

令和 5 年 1 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09578

研究課題名(和文) 心臓特異的ミオシン軽鎖キナーゼの活性制御機構の解明と治療への応用

研究課題名(英文) Analysis of the regulatory mechanism of the activity of cardiac specific myosin light chain kinase

研究代表者

塚本 蔵 (Tsukamoto, Osamu)

大阪大学・生命機能研究科・准教授

研究者番号：80589151

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ミオシン調節軽鎖キナーゼ(cMLCK)の活性制御機構について、分子学的、生理学的、および構造学的検討を行った。cMLCKは力学的負荷により一過性に活性化され、サルコメアの再構築に関与すること、cMLCKのN末端側はその活性に必須でなく、C末端側の調節ドメインは基質の認識にも関与することを示した。さらに、calmodulinとの共結晶構造解析に世界で初めて成功した。また、ヒトの心不全にcMLCK活性の低下が関与する事を明らかにすることができた。cMLCK活性を制御する手法として、cMLCKに特異的に結合して活性を阻害する擬天然ペプチドやcMLCKをコードするAAVベクターの開発も行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によりcMLCKの生理学的、分子構造学的な活性制御機構が解明された。また、cMLCK活性の異常がヒトの心不全および拡張型心筋症の発症に関与することが明らかとなり、cMLCK活性の正常化が心不全治療に成り得る可能性を示すことが出来た。さらにcMLCKの結晶構造解析にも成功したことで、その構造情報を基にしてcMLCK活性を制御する化合物の開発の基盤になると考えられる。将来的にはcMLCK活性の制御剤の開発やAAV9ベクターによるcMLCKを標的とした心不全治療法に繋がる可能性が考えられる。本邦で医学的かつ社会的問題である高齢者の心不全治療に新たな選択肢を与えることが出来る。

研究成果の概要(英文)：We investigated the physiological, molecular and structural regulatory mechanism of cMLCK activity. cMLCK is activated by mechanical stresses and phosphorylates myosin regulatory light chain to promote the sarcomere assembly. N-terminus of cMLCK is not essential for its kinase activity and C-terminus regulatory domain of cMLCK contributes to the recognition of the substrate. In addition, we successfully obtained the X-ray co-crystal structure of cMLCK and calmodulin.

Next, we investigated the contribution of the dysregulation of cMLCK activity to the development of heart failure in clinical practice, and we identified that depressed cMLCK activity could result in systolic heart failure or dilated cardiomyopathy in human. Furthermore, we tried to develop the methods to regulate cMLCK activity. The pseudo-nature peptides that specifically binds to cMLCK and the AAV vector that can express cMLCK were developed to inhibit or activate cMLCK, respectively.

研究分野：循環器

キーワード：心不全 ミオシン調節軽鎖キナーゼ

1. 研究開始当初の背景

内科的・外科的治療の進歩により従来救命できなかった心疾患患者の延命が可能になったが、その後の心不全進展の為、十分な社会生活を送れない重症心不全患者が急増している。臓器移植や補助人工心臓などの高度医療の恩恵を享受できる限られた患者を除き、多くの重症心不全患者はカテコラミンの持続点滴から離脱できず、長期入院にてベット上臥床を余儀なくされている。一方、近年の健康寿命への関心の高まりから心不全患者においても ADL の向上維持という点が重要視される様になり、心不全治療における強心薬の重要性が再認識されている。医療の現場ではカテコラミン静注薬に代わる経口強心薬の開発が望まれて久しいが、大規模臨床試験での強心薬の **negative** なイメージが先行し、新しい強心薬の開発は 20 年以上停滞していた。

しかし近年、直接的にサルコメア蛋白質を活性化するタイプの画期的な強心薬 (**direct sarcomere modulator**) が開発され臨床試験に至っている。従来の強心薬と異なり、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇を介さずに強心作用を発揮する為、長期予後を悪化せず血行動態と患者の ADL を改善することが期待されている。我々が標的とするミオシン軽鎖 (**MLC2v**) のリン酸化も細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇を介さずに直接サルコメア蛋白質を修飾して心筋の収縮性を増強するため、全く新規の **direct sarcomere modulator** と成り得る可能性が高い。

心筋 **MLC2v** のリン酸化は心筋収縮性の生理的調節因子として古くより認識されていたが、そのリン酸化酵素 (キナーゼ) については長い間不明であった。我々のグループは 2007 年に重症心不全患者の肺動脈楔入圧と強く相関して発現する遺伝子として **cMLCK** を発見し、**cMLCK** が心筋 **MLC2v** の重要なキナーゼであることを世界に先駆けて報告した。心筋の **MLC2v** は専ら **cMLCK** によってリン酸化されるため、**cMLCK** 遺伝子欠損マウスは **MLC2v** のリン酸化が激減し、心筋の収縮性が低下し、生後 4 か月より収縮不全による心不全を自然発症する。また、**cMLCK** の遺伝子変異によってヒトの家族性拡張型心筋症や肥大型心筋症が発症することを我々は確認している。更に、ヒトの不全心にて **MLC2v** のリン酸化が低下している事も多数報告されており、**cMLCK** による **MLC2v** のリン酸化状態が心不全病態生理に重要な役割を担っている事が想像される。さらに、心臓に **cMLCK** を過剰発現させた遺伝子改変マウスは圧負荷や心筋梗塞による心不全を発症しにくい事が報告されており、**cMLCK** が心不全治療の標的と成り得る可能性が示唆される。実臨床では内因性の **cMLCK** を賦活化させるか、外来性に **cMLCK** を過剰発現させる方法をとる必要がある。そのためには **cMLCK** 活性制御機構の解明と活性制御物の同定、そして外来性に **cMLCK** を心臓に過剰発現させて心不全が改善するか動物レベルで確認する必要がある。

2. 研究の目的

本研究は、**cMLCK** 活性制御機構を分子的、生理学的、構造学的に解明し、更に心不全および心筋症での **cMLCK** を標的とした治療法の可能性を検討しその確立を目指すことを目的とする。

A) **cMLCK** 活性制御機構の解明

- cMLCK mutants** や擬天然ペプチドによる **cMLCK** 活性制御の検討 (分子的機構)
- 力学的負荷刺激 (伸展刺激と圧刺激) の **cMLCK** 活性への影響の検討 (生理学的機構)
- cMLCK** と **calmodulin** および活性制御剤の共結晶構造解析 (構造学的機構)

ミオシン軽鎖キナーゼには心筋型 **MLCK** (**cMLCK**) 以外に平滑筋型 (**smMLCK**) と骨格筋型 (**skMLCK**) があるが、興味深い事に **cMLCK** のみ最大活性速度 (V_{max}) が極端に低い。そこで **cMLCK** の **deletion mutants** や **skMLCK** とのキメラ **cMLCK** を作製して活性に重要な分子内ドメインや **calmodulin** (内因性アクチベーター) との相互作用を解明する (分子制御機構)。また力学的刺激 (伸展・圧負荷) による **cMLCK** 活性の影響を明らかにする (生理学的制御機構)。さらに擬天然ペプチド等を用いて **cMLCK** 活性制御化合物を同定 (薬理学的制御機構) し、最終的には **cMLCK** と活性制御化合物との共結晶を精製して X 線結晶構造解析を行う (構造学的制御機構)。

B) 心筋症および心不全における **cMLCK** を標的とした治療法の確立

我々が同定している **cMLCK** 遺伝子変異による拡張型心筋症や心筋 **MLC2v** 遺伝子変異による肥大型心筋症のマウスモデルを作製する。次にアデノ関連ウイルス (**AAV9**) を用いて野生型の **cMLCK** を心筋症マウスモデルの心臓に発現させ、心不全や心肥大への進行抑制効果や、神経体液性因子の活性化を介さずに心機能を改善が得られるか確認する。心不全マウスモデルについても同様の検討を行う。さらに、ヒトの心筋症および重症心不全患者の心筋で **cMLCK** 発現、活性、**MLC2v** のリン酸化状態を確認する。

3. 研究の方法

研究計画 A: **cMLCK** 活性制御機構の解明

1) **cMLCK mutants** による **cMLCK** 分子内活性制御機構の検討

cMLCK と骨格筋型 **MLCK** (**skMLCK**) の酵素ドメインのアミノ酸配列は 90% 以上の相同性を有するが、**cMLCK** の最大活性速度は **skMLCK** の 1/100 程度と大きく異なる。その原因は未だに不明であ

るため、cMLCK と skMLCK の酵素ドメイン、調節ドメインを入れ替えたキメラ蛋白質を作製して、どの部位が活性制御に重要なのか同定することで cMLCK 活性の分子内制御機構を解明する。また smMLCK や skMLCK と異なり、cMLCK 活性の calmodulin (MLCK の内因性アクチベーター) 依存性に関する結論は出ていない。そこで calmodulin を精製し、cMLCK 活性における効果を検討する。まずは野生型 cMLCK に対して濃度依存的活性化を示すか、次に cMLCK の calmodulin binding domain を欠損させて calmodulin が結合できなくなる cMLCK mutant を作製して活性への影響を検討する。

2) 力学的負荷刺激（伸展負荷および圧負荷）による cMLCK 活性への影響の検討

心筋症や不全心では心臓拡大することで心筋細胞が伸展負荷や圧負荷等の力学的負荷に曝されているが、これまで力学的負荷の cMLCK 活性への影響についての検討は皆無である。我々は培養心筋細胞を伸展する装置や圧負荷を与えることができる装置を用いて、心筋細胞に対して力学的負荷を与えて、cMLCK 活性と MLC2v のリン酸化状態の変化を検討する。

3) cMLCK 活性を制御する擬天然ペプチドを同定

cMLCK に対する特異的活性制御剤の開発は行われていない。我々は RaPID system を用いて高い affinity で cMLCK に特異的に結合する擬天然ペプチドを既に 8 種類同定し、そのうち 2 種類が cMLCK 活性を低下させることを見出している。今後は他の MLCKs (skMLCK および平滑筋型 smMLCK) 活性への影響を検討し、skMLCK 活性と smMLCK 活性に影響せず cMLCK 活性のみに特異的に活性を制御するペプチドを同定する。

4) cMLCK の結晶構造解析

上記の検討で得られた結果を基にして、cMLCK、calmodulin、および活性制御化合物との共結晶を作製し X 線構造解析を行い、構造学的に cMLCK 活性制御機構の解明を目指す。

4-1) cMLCK の大量精製および単分散条件の検討

これまで世界中で多数の MLCK の結晶構造解析が試みられているが、未だ成功していない。その理由の一つが大腸菌でのキナーゼの安定な発現が難しい点にある。そこで我々は Sf21 昆虫細胞にバキュロウイルスを用いて cMLCK を大量精製させるシステムを構築し、cMLCK を大量に安定して発現させることに成功した。精製方法としては、Sf21 細胞に発現させた nHis-FLAG-TEV-cMLCK 蛋白質を His と Flag で sequential に affinity 精製し、ゲル濾過と動的光散乱法で単分散を評価する。この検討を野生型 cMLCK のみ、野生型 cMLCK + calmodulin の複合体、野生型 cMLCK + calmodulin + 阻害ペプチドの複合体、の 3 つの場合について行う。

4-2) 共結晶化と X 線構造解析

次に単分散したサンプルの濃縮条件を検討し、10~20 mg/ml 程度まで濃縮する。その後、sitting drop 法にて結晶化条件のスクリーニングを行う。さらに結晶化を得られた条件で pH、塩濃度、凝集剤の濃度を結晶化の最適化を行う。最後に得られた結晶で X 線結晶構造解析を行う。

研究計画 B: 心筋症および収縮性心不全における cMLCK を標的とした治療の有用性の確立

cMLCK が心筋症や心不全の有効な治療標的となり得るか検討する。

1) 遺伝性心筋症マウスモデルおよび心不全マウスモデルの作製

既報の心筋 MLC2v 遺伝子変異による家族性肥大型心筋症や我々が同定している cMLCK 遺伝子変異による家族性拡張型心筋症のマウスモデルを作製する。方法としては CRISPR を利用して MLC2v 遺伝子変異や cMLCK 遺伝子変異をマウス受精卵にノックインしてヒト遺伝性心筋症モデルマウスを作製する。生後経時的観察してヒトと同じ病態を発症するか心機能や cMLCK 活性および MLC2v リン酸化を評価して確認する。心不全モデル（圧負荷または心筋梗塞）についても同様の検討を行う。

2) アデノ随伴ウイルス (AAV9) による遺伝子デリバリーシステムの構築

In vivo にて心臓（心筋細胞）への長期の目的遺伝子発現が可能であるアデノ関連ウイルス (AAV9) ベクターに野生型 cMLCK を導入する。これを生後 1 週間の上記の心筋症モデルマウスに経頸静脈的に注射して心筋症マウスモデルの心臓に cMLCK を発現させ、心臓での cMLCK 活性が上昇し、収縮不全や心肥大の進展を抑制できるか検証する。

3) 心筋症（拡張型および肥大型）および重症心不全患者での MLC2v リン酸化状態の検討

心筋症患者および重症心不全患者の心臓における cMLCK の発現、活性、そして MLC2v のリン酸化状態を測定する。

4. 研究成果

研究計画 A: cMLCK 活性制御機構の解明

1) cMLCK mutants による cMLCK 分子内活性制御機構の検討

cMLCK の欠損変異体を用いた検討にて、catalytic domain よりも N 末端側は活性に必須ではないこと、C 末端の regulatory domain は基質の認識にも関与することを確認した（分子学的制御機構）。

2) 力学的負荷刺激（伸展負荷および圧負荷）による cMLCK 活性への影響の検討

力学的負荷刺激（伸展刺激と圧負荷刺激）により cMLCK が活性化されミオシン調節軽鎖のリン酸化が増加することが確認できた（生理学的制御機構）。

3) cMLCK 活性を制御する擬天然ペプチドを同定

RaPID system で同定した 2 種類が cMLCK 活性を低下させる擬天然ペプチドを用いて、skMLCK および平滑筋型 smMLCK 活性への影響を検討した。skMLCK 活性と smMLCK 活性に影響せず cMLCK 活性のみに特異的に活性を制御するペプチドであることが分かった。今後は cMLCK との共結晶構造解析を試みる。

4) cMLCK の結晶構造解析

4-1) cMLCK の大量精製および単分散条件の検討

Sf21 昆虫細胞にバキュロウイルスを用いて cMLCK を大量精製（10 L 培養）させるシステムを構築した。cMLCK の活性を保持したままで N 末端を欠損させた cMLCK と calmodulin の複合体を作製することで単分散を得ることができ、さらにその濃縮（10 mg/ml）に成功した。

4-2) 共結晶化と X 線構造解析

高エネルギー加速器研究機構にて実験を実施した。濃縮したサンプルを用いて、約 1000 条件の結晶化条件のスクリーニングを行い、最終的に結晶化条件を得ることが出来た。さらに X 線結晶構造解析を行い、現時点で 2.65 Å の結晶構造を得ることが出来た（構造学的制御機構）。

研究計画 B: 心筋症および収縮性心不全における cMLCK を標的とした治療の有用性の確立

1) 遺伝性心筋症マウスモデルおよび心不全マウスモデルの作製

cMLCK をコードする MYLK3 遺伝子の Exon 9 の splicing acceptor site の 1 塩基変異による exon skipping に伴う frame-shift により拡張型心筋症患者において同定した。この変異を有する cMLCK では frame shift により catalytic domain の途中から欠損するために cMLCK 活性が完全に消失していた。この MYLK3 遺伝子変異による拡張型心筋症のマウスモデルを作製するために、CRISPR を利用して同変異をノックインしてヒト遺伝性心筋症モデルマウスの作製に着手した。

2) アデノ随伴ウイルス(AAV9)による遺伝子デリバリーシステムの構築

野生型 cMLCK をコードしたアデノ関連ウイルス(AAV9)ベクターを作製した。成体マウスに頸静脈投与して、心臓に発現することを確認した。

3) 心筋症（拡張型および肥大型）および重症心不全患者での MLC2v リン酸化状態の検討

重症心不全患者の不全心における cMLCK とミオシン調節軽鎖脱リン酸化酵素(MLCP)の発現レベルを比較したところ、全ての不全心において cMLCK/MLCP の比率が低下していることが分かった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yamada N, Asano Y, Fujita M, Yamazaki S, Inanobe A, Matsuura N, Kobayashi H, Ohno S, Ebana Y, Tsukamoto O(10th/40) et al.	4. 巻 139
2. 論文標題 Mutant KCNJ3 and KCNJ5 Potassium Channels as Novel Molecular Targets in Bradyarrhythmias and Atrial Fibrillation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Circulation	6. 最初と最後の頁 2157-2169
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1161/CIRCULATIONAHA.118.036761.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hodatsu A, Fujino N, Uyama Y, Tsukamoto O, Imai-Okazaki A, Yamazaki S, Seguchi O, Konno T, Hayashi K, Kawashiri MA, Asano Y, Kitakaze M, Takashima S, Yamagishi M	4. 巻 6
2. 論文標題 Impact of cardiac myosin light chain kinase gene mutation on development of dilated cardiomyopathy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ESC Heart Fail	6. 最初と最後の頁 06-415
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/ehf2.12410.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tsukamoto O, Kitakaze M	4. 巻 313
2. 論文標題 Radiation-induced HFpEF model as a potential tool for the exploration of novel therapeutic targets.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Am J Physiol Heart Circ Physiol.	6. 最初と最後の頁 H323-H325
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1152/ajpheart.00307.2017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 5件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Osamu Tsukamoto
2. 発表標題 Direct sarcomere activators for the advanced stage systolic heart failure
3. 学会等名 第83回日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Osamu Tsukamoto
2. 発表標題 Myosin Regulatory Light Chain Phosphorylation as a Modulator of Sarcomere Contractility
3. 学会等名 第83回日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 塚本 蔵
2. 発表標題 心筋症の病態とこれに基づく薬物治療の期待
3. 学会等名 第3回日本心筋症研究会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 塚本 蔵
2. 発表標題 Therapeutic Application of Direct Sarcomere Modulators for Heart Failure
3. 学会等名 第21回日本心不全学会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 塚本 蔵
2. 発表標題 Translation of the Research from Bench to Bedside to Create the Drugs for Heart Failure
3. 学会等名 第21回日本心不全学会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 塚本 蔵
2. 発表標題 心不全治療を目的としたミオシン軽鎖リン酸化を調節する低分子化合物の開発
3. 学会等名 KEK 構造生物学研究センターセミナー（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 塚本 蔵
2. 発表標題 Development of direct sarcomere modulators for the treatment of heart failure
3. 学会等名 心血管代謝週間(CVMW)2017（招待講演）
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 塚本 蔵	4. 発行年 2019年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 5
3. 書名 直接的サルコメア制御剤による新しい心不全治療薬の開発 実験医学37巻 心不全のサイエンス	

1. 著者名 塚本 蔵	4. 発行年 2019年
2. 出版社 日本臨床社	5. 総ページ数 7
3. 書名 心不全の基礎研究 心不全の分子機序 Ca ²⁺ ハンドリング サルコメアタンパク質異常 日本臨床 心不全(第2版)上 最新の基礎・臨床研究の進歩76巻	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	西田 優也 (Yuya Nishida) (10793440)	大阪大学・医学系研究科・招へい教員 (14401)	
研究分担者	新谷 泰範 (Yasunori Shintani) (20712243)	大阪大学・生命機能研究科・准教授 (14401)	
研究分担者	朝野 仁裕 (Yoshihiro Asano) (60527670)	大阪大学・医学系研究科・講師 (14401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関