

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591088

研究課題名(和文) MURCによる心筋細胞のカベオラとトランスポートソームの制御機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of MURC-mediated mechanisms of caveolae function and transportsome formation in cardiomyocytes

研究代表者

上山 知己 (UEYAMA, Tomomi)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：80379388

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：心筋細胞においてMURCはカベオラやT管に局在しているため、MURC-KOマウスを作出し、MURC欠損によるカベオラ形態への影響を検討したが、MURC-KOマウスにおいてもwild-type (WT)マウス心筋細胞にカベオラを認めた。しかし、MURC-KOマウスでは α 1受容体刺激によるERKの活性化と心肥大がWTマウスに比べ抑制されていた。以上の結果から、MURCはカベオラの形成に必須ではないが、 α 1受容体刺激によるERKの活性化と心肥大に重要な役割を果たしていることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Immunoelectron microscopy revealed that MURC was expressed in caveolae and T tubules in cardiomyocytes, and transmission electron microscopy showed that caveolae were retained in cardiomyocytes of MURC-knockout (KO) mice. Alpha-1 adrenergic receptor (AR) stimulation-induced ERK activation and cardiac hypertrophy were attenuated in MURC-KO mice compared with wild-type mice. Upon alpha-1-AR stimulation, both MURC and phosphorylated ERK were translocated from the plasma membrane to the perinuclear region in cardiomyocytes. Immunoprecipitation revealed that MURC was associated with phosphorylated and total ERK. These findings suggest that MURC is dispensable for caveolar formation in cardiomyocytes, and that MURC serves as an ERK-recruiting protein in the caveolae within cardiomyocytes. The recruiting function of MURC is necessary to elicit efficient signaling of the alpha-1-AR/ERK cascade in the caveolae in cardiac hypertrophy.

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：心肥大 カベオラ 心筋細胞

1. 研究開始当初の背景

(1). 細胞膜の小さな窪みであるカベオラには受容体やイオンチャネルなどが集積しており、細胞膜における情報交換に中心的な役割を担っている。カベオラはまた、エンドサイトーシスや脂質糖代謝にも関わっていることが示されている。

(2). カベオラにはカベオリンと呼ばれる膜の裏打ち蛋白質が存在し、カベオラの形成や機能に重要な役割を果たしている。カベオリン-3は、筋細胞特異的に発現しており、カベオリン-3の遺伝子変異が、筋ジストロフィー、long-QT 症候群、心筋症の症例で報告されている。また、カベオリン以外に cavin family 蛋白質 (PTRF/Cavin-1, SDPR/Cavin-2, SRBC/Cavin-3) もまたカベオラの制御に重要なことが明らかになってきた。PTRF/cavin-1の遺伝子変異では、カベオラの形成異常が見られ、リポジストロフィー、筋ジストロフィー、long-QT 症候群、心室頻拍を呈すると報告されている。

(3). 我々はこれまでに、心臓、骨格筋、血管平滑筋にのみ発現している筋細胞特異的遺伝子 MURC を単離・同定し、MURC が心不全や不整脈発症に関与することを報告したが (Ogata et al. Mol Cell Biol. 2008)、その後、MURC が cavin family に属し、カベオラに局在することが示され、MURC を含む cavin family の筋疾患における重要性が示唆されるようになった。

2. 研究の目的

我々は、MURC と PTRF/Cavin-1 および SDPR/Cavin-2 やカベオリン-3 が結合すること、MURC の coiled-coil domain を欠失させた MURC の変異体 (Δ coiled-coil) では、細胞膜への局在がカベオリン-3 と共に損なわれることを見出している。これらの結果とカベオラがエンドサイトーシスに関与しているという知見から、我々は、MURC が筋細胞において膜輸送複合体 (トランスポートソーム) の形成を介して細胞の恒常性維持に関わり、その異常が筋疾患の原因となるのではないかと考えた。本研究では、MURC の筋細胞におけるトランスポートソームの形成における役割と、生体機能・病態との関わりを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1). MURC の筋細胞での局在を免疫電子顕微鏡法で検討する。

(2). MURC-knockout (KO) マウスを作成し、1 受容体刺激薬である phenylephrine (PE) 刺激による心肥大に対する MURC の作用を検討する。

(3). 筋細胞での PE 刺激時の ERK の活性化における MURC の役割を検討する。

(4). PE 刺激時の MURC と ERK の筋細胞での

局在を免疫染色にて検討する。

4. 研究成果

(1). 免疫電子顕微鏡法にて筋細胞における MURC の局在を検討したところ、MURC はカベオラ (図 1) や T 管に局在していた。

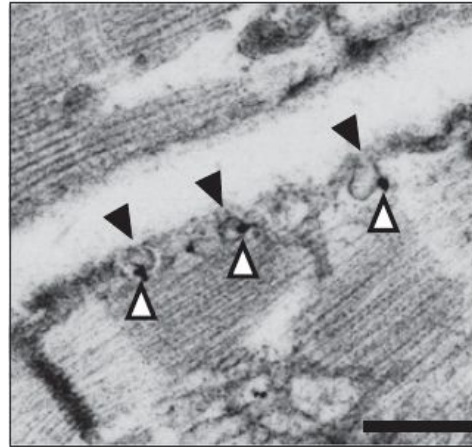


図 1 . 筋細胞において MURC はカベオラに局在する。 はカベオラ、 は金でラベルされた MURC を示す。Bar, 500nm . (Ogata T et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014)

(2). MURC-KO マウスを作成し、筋細胞におけるカベオラを電子顕微鏡にて観察したところ、MURC-KO マウスにおいてもカベオラを認めた。また、MURC-KO マウスの心重量や心機能を WT マウスと比較検討したが、MURC-KO マウスと WT マウスに差は認めなかった。しかし、PE を mini-osmotic pump を用い投与し心肥大モデルを作成したところ WT マウスに比べ MURC-KO マウスでは心肥大が抑制されており、ERK の活性化を示す ERK のリン酸化も抑制されていた (図 2)。

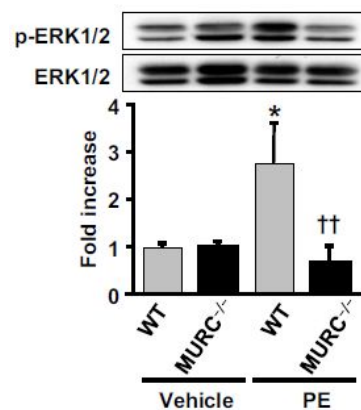


図 2 . MURC-KO マウスでは PE による ERK の活性化は抑制されている。* $P < 0.05$ vs vehicle-treated WT mice, $^{††}P < 0.01$ vs PE-treated WT mice . (Ogata T et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014)

(3). 次に、新生仔ラットの培養筋細胞に MURC shRNA を発現するアデノウイルスを感染させ MURC を knockdown し、PE による ERK の

活性化における MURC の役割を検討したところ、*vivo* の結果と同様に PE による ERK の活性化は MURC knockdown で抑制されていた。また、MURC とリン酸化 ERK は PE 刺激前には細胞膜に局在していたが、PE 刺激により核周囲に移行していた。そして、MURC を knockdown すると細胞膜におけるリン酸化 ERK の局在も減少していた。

(4). 以上の結果から、心筋細胞において MURC はカベオラの形成に必須ではないが、 α_1 受容体刺激による ERK の活性化と心肥大に重要な役割を果たしていることが明らかになった。また、 α_1 受容体刺激によるカベオリン-3 の局在変化は検討できていないが、 α_1 受容体刺激による MURC とリン酸化 ERK の局在変化はトランスポートソームによる可能性が考えられ、MURC がトランスポートソームの形成に関与している可能性も考えられるため、今後さらに検討が必要と考える。

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5件)

1. Ogata T, Naito D, Nakanishi N, Hayashi YK, Taniguchi T, Miyagawa K, Hamaoka T, Maruyama N, Matoba S, Ikeda K, Yamada H, Oh H, Ueyama T. MURC/Cavin-4 facilitates recruitment of ERK to caveolae and concentric cardiac hypertrophy induced by α_1 -adrenergic receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014; 111: 3811-3816.
2. Imoto-Tsubakimoto H, Takahashi T, Ueyama T, Ogata T, Adachi A, Nakanishi N, Mizushima K, Naito Y, Matsubara H. Serglycin is a novel adipocytokine highly expressed in epicardial adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013; 423: 105-110.
3. Nakanishi N, Takahashi T, Ogata T, Adachi A, Imoto-Tsubakimoto H, Ueyama T, Matsubara H. PARM-1 promotes cardiomyogenic differentiation through regulating the BMP/Smad signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012; 428: 500-505.
4. Adachi A, Takahashi T, Ogata T, Imoto-Tsubakimoto H, Nakanishi N, Ueyama T, Matsubara H. NFAT5 regulates the canonical Wnt pathway and is required for cardiomyogenic differentiation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012; 426: 317-323.
5. Rodriguez G, Ueyama T, Ogata T, Czernuszewicz G, Tan Y, Dorn GW 2nd, Bogaev R, Amano K, Oh H, Matsubara H, Willerson JT, Marian AJ. Molecular

genetic and functional characterization implicate muscle-restricted coiled-coil gene (MURC) as a causal gene for familial dilated cardiomyopathy. *Circ Cardiovasc Genet*. 2011; 4:349-358.

[学会発表](計25件)

1. Nakanishi N, Ogata T, Maruyama N, Miyagawa K, Hamaoka T, Ueyama T. MURC/Cavin-4 deficiency alleviates pulmonary arterial hypertension. 第78回日本循環器学会学術集会、2014年3月、東京都.
2. Miyagawa K, Ogata T, Nakanishi N, Hamaoka T, Maruyama N, Ueyama T. Genetic deletion of MURC/Cavin-4 aggravates abdominal aortic aneurysm. 第78回日本循環器学会学術集会、2014年3月、東京都.
3. Maruyama N, Ogata T, Nakanishi N, Miyagawa K, Hamaoka T, Ueyama T. SDPR/Cavin-2 prevents cardiomyocyte hypertrophy through the inhibition of Akt signaling. 第78回日本循環器学会学術集会、2014年3月、東京都.
4. Hamaoka T, Naito D, Ogata T, Nakanishi N, Miyagawa K, Maruyama N, T Shirayama, Ueyama T. MURC/Cavin-4 modulates caveolin-3 function and regulates cardiac function. 第78回日本循環器学会学術集会、2014年3月、東京都.
5. Nakanishi N, Ogata T, Miyagawa K, Hamaoka T, Maruyama N, Ueyama T. Deficiency of MURC/Cavin-4 alleviates pulmonary arterial hypertension. American Heart Association Scientific Session 2013. Nov. 2013, Dallas, USA.
6. Ogata T, Nakanishi N, Miyagawa K, Hamaoka T, Maruyama N, Ueyama T. MURC promotes recruitment of ERK1/2 to caveolae of the plasma membrane and concentric cardiac hypertrophy induced by α_1 -adrenergic stimulation. American Heart Association Scientific Session 2013. Nov. 2013, Dallas, USA.
7. Miyagawa K, Ogata T, Nakanishi N, Hamaoka T, Maruyama N, Ueyama T. Genetic deletion of MURC/cavin-4 aggravates abdominal aortic aneurysm. American Heart Association Scientific Session 2013. Nov. 2013, Dallas, USA.
8. Naito D, Ueyama T, Kobara M, Amano K, Ogata T, Taniguchi T, Nakanishi N, Miyagawa K, Matsubara H. MURC/Cavin-4 negatively regulates protective effects of caveolin-3 in cardiac function. 第77回日本循環器学会学術集会、2013年3月、神奈川県.
9. Nakanishi N, Ogata T, Miyagawa K, Naito

- D, Taniguchi T, Ueyama T, Matsubara H. MURC/Cavin-4, a muscle-specific caveolae-related protein, mediates the development of pulmonary arterial hypertension through enhanced G 13/p115RhoGEF/RhoA signaling. 第77回日本循環器学会学術集会、2013年3月、神奈川県.
10. Ogata T, Ueyama T, Naito D, Nakanishi N, Taniguchi T, Miyagawa K, Hamaoka T, Matsubara H. MURC/Cavin-4, a Muscle-restricted caveolar scaffolding protein for activated ERK, regulates cardiac hypertrophy induced by 1-adrenergic agonist. 第77回日本循環器学会学術集会、2013年3月、神奈川県.
 11. Nakanishi N, Ogata T, Miyagawa K, Hamaoka T, Maruyama N, Ueyama T. MURC regulates Rho/ROCK signaling in vascular smooth muscle cells and mediates the development of pulmonary arterial hypertension. 第21回日本血管生物学会学術集会、2013年9月、大阪府.
 12. Miyagawa K, Ogata T, Nakanishi N, Hamaoka T, Maruyama N, Ueyama T. MURC/Cavin-4 has a protective role in the progression of abdominal aortic aneurysm. 第21回日本血管生物学会学術集会、2013年9月、大阪府.
 13. Nakanishi N, Ogata T, Miyagawa K, Naito D, Taniguchi T, Ueyama T, Matsubara H. MURC/Cavin-4, a muscle-specific caveolae-related protein, mediates the development of pulmonary arterial hypertension through enhanced G 13/p115RhoGEF/RhoA signaling. American Heart Association Scientific Session 2012. Nov. 2012, Las Vegas, USA.
 14. Naito D, Ueyama T, Kobara M, Amano K, Ogata T, Taniguchi T, Nakanishi N, Miyagawa K, Matsubara H. MURC/Cavin-4 functions as a negative regulator of caveolin-3 in the development of heart failure. American Heart Association Scientific Session 2012. Nov. 2012, Las Vegas, USA.
 15. Ogata T, Ueyama T, Taniguchi T, Naito D, Nakanishi N, Miyagawa K, Hamaoka T, Matsubara H. MURC/Cavin-4, a new caveolar scaffolding protein for activated ERK, regulates cardiac hypertrophy induced by 1-adrenergic agonist. American Heart Association Scientific Session 2012. Nov. 2012, Las Vegas, USA.
 16. Ueyama T, Ogata T, Amano K, Matsubara H. Caveolae-related genes in heart failure and arrhythmia. 第76回日本循環器学会学術集会、2012年3月、福岡県.
 17. Nakanishi N, Ogata T, Miyagawa K, Naito D, Taniguchi T, Amano K, Ueyama T, Matsubara H. MURC functions as a caveolar scaffold protein for Rho signaling that regulates proliferation and migration of vascular smooth muscle cells. 第76回日本循環器学会学術集会、2012年3月、福岡県.
 18. Naito D, Amano K, Ogata T, Taniguchi T, Nakanishi N, Miyagawa K, Ueyama T, Matsubara H. Loss of MURC targeting to caveolae causes progressive cardiac dysfunction and intraventricular conduction delay. 第76回日本循環器学会学術集会、2012年3月、福岡県.
 19. Ogata T, Ueyama T, Naito D, Taniguchi T, Nakanishi N, Miyagawa K, Amano K, Matsubara H. MURC/Cavin-4 is a new caveolar scaffolding protein for phosphorylated ERK and regulates 1-adrenergic agonist-induced cardiomyocyte hypertrophy. 第49回日本臨床分子医学会学術集会、2012年4月、京都府.
 20. 中西直彦、小形岳寛、宮川浩太郎、内藤大督、谷口琢也、沢田尚久、上山知己、松原弘明. 筋特異的カベオラ蛋白MURCはCaveolin-1とG 13-GTPの結合を競合阻害し、Rho/ROCK pathwayを介した肺血管平滑筋細胞の増殖能・遊走能を亢進させる. 第1回日本肺循環学会学術集会、2012年9月、東京都.
 21. Naito D, Amano K, Ogata T, Taniguchi T, Nakanishi N, Miyagawa K, Ueyama T, Matsubara H. Impairment of MURC/Cavin-4 localization to caveolae causes progressive cardiac dysfunction and intraventricular conduction delay. 第29回国際心臓研究学会(ISHR)日本部会総会、2012年10月、福岡県.
 22. Nakanishi N, Ogata T, Miyagawa K, Naito D, Taniguchi T, Amano K, Ueyama T, Matsubara H. MURC regulates proliferation of vascular smooth muscle cells through the Rho/ROCK pathway. 第75回日本循環器学会総会、2011年8月、横浜.
 23. Naito D, Amano K, Ogata T, Taniguchi T, Nakanishi N, Miyagawa K, Hayashi YK, Morimoto T, Ueyama T, Matsubara H. MURC, muscle-restricted coiled-coil protein, is a component of the caveolin-cavin complex and regulates caveolae morphology in cardiomyocytes. 第75回日本循環器学会総会、2011年8月、横浜.
 24. Adachi A, Takahashi T, Imoto H, Nakanishi N, Kangawa H, Ueyama T,

Matsubara H. NFAT5 is essential for mesodermal and cardiomyogenic differentiation through regulating the canonical Wnt pathway . 第75回日本循環器学会総会、2011年8月、横浜.

25. 中西直彦, 小形岳寛, 宮川浩太郎, 内藤大督, 谷口琢也, 天野克也, 上山知己, 松原弘明 . MURC/Cavin-4 の Rho/ROCK pathwayを介した血管平滑筋機能制御メカニズムの検討 . 第34回日本高血圧学会総会、2011年10月、宇都宮.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

上山 知己 (TOMOMI UYAMA)

京都府立医科大学・医学研究科・講師

研究者番号 : 80379388