

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月15日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590248

研究課題名（和文）新たな心機能制御因子；Ca²⁺センサー-NCS-1の生理的・病態的役割の解明研究課題名（英文）Novel role of neuronal Ca²⁺ sensor-1 as a regulator of cardiac function

研究代表者

西谷 友重（NISHITANI TOMOE）

独立行政法人国立循環器病研究センター・分子生理学・室長

研究者番号：50393244

研究成果の概要（和文）：心臓の収縮や心肥大・心不全の発症を調節するものとして、細胞内カルシウム（Ca²⁺）の増減が重要なカギとなっている。幼少期の心臓は、「筋小胞体」と呼ばれる細胞内Ca²⁺貯蔵装置が成体と較べはるかに未発達であることから、どのようにCa²⁺による収縮調節を行っているのか不明であった。今回、幼少期の心臓に高発現するが、心臓における役割が不明であったCa²⁺結合タンパク質NCS-1（Neuronal Ca²⁺ sensor-1）に注目し、その遺伝子欠損（KO）マウスを解析した結果、NCS-1がその未熟さを補う因子であることがわかった。すなわち、NCS-1は細胞内Ca²⁺シグナルを増加させることにより、幼少期の心筋収縮を増加させることがわかった。さらにNCS-1は心肥大の際にもその発現量が上昇し、ホルモン刺激による心肥大を仲介するという、2つの重要機能を見出した。

研究成果の概要（英文）：Intracellular Ca²⁺ plays key roles in regulating excitation-contraction coupling (EC) and hypertrophy in the heart. In the immature heart, the structure and function of sarcoplasmic reticulum (SR) is immature; nonetheless, it is considered a primary source of Ca²⁺ for contraction, suggesting the existence of missing factors that promote SR-dependent EC coupling. We showed that neuronal Ca²⁺ sensor-1 (NCS-1), a small Ca²⁺ binding protein, which functions in the heart were unknown, is one such regulator that enhances Ca²⁺ signals and contraction in the immature heart. In addition, NCS-1 expression increases in the early stages of hypertrophy in the adult heart and promotes progression of hypertrophy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
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：分子・細胞生理学、カルシウム、心臓

1. 研究開始当初の背景

(1)心臓の収縮、心肥大形成などに細胞内Ca²⁺

が重要な役割を担っており、その働きを仲介するものとしてカルモジュリンに代表され

るような多くのEF-ハンドCa²⁺結合蛋白質が存在する。NCS-1(Neural Ca²⁺ sensor-1/Frequenin)は興奮性細胞特異的に発現するCa²⁺センサータンパク質であり、イオンチャネルやイノシトールリン酸酵素PI4Kの制御などを行なうことにより、神経機能に重要な役割を担っていることが知られている。NCS-1は神経のみならず、特に未成熟期の心臓にも高発現しているが、心臓におけるNCS-1の生理的・病態的役割についてはほとんど不明である。

(2) 未成熟期の心臓における興奮-収縮相関は、成体のそれとは異なることが報告されているが、その全貌は明らかではない。また、心肥大の発症メカニズムも全貌は明らかではない。

2. 研究の目的

(1) NCS-1欠損(KO)マウスを解析することにより、NCS-1の心臓における役割、特に未成熟期や病態時における生理的・病態的意義を明らかにすることを目的とした。

(2) 関連タンパク質同定を含めた分子メカニズムを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子改変動物の作製：野生型ヒトNCS-1およびCa²⁺との結合力が弱い変異型(E120Q)、またそれぞれのHA標識体を作製し、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。

(2) 心機能解析：Mモード左室短軸心エコーにより心機能および心臓形態を測定した。マウスを1-1.5%イソフルラン下で麻酔し、体温および心拍数、心電図をモニターしながら、心機能の指標として左室内径短縮率(FS)を下記の式にて計算して求めた。 $FS(\%) = \{LVDd(\text{左室拡張期内径}) - LVDs(\text{左室収縮期内径})\} / LVDdx100$ 。

(3) 心筋細胞の単離：成体マウス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、繊維芽細胞を取り除き、初代培養を行なった。

(4) 細胞内Ca²⁺濃度およびSR Ca²⁺量の測定：

①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)は34°Cにて、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(浜松フotonクス)を用いた。

②また筋小胞体内のCa²⁺レベルはカフェイン添加によるCa²⁺トランジェントの振幅を指標にした。蛍光指示薬はFluo-4を用い、室温で測定した。

(5) 免疫蛍光法、免疫沈降法：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 μ m)および培養心筋細胞を、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。また免疫沈降法は、心筋細胞をRIPA bufferで可溶化した後、遠心(15000rpm, 20min)した上清を、特異抗体およびプロテインAセファロース存在下で免疫沈降し、ウェスタンブロットにて相互作用するタンパク質を検出した。

(6) 肥大心の形成：浸透圧ミニポンプ

(Alzet 1007D, Durect Corporation)を用いてフェニレフリン(60 mg/(kg·day)⁻¹)またはPBSをマウス肩甲骨皮下内に注入し、1週間後、心臓を取り出して、心重量、繊維化、RT-PCRなど各種解析を行った。

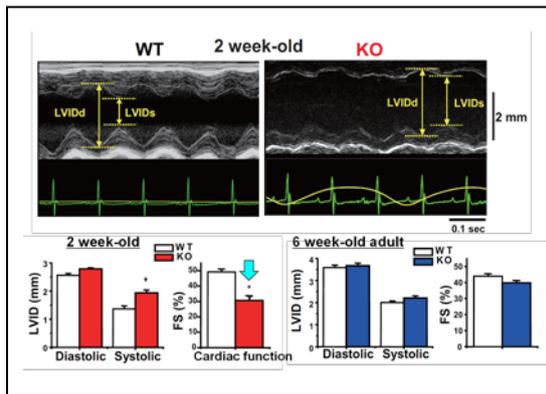
(7) 定量RT-PCR：凍結保存した心臓からトータルRNAを調整し、逆転写反応によりcDNAにする。これをテンプレートにして、ANP, BNP, α -MHC, β -MHCなどに対する各種primerおよびtaqman probeの混合物を添加し、LightCycler IIを用いて定量PCRを行った(Roche Molecular Biochemicals)。L6の値を内部コントロールとして相対値を比較した。

4. 研究成果

(1) NCS-1の心臓における発現パターン。NCS-1は成体に比べ、胎児および新生児期で発現量が高く、徐々に減少していくことがわかった。また細胞内局在は、形質膜および核膜周辺のほか、SRなどのCa²⁺シグナル関連部位に集積していた。

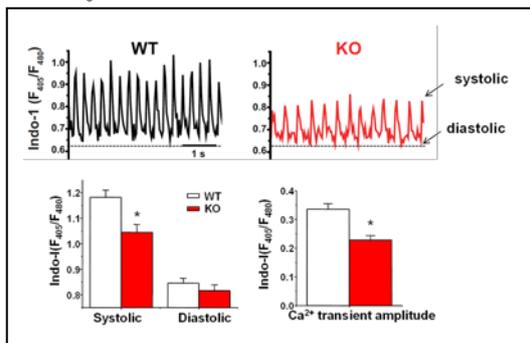
(2) NCS-1の遺伝子欠損(KO)マウスの個体レベルでの解析。

成体および生後2週齢の幼若マウスの両方で心エコーによる心機能解析を行った。2週齢のKOマウスでは、心機能の指標であるFractional shortening (FS)が顕著に低下していた。一方、6週齢の成体マウスでは、心機能はWTとKOで違いは認められなかった。



(3) 細胞内Ca²⁺レベルとその制御タンパク質の比較。

幼若マウスにおける心機能低下の細胞内メカニズムを明らかにするため、新生児由来の培養心筋細胞の細胞内Ca²⁺トランジェントをWTとKOで比較した。その結果、KO心筋では収縮期におけるCa²⁺レベルが顕著に低下しており、その結果amplitudeも低下していた。また、SRのCa²⁺量もKO心筋で低下していた。



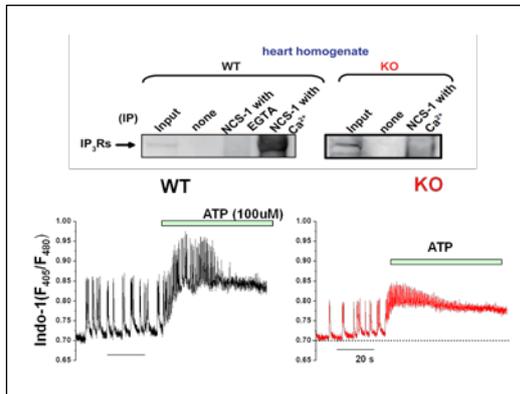
次に、どのような分子メカニズムでSR Ca²⁺量が変わったのか明らかにするため、種々の心筋Ca²⁺制御タンパク質の量を生後1週齢のWTとKOマウスで比較した。その結果、電位依存性Ca²⁺チャネル、Na⁺/Ca²⁺ exchanger, calsequestrin, SR Ca²⁺pumpの量はWTとKOでほとんど差は認められなかった。

ところが、KO心筋では、CaMKIIおよびCaMKII依存性PLBのリン酸化が顕著に低下していた。すなわち、CaMKIIおよびCaMKII依存性PLBの活性が低下することにより、SR Caポンプ活性が低下し、これが、SR Ca²⁺量、細胞内Ca²⁺量、心筋収縮力を低下させている原因と考えられた。

(4) NCS-1とIP₃受容体との相互作用。

次に、WTマウスにおいて、CaMKIIを活性化させているCa²⁺ソースは何かについて検討を行なった。私たちは、心筋においてNCS-1とSRからのCa²⁺ release チャンネルであるIP₃受容体が免疫沈降することを確認した。さ

らに、ATP添加によりIP₃受容体を活性化すると、WTでは弛緩期、収縮期両方のCa²⁺レベルが上昇したが、KO心筋ではWTほど上がらなかった。また、形質膜を介するCa²⁺流入をブロックするため細胞外Ca²⁺をフリーにして同様の実験を行ったところ、やはりKOで顕著に低下していることがわかった。これらの結果は、NCS-1が心筋においてもIP₃受容体活性を制御していることを強く示唆している。



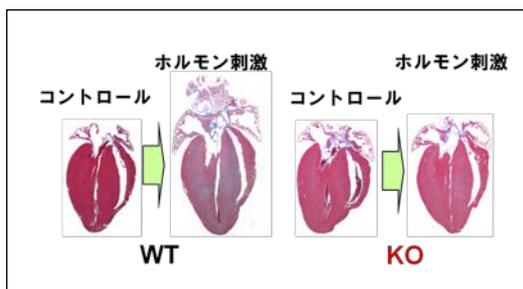
(5) NCS-1と心肥大との関連。

未成熟期に高発現するタンパク質は、” fetal program gene”などに代表されるように、その多くが心肥大にも関与することが知られている。また、IP₃受容体も心肥大に寄与することから、NCS-1と心肥大との関連について検討した。培養心筋細胞に、心肥大誘発ホルモンであるフェニレフリンやエンドセリン1を添加すると、NCS-1の発現量が上昇することが明らかとなった。また逆に、NCS-1をアデノウイルスにて高発現させた心筋細胞では、心肥大誘発因子を加えた場合と類似した形態変化や収縮力の増加、また心肥大マーカーであるANFの発現量が顕著に亢進した。すなわち、NCS-1の高発現は、心肥大を誘導することが示唆された。

次に、NCS-1のKO心臓ではホルモン刺激による心肥大は抑制されるかについて検討した。in vivo heartにおいて、浸透圧ミNOPポンプによりフェニレフリンを注入すると、WTでは心筋細胞面積の増加、繊維化、心肥大マーカーの増大を伴う顕著な心肥大が認められたのに対し、KO心筋ではこれら全てが顕著に抑えられることがわかった。これらの結果は、NCS-1がホルモン刺激による心肥大を一部、仲介することを強く示唆している。

さらに、Ca²⁺依存性心肥大シグナルとしてCaMKIIとカルシニューリンがあるが、フェニレフリンによるリン酸化CaMKIIおよびMCIP (カルシニューリン制御タンパク質)の発現増加がNCS-1 KOマウスで顕著に抑

えられていたことより、NCS-1による心肥大形成には、この両方の経路が関与していることがわかった。



(6) 考察。

以上の結果より、NCS-1の心筋における2つの重要な機能が初めて明らかとなった。それは、NCS-1は未成熟期や心肥大の際、その発現量が増加し、未成熟期の心機能亢進および心肥大形成に寄与することが明らかとなった。そのメカニズムとして、WT心筋において、NCS-1、IP₃受容体、CaMKIIの3者が未成熟期で高発現し、NCS-1がIP₃受容体をCa²⁺依存的に活性化することにより局所の心筋Ca²⁺シグナルが増加し、これがCaMKIIを活性化するCa²⁺ソースとなる。そして、CaMKII依存性PLB活性が活性化することによりSR Caポンプ活性が上昇し、SR Ca²⁺量および細胞内Ca²⁺量が増加して、未成熟なSRの機能を補助することにより、心筋収縮力を増加させていることがわかった。一方、成体においてもホルモン刺激などによりNCS-1の発現量が増加し、IP₃受容体との相互作用によりCaMKIIやカルシニューリンの活性化を介して心肥大形成に寄与することが明らかとなった。これらの知見は、小児科領域の心臓生理の理解のみならず、心肥大発症機構の解明、また心不全の治療などにも役立つことが期待される。

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 4件)

- ① Hisamitsu T, Nakamura TY, Wakabayashi S. Na⁺/H⁺ exchanger 1 directly binds to calcineurin A and activates downstream NFAT signaling, leading to cardiomyocyte hypertrophy. *Mol Cell Biol.* 2012 [Epub ahead of print]. DOI:10.1128/MCB.00145-12
- ② Kuramoto K, Okamura T, Yamaguchi T, Nakamura TY, Wakabayashi S, Morinaga H, Nomura M, Yanase T, Otsu K, Usuda

N, Matsumura S, Inoue K, Fushiki T, Kojima Y, Hashimoto T, Sakai F, Hirose F, Osumi T. Perilipin 5, a lipid droplet-binding protein, protects the heart from oxidative burden by sequestering fatty acid from excessive oxidation. *J Biol Chem.* 2012 [Epub ahead of print] DOI:10.1074/jbc.M111.328708

- ③ Tomoe Y. Nakamura, Andreas Jeromin, Katsuhiko Mikoshiba, Shigeo Wakabayashi. Neuronal Calcium Sensor-1 Promotes Immature Heart Function and Hypertrophy by Enhancing Ca²⁺ Signals. *Circulation Research.* 査読有、109、2011,512-523. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.111.248864
- ④ Wakabayashi S, Nakamura TY, Kobayashi S, Hisamitsu T. Novel phorbol ester-binding motif mediates hormonal activation of Na⁺/H⁺ exchanger. *J. Biol. Chem.* 査読有、285,2010,26652-61 DOI: 10.1074/jbc.M110.130120

[学会発表] (計 14件)

- ① 西谷(中村)友重. 幼少期の心機能および心肥大を制御する新しいカルシウム調節タンパク質の発見と分子機構。第89回日本生理学会大会(シンポジウム)。2012年3月29日。長野県松本文化会館。
- ② 中村(西谷)友重. Neuronal Ca²⁺ Sensor-1のストレス下の心筋サバイバル因子としての働き。第104回近畿生理学談話会。2011年10月1日。大阪医科大学。
- ③ 中村(西谷)友重. Neuronal Ca²⁺ sensor-1のストレス下の心筋サバイバルにおける役割。第84回日本生化学会大会(Talk)。2011年9月24日、京都国際会議場。
- ④ 若林繁夫。Na⁺/H⁺交換輸送体(NHE1)の活性化による心肥大シグナル増幅機構。第84回日本生化学会大会(シンポジウム)。2011年9月21日。京都国際会議場。
- ⑤ Wakabayashi, S., Newly identified phorbol ester-binding motif mediates hormonal activation of Na⁺/H⁺ exchanger (NHE1). 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会(Poster)。2010年12月9日、神戸ポートアイランド。

- ⑥ Nakamura-Nishitani, T. Neuronal Ca²⁺ Sensor-1 is a novel regulator of Ca²⁺-signaling in immature heart. 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会(Talk)。2010年12月7日、神戸ポートアイランド。
- ⑦ 中村(西谷)友重。Neuronal Ca²⁺ Sensor-1は幼弱心筋における心機能亢進因子である。第103回近畿生理学談話会。2010年10月2日、大阪大学銀杏会館。
- ⑧ 若林繁夫。Na⁺/H⁺交換輸送体は生理活性脂質およびホルボールエステルとの直接的相互作用を介して活性化される。第87回日本生理学会大会。2010年5月21日、盛岡市民文化ホール。
- ⑨ 中村(西谷)友重。Neuronal Ca²⁺ Sensor-1は新たな心筋Ca²⁺シグナル調節因子である。第87回日本生理学会大会。2010年5月21日、盛岡市民文化ホール。
- ⑩ Nakamura-Nishitani, T.Y., Novel role of neuronal Ca²⁺ sensor-1 as a regulator of Ca²⁺ signaling in the heart. ISHR第20回世界会議。2010年5月14日、京都国際会議場。
- ⑪ 西谷 友重。Neuronal Ca²⁺ Sensor-1 (NCS-1)は新しい心筋Ca²⁺シグナル調節因子である。特定領域研究「細胞感覚」平成21年度冬の班会議。2009年12月23日、箕面観光ホテル(大阪府)。
- ⑫ 西谷 友重・若林 繁夫。心機能不全におけるイオンシグナロームの役割と病態的意義の解明。循環器病研究委託費20公-3 平成21年度班会議。2009年12月18日、国立循環器病センター(大阪府)。
- ⑬ 西谷(中村)友重。Neuronal Ca²⁺ Sensor-1 (NCS-1)の心筋Ca²⁺シグナル調節因子としての機能解析。第82回日本生化学会大会。2009年10月24日、神戸ポートピアホテル(兵庫県)。
- ⑭ Tomoe-Y Nakamura-Nishitani. Novel role of NCS-1, a Ca²⁺ sensor as a regulator of cardiac function. The 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences. 2009年6月30日、京都国際会議場(京都府)。

[図書] (計 1件)

西谷 友重、共立出版、蛋白質 核酸 酵素
PNE (Fraction collector) Oh NO! NOが筋ジ

ストロフィーの原因となる! 2009, 852.

[その他]
新聞報道

- ① 2011年7月8日、毎日新聞朝刊。「子供の心拍調節たんぱく質」
- ② 2011年7月8日、産経新聞朝刊。「乳幼児の心不全治療に光」
- ③ 2011年7月、朝日新聞夕刊。「幼い子の心臓を調節 たんぱく質発見」

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西谷 友重 (TOMOE NISHITANI)
独立行政法人国立循環器病研究センター・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

()

研究者番号: