

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：84404

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860174

研究課題名(和文)新たな心肥大調節経路としての核内Ca²⁺動態とCa²⁺センサーNCS-1の意義

研究課題名(英文)A role of neuronal calcium sensor-1 on the nuclear calcium regulation in cardiomyocytes: contribution to cardiac hypertrophy

研究代表者

中尾 周 (NAKAO, Shu)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・流動研究員

研究者番号：30646956

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)：本研究では、心筋細胞の核内Ca²⁺濃度の制御機構に注目し、核と細胞質のCa²⁺濃度の変化を区別して測定できる蛍光Ca²⁺プローブGECOを導入したマウス心筋細胞を使って核内Ca²⁺動態とその調節因子を調べた。その結果、病態を誘発するホルモン刺激では大きな核内Ca²⁺濃度上昇が起こること、この核内Ca²⁺濃度上昇にCa²⁺結合タンパク質 Neuronal calcium sensor-1 (NCS-1) が関与することを見出した。さらに、NCS-1 による核内Ca²⁺濃度の調節は、細胞内Ca²⁺放出チャネルであるイノシトール三リン酸受容体との相互作用を介していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：To investigate the regulation of nuclear calcium in cardiomyocytes, we generated adenovirus vectors of cytoplasmic/nuclear-specific calcium probes GECOs, and induced them in mouse ventricular myocytes. Calcium imaging analysis revealed that a hypertrophy-associated hormone induced larger calcium transients in the nucleus than those in the cytoplasm. Using mice lacking a calcium sensor protein neuronal calcium sensor-1 (NCS-1), which we previously reported as a crucial regulator of calcium signaling in cardiomyocytes, we demonstrated that NCS-1 contributes to the nuclear calcium regulation. Moreover, a protein/protein interaction assay exhibited that a NCS-1-dependent regulation of nuclear calcium is modulated through the interaction between NCS-1 and inositol-1,4,5 trisphosphate receptor, an intracellular calcium release channel, in cardiomyocytes.

研究分野：心臓生理学

キーワード：細胞生物学 分子生物学 カルシウム 心肥大 心筋細胞 カルシウムセンサー 興奮収縮連関 受容体刺激

1. 研究開始当初の背景

心肥大は慢性心不全の進行に密接に関わっていることから、その成り立ちを解明することは病態生理学的に重要である。近年、心肥大をもたらす分子メカニズムの1つとして、心筋細胞の局所での Ca^{2+} 濃度の上昇が、 Ca^{2+} 依存性シグナルを活性化することにより遺伝子発現を調節することが分かってきたが、その詳細な分子機構は不明であった。一方、当グループでは Ca^{2+} 結合タンパク質 neuronal calcium sensor-1 (NCS-1) が細胞内 Ca^{2+} 放出チャネルであるイノシトール三リン酸受容体 (IP3R) を介した Ca^{2+} シグナル調節関与していることを見出しており、幼若期における心収縮能および成体での心肥大への関与を示していた。

2. 研究の目的

本研究では、心筋細胞における肥大シグナル経路として、「核内」の Ca^{2+} 制御機構に注目し、核内 Ca^{2+} 濃度が異なる刺激を与えた時にどのように調節されているのか、また、NCS-1 がその制御に寄与しているかどうかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 心筋細胞の細胞質 / 核内 Ca^{2+} 濃度測定

細胞質と核内のカルシウム濃度を同時に測定できる Ca^{2+} プローブとして、近年開発された GECO のアデノウイルスベクターを作製し、これをマウス心筋細胞に導入した。収縮を起こす電気刺激あるいは心肥大を誘発するホルモン (IGF-1) で受容体刺激したときの細胞質と核内の Ca^{2+} 濃度の変化を蛍光 Ca^{2+} イメージングにより解析した。

また、 Ca^{2+} キレートタンパク質 Parvalbumin を細胞質あるいは核内に高発現した心筋細胞を使って細胞内の Ca^{2+} 動態を調べた。

(2) NCS-1、核膜タンパク質、 Ca^{2+} 調節タンパク質の細胞内局在解析

NCS-1 および IP3R が細胞内のどこに発現しているのかを調べるために、蛍光免疫染色法により核膜内膜タンパク質 LAP2 との位置関係を解析した。また、細胞分画法により心筋細胞を細胞質、膜、核に分けた時の NCS-1、IP3R、および LAP2 の局在を調べた。

(3) NCS-1 と IP3R の相互作用解析

Proximity ligation assay (PLA) 法により、IGF-1 刺激前後における心筋細胞内の NCS-1 と IP3R の相互作用の変化を調べた。

4. 研究成果

収縮を起こす電気刺激の際には、核内 Ca^{2+} は細胞質よりも遅れて上昇 / 下降し、核内の Ca^{2+} 濃度の増減は、ライアノジン受容体阻害薬で消失した。興味深いことに、細胞質および核内いずれの Ca^{2+} をキレートした際でも核内 Ca^{2+} 濃度の増減が抑制された。このことから電気刺激の際の核内 Ca^{2+} 濃度の変化は、心筋収縮の調節機構である EC カップリングで制御された細胞質内 Ca^{2+} 濃度の変化に依存していることが示唆された。

病態を誘発する IGF-1 による受容体刺激では、時間的な差はみられなかったが核内でもより大きな Ca^{2+} 上昇が生じた。これはライアノジン受容体阻害薬では抑制されず IP3R 阻害薬で抑制された。さらにこの Ca^{2+} 上昇は NCS-1 欠損マウスの心筋細胞で有意に小さかった。したがって、IGF-1 誘発性の核内 Ca^{2+} 濃度上昇は IP3R 依存性であり、NCS-1 がその調節に寄与していることが示された。

免疫細胞化学染色および細胞分画法によって、NCS-1 と IP3R は核内よりもむしろ核周囲領域で共局在しており、PLA 法では NCS-1 と IP3R の相互作用は IGF-1 刺激によって核周囲を含む細胞質で増加することが分かった。

以上の結果から、心筋細胞の核周囲において NCS-1 は IP3R との相互作用を介して心筋細胞の核内 Ca^{2+} 濃度を調節する因子であることが示唆された。

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1件)

1. Nakao S, Wakabayashi S, Nakamura TY. Stimulus-dependent regulation of nuclear Ca^{2+} signaling in cardiomyocytes. *PLoS One* 2015;10:e0125050 (査読有)

〔学会発表〕(計17件)

1. 中尾 周, 中村(西谷)友重, 若林繁夫. 新たな蛍光カルシウムプローブ GECO を用いたマウス心筋細胞の核内カルシウムシグナル動態の解析. 第90回 日本生理学会大会, 2013年3月
2. 中村(西谷)友重, 中尾 周, 若林繁夫. 心筋細胞の生死を決める新たな調節因子としてのカルシウムセンサー NCS 1 の役割. 第90回日本生理学会大会, 2013年3月
3. 中尾 周, 中村(西谷)友重, 若林繁夫. 心筋の核内カルシウムシグナル制御におけるカルシウムセンサー NCS-1 の役割.

- 第86回 日本生化学会大会, 2013年9月
4. 中尾 周, 中村(西谷)友重, 若林繁夫. 心筋細胞の核内Ca²⁺濃度調節におけるカルシウムセンサーNCS-1の役割. 第106回近畿生理談話会, 2013年11月
 5. 中尾 周, 中村(西谷)友重, 若林繁夫. 心筋細胞の核内カルシウム濃度調節におけるカルシウムセンサーNCS-1の機能とその局在. 第91回日本生理学会大会, 2014年3月
 6. Nakamura TY, Nakao S, Wakabayashi S. Regulation of nuclear and cytoplasmic Ca²⁺ signaling and its function in cardiomyocytes: role of neuronal Ca²⁺ sensor-1. 第91回日本生理学会大会, 2014年3月
 7. 中村(西谷)友重, 中尾 周, 若林繁夫. ストレス下心筋におけるサバイバル機構: Ca²⁺センサーNCS-1の役割. 第5回 Molecular Cardiovascular Conference II, 2014年9月
 8. 中尾 周, 若林繁夫, 中村(西谷)友重. マウス心筋細胞における核内Ca²⁺動態の生理的役割—細胞質内Ca²⁺動態との関連について—. 第87回日本生化学会大会, 2015年10月
 9. 中村(西谷)友重, 中尾 周, 中城有香子, 高橋 淳, 若林繁夫, 柳本広二. マウスの空間学習・記憶におけるカルシウムセンサーNCS-1の役割. 第87回日本生化学会大会
 10. 中村(西谷)友重, 中尾 周, 若林繁夫. Ca²⁺シグナル調節因子による新規肥満制御経路の解析. 第107回近畿生理談話会, 2014年10月
 11. Nakamura TY, Nakao S, Wakabayashi S. Cardioprotective role of neuronal Ca²⁺-sensor-1 during stress. Biophysical Society 59th Annual Meeting, 2015年2月
 12. 中尾 周, 中城有香子, 高橋 淳, 中川 修, 若林繁夫, 柳本広二, 中村(西谷)友重. カルシウムセンサーNCS-1はマウスの空間学習・記憶に寄与する. 第92回日本生理学会大会, 2015年3月
 13. 中村(西谷)友重, 中尾 周, 中川 修, 若林繁夫. 細胞内Ca²⁺シグナルによる代謝調節. 第92回日本生理学会大会, 2015年3月
 14. 若林繁夫, 中尾 周, 稲垣薫克, 土持裕胤, 中村(西谷)友重, 白井幹康. トレッドミル有酸素運動はCa²⁺センサー蛋白質の遺伝子欠損マウスで起こる肥満を解消できる. 第92回日本生理学会大会, 2015年3月
 15. 中村(西谷)友重, 中尾 周, 中川 修, 若林繁夫. 細胞内Ca²⁺センサーによる新規代謝調節経路. 第88回日本生化学会大会, 2015年12月
 16. 若林繁夫, 中尾 周, 稲垣薫克, 土持裕胤, 中村(西谷)友重, 白井幹康. 継続的な有酸素運動はCa²⁺センサー蛋白質欠損で起こるマウスの肥満を解消できる. 第88回日本生化学会大会, 2015年12月
 17. 中村(西谷)友重, 中尾 周, 中川 修, 若林繁夫. 細胞内カルシウムセンサーによる心筋ストレス防御機構: ミトコンドリア機能維持を介して. 第93回日本生理学会大会, 2016年3月
- 〔図書〕(計0件)
- 〔産業財産権〕
- 出願状況(計0件)
- 取得状況(計0件)
- 〔その他〕
- ホームページ等
1. 中村(西谷)友重, 中尾周, 若林繁夫. 心筋細胞における核内Ca²⁺濃度調節の重要性: 刺激に応じた制御と生理的役割. BioMedサーカス.com http://biomedcircus.com/paper_03_38.html
 2. 国立循環器病研究センター研究所・分子生理部 http://www.ncvc.go.jp/res/divisions/molecular_physiology/
6. 研究組織
- (1)研究代表者
- 中尾 周 (NAKAO, shu)
国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・流動研究員
研究者番号: 30646956
- (2)研究分担者
- 該当なし
- (3)連携研究者

1. 中村(西谷)友重(NAKAMURA Tomoe Y)
国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・室長
研究者番号：50393244
2. 若林繁夫 (WAKABAYASHI Shigeo)
国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・非常勤研究員
研究者番号：70158583