

平成 21 年 6 月 1 日現在

研究種目：基盤研究 (A)

研究期間：2007 ～ 2008

課題番号：19209030

研究課題名 (和文) 細胞内ナノドメイン機能制御による心不全治療法の開発

研究課題名 (英文) Exploration into the Development of New Therapy for Heart Failure by Modifying Sarcoplasmic Reticulum Nanodomain Function

研究代表者

松崎 益徳 (MATSUZAKI MASUNORI)

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：60116754

## 研究成果の概要：

重症心不全の心筋細胞でみられる  $Ca^{2+}$  循環制御蛋白のリン酸化異常を惹起する分子機構を解明し、治療応用するための基盤的研究である。心筋から精製した筋小胞体 (SR) 再分画を使って、各ドメイン蛋白群 ( $Ca^{2+}$  放出 SR: Junctional SR,  $Ca^{2+}$  取り込み SR: Longitudinal SR) をそれぞれ同定し、リン酸化制御に関する主要蛋白の蛋白相互作用・機能解析を行った。また、その中でも最も重要な蛋白で  $Ca^{2+}$  放出チャネルあるリアノジン受容体 (RyR) について、機能安定化作用を有するアミノ酸配列を同定した。さらに筋小胞体表面の脱リン酸化調節をおこなう蛋白ホスファターゼ 1 の最も重要なアイソフォームを同定した。これら発見は心不全に対する分子標的療法を確立していくうえで重要な知見になると考えられた。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	28,800,000	8,640,000	37,440,000
2008年度	10,200,000	3,060,000	13,260,000
年度			
年度			
年度			
総計	39,000,000	11,700,000	50,700,000

研究分野：循環器内科・心臓病態学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：(1) sarcoplasmic reticulum(SR) (2) shotgun proteomics (3) junctional SR (4) longitudinal SR (5) calcium (6) protein phosphatase 1 (7) ryanodine receptor

## 1. 研究開始当初の背景

我々は、心不全の基礎病態には筋小胞体 (SR)  $Ca^{2+}$  制御異常が重要であり、分子標的介入による機能は正で心不全が治療できることを示してきた。具体的には、

(1) ホスホランパン (PLN) 機能抑制は、心機能を改善し心不全進行を予防する (Hoshijima M, Ikeda Y et al., Nat

Med, 2002, Iwanaga Y et al, JCI 2004)。

(2) 蛋白ホスファターゼ 1 (PP1) の内因性阻害蛋白 (INH-2) による抑制は PLN のリン酸化を改善させ、心機能改善・生命予後改善をもたらす (Yamada M Ikeda Y et al, FASEB J, 2006)。

(3) リアノジン受容体 (RyR) 安定化は心不全の心機能を改善するとともに、

致死的不整脈を軽減させる可能性がある (Yano et al, Circulation 2003, Yano et al, Circulation 2005)。

我々の提唱する治療戦略は、多面的アプローチにより  $Ca^{2+}$ 貯蔵庫としての SR 機能を回復させることである。SR 機能調節異常に関わる重要な点として、RyR と PLN のリン酸化状態のアンバランスがあげられる(図 1)。つまり、同じ SR 上の  $Ca^{2+}$ 調節蛋白でありながら、異なるリン酸化バランスが惹起されてしまうために、結果的に SR 内  $Ca^{2+}$ 含量低下をきたし、正常な心筋収縮が障害されることが問題となる。ところが、SR 局所のリン酸化を制御する一群の蛋白とその機能については、不明な部分が多い。

心筋細胞の SR は RyR を多く含む Junctional SR (J-SR) と筋小胞体 ATPase (SERCA) や PLN を多く含む Longitudinal SR (L-SR) に分離可能である (Inui, JBC 1988)。したがって、リン酸化制御を行う一群の蛋白群もそれぞれ二つの SR 分画ごとに構成されていると考えられる。

J-SR でリン酸化制御に関わる一群の蛋白 (J-ドメイン)、L-SR でリン酸化制御に関わる一群の蛋白 (L-ドメイン) をプロテオーム解析で同定し、リン酸化調節ならびに  $Ca^{2+}$ 制御機能を検討することで新しい心不全療法の開発基盤になるのではないかと考えるに至った (SR リン酸化制御ナノドメイン仮説)。

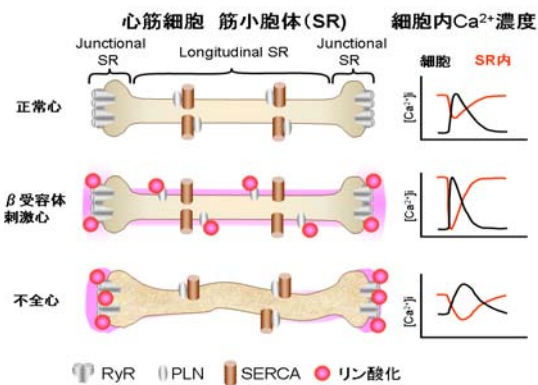


図 1 : 筋小胞体関連蛋白のリン酸化と細胞内  $Ca^{2+}$ 濃度変化 リン酸化亢進した部分をピンク色で示す

## 2. 研究の目的

不全心での心筋細胞筋小胞体 (SR) 局所リン酸化制御 (J/L) ドメインの機能異常を是正する分子標的治療法の開発基盤を整える。

(1) 不全心における (J/L) ドメインを形成する蛋白群の網羅的プロテオーム同定と

## 蛋白機能解析

(2) 筋小胞体リン酸化ドメイン蛋白の脱リン酸化制御を標的とした分子標的療法の開発を行う。

## 3. 研究の方法

(1) 精製筋小胞体の構成蛋白同定：プロテオーム解析用に精製された心筋細胞筋小胞体 (SR) を段階的遠心法+密度勾配超遠心法で longitudinal SR ドメイン、Junctional SR ドメインを分離精製し、構成蛋白をショットガンプロテオミクスで同定し、蛋白相互作用を解析する用法を開発した。

正常心の試料では、ミトコンドリア蛋白、核分画、細胞膜などのコンタミを定量し、プロテオミクスにおける蛋白定量の際に考慮した。Longitudinal SR 分画は ATP、 $Mg^{2+}$ 存在下で  $Ca^{2+}$ 負荷を行うと SR 内に  $Ca^{2+}$ が取り込まれ比重が大きくなることからコンタミの少ない試料調整が可能であったが、Junctional SR 分画は、30%程度のミトコンドリア膜成分を中心とした蛋白のコンタミがみられた。

## (2) RyR 安定化蛋白の同定

RyR のチャンネル機構は 5000 以上のアミノ酸が 3 次的に構築する 3 つのドメインの構造によってチャンネル活性が制御されていると考えられている。以前の研究で RyR を安定化させる作用のある K201 (JVT519) の結合部位を同定することによって、RyR 安定化に関わる重要なペプチド配列を同定した。解析には Quartz Crystal Microbalance (QCM) 法を用いて、K201 と RyR ペプチドフラグメントの結合強度を定量した (図 2)。

K201-binding assay using Quartz Crystal Microbalance (QCM): a very high sensitive mass-measuring system

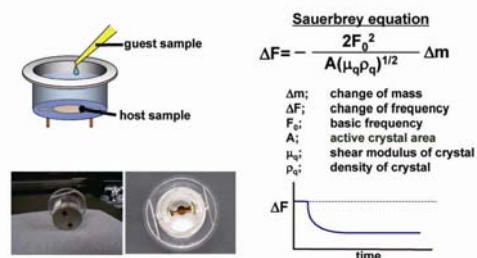


図 2 Quartz Crystal Microbalance (QCM) 法による RyR ドメインと K201 相互作用同定

(3) 筋小胞体脱リン酸化に関わる蛋白ホスファターゼ 1 (PP1) アイソフォームの同定 PP1 の触媒蛋白は 3 つの遺伝子 ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) で構成され、アミノ末端とカルボキシル末端のアミノ酸配列の違いで標的脱リン酸化部位が制御されている。この 3 つの PP1 触媒酵素に

対する RNAi をアデノウイルスベクターで単離培養心筋細胞に導入し SR Ca<sup>2+</sup>循環調節機能に及ぼす影響について解析した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 精製筋小胞体の構成蛋白同定：

Longitudinal SR ドメインから SR 構成蛋白 252 を同定した。最も高頻度に検出された蛋白は、SERCA2a、GRP78、GRP94、sarcalumenin、calsequestrin、phospholamban (PLN) などであった。同定された蛋白の大部分は SR ないし endoplasmic reticulum (ER) に豊富に局在することが既に報告された蛋白で、機能未知の蛋白も 30 個程度認められた (今後機能解析の予定)。また、従来からの段階的遠心分離法では、十分な SR 分画を得るために 100g 程度 (イヌ心筋 1 頭分) が必要であったが、購入した自動細胞分画分離装置を使って、少量の筋小胞体を自動的に精製する手法を確立し、マウスやラット心筋からも比較的コンタミの少ない SR 分画を精製することに成功した。また従来から解析を行っている蛋白ホスファターゼ 1 については、PP1β と α が Ca<sup>2+</sup>取り込み側 (Longitudinal SR)、PP1γ が Junctional SR 側に多いことが判明した (図 3)。

##### PP1β Is Most Effectively Enriched in the Canine Longitudinal SR

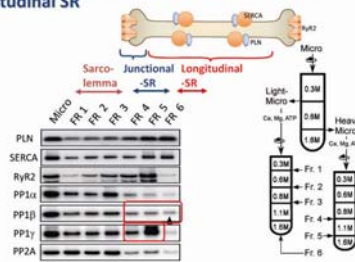


図 3：筋小胞体 J-SR、L-SR における PP1 アイソフォームの分布

##### (2) リアノジン受容体 (RyR) 安定化蛋白の同定

これまでの研究成果から K201 は細胞膜に存在するアネキシン V と結合することが報告されており、結合部位同定されている。我々は K201 とアネキシン V との結合部位のアミノ酸配列と相同性のある配列を RyR セントラルドメイン近傍に見いだした (DP2114-2149)。ペプチドフラグメント化し

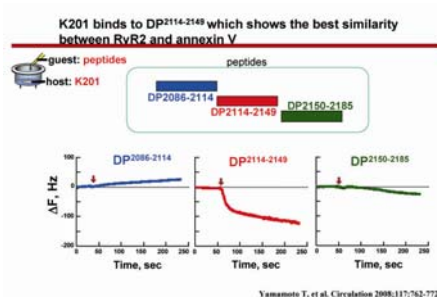


図 4：K201 と RyR ペプチドの QCM 法による結合強度の変化

たアミノ酸配列と K201 の間のタンパク相互作用を QCM 法で解析すると RyR のペプチドフラグメント DP2114-2149 でのみ特異的に K201 の結合強度が増強した (図 4 中央パネル)。

(3) 筋小胞体脱リン酸化に関わる蛋白ホスファターゼアイソフォームの同定  
心筋細胞の PP1 アイソフォームをノックダウンすると PP1β がもっとも PLN のリン酸化状態を変化させた。PP1β は各種不全心で発現量が増加しており治療標的になる可能性がある (図 5)。

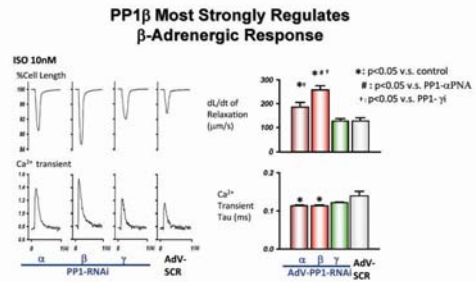


図 5：PP1 アイソフォームノックダウンによる心筋収縮・Ca<sup>2+</sup>トランジエントの変化

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 12 件)

1. Ikeda Y, Yano M. Inhibitor-1 is Potential Target for Enhancing Sarcoplasmic Reticulum Ca(2+) Loading in Failing Hearts. *Circ J*. 2009 Jun;73(6):1018-9. (Editorial).
2. Kobayashi S, Yano M, Suetomi T, Ono M, Tateishi H, Mochizuki M, Xu X, Uchinoumi H, Okuda S, Yamamoto T, Koseki N, Kyushiki H, Ikemoto N, Matsuzaki M. Dantrolene, a therapeutic agent for malignant hyperthermia, markedly improves the function of failing cardiomyocytes by stabilizing interdomain interactions within the ryanodine receptor. *J Am Coll Cardiol*. 2009 May 26;53(21):1993-2005.
3. Yano M, Yamamoto T, Kobayashi S, Matsuzaki M. Role of ryanodine receptor as a Ca(2+) regulatory center in normal and failing hearts. *J Cardiol*. 2009 Feb;53(1):1-7
4. Tateishi H, Yano M, Mochizuki M, Suetomi T, Ono M, Xu X, Uchinoumi H, Okuda S, Oda T, Kobayashi S, Yamamoto T, Ikeda Y, Ohkusa T, Ikemoto N, Matsuzaki M. Defective domain-domain interactions within the ryanodine receptor as a critical

- cause of diastolic Ca<sup>2+</sup> leak in failing hearts. *Cardiovasc Res.* 2008 Dec 2.
5. Yamamoto T, Yano M, Xu X, Uchinoumi H, Tateishi H, Mochizuki M, Oda T, Kobayashi S, Ikemoto N, Matsuzaki M. Identification of target domains of the cardiac ryanodine receptor to correct channel disorder in failing hearts. *Circulation.* 2008 Feb 12;117(6):762-72. Epub 2008 Jan 28. PubMed PMID: 18227387.
  6. Maturana AD, Wälchli S, Iwata M, Ryser S, Van Lint J, Hoshijima M, Schlegel W, Ikeda Y, Tanizawa K, Kuroda S. Enigma homolog 1 scaffolds protein kinase D1 to regulate the activity of the cardiac L-type voltage-gated calcium channel. *Cardiovasc Res.* 2008 Jun 1;78(3):458-65. Epub 2008 Feb 23.
  7. Mizukami Y, Ono K, Du CK, Aki T, Hatano N, Okamoto Y, Ikeda Y, Ito H, Hamano K, Morimoto S. Identification and physiological activity of survival factor released from cardiomyocytes during ischaemia and reperfusion. *Cardiovasc Res.* 2008 Sep 1;79(4):589-99. Epub 2008 Jun 5.
  8. Niwano K, Arai M, Koitabashi N, Watanabe A, Ikeda Y, Miyoshi H, Kurabayashi M. Lentiviral Vector-mediated SERCA2 Gene Transfer Protects Against Heart Failure and Left Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction in Rats. *Mol Ther.* 2008 Mar 25; [Epub ahead of print]
  9. Briggs LE, Takeda M, Cuadra AE, Wakimoto H, Marks MH, Walker AJ, Seki T, Oh SP, Lu JT, Summers C, Raizada MK, Horikoshi N, Weinberg EO, Yasui K, Ikeda Y, Chien KR, Kasahara H. Perinatal loss of Nkx2-5 results in rapid conduction and contraction defects. *Circ Res.* 2008 Sep 12;103(6):580-90. Epub 2008 Aug 8.
  10. Li TS, Mikamo A, Takahashi M, Suzuki R, Ueda K, Ikeda Y, Matsuzaki M, Hamano K. Comparison of cell therapy and cytokine therapy for functional repair in ischemic and nonischemic heart failure. *Cell Transplant.* 2007;16(4):365-74 .
  11. Hikoso M\*, Ikeda Y\*, Yamaguchi O, Takeda T, Higuchi Y, Hirotani S, Kashiwase K, Yamada M, Asahi M, Matsumura Y, Nishida K, Matsuzaki M, Hori M, Otsu K, Progression of heart failure was suppressed by inhibition of apoptosis-signal regulating kinase 1(ASK-1) via transc coronary gene transfer. *J Am Coll Cardiol* 2007 50(5):453-462 (\*co-first author)
  12. Mochizuki M, Yano M, Oda T, Tateishi H, Kobayashi S, Yamamoto T, Ikeda Y,

Ohkusa T, Ikemoto N, Matsuzaki M. Scavenging free radicals by low-dose carvedilol prevents redox-dependent Ca<sup>2+</sup> leak via stabilization of ryanodine receptor in heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 2007 Apr 24;49(16):1722-32. Epub 2007 Apr 5.

[学会発表] (計 8 件)

1. Aoyama H, Ikeda Y, Miyazaki Y, Ono M, Yoshimura K, Yamamoto T, Aoki H, Inui M, and Matsuzaki M, Abstract 1533: Protein Phosphatase 1 Beta is Most Abundant Isoform in the Longitudinal Sarcoplasmic Reticulum and Regulates Phospholamban Phosphorylation in Cardiomyocytes *Circulation* 118: S\_345-c-346S\_-c , 2008 年 11 月 8-12 日, New Orleans、USA
2. Aoki H, Yoshimura K, Ikeda Y, and Matsuzaki M, Abstract 1355: The Vascular Smooth Muscle Cell-Autonomous Role of Id2 in Phenotypic Modulation In Vitro And Atherogenesis In Vivo *Circulation* 118: S\_312-a 2008 年 11 月 8-12 日, New Orleans、USA
3. Yoshimura K, Aoki H, Kimura K, Ikeda Y, Aoyama H, Miyazaki Y, Morikage N, Furutani A, Hamano H, and Matsuzaki M, Abstract 427: c-Jun N-terminal Kinase 2 Translates Mechanical Stress to Inflammatory Signal in Macrophages and Promotes Progression of Abdominal Aortic Aneurysm In Vivo *Circulation* 118: S\_303-b 2008 年 11 月 8-12 日, New Orleans、USA
4. Ono M, Yano M, Suetomi T, Xu X, Uchinoumi H, Tateishi H, Okuda S, Kobayashi S, Yamamoto T, Ikeda Y, Ohkusa T, and Matsuzaki M, Abstract 5251: Defective Inter-domain Interaction May Cause Spontaneous Ca<sup>2+</sup> Release Via Reduced Affinity of Calmodulin Binding to RyR2 in Failing Hearts *Circulation* 118: S\_513-d-514S\_-d 2008 年 11 月 8-12 日, New Orleans、USA
5. Briggs LE, Takeda M, Cuadra AE, Wakimoto H, Lu JT, Yasui K, Ikeda Y, Chien KR, and Kasahara H, Abstract 5272: Perinatal Loss of Nkx2-5 Results in Rapid Conduction and Contraction Defects *Circulation* 118: S\_517-a 2008 年 11 月 8-12 日, New Orleans、USA
6. Suetomi T, Yano M, Xu X, Ono M, Uchinoumi H, Tateishi H, Okuda S, Kobayashi S, Yamamoto T, Ikeda Y, Ohkusa T, and Matsuzaki M, Abstract 5289: Abnormally Tight Domain-Domain Interaction at Mutation Site Could be a Primary Cause of Catecholaminergic

- Polymorphic Ventricular Tachycardia:  
Insight from RyR2<sup>S2246L/+</sup> Knock-In Mouse  
Model Circulation 118: S\_520-b 2008 年  
11 月 8-12 日, New Orleans, USA
7. Xu X, Yano M, Suetomi T, Ono M,  
Uchinoumi H, Tateishi H, Okuda S,  
Kobayashi S, Yamamoto T, Ikeda Y, Ohkusa  
T, and Matsuzaki M, Abstract 5303:  
Decreased Affinity of Calmodulin Binding to  
RyR2 May Cause Leaky Channel in  
CPVT-Associated Mutation: Insight from  
RyR2<sup>R2474s/+</sup> Knock-In Mouse Model  
Circulation 118: S\_523-a 2008 年 11 月  
8-12 日, New Orleans, USA
8. Uchinoumi H, Yano M, Suetomi T, Xu Z,  
Ono M, Tateishi H, Okuda S, Kobayashi S,  
Yamamoto T, Ikeda Y, Ohkusa T, and  
Matsuzaki M, Abstract 5322:  
Mutation-Linked, Defective Inter-Domain  
Interaction within the Cardiac Ryanodine  
Receptor as a Critical Cause of  
Catecholaminergic Polymorphic Ventricular  
Tachycardia (CPVT) Circulation 118:  
S\_526-b 2008 年 11 月 8-12 日, New  
Orleans, USA

[図書] (計 1 件)

1. Ikeda Y, Yamamoto T, Yano M, Matsuzaki  
M. Heart Failure Pathophysiology in  
Supportive Care for Cardiac Patient. Oxford  
University Press. 2008

[その他]

ホームページ等

<http://ds.cc.yamaguchi-u.ac.jp/~ninai/ninai.htm>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松崎 益徳 (MATSUZAKI MASUNORI)  
山口大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：60116754

### (2) 研究分担者

池田 安宏 (IKEDA YASUHIRO)  
山口大学・医学部・講師  
研究者番号：00260349

矢野 雅文 (YANO MASAFUMI)  
山口大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号：90294628

青木 浩樹 (AOKI HIROKI)  
山口大学・医学部・准教授  
研究者番号：60322244

山本 健 (YAMAMOTO TAKESHI)  
山口大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：50363122

泉 友則 (IZUMI TOMONORI)  
山口大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号：00261694

前川 剛志 (MAEKAWA TSUYOSHI)  
山口大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：60034972

(3) 連携研究者  
なし

### (4) 研究協力者

山口大学大学院医学系研究科  
大学院生 青山 英和  
大学院生 宮崎 要介  
技術補佐員 藤本 静香