

平成 23 年 2 月 9 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20790557

研究課題名 (和文) Gene33/RALT は心筋の酸化ストレス障害に対する抑制因子か？

研究課題名 (英文) Role of Gene33/RALT in oxidative stress-induced signal transduction in cardiac cells.

研究代表者

竹田 健史 (TAKEDA KENJI)

金沢医科大学・医学部・助教

研究者番号：90340009

研究成果の概要 (和文)：ラット心筋細胞 H9c2 に酸化ストレス刺激を与えると、EGF 受容体を介した経路により Ralt の発現が誘導された。Ralt を安定発現する H9c2 細胞を樹立し、解析した結果、この細胞において HB-EGF を介したシグナル伝達系が抑制されていることがわかった。さらに、Ralt と結合する心筋の内在性分子を同定するためにプロテオミクス解析を行った。その結果 Ralt は 14-3-3 タンパク質ファミリーと、そのリン酸化状態に依存せずに安定な複合体を形成することが明らかとなった。

研究成果の概要 (英文)：We found that rat embryonic heart-derived H9c2 cells treated with oxidative stress exhibited a significant induction in Ralt mRNA and protein. Stable overexpression of Ralt in H9c2 cells prevented HB-EGF-induced signal transduction. To identify endogenous proteins that bind to Ralt in cardiac cells, we carried out a proteomic analysis and found that Ralt specifically bound to several different isoforms of 14-3-3 proteins independently of its phosphorylation status.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

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：分子心臓病態学、蛋白質間相互作用、心筋細胞、Mig-6

1. 研究開始当初の背景

心筋への持続的な低酸素刺激や虚血再灌流時において、局所で産生された酸化ストレスによって心筋細胞死が誘導されることが知られている。このストレスシグナルを仲介す

るために重要な役割を果たす受容体の一つが、ErbB family に属する上皮成長因子受容体 (EGFR/ErbB1) である。EGFR は、メタロプロテアーゼを介した shedding によって細胞膜上から遊離した HB-EGF によって活性化することが知られている (トランス活性化)。

そして、下流のレドックス感受性シグナル伝達経路を介して、最終的に心筋アポトーシスを促進するような心筋の遺伝子発現を誘導するが、同時に、このシグナル伝達を抑制する内在性の負のフィードバック制御因子も多数誘導される。

我々はこれまでに、ラット心臓の虚血再灌流モデルにおいて、細胞内アダプター分子として知られていた Ralt の発現が、心筋や心線維芽細胞で急速に誘導されることや、培養心筋細胞への酸化ストレス刺激や、HB-EGF の刺激でも強発現することを報告した。

近年、これまでに機能不明であった Ralt が、腫瘍細胞等において ErbB family と結合し、ErbB を介したシグナル伝達系を負に制御することが複数報告された。これらの結果は、Ralt が酸化ストレスによる心筋細胞死や病的な心肥大のシグナル伝達系において誘導される内在性の負のフィードバック制御因子であり、結果として心保護的に働く因子であることを示唆していた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、Ralt の心筋細胞内での役割を明らかにすることである。特に、心筋の酸化ストレス傷害や、病的な心肥大の進展に重要な役割を果たすことが知られている HB-EGF-EGFR を介した情報伝達経路に注目し、Ralt がこのシグナルに対する負のフィードバック制御因子として機能するのか否かに注目した。

3. 研究の方法

(1) Ralt を安定発現する心筋細胞株の解析

ラット心筋由来の myoblasts である H9c2 細胞株は、心筋の酸化ストレスシグナル伝達系の解析等において、広く利用されている心筋細胞株である。Ralt 発現ベクターの導入、及び G418 による薬剤セクションにより、Ralt 安定発現細胞株 (G33sc) を樹立した。そして、HB-EGF 刺激による下流の情報伝達系に及ぼす変化を遺伝子・蛋白質発現、下流の情報伝達因子のリン酸化の変化、レドックス感受性遺伝子のの上流プロモーター活性に及ぼす影響についてそれぞれ解析を行った。

(2) Ralt 結合能を有する心筋内在性分子の同定

心臓における Ralt の機能をさらに解析するために、心筋細胞内で Ralt と結合する内在性分子の同定を試みた。Ralt 安定発現細胞株を材料にして、免疫沈降法と質量分析を用いたプロテオミクス解析によって、Ralt 複合

体を構成する新規の分子を同定し、その遺伝子の単離も行った。次に、この遺伝子の一過性発現により、さらに詳細な生化学的解析を行い、Ralt との相互作用に重要な部位を同定した。

4. 研究成果

(1) G33sc 細胞の解析

H9c2 細胞を、HB-EGF で刺激すると、すみやかに EGFR の活性化を介した Akt/PKB や Erk1/2 など下流の経路の活性化が認められたが、G33sc 細胞では抑制されていた (図 1)。さらに G33sc 細胞においては、HB-EGF による

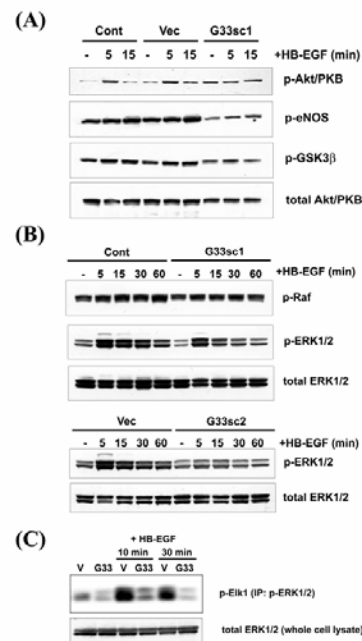


図1 G33sc細胞は、HB-EGF刺激に対する応答が減弱している。(A) Akt/PKB 経路 (B) Raf1-Erk 経路 (C) recombinant Elk1を用いた in vitro Erk1/2 kinase assay; V, empty vector 導入細胞; G33, G33sc細胞

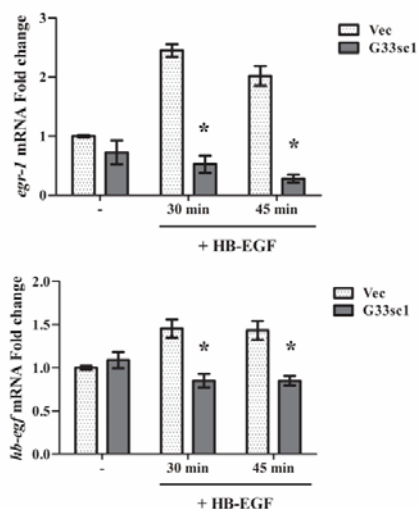


図2 G33sc細胞はHB-EGFによるauto-inductionが抑制されている

Egr-1 の発現が抑制されていた (図 2 上)。

興味深いことに、H9c2 細胞において、HB-EGF 刺激によって、HB-EGF 自身の遺伝子発現も誘導された (auto-induction) が、G33sc 細胞では HB-EGF 遺伝子発現の誘導は認められなかった (図 2 下)。

さらに、Egr-1 に対する siRNA を H9c2 細胞へ導入し、この遺伝子発現を抑制すると HB-EGF の auto-induction が観察されなくなることから、この経路には Egr-1 の発現誘導が関与していることを示した (図 3)。また、HB-EGF によって誘導される Egr-1 の DNA 標的配列における結合活性を、ゲルシフトアッセイにより解析した結果、Ralt の安定発現によって、標的配列に結合する Egr-1 の減弱が見られた。

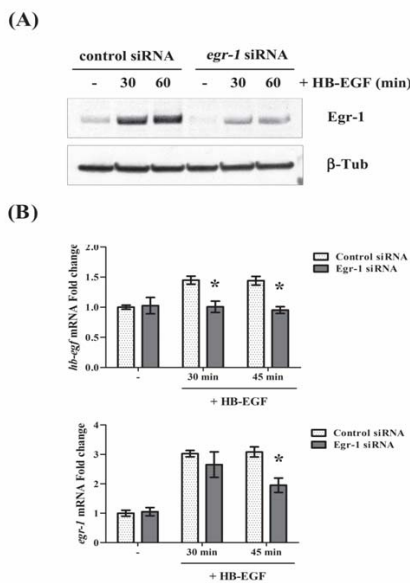


図3 HB-EGFのauto-inductionは、Egr-1遺伝子のノックダウンで抑制される。(A)Western Blot解析 (B) RT-PCR解析



図4 G33sc細胞は、HB-EGF刺激に対する応答が減弱している。(A) Akt/PKB 経路 (B) Raf1-Erk経路 (C) recombinant Elk1を用いた in vitro Erk1/2 kinase assay; V, empty vector導入細胞; G33, G33sc細胞

(2) Ralt 結合能を有する心筋内在性分子の同定

免疫沈降法と質量分析を用いたプロテオミクス解析によって、Ralt 複合体を構成する分子の一つとして、14-3-3 蛋白質を同定した。さらに、Western Blot 解析を行った結果、いくつかの内在性 14-3-3 蛋白質と Ralt が結合することが確認できた (図 4)。この内、心筋の発生過程や細胞死に関与することが知られる 14-3-3 theta アイソフォームに注目し、Ralt との結合調節機構の解析を行った。

その結果、14-3-3 theta 内の 49 番目のリジンがグルタミン酸へ、176 番目のバリンがアスパラギン酸に置換した変異体は、野生型 Ralt との結合能が失われることがわかった。また、Ralt 内の 250 番目のセリン残基をアラニンに置換した変異体では、野生型 14-3-3 theta との結合が抑制されることが明らかとなった。さらに、protein phosphatase1 (PP1) で脱リン酸化処理を行った組換え Ralt 蛋白質は、14-3-3 theta との結合に影響は無かったことから、この結合には Ralt のリン酸化

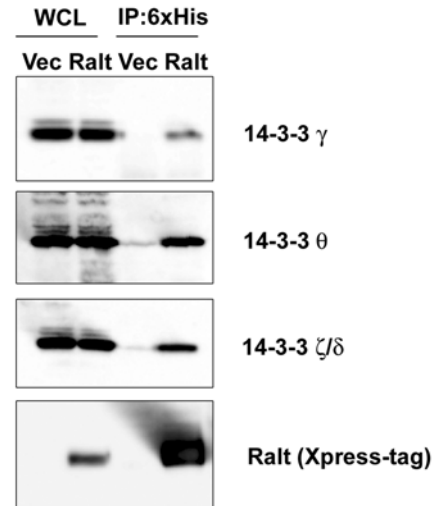


図4 Raltは内在性の14-3-3蛋白質ファミリーと結合する。H9c2細胞で発現させたRaltを6xHisタグ抗体で免疫沈降後、Western Blot解析により14-3-3蛋白質アイソフォームとの結合を調べた。

状態に依存しないことを示唆した。しかしながら、他の全ての 14-3-3 蛋白質アイソフォームとの結合において、Ralt のリン酸化状態に依存しないのかどうかに関しては、theta アイソフォームも含め、今後さらなる詳細な解析が必要であると考えられる。

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 1 件)

- ① Takeda K, Akazawa S, Kawai Y, Kajinami K. Regulation of Positive Feedback Loop of HB-EGF Signal by Gene33/Ralt in H9c2 cells. J. Kanazawa Med. Univ. 2008 (33): 76-85 査読有

[学会発表] (計 2 件)

- ① Kenji Takeda, Yasuhito Ishigaki, Yasuyuki Kawai, Kouji Kajinami Ralt interacts with 14-3-3 proteins in H9c2 cells. 第 32 回日本分子生物学会年会 2009 年 12 月 9 日 横浜
- ② 竹田健史, 河合康幸, 梶波康二 Gene33

は、H9c2 細胞においてHB-EGFシグナルの負のフィードバック制御因子として働く。第31回日本分子生物学会年会 2008年12月12日 神戸

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹田 健史 (TAKEDA KENJI)
金沢医科大学・医学部・助教
研究者番号：90340009