

令和 4 年 5 月 17 日現在

機関番号：21601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22907

研究課題名（和文）細胞内品質管理に着目した心不全の新規メカニズムの解明：N-ミリスチル化の意義

研究課題名（英文）The role of N-myristoylation for intracellular quality control in heart failure

研究代表者

安齋 文弥（Fumiya, Anzai）

福島県立医科大学・医学部・博士研究員

研究者番号：00877087

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：プロテオミクス解析によりミリスチル化蛋白質の網羅的解析を行い、心筋細胞におけるミリスチル化蛋白質を同定した。siRNAまたはアデノウイルスshRNAによるN-myristoyltransferase (NMT) 2ノックダウンで、H9c2心筋細胞、仔ラット心筋細胞のN-ミリスチル化レベルが著しく低下すること示し、心筋細胞をアンジオテンシン（A）で刺激し、Aに反応して全体のN-ミリスチル化レベルが減少することを示した。アデノ随伴ウイルス9を用いた遺伝子導入により、マウス心臓にNMT2を過剰発現させたところ、横行大動脈縮窄後で左室収縮機能障害、心肥大、心筋線維化が改善した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では心不全におけるN-ミリスチル化の病態意義を解明し、それが治療法の開発につながるか検討した。心不全と密接に関連するN-ミリスチル化を同定して、N-ミリスチル化を正常にコントロールすることにより心筋細胞内のタンパク質品質管理が維持され、心不全の改善が期待される。さらに、N-ミリスチル化とオートファジーとの関連性を明らかにすることで、タンパク質分解機構のメカニズム解明につながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Proteomics analysis detected the N-myristoylated protein in cardiomyocytes. The knock-down of N-myristoyltransferase (NMT) 2 using siRNA or shRNA showed the suppression of N-myristoylation in H9c2(cardiomyocytes) and neonatal rat cardiomyocytes, and Angiotensin II stimulation suppressed N-myristoylation in for cardiomyocytes. Furthermore, the over-expression of NMT2 in mice heart using Adeno-associated virus 9 improved the left ventricular systolic dysfunction, hypertrophy and the fibrosis by transverse aortic constriction.

研究分野：心不全

キーワード：心不全 ミリスチル化 オートファジー 細胞内品質管理

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本邦の加速する超高齢社会において、心不全の患者数に加えて心不全で死亡する症例が劇的に増加し、病態解明に基づく新たな心不全治療の開発が望まれている。心筋細胞は、分裂しない終末分化した細胞であるため、細胞内の恒常性維持のためのタンパク質品質管理は特に重要である。そのため、ユビキチン-プロテアソーム系、オートファジーなど複数の細胞内タンパク質分解経路が備わっているが、心不全の心筋細胞内では不良タンパク質の凝集や蓄積が認められる。すなわち、細胞内品質管理が適切でない場合、ミスフォールディングした不良タンパク質の蓄積が生じて、心筋障害から心機能低下を来し、心不全の発症と進展に強く関与する。

タンパク質の N-ミリスチル化は、N-ミリスチル転移酵素 (NMT) によって N-末端グリシン残基にミリスチル基が結合するタンパク質翻訳後修飾である。最近、N-ミリスチル化を免れたタンパク質は、ユビキチン-プロテアソーム系で分解されることが報告され (Science 2019; 365: eaaw4912)、言い換えれば、非 N-ミリスチル化タンパク質は不良タンパク質として認識され、その蓄積・凝集から細胞障害を引き起こすことが示唆される。すなわち、N-ミリスチル化は、細胞情報伝達などの正常な生理活性に関与するだけではなく、心筋細胞のタンパク質品質管理に関与している可能性がある。しかし、心臓における N-ミリスチル化タンパク質についてはこれまで検討されておらず、心不全における病態意義も未解明である。N-ミリスチル化の基質となる特定のタンパク質蓄積やそのメカニズムを解明して、それをコントロールできれば新しい治療法の開発につながる可能性があり、これを明らかにする意義は大きい。

2. 研究の目的

N-ミリスチル化の基質となる特定のタンパク質蓄積やそのメカニズムを解明し、心臓における N-ミリスチル化の詳細や心不全における病態意義を明らかにすること。

3. 研究の方法

1) H9c2 心筋細胞、仔ラット心筋細胞を用いた N-ミリスチル化タンパク質の網羅的解析

siRNA またはアデノウイルス shRNA を作成して、これを用いて H9c2 心筋細胞、仔ラット心筋細胞の NMT2 をノックダウンさせ、クリックケミストリー法により標識された N-ミリスチル化タンパク質をプロテオミクス解析によりプロファイリングする。また、心肥大とりモデリングの過程における N-ミリスチル化の役割を明らかにするために、心筋細胞を A で刺激して同様に N-ミリスチル化タンパク質の変化を定量する。

2) N-ミリスチル化タンパク質 X と A 誘導性心筋細胞肥大の関連性の検討

N-ミリスチル化タンパク質の網羅的解析の結果から NMT2、A 刺激 に応答して N-ミリスチル化が著しく低下するタンパク質 X を同定し、ミリスチル化不全タンパク質 X を用いて、A 誘導性心筋細胞肥大におけるタンパク質 X の意義を検討する。

3) マウス大動脈縮窄による圧負荷心不全モデルを用いた NMT2 の意義の検討

心臓における N-ミリスチル化の役割を明らかにするために、アデノ随伴ウイルス 9 を用いた遺伝子導入により、圧負荷心不全モデルマウスに心臓に特異的な NMT2 を過剰発現させ、横行大動脈収縮後 4 週間で圧力負荷による左室収縮機能障害、心肥大、心筋線維化が改善されるかを検討する。

4. 研究成果

1) 心筋細胞におけるグローバルな N-ミリスチル化タンパク質プロファイリングと心肥大とりモデリングの過程における N-ミリスチル化の変化

H9c2 心筋細胞および仔ラット心筋細胞において、クリックケミストリーを用いたプロテオミクス解析を施行した。siRNA またはアデノウイルス shRNA によるノックダウンで NMT2 を阻害すると細胞内の N-ミリスチル化レベルは著しく低下した。心肥大とりモデリングの過程における N-ミリスチル化の役割を明らかにするために、心筋細胞を A で刺激し、A に反応して全体の N-ミリスチル化レベルが有意に減少することを示した。

2) 心筋細胞におけるタンパク質 X の意義

プロテオミクス解析の結果から AII に応答してタンパク質 X の N-ミリスチル化が著しく低下することが観察されたため、N 末端のグリシンをアラニンに置換した変異型タンパク質 X (G2A) を作製した。免疫蛍光分析により、野生型タンパク質 X が細胞膜に局在しているのに対し、変異型タンパク質 X は細胞質内に分布していることが示された。AII 刺激後、変異型タンパク質 X では遺伝子の転写促進を伴って心筋細胞表面積が増大した。このことから、タンパク質 X の N 末端グリシンのミリスチル化が、その局在化により心筋細胞のリモデリングに機能的影響を与えることが示唆された。

3) マウス大動脈狭窄 (transverse aortic constriction, TAC) による圧負荷心不全モデルにおける N-ミリスチル化改善の意義

心臓における N-ミリスチル化の役割を明らかにするために、アデノ随伴ウイルス 9 を用いた遺伝子導入により、マウスに心臓に特異的な NMT2 を過剰発現させたところ、横行大動脈収縮後 4 週間で圧力負荷による左室収縮機能障害、心肥大、心筋線維化が有意に改善されることが示された。心筋細胞の N-ミリスチル化は心不全発症時に必須の役割を果たし、NMT2 によるその修飾は心不全の新規戦略として期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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

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