

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 10 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460295

研究課題名(和文) ラット胎生初期の心臓原基におけるカルシウムトランジェントと収縮の関連

研究課題名(英文) The relationship between the calcium transient and contraction in rat heart primordium.

研究代表者

小林 武志 (Kobayashi, Takeshi)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：80363688

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：一般的に心筋細胞においては、細胞内カルシウム濃度の上昇(カルシウムトランジェント)に引き続き収縮が観察されるが、胎生初期の胎仔心臓原基では、カルシウムトランジェントが生じているのに収縮がもたらされない現象を呈することを我々は見いだした。ただし、この現象が生じる機序は現在のところ不明であり、収縮関連蛋白質の発現量やリン酸化などの修飾、細胞内での局在の変化を検討する必要があるが、この時期の胎仔心臓原基は非常に小さいため、その測定は困難とされてきた。今回我々はマイクロアレー法、高感度ウエスタンブロット法、及び whole mount免疫染色法を用いることによって上記問題の解決が出来ることを報告する。

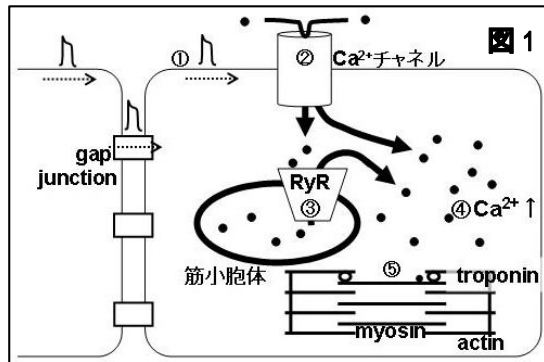
研究成果の概要(英文)：During the usual excitation-contraction coupling of mature cardiomyocyte, the calcium transient brings the contraction. However, the calcium transient of immature cardiomyocyte fails to bring the contraction, especially just after the beginning of the calcium transient. No previous study shows the mechanism about the inconsistency between the beginning of the calcium transient and the beginning of the contraction. The heart primordium at the beginning of the calcium transient is so small that it has been considered difficult to evaluate the RNAs and proteins of cardiomyocyte. Here, we show that microarray analysis, highly sensitive western blot analysis and whole mount immunostaining are powerful techniques for evaluating the developmental change in expression amount, phosphorylation ratio and cellular localization of RNAs and proteins.

研究分野：胎児心筋

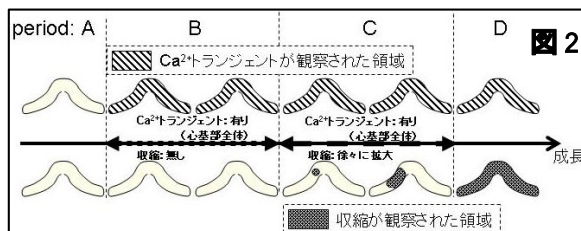
キーワード：rat heart primordium E-C coupling calcium transient -cardiac actin troponin-C

1. 研究開始当初の背景

一般的に心筋細胞の収縮時には『細胞膜の脱分極 脱分極によって開口したカルシウムチャネルを通る細胞外からのカルシウムの流入 流入したカルシウムによって開口した筋小胞体のリアノジンレセプターからの筋小胞体内のカルシウムの放出(カルシウムトランジェントの形成) 細胞内カルシウム濃度の上昇 カルシウムとトロポニンが結合することによりアクチンとミオシンが接触可能 収縮発生』といった過程(“興奮-収縮連関”)が生じている(図1)。



胎生初期に初めて心臓が動き出すときにも、初めから上記“興奮-収縮連関”がきちんと機能しているかどうかに関する過去の報告が皆無であったことから、我々はラットの胎仔を用いた観察を実施した。そうしたところ、胎生 9.99 ~ 10.13 日目の心臓原基は



『period A: カルシウムトランジェントも収縮も観察されない、period B: カルシウムトランジェントが心臓原基全体で観察されているにもかかわらず収縮は観察されない、period C: 収縮が心臓原基の一部分から始まり、時間と共に収縮範囲が拡大していく(カルシウムトランジェントは心臓原基全体で観察可能)、period D: カルシウムトランジェントも収縮も心臓原基全体で観察される』、といった経過をたどるといふ知見を我々は得た(図2)(Kobayashi et al. J Physiol Sci. 61:p141-149, 2011.)。驚くべきは period B での『カルシウムトランジェントが有るのに収縮は起きていない』という現象である。この現象は胎生 10.5 日目以降のラット胎仔では決して観察されないことより、胎生期の心拍動開始時に特異的な現象であると考えている。一方 period C の結果、つまり収縮は当初心臓原基のごく狭い一部分から始まり、その後時間と共に収縮範囲が拡大しているという観察結果は、収縮能獲得に関

して心臓原基の細胞によって差異が存在していることを意味する。

以上のことより、period B~C にかけての『カルシウムトランジェントが生じているのに収縮がもたらされない』という現象の主たる原因は、収縮関連蛋白の成長に伴う変化ではないかと我々は推測している。具体的には、1) アクチン・ミオシン・トロポニンなどの収縮関連蛋白の発現量が不十分、2) 収縮関連蛋白の発現量は十分であるが、いずれかの収縮関連蛋白のリン酸化などの修飾が不十分で収縮できない、3) 収縮関連蛋白の発現量は十分であるが収縮関連蛋白同志の相互位置関係が正しくないため(整列していないため)カルシウムトランジェントに反応できない、などが想定されているが具他的な報告は今迄行われていない。

2. 研究の目的

上記の想定を検討するためには、心拍動開始時期の収縮関連分子の RNA や蛋白質の発現量の測定を行う必要があるが、しかしながら、胎仔及びその心臓原基は非常に小さいため RNA や蛋白量が非常に少なく、通常の観察法で検討を行うのは困難とされてきた。そこで本研究では、上記時期の収縮関連分子の RNA や蛋白質の発現量測定法の確立を目的とした。具体的には、(1) マイクロアレー法による RNA の測定、(2) 高感度ウエスタンブロット法及び(3) whole mount 免疫染色法による蛋白質の測定である。

本研究の遂行によって、発生初期における心臓原基での“興奮-収縮連関”の詳細なメカニズムの理解に寄与できると考えている。

3. 研究の方法

(1) マイクロアレー法

胎生 10 日目のラット胎仔を子宮より摘出し、心臓原基の形態より『心拍動前』または『心拍動後』かを判別。心臓原基が前面である胎仔全体の写真を撮影後、心臓原基のみ摘出し TRIzol® Reagent (Thermo Fisher Scientific) にて RNA を抽出。この時期の心臓原基は小さく、RNA 量も少ないため、マイクロアレー法 1 プレートを施行するのに必要な数~数十匹分の心臓原基をまとめる必要が生じた。今回は『心拍動前』及び『心拍動後』はそれぞれ 3 プレートずつ行ったが、それに必要なラット胎仔は『心拍動前』は 26 匹、20 匹、28 匹、『心拍動後』は 19 匹、20 匹、45 匹であった。このサンプルを用いアジレントアレイ(アジレント・テクノロジー社)を実施した。

(2) 高感度ウエスタンブロット法

基本手技は Takeya et al. Am. J. Physiol. Renal. Physiol. 294(6), F1487-F1492, 2008. を参照した。具体的な手技としては以下である。心臓原基はタイロード溶液中で摘出し、直接泳動バッファーに溶解し、95、5 分間

処理した。サンプル量が少ないため、コーム幅 1mm のコームを用い泳動ゲルを作成し、200V にて泳動。0.2 μm PVDF 膜(BIO-RAD)に 25V、48 時間で転写。ECL Advance Blocking agent(GE healthcare)を用い PVDF 膜をブロッキングした後、1 次抗体、2 次抗体、Pierce® High Sensitivity NeutrAvidin®-HRP (Thermo Fisher Scientific) SuperSignal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Fisher Scientific) の順で反応させ、ChemiDoc XRS Plus(BIO-RAD)にて撮影を行った。

(3) whole mount 免疫染色法

基本手技は横溝智雅ら, 実験医学, Vol30, No.14, p2289-2294, 2012、及び、吉田尚弘, 『ホールマウント免疫染色』, タンパク質研究のための抗体実験マニュアル, 羊土社, p42-52 を参照した。具体的な手技としては以下である。胎仔をタイロッド溶液中で摘出し 4% paraformaldehyde で固定。1%ヤギ血清/0.2% ウシ血性由来アルブミン/0.1%スキムミルクでブロッキングした後、1 次抗体、2 次抗体、DAPI の順で反応。30%-, 45%-, 60%-, 70%-, 80%-glycerol と置換していき、Glass Bottom Dish(MATSUNAMI) を用い、ConfoCor3LSM510META (ZEISS) にて撮影を行った。

4. 研究成果

(1) マイクロアレー法による検討

心拍動開始前後の心臓原基を検討したところ、収縮関連分子で有意に増加したものは以下であった。

- Troponin C (slow skeletal)
- Troponin I (cardiac)
- Troponin I (fast skeletal)
- Troponin I (slow skeletal)
- Troponin T (slow skeletal)
- actin (alpha, skeletal)
- actin (alpha, smooth muscle)(Acta2)
- myosin (heavy chain 11, smooth muscle)
- myosin (heavy chain 6, cardiac muscle, alpha)
- myosin (heavy chain 7, cardiac muscle, beta)
- myosin (heavy chain 8, skeletal muscle, perinatal)
- myosin (light chain 1, transcript variant 3f)
- myosin (light chain 3, alkali; ventricular, skeletal, slow)
- myosin (light chain 9, regulatory)
- myosin (light chain, phosphorylatable, fast skeletal muscle)
- myosin (light polypeptide 2, regulatory, cardiac, slow)
- myosin (myosin XVI)
- myosin (myosin XVIIIa)
- actinin (alpha 2)

- tropomyosin 1(alpha)
- myosin binding protein C, cardiac
- myosin binding protein H
- calcium channel(calcium channel, voltage-dependent, gamma subunit 6)
- calcium channel(calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1C subunit)
- calcium channel (calcium channel, voltage-dependent, T type, alpha 1H subunit)
- chloride channel (chloride channel Kb)
- potassium channel (potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily M, beta member 1)
- potassium channel (potassium voltage-gated channel, delayed-rectifier, subfamily S, member 2)
- potassium channel (potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, member 5)
- potassium channel (potassium voltage-gated channel, subfamily H (eag-related), member 6)
- sodium channel(SCN5A)- voltage-gated, type V, alpha subunit (Scn5a), transcript variant 1
- Ca ATPase(SERCA1, cardiac muscle, fast twitch 1 (Atp2a1))
- Ca ATPase(heart type SERCA2)(Atp2a2)
- calsequestrin 1 (fast-twitch, skeletal muscle) (Casq1)
- junctophilin 2 (Jph2)
- adenylylase cyclase type-5 (Adcy5)

以下の分子は有意な増加は示さなかった。

- PKA-protein kinase, cAMP-dependent, catalytic, alpha (Prkaca)
 - PKA-protein kinase, cAMP dependent, catalytic, beta (Prkacb)
 - -cardiac actin
 - GAPDH
- 以上より、収縮関連分子の増加が心拍動開始に寄与している可能性が示唆された。また当初予想していた PKA の発現増加は認められなかったが、adenylylase cyclase type-5 の増加を認めた。adenylylase cyclase type-5 及び type-6 は成体の心臓で主に働いていると考えられているが、そのうちの type-5 の増加が示されたことより、収縮関連蛋白質のリン酸化の増加が心拍動開始に関与している可能性が示唆された。

(2) 高感度ウエスタンブロット法による検討

次にウエスタンブロット法による心臓原基における蛋白質発現量の検討を行った。図は上から、心拍動開始前後の胎仔像、Troponin-I 発現量、-cardiac actin 発現量、GAPDH 発現量を表している。本泳動する前に、GAPDH の発現量をあらかじめ測定し、

GAPDH が同じになるように、サンプル量を調整し改めて本泳動を行っている。これまでの検討よりこの時期に心拍動は開始するので、①は心拍動開始前、②は心拍動開始後となる。Troponin-I 及び α -cardiac actin が成長に伴い発現量が増加していることが示された。Troponin-I はマイクロアレー法による検討でも増加していたが、 α -cardiac actin はマイクロアレー法による検討では増加していなかった。これらの差異は次の2つの理由が原因である可能性がある。1つ目は見ている分子の違いである。マイクロアレー法は RNA を、ウエスタンブロット法は蛋白質を測定する方法である。であるので、RNA と蛋白質の発現量変化に時間差が生じる場合は、その結果にも差が生じることが考えられる。2つ目は結果の表示法の差異である。マイクロアレー法の発現量は、全 RNA に対する相対値を示している。その為、サンプルに含まれる細胞数は問題視されない。一方ウエスタンブロット法では細胞一個に含まれる蛋白質が変化しなくても細胞数が増えたと増加するように見える。その為、内部標準蛋白質での補正が必要である。一般的に心筋細胞の内部標準蛋白質としては α -cardiac actin が使用されるが、この時期の α -cardiac actin の細胞一個での発現量が増えている可能性がある。また、この時期の心臓原基は時間と共に大きくなり、また、心臓原基の背面は前脳であり、2者を物理的に分かつのは不可であるため、GAPDH 等の一般的な内部標準分子を使用することが出来ないことが想定された。その為、ウエスタンブロット法を継続するに当たり、まず、この時期の心筋細胞に特異的に発現している分子を同定する必要があると判明し、whole mount 免疫染色法を実施することとした。

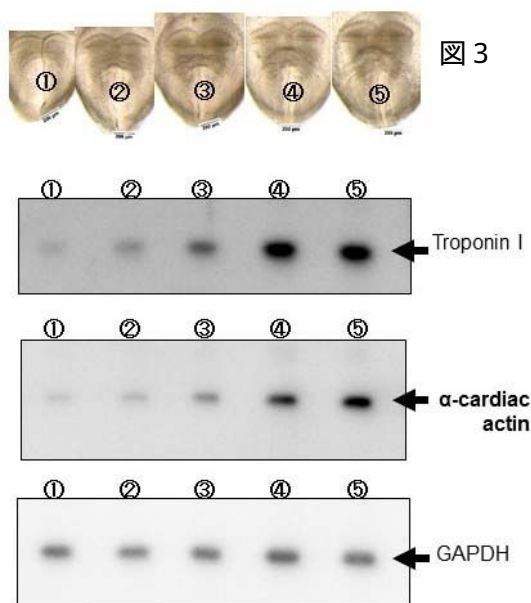


図 3

(3) whole mount 免疫染色法による検討
心拍動開始前後のラット胎仔を用いて whole mount 免疫染色法を施行した。この時期の心筋細胞に特異的に発現していることが予想される分子として、 α -cardiac actin と troponin-C を検討した。心筋細胞以外の細胞との関連を検討するため核染色剤の DAPI も用いることとした。その結果、心拍動開始前の心臓原基(cardiac crescent: 図 4) から心拍動開始後しばらく経過した時期の心臓原基(linear cardiac tube: 図 5)までの間で、 α -cardiac actin と troponin-C は共に主に心臓原基のみに発現していることが判明した。anti- α -cardiac actin はやや心臓以外での non-specific なシグナルを確認した。それに比べ、anti-troponin-C の方が特異性が高かった。

図 4 (cardiac crescent)

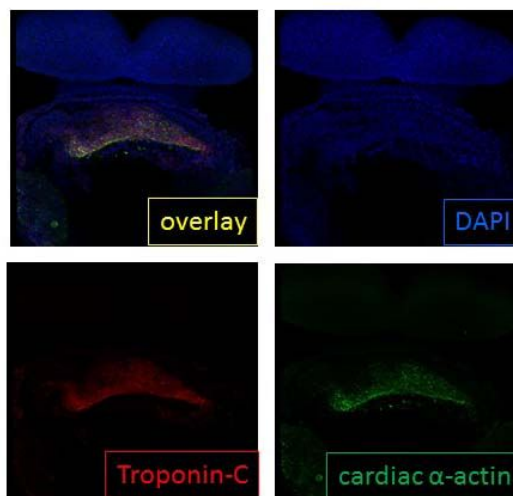
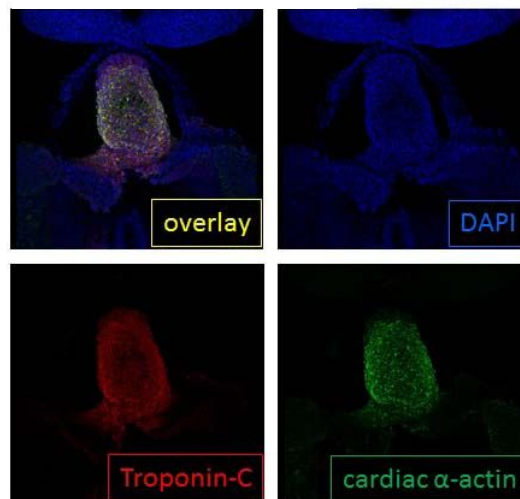


図 5 (linear cardiac tube)



以上より、心拍動開始前後の心臓原基のウエスタンブロット法を行う場合は、troponin-C や α -cardiac actin を内部標準蛋白質とし、検討を行った方が良いことが判明した。

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 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

・ Kobayashi T, " The developmental changes in the contractile proteins of rat embryonic hearts around the period of the appearance of the heartbeat." 第 91 回日本生理学会大会, 2014 年 03 月 16 日 ~ 2014 年 03 月 18 日, 鹿児島大学(鹿児島県・鹿児島市)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 武志 (Kobayashi, Takeshi) 札幌医科大学・医学部・講師
研究者番号：80363688

(2) 研究分担者

當瀬 規嗣 (Tohse, Noritsugu) 札幌医科大学・医学部・教授
研究者番号：80192657

(3) 連携研究者

()

研究者番号：