

平成 21 年 6 月 12 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19590220

研究課題名 (和文) 細胞内 Ca^{2+} センサータンパク質 NCS-1 の心臓における生理機能の解明研究課題名 (英文) Physiological role of NCS-1, a Ca^{2+} sensor, in the heart

研究代表者

西谷 友重 (NISHITANI TOMOE)

国立循環器病センター研究所・循環分子生理部・室長

研究者番号：50393244

研究成果の概要： Ca^{2+} センサー NCS-1 は、シナプス伝達や可塑性など神経機能に重要な役割を担うことが知られているが、心臓における生理的・病態的役割は全く知られていなかった。本研究により、NCS-1 が心臓においても未成熟期や病態時にその発現量が上昇し、心筋 Ca^{2+} シグナルを調節して収縮、ストレス時のサバイバル、またホルモン刺激による心肥大形成にも寄与する可能性があることを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：細胞生理学、心機能、カルシウムシグナル

1. 研究開始当初の背景

心臓において細胞内 Ca^{2+} は筋収縮やシグナル伝達、細胞死などあらゆる生体反応を制御するキー因子である。その働きを仲介するものとして種々の Ca^{2+} センサータンパク質が存在し、時期・部位特異的に Ca^{2+} 依存性の反応を制御している。特に発達期や心肥大形成過程

においては細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇がおり Ca^{2+} センサータンパク質を介した心機能調節が行なわれていると考えられるが、未成熟期の心筋収縮機構ならびに心肥大発症メカニズムについては未だ全貌は明らかでなく、新たな制御因子の発見、関連シグナルの解明は生理的・病態的見地から重要である。

NCS-1 (NeuronalCa²⁺ sensor-1/ Frequenin) は神経など興奮性細胞特異的に発現する、分子量 22kDa の EF ハンド Ca²⁺センサータンパク質であり、神経機能に重要な役割を担っていると考えられてきた。私達は以前の研究により、NCS-1 がある種のイオンチャネルの制御因子であることを初めて証明し、また傷害神経において発現誘導されるサバイバル因子としても働くという新規の機能を明らかにしてきた。興味深いことに、NCS-1 は神経のみならず特に未成熟期の心臓にも神経なみに高発現しており、形質膜にも高発現しているが、心臓における NCS-1 の役割については現在までほとんど不明であった。しかし現在行なっている遺伝子欠損 (KO) マウスの解析により、NCS-1 が特に幼弱時の心筋拍動ならびに、ストレス下におけるサバイバルに重要な役割を担っており、心肥大形成過程にも関与している可能性を示す実験結果を得た。

2. 研究の目的

新たな心機能調節因子としての NCS-1 の生理的・病態的意義を確定し、関連タンパク質との相互作用理解も含めたシグナル伝達経路を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 野生型ヒト NCS-1 および Ca²⁺との結合力が弱い変異型 (E120Q)、また N 末端がミリスチル化されず PI₄K を活性化しない変異型 NCS-1 (G2A)、またそれぞれの HA 標識体は、通常の PCR 法により作製した。さらにこれらをコードするアデノウイルスも定法に従い作製した。また、心筋 α-ミオシン重鎖 (α-MHC) プロモータを用いて心筋特異的に発現するトランスジェニック (Tg) マウスを作製した。さらにノックアウト (KO) マウスも共同研究により、作製済みである。

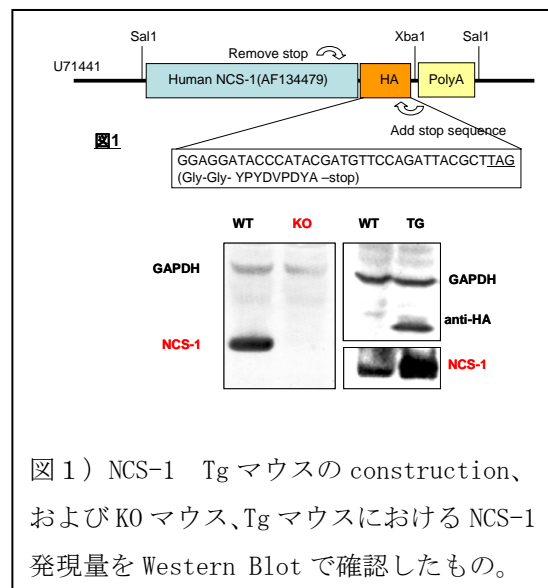


図1) NCS-1 Tg マウスの construction、および KO マウス、Tg マウスにおける NCS-1 発現量を Western Blot で確認したもの。

(2) 単一心筋細胞は、ランゲンドルフ灌流システムを用いた酵素処理により単離した。一方、培養心筋細胞は生後 1-2 日目の新生児マウスの心室筋よりトリプシン処理を行なってバラバラにした後、繊維雅細胞を取り除き、初代培養を行なった。

(3) NCS-1 タンパク質の局在パターンは、丸ごと心臓の連続切片 (5・m)、培養心筋細胞、あるいは HEK293 または COS-7 細胞に遺伝子導入して高発現させたものを、免疫蛍光法により可視化し、オリンパス Fluoview FV1000 コンフォーカル顕微鏡を用いて蛍光像観察を行った。

(4) 細胞内 Ca²⁺濃度は、自動拍動、あるいは電気フィールド刺激した際の Ca²⁺濃度変化 (Ca²⁺トランジェント) を蛍光指示薬 Indo 1-AM を用いた蛍光法により測定した。その際、冷却 CCD 高速カメラ付き AQUACOSMOS システムを用いた。

(5) 心筋細胞の細胞死の判定は、形態および Hoechst33342 を用いて核染色を行ったもの

について、クロモソームの凝集の有無で判定した。

4. 研究成果

まず、心臓における NCS-1 の役割を確認するため、1) 心臓での発現パターン、2) NCS-1 を過剰発現した場合、また 3) NCS-1 を欠損させた場合、心機能やサバイバルにどのような影響を及ぼすかについて、野生型、ドミナントネガティブ変異型 NCS-1 を高発現する Tg マウス、また KO マウス心室筋より単離した培養心筋細胞を用いて検討した。また、心肥大との関連についても検討を行なった。

その結果、1) NCS-1 は繊維芽細胞ではなく心筋細胞に高発現し、その細胞内局在は、形質膜、核膜周辺および筋小胞体に集積していることがわかった。また各成長過程では、成体と比べ未成熟期に高発現していた。一方、病的な肥大心筋では、未成熟期と同様に細胞内 Ca^{2+} レベルが高く Ca^{2+} 依存性シグナルが活性化されていると考えられるが、NCS-1 の発現量も上昇していた (図 2)。

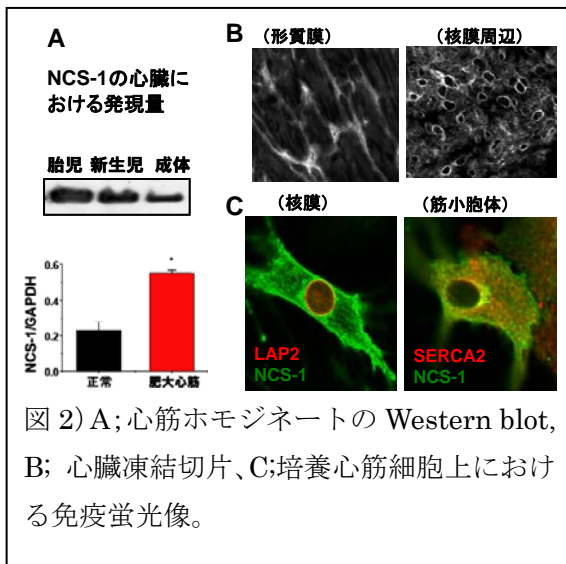


図 2) A; 心筋ホモジネートの Western blot, B; 心臓凍結切片, C; 培養心筋細胞上における免疫蛍光像。

2) 次に NCS-1 を培養心筋細胞にアデノウイルスにより過剰発現させると、自動拍動の速さが速くなり、収縮期、弛緩期ともに細胞

内 Ca^{2+} 濃度が上昇していた。また形態も心肥大誘発因子を加えたときと同様の様相を呈していた。

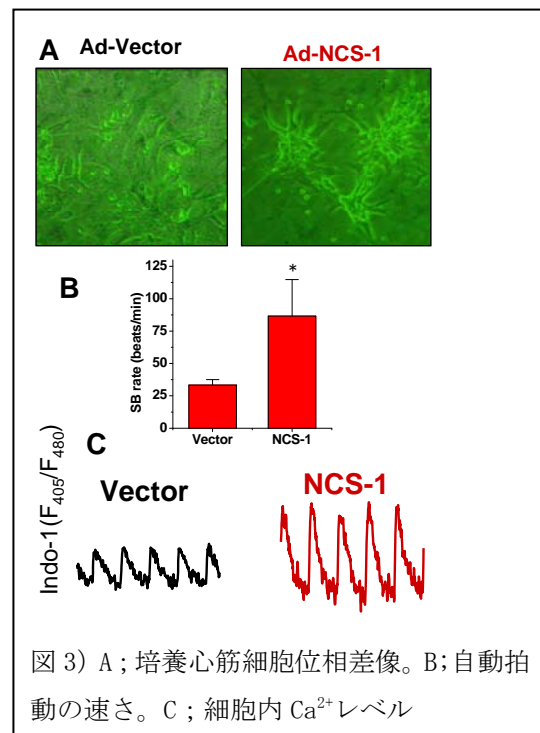


図 3) A; 培養心筋細胞位相差像。B; 自動拍動の速さ。C; 細胞内 Ca^{2+} レベル

3) 逆に NCS-1 の KO マウス由来の培養心筋細胞では、特に血清除去などのストレス下において自動拍動の速さが日ごとに低下していき、それに伴い細胞内 Ca^{2+} 濃度の顕著な低下も認められた。さらに日数が経過すると、やがて核の凝集を伴う細胞死が認められた。

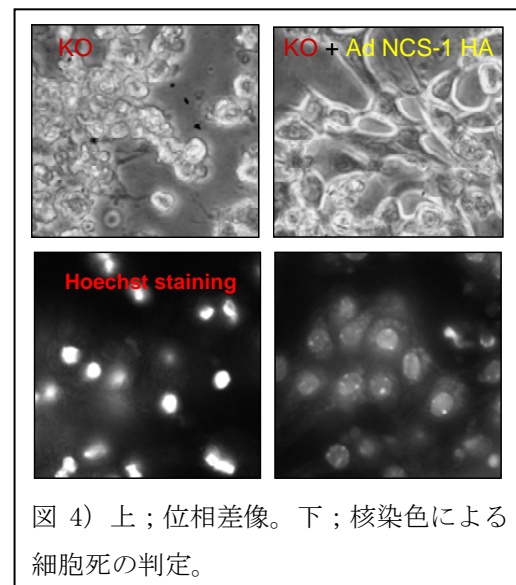


図 4) 上; 位相差像。下; 核染色による細胞死の判定。

しかし KO マウス心筋細胞にアデノウイルスにより NCS-1 を高発現させると、細胞死からレスキューされることがわかった (図 4)。

4) 一方、NCS-1 の発現量が肥大心筋で増加することから、心肥大との関連についても検討を行なった。培養心筋細胞に様々な心肥大誘発因子を添加したところ、Endothelin-1 (ET-1) をはじめとするいくつかのホルモン刺激により、NCS-1 の発現量の増加が認められた。逆に、NCS-1 をアデノウイルスにて過剰発現させると、心肥大誘発因子を添加した場合と同様の特徴的な形態変化が認められ、細胞内 Ca^{2+} 濃度も上昇していた。さらに、KO マウス由来の培養心筋細胞では、ET-1 刺激によっても反応が鈍く、野生型で見られたような心肥大はほとんど認められなかった。以上の結果は、NCS-1 が ET-1 などのホルモン刺激による心肥大形成経路を仲介している可能性を示唆している。

ところで、ET-1 による心肥大シグナルは、筋小胞体 Ca^{2+} 放出チャネルである $InsP_3$ 受容体タイプ 2 (IP_3R2) を介した Ca^{2+} 放出が寄与していることが報告されている。また NCS-1 が神経において $InsP_3$ 受容体と結合しているとの報告がある。そこで、心筋における NCS-1 と $InsP_3$ 受容体との関係を調べた結果、心筋においても NCS-1 は主に核膜周辺に局在する IP_3R2 と *in vivo* で免疫沈降し、共局在することがわかった。現在、これら相互作用をさらに確実なものにするため、共同研究により IP_3R1 および IP_3R2 の cDNA を入手し、*in vitro* の発現系での結合を確認中である。

以上の結果は、 Ca^{2+} センサーである NCS-1 が、形質膜や核膜周辺に存在するイオンチャネルなどの興奮性制御タンパク質との相互作用を介して心筋 Ca^{2+} シグナルを調節し、様々な細胞応答、特に心臓の収縮機能、スト

レス下における心筋サバイバル、また心肥大の誘発に重要な役割を担っていることを示唆している。特に心肥大形成においては、NCS-1 は IP_3R との相互作用を介して心筋 Ca^{2+} シグナルを調節している可能性がある。

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 3 件)

- ① Nakamura TY, Iwata Y, Arai Y, Komamura K, Wakabayashi S. Activation of Na^+/H^+ exchanger 1 is sufficient to generate Ca^{2+} signals that induce cardiac hypertrophy and heart failure. *Circ Res.* 査読有り。8, 2008, 891-899.
- ② Nakamura TY, Coetzee WA. Functional and pharmacological characterization of a Shal-related K^+ channel subunit in Zebrafish. *BMC Physiol.* 査読有り。8, (2008), 2 (電子ジャーナルのため)
- ③ Hisamitsu T, Yamada K, Nakamura TY, Wakabayashi S. Functional importance of charged residues within the putative intracellular loops in pH regulation by Na^+/H^+ exchanger NHE1. *FEBS J.* 査読有, 274, (2007), 4326-4335.

[学会発表] (計 5 件)

- ① 西谷友重・若林繁夫、「細胞内 Ca^{2+} センサー-NCS-1の心臓における新規機能の解析」、特定領域研究「細胞感覚」平成20年度冬の班会議、2008年12月18-19日、岡崎カンファレンスセンター
- ② 中村(西谷)友重・Jeromin, A.・若林繁夫

「新しい心機能調節因子としてのCa²⁺センサータンパク質NCS-1の役割」. 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会、2008年12月9日、神戸ポートピアホテル

③ 中村（西谷）友重, 活性化型Na⁺/H⁺ 交換輸送体 (NHE1) 高発現マウス心筋における心肥大、心不全発症の分子・細胞メカニズム, BMB 2007, 2007年12月11日, 横浜 (パシフィコ横浜)

④ 岩田 裕子, 活性化型Na⁺/H⁺ 交換輸送体 (NHE1) の心筋過剰発現マウスは拡張型心筋症をひき起こす, BMB 2007, 2007年12月11日, 横浜 (パシフィコ横浜)

⑤ 中村（西谷）友重, Na⁺/H⁺ 交換輸送体の活性化は心肥大・心不全を引き起こす: 細胞内イオン代謝と分子機構の解析, 第85回日本生理学会大会, 2008年3月26日, 東京 (京王プラザ)

[図書] (計 2 件)

① T. Y. Nakamura, L. Parachuru, S. Nandi, L. Porter, D. J. Pountney and W. A. Coetzee, Nova Science publishers, Inc, NCS-1 as a regulator of Kv4 K⁺ channels. In: Neuronal Calcium Sensor Proteins. Chapter III, (2008), In press.

② 中村（西谷）友重・古林創史・久光隆・岩田裕子・若林繁夫, (株)メデイカルドウ, Na⁺/H⁺交換輸送体: 機能調節と薬物標的としての意義。遺伝子医学 MOOK 12号「最新トランスポーター研究2008」, (2008), 255-260.

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西谷 友重 (NISHITANI TOMOE)
国立循環器病センター研究所・循環分子生理部・室長
研究者番号: 50393244

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

若林 繁夫 (WAKABAYASI SHIGEO)
国立循環器病センター研究所・循環分子生理部・部長
研究者番号: 70158583