

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 27 日現在

機関番号：14401
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2012～2012
 課題番号：24659391
 研究課題名（和文）ドッキングタンパク質の心筋・骨格筋特異的アイソフォームの心不全病態での役割
 研究課題名（英文）The role of sarcomere-specific isoform of docking protein Gab1 in heart failure
 研究代表者
 中岡 良和（NAKAOKA YOSHIKAZU）
 大阪大学・医学系研究科・助教
 研究者番号：90393214

研究成果の概要（和文）：研究代表者はこれまで Gab ドッキングタンパク質に着目して研究して来た。今回、ドッキングタンパク質 Gab1 には普遍的に全身の細胞で発現するアイソフォーム（100kDa）に加えて、心筋・骨格筋で特異的に発現するサルコメア特異的アイソフォーム（120kDa）が存在することを見出した。更に、心筋・骨格筋特異的アイソフォーム Gab1 の cDNA 単離に成功し、これまで報告のない余剰エクソンが哺乳類で共通して存在することを明らかにした。この余剰エクソンはマウスの各臓器 mRNA での RT-PCR 解析で、心臓と骨格筋にのみ発現が見られ、この余剰エクソンのアミノ酸配列特異的な抗体を作成するとマウス胚 12.5 日齢では心臓特異的に発現していた。

研究成果の概要（英文）：We are focusing on the role of Gab docking proteins in the cardiovascular field. In the present study, we identified a novel isoform of Gab1 (120 kDa) expressed exclusively in cardiac muscle and skeletal muscle, which is different from a ubiquitous isoform of Gab1 expressed in all the tissues. We succeeded in cloning of sarcomere-specific Gab1 isoform cDNA and found the existence of extra-exon in sarcomere-specific Gab1 isoform in mammals. RT-PCR analysis revealed that the expression of this extra-exon was confined to myocardium and skeletal muscle in mice. In addition, we created rabbit polyclonal antibody specific to the amino acid sequences of this extra-exon, and found that this isoform is indeed expressed in the embryonic murine heart at E12.5.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,600,000	780,000	3,380,000

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：Gab1、ドッキングタンパク質、neuregulin-1、サルコメア、アイソフォーム

1. 研究開始当初の背景

研究代表者はこれまでレセプター型チロシンキナーゼ（RTK）のシグナル伝達で重要な役割を担う「Gab ドッキングタンパク質」の心血管系での機能解析に取り組んできた。心筋細胞特異的 Gab タンパク質（Gab1/Gab2）二重欠損（DKO）マウスの解析を

行い、このマウスが心臓組織内での内皮細胞から心筋細胞へ伝達される「neuregulin-1 (NRG-1)/ErbB シグナル」と心筋細胞から内皮細胞へ伝達される「angiopoietin-1 (Ang1)/Tie2 シグナル」からなる双方向性のパラクラインシグナルネットワークに破綻を来して拡張型心筋症

様の心不全を自然発症することを報告した (Nakaoka et al. *J. Clin. Invest.* 117, 1771, 2007)。

上記の研究過程で、研究代表者らは心臓と骨格筋のみで発現する Gab1 アイソフォームを発見した (図 1; Heart レーンの矢印)。

心臓 (と骨格筋) では Gab1 は通常の普遍型アイソフォームの分子量 100kDa に加えて、約 120 kDa のアイソフォームが発現していることを見出した。そこで、心筋・骨格筋特異的 Gab1 アイソフォームの cDNA を単離・同定して、その機能を明らかにしたいと考えた。

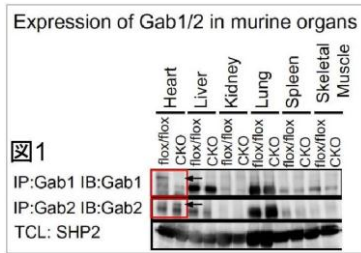


図1

2. 研究の目的

本研究では、心筋と骨格筋に特異的に発現する Gab1 のアイソフォームの cDNA を単離するとともに、そのアイソフォームの機能を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 従来から報告されている Gab1cDNA (Gab1-Short アイソフォーム) 上の既存のエクソン間に余剰エクソンがないかの RT-PCR によるスクリーニング

マウスの成体の心臓、肺、脳由来の mRNA を用いて、Gab1cDNA 上で既存エクソンをまたぐ様にプライマーを複数設定して RT-PCR を施行して、エクソン間の余剰エクソンが心臓由来 mRNA で検出されないかを検討したところ、81bp の余剰エクソンが検出された。

(2) 心臓の余剰エクソンを含む Gab1-Long アイソフォーム全長 cDNA 単離と HEK293 細胞を用いた発現確認

余剰エクソンを含む全長 cDNA を心臓組織 cDNA より単離して、pcDNA3 ベクターのマルチクローニングサイトに組み込んだ。このプラスミドを HEK293 細胞にトランスフェクトしてタンパク質の電気泳動上のサイズが心臓で見られる Gab1 アイソフォームと同じかについて確認した。

(3) 余剰エクソンを含む Gab1-Long アイソフォームのマウスの各臓器での発現分布の確認

Clontech 社の Mouse cDNA panel キットを用いて、余剰エクソンを含むアイソフォームの発現がどの臓器、細胞にみられるかを検討した。

(4) 余剰エクソン部分のアミノ酸配列特異

的な抗体の作製と同抗体による Gab1 アイソフォームの発現確認

余剰エクソン部分に相当するアミノ酸配列 (27 アミノ酸) に対するポリクローナル抗体をウサギで作製した。その抗体を用いて、E12.5 マウス胚での発現確認を行った。

(5) アデノウイルスベクターによる Gab1-Long アイソフォーム、Gab1-Short アイソフォームの強制発現実験

普遍型 Gab1 (Short アイソフォーム) とサルコメア特異的 Gab1 (Long アイソフォーム) をアデノウイルスベクターに組み込みラット新生仔培養心筋細胞に感染させて過剰発現させて、シグナル解析を行った。

4. 研究成果

(1) 既存の Gab1-Short アイソフォーム上の既存のエクソン間の余剰エクソンの探索

心臓、肺、脳由来の mRNA を用いて、Gab1cDNA 上で既存エクソンをまたぐプライマーを設定して RT-PCR を施行したところ、心臓由来 mRNA には 81bp (27 アミノ酸) の余剰エクソン配列が検

出された

(図 2)。この配列はマウスのほか、ヒト、チンパンジー、ウシ、ラットでも観察

されて、哺乳類に広く存在することが分かった。

(2) 心臓に発現する余剰エクソンを含む Gab1-Long アイソフォーム全長 cDNA の単離と HEK293 細胞を用いた発現確認

余剰エクソンを含む Gab1-Long アイソフォーム全長 cDNA の単離を long PCR で行った。その cDNA を pcDNA3 に組み込み、HEK293 にトランスフェクトしてウェスタンブロットでアイソフォームの電気泳動上のサイズを確認をすると、Short-アイソフォームに比して 20 kDa ほどサイズが大きいことが確認された (図 2)。

(3) Gab1-Long アイソフォームのマウスの各臓器での発現分布

余剰エクソンをまたぐプライマー設定

(1: 黒矢印) すると、

心臓と骨格筋のみで他の臓器で見られない余剰エクソン分の大きなバンドが観

察されて (図 3 上段)、余剰エクソン内に

Human: QGSSSFVSEEGEEYLLLEDVFESKTIPLQ
 Chimpanzee: QGSSSFVSEEGEEYLLLEDVFESKTIPLQ
 Cow: QGSSSFVSEEGEEYLLLEDVFESKTIPLQ
 Mouse: QGSSSFVSEEGEEYLLLEDVFESKAIPLQ
 Rat: QGSSLVSEEGEEYLLLEDVFESKAIPLQ

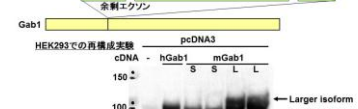


図2: サルコメア特異的 Large-Gab1 アイソフォームの cDNA 単離

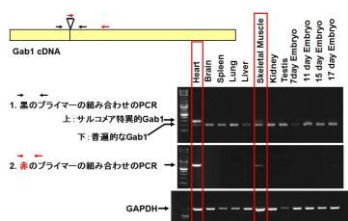


図3: Large-Gab1 アイソフォームはサルコメア組織 (心筋、骨格筋) 特異的に発現する

ライマーを片方設定すると（2：赤矢印）、心臓と骨格筋のみでPCRが掛かった。以上より、この余剰エクソンは心筋と骨格筋というサルコメアを有する組織に特異的な発現して機能する可能性が示唆された。

（4）余剰エクソン部分のアミノ酸配列特異的な抗体の作製と同抗体によるGab1アイソフォームの発現確認

余剰エクソンに相当するアミノ酸配列（27アミノ酸）でポリクローナル抗体を作製した。その抗体を用いて、E12.5マウス胚での発現確認を行うと、心臓では心筋層（肉柱と緻密帯）特異的に発現が見られた（図4）。

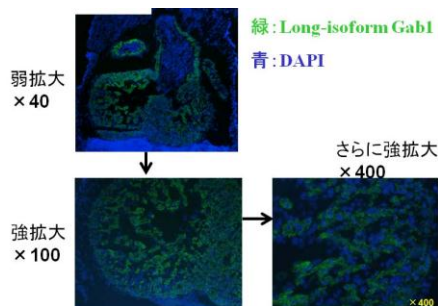


図4：マウス胎仔(E12.5)での免疫蛍光染色ではLarge-Gab1アイソフォームに特異的な抗体は心筋層にのみ発現を検出した

（5）アデノウイルスベクターによるGab1-Longアイソフォーム、Gab1-Shortアイソフォームの強制発現実験

普遍型Gab1 (Shortアイソフォーム)とサルコメア特異的Gab1 (Longアイソフォーム)をアデノウイルスベクターでラット新生仔培養心筋細胞に過剰発現させて、neuregulin-1 (NRG-1) 刺激後のシグナルを解析した。Longアイソフォームの発現下ではコントロールウイルス (β -gal) 感染下と同様のAKT活性化が見られたが、Shortアイソフォームの過剰発現下ではAKTの活性化が有意に抑圧されていた。NRG-1シグナルは心臓の恒常性維持に極めて重要であり、Gab1のアイソフォーム毎のシグナル制御を今後詳細に詰める必要がある。

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 7 件）

1. Higuchi K. Endothelial Gab1 Deletion Accelerates Angiotensin II-Dependent Vascular Inflammation and Atherosclerosis in Apolipoprotein E Knockout Mice. *Circulation Journal* 76, 2031-2040, 2012(査読有)
2. Rodriguez-Araujo G. Alpha-synuclein elicits glucose uptake and utilization in

adipocytes through the Gab1/PI3K/Akt transduction pathway. *Cellular and Molecular Life Sciences* 70, 1123-1133, 2012(査読有)

3. Nakaoka Y. Gab docking proteins in cardiovascular disease, cancer, and inflammation. *International Journal of Inflammation* 2012 Article ID 141068, e1-e11, 2013(査読有)
4. 中岡良和; 血管体性幹細胞; *BioClinica*, 27, 844-848, 2012(査読無)
5. 中岡良和; トラスツズマブの心毒性から明らかになったNeuregulin-1/ErbBシグナルの重要性; *心臓*, 44, 698-699, 2012(査読無)
6. 中岡良和; 高安動脈炎の治療; *日本臨床 (増刊号 血管炎)*, 71 Supple 1, 173-178, 2012(査読無)
7. 中岡良和; 大型血管炎—高安病を中心に; *臨床検査*, 57, 298-305, 2013(査読無)

〔学会発表〕（計 11 件）

1. Arita Y. Angiotensin-1 is critical for coronary venogenesis in the developing heart. 17th International Vascular Biology Meeting 2012 (2012年06月02日～2012年06月05日. Wiesbaden, Germany)
2. Nakaoka Y. Endothelial Gab1 deletion accelerates angiotensin II-dependent vascular inflammation and atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice. 17th International Vascular Biology Meeting 2012 (2012年06月02日～2012年06月05日. Wiesbaden, Germany)
3. 橋本崇弘; 低酸素誘発性肺高血圧マウスに対するIL-6受容体拮抗薬の発症抑制効果: 第3回Molecular Cardiovascular Conference II (2012年09月07日～2012年09月09日. キロロホテルピアノ)
4. 有田陽; アンジオポイエチン1の冠静脈の特異化及び遊走における役割: 第3回Molecular Cardiovascular Conference II (2012年09月07日～2012年09月09日. キロロホテルピアノ)
5. 片岡崇弘; 低酸素誘発性肺高血圧マウスに対するIL-6受容体拮抗薬の発症抑制効果: 第1回肺循環学会(東京ステーションコンファレンス)
6. Arita Y. Angiotensin-1 is essential for coronary vein formation in the developing heart. American Heart Association Scientific Session 2012 (2012年11月04日～2012年11月07日. 米国カリフォルニア州ロサ

ンゼルス)

7. Arita Y. Angiopoietin-1 is essential for coronary vein formation in the developing heart. 第20回日本血管生物医学会 YIA competition (2012年12月05日～2012年12月07日. 徳島、あわぎんホール)
8. Nakaoka Y. Tocilizumab Ameliorates Vascular Inflammation and Clinical Symptoms in the Patients with Takayasu Arteritis Refractory to Glucocorticoids. American College of Cardiology (ACC) 2013 (2013年03月09日～2013年03月11日. 米国カリフォルニア州サンフランシスコ)
9. Nakaoka Y. Blockade of Interleukin-6 (IL-6) signaling by Anti-IL-6 Receptor Monoclonal Antibody might be a Promising Therapeutic Strategy for Pulmonary Arterial Hypertension. 第77回日本循環器学会 (2013年03月15日～2013年03月17日. パシフィコ横浜)
10. Arita Y. Angiopoietin-1 Derived from cardiomyocytes is Essential for Coronary Vein Formation through Attraction of Tie2-positive Endothelial Cells from Sinus Venosus. 第77回日本循環器学会 (2013年03月15日～2013年03月17日. パシフィコ横浜)
11. Hashimoto-Kataoka T. Blockade of interleukin-6 signaling might be a promising therapeutic option for pulmonary arterial hypertension via regulating macrophage polarization. 第77回日本循環器学会 (2013年03月15日～2013年03月17日. パシフィコ横浜)

[図書] (計 1 件)

1. 中岡良和；血管新生研究の最先端 (8 章 2) Angiopoietin/Tie 受容体)、医薬ジャーナル社、2013 年

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/cardiology/27research/2784res.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中岡 良和 (NAKAOKA YOSHIKAZU)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号：90393214

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

小室 一成 (KOMURO ISSEI)
東京大学・医学系研究科・教授
研究者番号：30260483