

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：84404

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790231

研究課題名(和文) CHP3はGSK3 のリン酸化抑制を介して心筋細胞肥大を制御する

研究課題名(英文) Calcineurin B homologous protein (CHP3) regulates cardiomyocyte hypertrophy via inhibition of GSK3beta phosphorylation

研究代表者

古林 創史 (KOBAYASHI, SOUSHI)

独立行政法人国立循環器病研究センター・研究所・研究員

研究者番号：50511531

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：カルシニューリンB様蛋白質3(CHP3)は25 kDaのカルシウム結合蛋白質であり、心臓に多く発現している。CHP3を高発現させた繊維芽細胞由来の培養細胞において、インスリン誘発性のグリコーゲン合成リン酸化酵素3 (GSK3 )のリン酸化レベル上昇を抑制する可能性が示唆された。さらに、共免疫沈降法によりCHP3がGSK3 と相互作用する可能性が示唆された。以上より、CHP3はGSK3 のリン酸化を負に調節して心筋肥大反応の制御に関わる可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Calcineurin B homologous protein 3 (CHP3) is a 25-kDa calcium-binding protein mainly expressed in heart, but its function remains largely unknown. To understand the role of CHP3, we stably overexpressed CHP3 in fibroblast-derived cell line. When treated with insulin, there were significant decreases in phosphorylation level of GSK3beta in CHP3-overexpressed cells compared with that in control cells. Moreover, co-immunoprecipitation experiments demonstrated the interaction of CHP3 with GSK3beta. These results suggest that CHP3 serves as a novel regulatory factor for GSK3beta, which modulates cardiac hypertrophy.

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：CHP3 心筋細胞肥大 GSK3 細胞内シグナル

### 1. 研究開始当初の背景

心臓は成長や運動時など血流量が増え負荷がかかると、心筋細胞を肥大化することで心臓全体を大きくし、血液の拍出量を維持しようとする(生理的心肥大)。このとき、インスリン様成長因子 1(IGF-1)やストレスなどの刺激により心筋細胞内ではグリコゲン合成リン酸化酵素 3β(GSK3β)のリン酸化レベルが増強し、心肥大に関わる遺伝子の転写活性および蛋白質合成が促進されると考えられている(*J Clin Invest* 115, 527, 2005)。しかし慢性的に GSK3β のリン酸化レベルが上昇すると、心臓は生理的範囲を超えた病的な心肥大を引き起こし、最終的に心不全を引き起こす可能性が示唆されている(*Cir Res*, 107, 1164, 2007)。

カルシニューリン B 様蛋白質 3 (CHP3) は 25 kDa のカルシウム結合蛋白質の一つであり、心臓に発現しているがその機能はほとんど分かっていない。研究代表者のこれまでの予備実験結果より、ラットにおいて CHP3 は心筋細胞にほぼ選択的に発現することが分かった。アデノウィルスを用いて CHP3 をノックダウンさせた心筋細胞では、細胞のサイズが大きくなり、心肥大マーカーの一つである心房性ナトリウム利尿ペプチドの発現量が上昇していた。また、CHP3 のノックダウンに伴い活性が変化した蛋白質をリン酸化を指標に網羅的に探索したところ、GSK3β のリン酸化レベルが上昇することが分かった。これらより CHP3 が GSK3β のリン酸化レベルを負に調節する可能性が示唆された。

したがって、CHP3 の役割を明らかにすることで、病的な心肥大の新たな予防戦略が確立できるのではないかと考えられた。

### 2. 研究の目的

本研究では、CHP3 の役割を明らかにするため、以下(1)~(4)のような研究目標を掲げた。

- (1)心肥大刺激後の心筋細胞における CHP3 の細胞内動態の解析。
- (2)CHP3 高発現細胞における GSK3β のリン酸化レベルの解析。
- (3)CHP3 と GSK3β の蛋白質間相互作用の解析。
- (4)CHP3 ノックアウトマウスの作製。CHP3 の機能を個体レベルで解析する。

### 3. 研究の方法

(1)心肥大刺激後の心筋細胞における CHP3 の細胞内動態の解析。

①ラット新生児から単離培養した心筋細胞を、24 時間心肥大刺激(フェニレフリン、IGF-1、インスリン、10%血清刺激)し、内因性 CHP3 の発現量をウェスタンブロッティング法を用いて評価した。

②ラット新生児心筋細胞を 16 時間無血清培地で培養後、IGF-1 刺激を処置し(15分、48 時間)、内因性 CHP3 の細胞内局在を免疫蛍光法を用いて評価した。 $\alpha$ -actinin は心筋細胞のマーカー蛋白質である。

(2)CHP3 と GSK3β の蛋白質間相互作用の解析。

①CHP3 を高発現させた繊維芽細胞由来の培養細胞を用いて、CHP3 と GSK3β との相互作用を共免疫沈降法およびウェスタンブロッティング法を用いて評価した。

②ラット新生児心筋細胞を単離培養後、内因性 CHP3 と GSK3β との相互作用を共免疫沈降法およびウェスタンブロッティング法を用いて評価した。

③ラット新生児心筋細胞における内因性 CHP3 および GSK3β の細胞内局在を免疫蛍光法を用いて評価した。

(3) CHP3 高発現細胞における GSK3β のリン酸化の解析。

CHP3 を高発現させた繊維芽細胞由来の培養細胞をインスリンで刺激し(5, 15 分)、GSK3β のリン酸化レベルをウェスタンブロッティング法を用いて評価した。コントロールとして GFP を高発現させた細胞を用いた。

(4)CHP3 ノックアウトマウスの作製

CHP3 ノックアウトマウスの作製は外部に委託した。

### 4. 研究成果

(1)心肥大刺激後の心筋細胞における CHP3 の細胞内動態の解析。

①ラット新生児心筋細胞において心肥大刺激による内因性 CHP3 の発現量の変化は認め

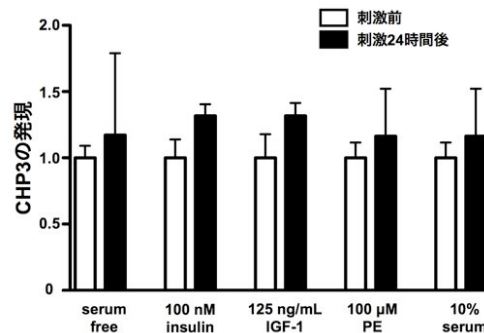


図1 心肥大刺激により心筋細胞における内因性 CHP3 の発現量は変化しなかった。

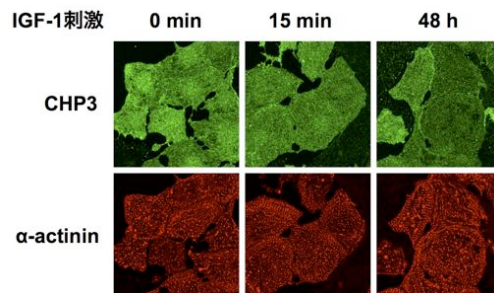


図2 IGF-1 刺激による CHP3 の細胞内局在の変化は認められなかった。

られなかった(図 1)。

②無血清培養時、内因性 CHP3 は心筋細胞全体に分布していた。IGF-1 刺激により心筋細胞の肥大化は認められたが、CHP3 の局在の変化は認められなかった(図 2)。

(2)CHP3 と GSK3 $\beta$  の蛋白質間相互作用の解析。

①CHP3 を高発現させた培養細胞において CHP3 と GSK3 $\beta$  の共沈降が認められた(図 3A)。

②ラット新生児心筋細胞において内因性 CHP3 と GSK3 $\beta$  との共沈降が認められた(図 3B)。

③ラット新生児心筋細胞において内因性 CHP3 と GSK3 $\beta$  との細胞内局在が部分的に重なった(図 4)。

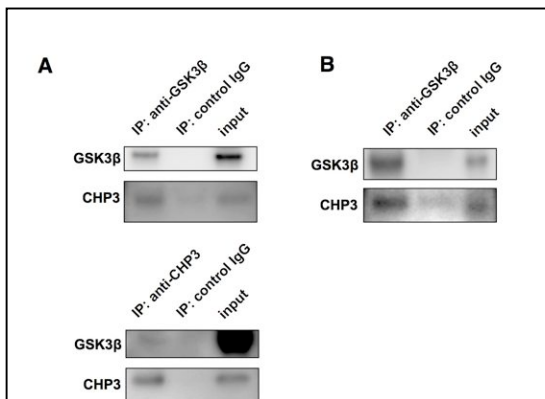


図 3 CHP3 と GSK3 $\beta$  は共免疫沈降する

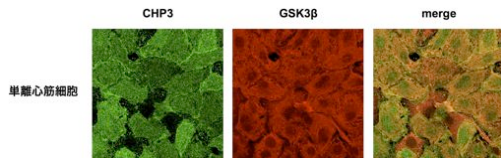


図 4 心筋細胞において CHP3 と GSK3 $\beta$  は共局在する。

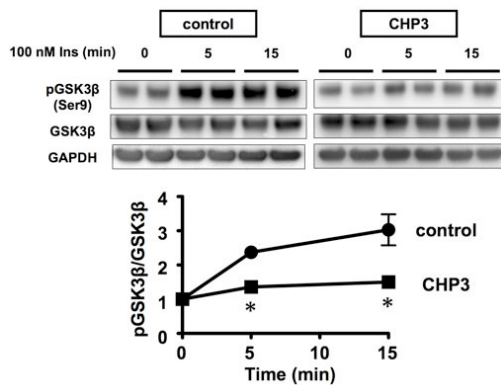


図 5 CHP3 はインスリン誘発性 GSK3 $\beta$  のリン酸化を抑制する。

(3) CHP3 高発現細胞における GSK3 $\beta$  のリン酸化の解析。

GFP を高発現させた培養細胞ではインスリン刺激後 5 分で GSK3 $\beta$  のリン酸化レベルが劇的に上昇し、15 分後まで高レベルを維持した。一方、CHP3 を高発現させた培養細胞ではインスリン刺激 5 分、15 分後における GSK3 $\beta$  のリン酸化レベルの上昇が有意に抑制された(図 5)。

(4) CHP3 ノックアウトマウスの作製。

CHP3 ノックアウトマウスの作製が遅れているが、現在キメラマウスまで完成している。

以上より、CHP3 は GSK3 $\beta$  と相互作用することでリン酸化を負に調節することで心肥大を抑制する因子である可能性が示唆された(図 6)。

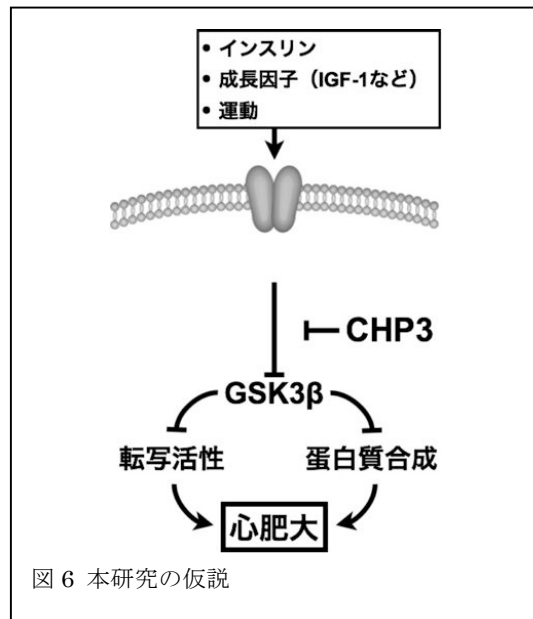


図 6 本研究の仮説

## 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)

[学会発表] (計 3 件)

(1)古林 創史 若林 繁夫、カルシニューリン B 様蛋白質 CHP3 による GSK3 $\beta$  の活性調節メカニズムの解明、第 85 回日本生化学会大会、2012 年 12 月 14 日～16 日、福岡

(2)古林 創史 若林 繁夫、心筋のカルシニューリン B 様蛋白質 CHP3 は Akt/GSK3 $\beta$  シグナルの新しい調節因子である、第 86 回日本生化学会大会、2013 年 9 月 11 日～13 日、神奈川

(3)古林 創史 若林 繁夫、Calcineurin B homologous protein 3 (CHP3) modulates Akt-GSK3 $\beta$  signaling in rat cardiomyocytes、第 91 回日本生理学会大会、2014 年 3 月 16 日～18 日、鹿児島

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

古林 創史 (KOBAYASHI SOUSHI)  
国立循環器病研究センター・研究所・研究  
員  
研究者番号：50511531

(2)研究分担者  
なし

(3)連携研究者  
なし