

令和 4 年 6 月 24 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07130

研究課題名(和文) ユビキチンリガーゼParkinによる心筋収縮調節因子PLNの制御機構

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of PLN degradation by Parkin

研究代表者

横江 俊一 (Shunichi, Yokoe)

大阪医科薬科大学・医学部・助教

研究者番号：40454756

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト心不全病態下では、多くのタンパクのユビキチン化の亢進が観察されるが、今回、心臓に存在しているユビキチンリガーゼ「Parkin」が心不全病態下でカルシウムポンプ(SERCA2a)の制御因子であるホスホランバン(PLN)のユビキチン化に寄与していることを見出した。種々の心不全モデルマウスの心臓では、ParkinとPLNの結合は野生型マウスと比較して顕著に増加していた。さらに、Parkinと協調して働くことが知られているリン酸化酵素のPINK1とPLNの結合も顕著に増加していることが観察された。以上より、心不全病態下におけるPLN分解系の一端をParkinが担っていることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本では急速に高齢化が進み、心不全を始めとした心疾患の増加にも直面している。今回、心臓の律動的な拍動に重要な働きを担っている分子であるPLNに着目し、その分解に関与しているユビキチンリガーゼの探索を試みたところ、ParkinがPLNのユビキチン化および分解の一旦を担っていることを明らかにできた。将来的にParkinを標的とした治療戦略を立てることを目標としており、心不全症状の改善や治療法の向上を目指す上でとても意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In human heart failure, increased ubiquitination of many proteins is observed. In this study, we found that phospholamban (PLN), a regulator of calcium pump (SERCA2a), is downregulated by ubiquitin ligase "Parkin" in heart failure. In the hearts of various heart failure model mice, the binding between Parkin and PLN was significantly increased compared to wild-type mice. Furthermore, it was observed that the binding of PLN and PINK1, which are known to work in cooperation with Parkin, is also significantly increased. In conclusion, we suggest that Parkin plays a pivotal role in the degradation of PLN in heart failure.

研究分野：循環薬理学

キーワード：ユビキチンリガーゼ 心不全

1. 研究開始当初の背景

厚生労働省の「2017年人口動態統計」によると、心疾患は日本における死因の第2位になっている。医療技術の目覚しく発展してきた現代においても、死亡者数・死亡率ともに一貫して増加し続けており、近い将来、超高齢化社会を迎えるにあたり、心不全を始めとした心疾患に対する効果的な予防・治療法の確立(創薬を含めて)が急務となっている。これまで心不全に関する研究は、[1]カルシウム(Ca^{2+})シグナリング異常に起因するものと、[2]心機能関連タンパク質や小器官(オルガネラ)分解系の異常に起因するものの二つに大別され、それぞれについて多くの報告があるが、どちらかの異常だけで心不全が決定付けられ、予防や治療の標的に結び付くことはほとんど無かった。ところが研究代表者は最近、心臓の Ca^{2+} シグナリング分子とタンパク質の分解に関与している分子の直接の結合を見出したことから、心不全発症機序や病態生理学的意義について新たな知見が得られると期待される。

2. 研究の目的

心不全発症機序の解明を目指す中で、これまで別個に研究が進められてきた2領域(上記[1],[2])について、関連している点や相違点をさらに明確にしていくことが本研究の目的であり、そうすれば、心不全発症機序の全体像が見えてくると考える。本研究課題で着目しているのが、心不全で増えてくることが知られている、異常ミトコンドリアの蓄積(上記[2]のオルガネラ分解系の異常に起因する)により活性化されるE3リガーゼ「Parkin」による Ca^{2+} シグナリング分子(PLN)制御である。Parkinは元々、リン酸化酵素であるPINK1とともに家族性パーキンソン病の原因遺伝子として同定されたE3リガーゼであり、ユビキチン化活性が異常ミトコンドリアの分解・除去に必須である。しかしながら、急性あるいは慢性心不全時の異常ミトコンドリア蓄積に対してどの程度分解・除去能力があるのかは不明であり、また、PLNをはじめとした心筋小胞体 Ca^{2+} シグナリング分子に対してユビキチン化を引き起こし、分解・除去へ導くという報告はまだ無い。そのため、これらの解明を目指す本研究のアプローチは学術的独自性と創造性を備えていると考えられ、E3リガーゼによる心筋小胞体 Ca^{2+} シグナリング分子制御機構の解明による波及効果は大きいと考えられる。

3. 研究の方法

心不全の重篤度によってParkinとPLNの結合、およびPLNのユビキチン化がどの程度変動するのかを明らかにするために、各種心不全(遺伝性、圧負荷誘導性)モデルマウスの心臓切片やホモジネート、単離心筋細胞を用いて共局在性や相互作用、PLN発現レベルの変化、心収縮能を検証する。

(1) PLNとParkinの相互作用の検証

・PLNとParkinの共局在の場所や割合をより明確にするために、高速スキャン共焦点顕微鏡(SP8, Leica)を用い、蛍光免疫染色による観察を行う。

・様々な病態を呈する種々の心不全モデルマウス(Na^+/H^+ 交換輸送体発現マウス:tgNHE1、

PLN-R9C 発現マウス：tgPLN^{R9C}、)および、大動脈弓結紮 (TAC)により心不全を誘発したマウスの心臓でも同様に PLN と Parkin の結合や局在を観察することで、心不全で普遍的に見られる相互作用なのか、病態の重篤度に応じて変化するのかを評価する。

(2) Parkin遺伝子ノックダウン (KD) による心機能への影響の検証

・ PLN 発現 HEK293 細胞に、i) Parkin 遺伝子を強発現、あるいは ii) Parkin 遺伝子を KD した際の PLN の発現量変化を観察することで、PLN の分解に Parkin がどの程度関与しているのかを明らかにする。

4 . 研究成果

各種心不全モデルマウスの心臓では、いずれもParkinの発現量が野生型マウスと比較して減少していたにもかかわらず、ParkinとPLNの結合は顕著に増加していることが観察された。重篤な心不全ではPLNの発現量が減少することが知られているが、その一因として、心不全病態下では、ParkinがPLNを標的としてユビキチン化の亢進、ならびに分解促進の一端を担っていることが示唆された。一方、Parkin遺伝子を強発現させたPLN発現HEK293細胞では、コントロール遺伝子を強発現させた細胞と比較して、PLNの発現が減少した。また、Parkin遺伝子をsiRNAでKDさせたPLN発現HEK293細胞は、コントロールsiRNA導入細胞と比較してPLNの発現が増加した。以上の結果より、心収縮能調節因子であるPLNをユビキチン化しているユビキチンリガーゼの一つとして、新たにParkinの寄与を示すことができ、心不全症状を呈する場合には、PLN分解系の亢進にも寄与していることを見出した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 横江俊一、朝日通雄
2. 発表標題 心不全において、ホスホランバンはParkinによる分解を受けている
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

大阪医科薬科大学 薬理学教室 ホームページ https://www.ompu.ac.jp/u-deps/pha/
--

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	朝日 通雄 (Asahi Michio) (10397614)	大阪医科薬科大学・医学部・教授 (34401)	

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
---------	---------