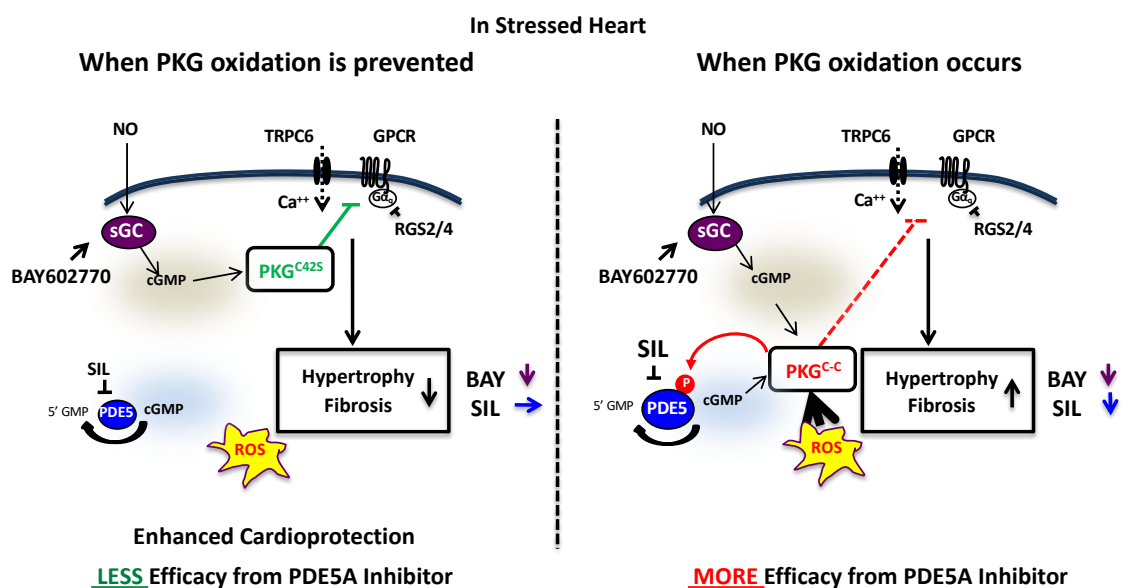


図2 Summarized illustration for the relationship between PKG and PDE5

(3) 新規 PKG 基質チュベリン(TSC2)の表現型解析

網羅的なリン酸化プロテオーム解析で、病的肥大との関連性が指摘されている機械的ラパマイシン標的タンパク質 mTOR シグナルを負に制御している TSC2 上に新規リン酸化部位を同定したため(図 3A)、その機能解析を行った。PKG を導入した胎仔ラット心筋細胞を用いた先行実験により、エンドセリン ET1 刺激による mTOR 下流の病的肥大シグナルが、既知の TSC2 の上流因子に関わらず、PKG による TSC2 リン酸化が抑制されると、有意に進展されることがわかった(図 3B)。そのため、共同研究によりリン酸化変異マウスを作製した上で表現型解析を行い、PKG/TSC2/mTORC1 シグナルによる新たな心肥大抑制の機序とその生理的な意義を見出し、共著にて報告した⁵。

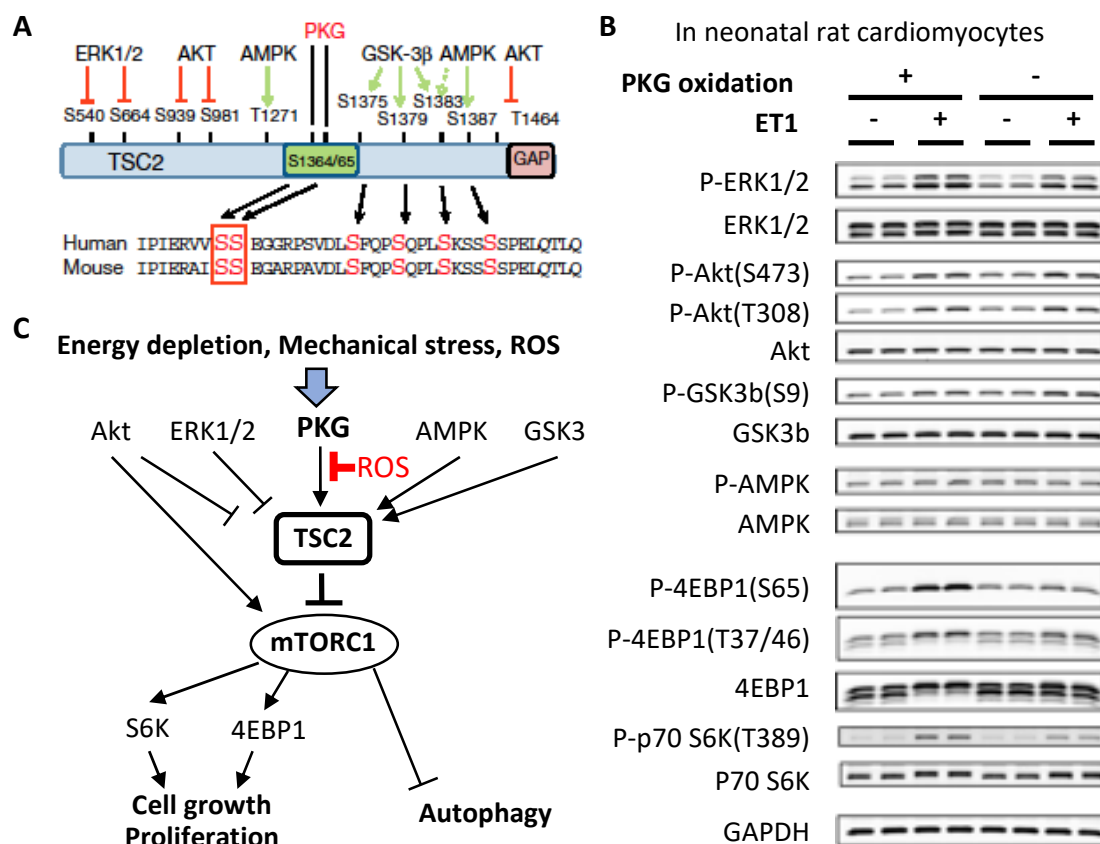


図3 PKG/TSC2/mTORC1 signaling in preventing pathological hypertrophy

(4) PKG1 α レドックス制御による基質相互作用変化 (TSC2 リン酸化)

引き続き、上記で見出した TSC2 リン酸化部位における PKG レドックス制御の意義を検討した。胸部大動脈縮窄による圧負荷誘導心肥大モデルにおいて、C42 を介した PKG の酸化は TSC2 のリン酸化を抑制することで、mTORC1 シグナルを負に制御できず、PKG による病的肥大抑制効果が減弱することを明らかにした(図 3C)⁶。

(5) PKG1 α レドックス制御による cGMP/PKG シグナルの格差と心不全への臨床応用としての展望について、本研究から得られた結果成果の視点から総説として報告した⁷。

<引用文献>

1. Burgoyne, J. R. *et al.* Cysteine redox sensor in PKGI α enables oxidant-induced activation. *Science* 317, 1393-1397, doi:10.1126/science.1144318 (2007).
2. Pryszyzhna, O., Rudyk, O. & Eaton, P. Single atom substitution in mouse protein kinase G eliminates oxidant sensing to cause hypertension. *Nat Med* 18, 286-290, doi:10.1038/nm.2603 (2012).
3. Nakamura, T. *et al.* Prevention of PKG1 α oxidation augments cardioprotection in the stressed heart. *J Clin Invest* 125, 2468-2472, doi:10.1172/JCI80275 (2015).
4. Nakamura, T. *et al.* Prevention of PKG-1 α Oxidation Suppresses Antihypertrophic/Antifibrotic Effects From PDE5 Inhibition but not sGC Stimulation. *Circ Heart Fail* 11, e004740, doi:10.1161/CIRCHEARTFAILURE.117.004740 (2018).
5. Ranek, M. J. *et al.* PKG1-modified TSC2 regulates mTORC1 activity to counter adverse cardiac stress. *Nature* 566, 264-269, doi:10.1038/s41586-019-0895-y (2019).

6. Oeung, C. U. *et al.* PKG1alpha Cysteine-42 Redox State Controls mTORC1 Activation in Pathological Cardiac Hypertrophy. *Circ Res* 127, 522-533, doi:10.1161/CIRCRESAHA.119.315714 (2020).
7. Nakamura, T. & Tsujita, K. Current trends and future perspectives for heart failure treatment leveraging cGMP modifiers and the practical effector PKG. *J Cardiol*, doi:10.1016/j.jjcc.2021.03.004 (2021).

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 4件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nakamura T, Tsujita K.	4. 巻 Online ahead of print
2. 論文標題 Current trends and future perspectives for heart failure treatment leveraging cGMP modifiers and the practical effector PKG.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Cardiol.	6. 最初と最後の頁 S0914-5087(21)
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jjcc.2021.03.004.	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 Oeing CU, Nakamura T, Pan S, Mishra S, Dunkerly-Eyring BL, Kokkonen-Simon KM, Lin BL, Chen A, Zhu G, Bedja D, Lee DI, Kass DA, Ranek MJ.	4. 巻 127
2. 論文標題 PKG1 Cysteine-42 Redox State Controls mTORC1 Activation in Pathological Cardiac Hypertrophy.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Circ Res.	6. 最初と最後の頁 522-523
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1161/CIRCRESAHA.119.315714.	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 該当する
1. 著者名 Ranek Mark J., Kokkonen-Simon Kristen M., Chen Anna, Dunkerly-Eyring Brittany L., Vera Miguel Pinilla, Oeing Christian U., Patel Chirag H., Nakamura Taishi, Zhu Guangshuo, Bedja Djahida, Sasaki Masayuki, Holewinski Ronald J., Van Eyk Jennifer E., Powell Jonathan D., Lee Dong Ik, Kass David A.	4. 巻 566
2. 論文標題 PKG1-modified TSC2 regulates mTORC1 activity to counter adverse cardiac stress	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 264 ~ 269
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41586-019-0895-y	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 該当する
1. 著者名 Nakamura T, Zhu G, Ranek MJ, Kokkonen-Simon K, Zhang M, Kim GE, Tsujita K, Kass DA.	4. 巻 11
2. 論文標題 Prevention of PKG-1 oxidation suppresses antihypertrophic/antifibrotic effects from PDE5 inhibition but not sGC stimulation.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Circ Heart Fail.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.117.004740.	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 該当する

1. 著者名 Kokkonen-Simon KM, Saberi A, Nakamura T, Ranek MJ, Zhu G, Bedja D, Kuhn M, Halushka MK, Lee DI, Kass DA.	4. 巻 3
2. 論文標題 Marked disparity of microRNA modulation by cGMP-selective PDE5 versus PDE9 inhibitors in heart disease.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 JCI Insight.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/jci.insight.121739.	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 該当する

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 中村太志, 辻田賢一
2. 発表標題 HFpEFをどのように考え、アプローチするか(基礎)
3. 学会等名 第24回日本心不全学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Nakamura T, Tokunaga N, Mitsuyama S, Tsujita K.
2. 発表標題 Single Cysteine Redox Sensor in PKG1 Controls Salt Sensitivity through Renal Sympathetic Nerve Activity.
3. 学会等名 The 84rd Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中村太志, 徳永信行, 長谷川雄, 光山勝慶, 宇宿功市郎, 辻田賢一
2. 発表標題 PKG1 の特異的なシステイン酸化による二量体化は腎交感神経を介し食塩感受性を誘導する
3. 学会等名 第19回日本NO学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村太志, 徳永信行, 長谷川雄, 光山勝慶, 宇宿功市郎, 辻田賢一
2. 発表標題 プロテインキナーゼG(PKG) 1 のジスルフィド二量体化の予防は、腎交感神経を介して食塩感受性を緩和し心腎血管連関における有用な治療戦略である
3. 学会等名 第42回日本高血圧学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 徳永信行, 中村太志, 山本英一郎, 光山勝慶, 辻田賢一
2. 発表標題 サイクリックGMP依存性プロテインキナーゼ(PKG1)の酸化は心臓交感神経系を介し、食塩感受性高血圧を惹起する
3. 学会等名 第42回日本高血圧学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tokunaga N, Nakamura T, Tsujita K
2. 発表標題 The Oxidation of Cyclic GMP-dependent Protein Kinase-1 Induced Salt Sensitive Hypertension through Activated Sympathetic Nervous System.
3. 学会等名 American Heart Association Scientific Sessions 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nakamura T.
2. 発表標題 Pharmacological Cyclic GMP Intervention and the Disparate MicroRNA Modulations in Heart Disease.
3. 学会等名 The 10th Annual International Congress of Cardiology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1 . 発表者名 Nakamura T, Tokunaga N, Mitsuyama S, Tsujita K.
2 . 発表標題 Single Cysteine Redox in PKG1 Controls Salt Sensitivity through Sympathetic Nervous System.
3 . 学会等名 The 83rd Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Nakamura T, Zhu G, Ranek MJ, Tsujita K, Kass DA
2 . 発表標題 PKG1 oxidation is required for cardiac anti-hypertrophic/fibrotic effects from PDE5 inhibition but not soluble guanylate cyclase activation.
3 . 学会等名 American Heart Association Scientific Sessions 2017 (国際学会)
4 . 発表年 2017年

1 . 発表者名 Nakamura T, Tsujita K, Kass DA
2 . 発表標題 PKG1 Disulfide Formation in the Stressed Heart -Differential Efficacy from cGMP Modulators-
3 . 学会等名 The 1st JCS Council Forum on Basic CardioVascular Research
4 . 発表年 2018年

1 . 発表者名 Nakamura T, Kass DA, Tsujita K
2 . 発表標題 PKG1 disulfide formation by oxidation facilitates anti-hypertrophic/anti-fibrotic effects from PDE5 inhibition but not sGC activation
3 . 学会等名 The 82nd Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society
4 . 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

ResearchGate https://www.researchgate.net kass lab https://kasslab.johnshopkins.edu
--

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	泉家 康宏 (Izumiya Yasuhiro) (10515414)	熊本大学・病院・非常勤診療医師 (17401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
米国	Johns Hopkins Medical Institutions	Division of Cardiology	