

機関番号：22701

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590212

研究課題名（和文）肥大心より同定された新規G蛋白活性制御因子の解析

研究課題名（英文）Characterization of novel activator of G protein signalings (AGSs) identified in the hypertrophic heart.

研究代表者

佐藤 元彦 (SATO MOTOHIKO)

横浜市立大学・医学部・准教授

研究者番号：40292122

研究成果の概要（和文）：

受容体のみならず、G蛋白を直接活性化する蛋白の存在が知られ、これが細胞のストレス適応に関係する。我々は大動脈縮窄マウスの肥大心で発現するG蛋白活性調節因子の同定を試みた。その結果、MITF/TFE転写因子であるTFE3がG α 16に対するG蛋白活性調節因子であることを見出した。興味深いことに、TFE3はG α 16を細胞核内へ移行させ、心筋細胞膜の重要な構成蛋白であるclaudin14の転写を亢進させた。これは、G蛋白とそのG蛋白活性調節因子による、圧負荷下でのあらたな転写調節機構の存在を示した。

研究成果の概要（英文）：

In addition to G-protein coupled receptors, there exist receptor-independent regulators for heterotrimeric G-proteins which provide alternative signal input that may be involved in the adaptation process of cells to various stresses. As a part of an effort to identify such entities in cardiovascular diseases, we used a functional screen to identify receptor-independent activators of G-protein signaling (AGS) in the hypertrophied mouse heart by transverse aortic constriction. We identified three MITF/TFE transcription factors, TFE3 as novel AGS proteins for G α 16. TFE3 induced translocation of G α 16 to the nucleus. Interestingly, the accumulation of TFE3/G α 16 in the nucleus induced the expression of claudin 14, which was a key component of membrane structure in cardiomyocytes. TFE3 transcription factor is a new AGS for G α 16, that appears to generate a TEF3-G α 16 complex in the nucleus that drives the transcription of claudin 14. These findings suggest the existence of a novel mechanism of transcriptional regulation under pressure overload stress via the relocalization/activation of G α subunit with specific AGS proteins.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：分子循環病学

科研費の分科・細目：生理学一般

キーワード：細胞内情報伝達、G蛋白質、心肥大

1. 研究開始当初の背景

G 蛋白共役受容体を介する情報は、細胞において非常に重要な情報伝達系であり、疾病の発症・進展に密接に関与する。三量体 G 蛋白質は古典的に細胞膜受容体から効果器へのトランスデューサーとされてきたが、近年の研究は三量体 G 蛋白が受容体以外の蛋白 (G 蛋白活性制御因子) により活性化されることを明らかにした (Sato M et al. Annual Review of Pharmacology 2006;46:151.)。G 蛋白活性制御因子の生化学的解析は多くなされているが、その一方、生理学的な意義はごく一部を除いて明らかにされていない。疾病の発症進展に関与する G 蛋白活性制御因子として、申請者はラット狭心症モデルより、虚血心筋に発現誘導される G 蛋白活性制御因子 (Activator of G-protein Signaling 8、AGS8) を同定することに成功した (Sato M et al. Proc Natl Acad Sci USA. 2006;103:797、Yuan C, Sato M 他 2 名、J.Biol.Chem. 2007;282:19938.)。では、心疾患の重要な課題である心肥大に関与する G 蛋白活性制御因子はあるのであろうか? このような新規蛋白分子を同定することができれば、新たな病態機序の解明、治療法につながる可能性がある。

2. 研究の目的

申請者はマウス肥大心モデル cDNA ライブラリーを用いて G 蛋白活性制御因子の機能的スクリーンを行い、3 種類の新規 G 蛋白活性制御因子の同定に成功した。興味深いことに、これら 3 種類の蛋白はすべて MITF/TEE ファミリーに属する転写因子であった。本研究では、同定した G 蛋白活性制御因子と G 蛋白の相互作用、G 蛋白活性制御因子・G 蛋白複合体が細胞内情報伝達系あるいは転写へ与える影響、さらに心肥大病態形成への関与する可能性を検討する。

3. 研究の方法

(1) 各完全長蛋白の活性：得られたクローンはすべて MITF/TEE 転写因子の一部であったが、完全長蛋白が得られたクローンと同様の G 蛋白活性化能力を持つ酵母を用いて検討した。

(2) G 蛋白活性調節因子・G 蛋白複合体の確認：次に、同定した G 蛋白活性調節因子が G 蛋白と安定した複合体を形成し得るか検討した。これは、精製蛋白を用いた *in vitro* の実験系と発現細胞からの複合体分離という 2 つの実験系で検討した。

(3) 哺乳類細胞での G 蛋白情報伝達系への関与：G 蛋白活性調節因子が、標的 G 蛋白を

介する情報伝達に影響を与えるか、強発現系を用いて G 蛋白活性調節因子レベルを変化させその影響を検討した。

(4) 転写因子である G 蛋白活性調節因子と G 蛋白の相互作用がその転写活性に与える影響：同定した G 蛋白活性調節因子は転写因子の一群であったが、G 蛋白と転写因子の相互作用がその転写活性に影響を与えるか、マイクロアレーを利用した解析で検討を行った。

(5) 同定した G 蛋白活性調節因子の心肥大への関与：新たな G 蛋白活性調節因子の転写促進作用が心筋細胞あるいは肥大心で起きているか、培養心筋細胞中の G 蛋白活性調節因子および標的 G 蛋白のレベルを siRNA を用いて変化させ検討を行った。また、肥大心組織での発現変化を real-time PCR 法、免疫化学染色法により検討した。

4. 研究成果

申請者は、心肥大モデルより 3 種類の新規 G 蛋白活性制御因子の同定に成功したが、それらはすべて MITF/TEE 転写因子 (TFE3, TFEB, MITF) の一部であった。

(1) G 蛋白サブユニットの選択性：申請者が同定した新規 G 蛋白活性調節因子の機能解析を酵母系を利用して解析した。用いた酵母ではヒトあるいはラット G α サブユニットが発現しており、G 蛋白が活性化されると酵母が増殖するように修飾が加えられている。先のスクリーンで得られたのは新規 G 蛋白活性調節因子の部分であったが、各蛋白の全長をクローニングし酵母内で発現させ、以下の検討を行った。

全長 G 蛋白活性調節因子は他の G α サブユニットに比べ、G α 16 に対して強い活性を示した。G 蛋白あるいはその下流が欠如している酵母株で全長 G 蛋白活性調節因子の生物活性を検討したところ、G 蛋白サブユニットを欠如する酵母株では生物活性を示さなかった。このことから、同定した G 蛋白活性調節因子は G 蛋白に直接作用しているものと考えられた。

(2) 同定した新規 G 蛋白活性制御因子の一つ TFE3 に注目し、さらに検討を進めた。TFE3 が G 蛋白サブユニットと複合体を形成するか、TFE3 を G S T 融合蛋白として大腸菌で作製し、G 蛋白との相互作用を *in vitro* の pull down assay により検討した。

①TFE3・G 蛋白の相互作用は G α 16 サブユニ

ットに確認されたが、 $G\alpha i$ 、 $G\alpha s$ 、あるいは $G\alpha q$ サブユニットには認められなかった。また、TFE3 と $G\alpha 16$ サブユニットの相互作用は、 $G\alpha$ の活性化状態に依存し、非活性型変異 $G\alpha 16$ あるいは持続活性型変異 $G\alpha 16$ は TFE3 と相互作用を示さなかった。

②COS7細胞に TFE3 と $G\alpha 16$ サブユニットを発現させ、TFE3・G蛋白複合体が細胞内で形成されるか免疫沈降法により検討した。In vitro での検討と同様に TFE3 は $G\alpha 16$ サブユニット選択的に複合体を形成することが確認された。

③さらに、TFE3・G蛋白複合体の細胞内局在を蛍光免疫染色法により検討した。 $G\alpha 16$ サブユニットは単独で発現させると細胞質を中心に分布した。ところが、 $G\alpha 16$ サブユニットを TFE3 と共発現させると、両蛋白とも細胞核に集積することが明らかとなった。一方、持続活性変異型の $G\alpha 16$ サブユニットは細胞核以外の細胞質に分布することから、 $G\alpha 16$ サブユニットの核内集積には $G\alpha$ サブユニットと TFE3 の複合体形成が強く関与していると考えられた。

(3) 哺乳類細胞でのG蛋白情報伝達系への関与を $\beta 2$ アドレナリン受容体- $G\alpha 16$ -フォスホオリパーゼ $\beta 1$ の情報伝達系で検討したが、TFE3 は細胞膜受容体を介する情報伝達には影響を与えないことが明らかになった。

(4) 次に転写因子であるG蛋白活性調節因子とG蛋白の相互作用がその転写活性に与える影響を検討し、細胞核内へ移行した $G\alpha 16$ -TFE3 は接合部蛋白である claudin14 の発現を著しく増加させることが明らかとなった。また、興味深いことに claudin14 の誘導には $G\alpha 16$ の核内での活性化が必要であった。

(5) さらに心肥大モデルにおける各コンポーネントの発現変化を検討したところ、 $G\alpha 16$ および TFE3 は肥大心で発現が上昇しており、claudin14 も約5倍発現が上昇していた。なお、心筋細胞の $G\alpha 16$ および TFE3 を siRNA により抑制すると claudin14 の発現も低下した。このことは三量体G蛋白・G蛋白活性制御因子によるまだ解明されていない遺伝子調節機構が存在することを示唆していた (Sato M., et al. *J. Biol. Chem* 286, 2011, 17766-17776)。

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10件)

- ① Sato M., 他 9 名. Identification of Transcription factor E3 (TFE3) as a Receptor-Independent Activator of $G\alpha 16$: Gene Regulation by Nuclear $G\alpha$ subunit and its Activator *J Biol Chem*. 査読有、Vol 286, 2011, 17766-17776.
- ② Sato M., 他 4 名. The roles of cytochrome P450 in ischemic heart disease. *Current Drug Metabolism* 査読有、Vol 12, 2011, 526-532.
- ③ Sato M and Ishikawa Y. Accessory proteins for heterotrimeric G protein: Implication in the cardiovascular system. *Pathophysiology. : the official journal of the International Society for Pathophysiology*, 査読有、17(2), 2010, 89-99.
- ④ Yokoyama U., 他 12 名. (Sato M., 10 番目). Differential Regulation of Vascular Tone and Remodeling via Stimulation of Type 2 and Type 6 Adenylyl Cyclases in the Ductus Arteriosus. *Circ Res*. 査読有、Vol 106, 2010, 1882-1892.
- ⑤ Suzuki S., 他 9 名. (Sato M., 8 番目). Defferential roles of EPAC in regulating cell death in neuronal and myocardial cells. *J Biol Chem*. 査読有、Vol 285, 2010, 24248-24259.
- ⑥ Otsu K., 他 10 名. (Sato M., 6 番目). Caveolin gene transfer improves glucose metabolism in diabetic mice. *Am J Physiol Cell Physiol*. 査読有、Vol 298, 2010, C450-456.
- ⑦ Sato M., 他 9 名. Activator of G protein signaling 8 (AGS8) is required for hypoxia-induced apoptosis of cardiomyocytes: role of G betagamma and connexin 43 (CX43) *J Biol Chem*. 査読有、Vol 284, 2009, 31431-31440.
- ⑧ Akaike T., 他 13 名. (Sato M., 8 番目). T-type Ca^{2+} channels promote oxygenation-induced closure of the rat ductus arteriosus not only by vasoconstriction but also by neointima formation. *J Biol Chem*. 査読有、Vol 284, 2009, 24025-24034.
- ⑨ Okumura S., 他 10 名. (Sato M., 8 番目). Type 5 adenylyl cyclase plays a major role in stabilizing heart rate in response to microgravity induced by parabolic flight. *J Appl Physiol*. 査読有、Vol 105, 2008, 173-179.
- ⑩ Yokoyama U., 他 12 名. (Sato M., 12 番目). PGE2-activated Epac promotes

neointimal cushion formation of the rat ductus arteriosus by a process distinct from that of PKA. *J Biol Chem.* 査読有、Vol 283、2008、28702-28709.

[学会発表] (計 16 件)

- ① Sato M., 他 5 名 . Novel transcriptional regulation by Galpha subunit and its regulator TFE3/AGS11 under pressure overload stress of the heart. *The 88th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan* 2011 年 3 月 30 日 神奈川県横浜市, パシフィコ横浜.
- ② Hiraoka M., 他 3 名. (Sato M., 2 番目) . Regulation of connexin 43 under hypoxic stress by novel synthetic peptide derived from ischemia-inducible Activator of G-protein Signaling 8. *The 88th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan* 2011 年 3 月 30 日 神奈川県横浜市, パシフィコ横浜.
- ③ Sato M., 他 5 名. Novel Activator of G-protein signaling 11 (AGS11)/TFE3 regulates transcription of claudin via activation of nuclear Galpha16. *The 84th Annual Meeting of The Japanese Pharmacological Society, The 11th Southeast Asian Western Pacific Regional Meeting of Pharmacologists* 2011 年 3 月 23 日 神奈川県横浜市, パシフィコ横浜.
- ④ Sato M., 他 5 名. TFE3, a transcription factor, directly regulates a Galpha subunit and is involved in the development of cardiac hypertrophy and remodeling. *The 75th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society* 2011 年 3 月 20 日 神奈川県横浜市, パシフィコ横浜.
- ⑤ Sato M., 他 7 名. Novel transcription regulation in the hypertrophied myocardium via nuclear G α 16 subunit and activator of G-protein signaling (AGS). *American Heart Association's Scientific Sessions* 2010 年 11 月 15 日 Chicago, IL, USA.
- ⑥ 佐藤元彦 疾病と関連して発現誘導される新規 G 蛋白活性調節因子の同定と機能解析 旭川医科大学医学奨励賞記念講演 (招待講演) 2010 年 10 月 7 日 北海道旭川市、旭川医科大学.
- ⑦ Sato M., 他 5 名 . Regulation of Connexin43 by activator of G protein signaling 8 and Gbetagamma. *The 87th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan* 2010 年 5 月 20 日 岩手県盛岡市、いわて県民情報交流センター.
- ⑧ Sato M., 他 3 名. Ischemia-inducible G-protein Activator, Activator of G-protein Signaling 8 (AGS8), Regulates Hypoxia-induced Apoptosis of Cardiomyocytes via G β γ and Connexin 43. *The 74th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society*, 2010 年 3 月 5 日、京都、京都国際会議場.
- ⑨ Sato M., 他 6 名. Connexin 43 was regulated by Ischemia-inducible G-protein Activator and G β γ under hypoxic stress、*The 83rd Annual Scientific Meeting of the Japanese Pharmacological Society*, 2010 年 3 月 16 日、大阪、大阪国際会議場.
- ⑩ Sato M., 他 6 名 . Roles of Ischemia-inducible G-protein Activator in Hypoxia-Induced Apoptosis of Cardiomyocytes and its Regulation of Connexin 43. *American Heart Association's Scientific Sessions*、2009 年 11 月 18 日、Orlando, FL, USA.
- ⑪ Sato M., 他 6 名 . REQUIREMENT OF RECEPTOR-INDEPENDENT G-PROTEIN ACTIVATOR, ACTIVATOR OF G PROTEIN SIGNALING 8 FOR HYPOXIA-INDUCED APOPTOSIS OF CARDIOMYOCYTES. *36th International Congress of Physiological Sciences*, 2009 年 7 月 28 日、京都、京都国際会議場.
- ⑫ Jiao Q., 他 4 名. (Sato M., 2 番目) . Alterations of cardiac connexin 43 under hypoxic stress: roles of Activator of G protein Signaling 8 and Gbetagamma. *36th International Congress of Physiological Sciences*. 2009 年 7 月 28 日、京都、京都国際会議場
- ⑬ 佐藤元彦、他 5 名. 新たな G 蛋白活性制御因子 AGS 8 の低酸素誘導心筋アポトーシスへの関与。第 29 回日本循環制御医学会総会、2008 年 5 月 10 日、横浜市、横浜シンポジア.
- ⑭ Sato M., 他 3 名 . Roles of Ischemia-Inducible G-protein activator, Activator of G-protein Signaling 8: Regulation of Apoptosis and Connexin 43 of Cardiomyocytes. *The 73rd Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society*, 2009 年 3 月 22 日、大阪、大阪国際会議場.
- ⑮ Sato M., 他 6 名. An Involvement of Activator of G-protein Signaling 8 (AGS8) in Hypoxia-induced Apoptosis of Cardiomyocytes. *The 82nd Annual Meeting of the Physiological Society of Japan*

Scientific Meeting of the Japanese Pharmacological Society, 2009年3月18日、神奈川県横浜市、パシフィコ横浜.

- ⑩ Sato M., 他6名. An Involvement of a Novel G-protein Activator on Hypoxia-Induced Apoptosis of Cardiomyocytes and its Interaction with Connexin 43. *American Heart Association's Scientific Sessions*, 2008年11月11日、New Orleans, USA.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 元彦 (SATO MOTOHIKO)
横浜市立大学・医学部・准教授
研究者番号：40292122

(2) 研究分担者

奥村 敏 (OKUMURA SATOSHI)
横浜市立大学・医学部・准教授
研究者番号：60233475

(3) 連携研究者

()

研究者番号：