

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 10 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440045

研究課題名(和文) 心筋肥大におけるN-WASP-NebI複合体の活性化制御機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of N-WASP-NebI complex activation during cardiomyocyte hypertrophy

研究代表者

高野 和儀 (Takano, Kazunori)

千葉大学・大学院融合科学研究科・助教

研究者番号：60466860

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：骨格筋や心筋の肥大は成長や運動，疾患により増大した機械的刺激に耐えるための重要な現象である。心筋肥大においては筋原線維形成が不可欠であるが，その分子機構は不明であった。筋原線維のアクチン線維形成を可視化したところ，心筋肥大においても筋原線維Z線からアクチン線維形成が起こった。また，N-WASP-NebI複合体形成を抑制する分子についてAmph2を同定した。N-WASPの心筋特異的誘導性cKOにより拡張型心肥大が誘導された。したがって，心筋肥大においてN-WASP-NebI複合体を介した筋原線維形成が心機能の維持あるいは心筋保護に関わる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Striated muscle hypertrophy is necessary for adaptation to mechanical stress increases by growth, exercise and disease conditions. Muscle hypertrophy requires myofibrillogenesis, however, the mechanism of myofibrillogenesis has been obscure. In this study, we focused on that N-WASP interacts stably with nebulin (NebI), a cardiac specific nebulin family protein. Thus, the activity of N-WASP-NebI complex seemed to be regulated in vivo. First, we showed that actin monomer is incorporated into Z-band of myofibrils in cardiac muscle in vivo. We also identified Amph2 as one of the N-WASP-binding proteins in cardiac muscle. Furthermore, cardiac muscle specific inducible N-WASP knockout mice exhibited symptoms of dilated cardiac hypertrophy. Taken together, these results suggest that N-WASP is involved in cardiac muscle maintenance by regulating myofibrillogenesis.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：筋原線維形成 アクチン重合 N-WASP nebulin 心筋 筋肥大

## 1. 研究開始当初の背景

骨格筋や心筋は、筋原線維の収縮・弛緩を通して運動や呼吸、心機能の維持などの生命活動に必須の役割を果たしている。骨格筋はインスリン様増殖因子-1 (IGF-1) によって肥大する (Schiaffino, et al., *Skelet. Muscle* (2011) 1: 4)。しかし、骨格筋肥大に必要な筋原線維形成の分子機構はこれまで不明であった。我々は、次のような機構でマウス骨格筋における筋原線維のアクチン線維が形成され、骨格筋の肥大につながることを解明した (Takano, et al., *Science* (2010) 330: 1536-40.)。 (A) IGF-1 が作用しないと、GSK-3 が骨格筋特異的タンパク質 nebulin の C 末端をリン酸化する。リン酸化 nebulin にはアクチン線維形成を担う N-WASP が結合できず、アクチン線維が形成されない。 (B) IGF-1 が作用すると、PI3 キナーゼ (PI3K)-Akt シグナリングが活性化され、GSK-3 がリン酸化されて不活性化される。これにより GSK-3 による nebulin のリン酸化が解除され、N-WASP と nebulin が筋原線維の Z 帯で結合する。こうして N-WASP は Z 帯に局在化する。この N-WASP-nebulin 複合体が Z 帯でアクチン重合核を形成し、Z 帯からアクチン線維が形成される。このアクチン線維形成を介した筋原線維形成は、骨格筋の肥大において必要不可欠な機構である。

一方、心筋細胞の肥大 (心筋肥大) は心機能や心筋症などの心疾患と密接にかかわっている重要な現象である。たとえば、生後の成長過程や高血圧等の病理的条件下において、心筋肥大が起こり心臓のサイズが大きくなる。また、筋原線維タンパク質の遺伝子変異は先天性心疾患の原因となる (Ottenheijm, et al., *Hum. Mol. Genet.*, (2009) 18: 2359-69.)。このため、骨格筋肥大と同様に、心筋肥大にも筋原線維形成が必要であると考えられる。しかし、これまでに心筋肥大における筋原線維形成の分子機構は解明されていない。

心筋には nebulin は存在せず、代わりに心筋特異的 nebulin ファミリータンパク質である nebulin (Neb1) が存在する (Ottenheijm,

et al., *Hum. Mol. Genet.*, (2009) 18: 2359-69.)。そこで、我々は心筋細胞においてアクチン線維形成が N-WASP-Neb1 複合体により制御される可能性を検討した。骨格筋において N-WASP の局在は nebulin のリン酸化状態により制御されるが、心筋細胞において N-WASP は Z 帯に恒常的に局在した。これと一致して、N-WASP と Neb1 は IGF-1 シグナルに依存せず、恒常的に結合した。さらに、両者の結合により、*in vitro* においてアクチン重合が促進された。したがって、心筋細胞では常にアクチン線維形成が促進されると考えられた。ところが、*in vivo* の心筋細胞に発現させたアクチンは骨格筋と同様に Z 帯に取り込まれるが、生理的条件下においてアクチン線維は Z 帯から伸長しなかった。この結果から、心筋細胞においても Z 帯はアクチン重合の場であり、その一方で、生理的条件下では N-WASP-Neb1 複合体の活性化が抑制されている可能性が考えられた。そこで、次に N-WASP の活性抑制機構に着目した。N-WASP の活性は WIP ファミリータンパク質によって抑制されており (Takano, et al., *EMBO J.* (2008) 27: 2817-28.)、実際に WIP は心筋細胞の Z 帯に局在した。一方、N-WASP の WH2 ドメインはアクチン線維にアクチンモノマーを付加することにより、アクチン線維の伸長に参与する (Co, et al., *Cell* (2007) 128: 901-13., Hu, X. and Kuhn, J. R. *PLoS One* (2012) 7: e31385.)。さらに、このアクチン線維の伸長にはアクチンモノマーを Z 帯に取り込む N-WASP 自体のターンオーバーが必要である (Co, et al., *Cell* (2007) 128: 901-13., Takano, et al., *Science* (2010) 330: 1536-40.)。したがって、心筋肥大においては Z 帯における WIP ファミリータンパク質の制御や N-WASP 抑制因子の解離によるターンオーバーの調節が、アクチン線維の伸長を制御していると考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究では、心筋肥大において N-WASP-Neb1 複合体の活性化がどのように調節されるかを解明し、その生理的な役

割について明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### < アデノ随伴ウイルスの作製と感染 >

マウス心筋細胞への遺伝子導入にはアデノ随伴ウイルス(AAV)を用いた。AAV/DJ-8 骨格に EGFP-alpha-actin cDNA を挿入し、ヘルパーベクターとともに 30 枚の 150-mm dish 上の 293 細胞に polyethylenimine (PEI) Max によるトランスフェクションを行い 3 日間培養した。遠心分離後の培養上清はクロソフロー方式を採用した限外濾過を用いて 15 倍まで濃縮し、一方の沈殿として得られた細胞は 10 ml に懸濁した後に凍結融解を繰り返すことでウイルス粒子を細胞外へ拡散させた。これらは DNaseI 処理を行うことにより、培養細胞およびウイルス由来の DNA を除去した後に混合し、遠心方式の限外濾過を行うことにより、さらに 10 倍濃縮させた。これを iodixanol 密度勾配遠心分離 (76 krpm, 1 hr, 4°C) を行うことで AAV 粒子のバンドを回収した。回収したウイルス粒子は PBS に対して 4°C で一晚透析した後に、ウイルスゲノム (vg) 濃度を測定した。イソフルラン麻酔下における開胸術により、左心室壁に  $3 \times 10^{12}$  vg の AAV を注入して感染させた。AAV 作製にともなう遺伝子組換え実験については「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」(カルタヘナ法) を遵守し、本研究で用いる遺伝子組み換え実験計画はすべて機関承認実験 (学長承認の範囲内) であるため、承認を得て行った。

#### < マウス上行大動脈狭窄 (TAC) 術 >

マウス大動脈の結紮では上記のとおり開胸し、上行大動脈を 27-G 針の太さとなるように 7-0 ナイロン糸で結紮した。結紮後は 27-G 針を除去した後に速やかに閉胸し、心肥大が誘導されるまでの期間、通常に飼育した。大動脈結紮による心機能の低下は心カテーテル電極による左心室 P-V ループにより評価した。これらの動物実験と実験動物の取り扱いは「動物の愛護及び管理に関する法律」および「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」(平成

18 年文部科学省告示第 71 号)等に基づき、本学の動物実験実施規定を遵守しかつ承認を得て行った。

#### < 凍結切片の免疫蛍光染色 >

マウス心筋は 3.7%ホルムアルデヒド溶液により固定した後に、 $5\text{-}\mu\text{m}$  厚の凍結切片を作製した。得られた切片は特異的抗体およびその 2 次抗体によりタンパク質の局在をラベルし、共焦点レーザー顕微鏡により検出した。

### 4. 研究成果

まず、N-WASP が心筋においてどのような役割を果たしているかを検討する目的で、N-WASP 阻害剤である wiskostatin を充填した infusion pump を用いて C57BL/6 マウスに作用させた。その結果、wiskostatin の投与により上行大動脈狭窄術 (TAC) 後の心機能低下が増悪した。したがって、心筋の定常状態における N-WASP 依存的なアクチン線維形成は抑制されているものの、N-WASP-nebulette の活性は心肥大時の心機能の維持に必須の役割を果たす可能性が示唆された。一方でこの結果のみでは wiskostatin の全身性の作用の結果、心臓に影響が出た可能性は払拭できなかった。本研究では、N-WASP の心筋特異的誘導性コンディショナルノックアウト (cKO) マウスを用いることにより、拡張型心肥大が誘導されることが明らかにすることができた。このとき、心筋細胞は短軸方向へ短縮して細くなっており、TAC による心臓の機能低下は N-WASP cKO マウスではさらに悪化した。興味深いことに、N-WASP cKO マウスの心臓では線維化が誘導されていた。以上のことから、N-WASP は心筋においても筋原線維のアクチン線維形成の制御に関わることが示唆され、N-WASP を介した筋原線維形成が心筋の機能維持あるいは心筋保護に関わることが明らかになった。

次に筋原線維形成を可視化する目的でアクチンを発現する AAV を左心室壁に感染させ 14 日後に観察をした。その結果、骨格筋と同様に Z 帯から取り込むのは確認されたものの、TAC によりアクチン取り込み量

はわずかに増加する傾向であったが、TACを行ったとしても筋原線維全体にわたってアクチンモノマーが取り込まれることはなかった。また、骨格筋同様に pointed end から取り込まれている様子は *in vivo* においてはやはり確認できなかった。したがって、生体内における筋原線維の形成やアクチンの取り込みの場は骨格筋と同様に Z 帯ではあるものの、その形成のスピードあるいは N-WASP の Z 帯におけるターンオーバー速度は心筋の方がはるかに緩やかである可能性が示唆された。その一方で、TAC により心筋細胞径は有意に増加していたことから、TAC による心筋肥大には筋原線維形成を伴うものの、完全長のアクチン線維を形成するには至らないことが考えられる。このことから、TAC による心筋肥大における心機能あるいは心筋収縮能の低下は、筋原線維形成が完了しないことからもたらされる可能性がある。したがって、N-WASP の機能を促進させることにより、心肥大における心筋収縮能の低下を改善できるかもしれない。しかしながら、本研究のみでは TAC による筋原線維形成の促進を明瞭に捉えることができなかった。その理由の一つとしては、AAV はそのゲノムを 19 番染色体上の AAVS1 領域に挿入させることにより長期にわたる外来遺伝子の発現が期待できるが (Musayev, et al., *J. Biol. Chem.* (2015) 290(46): 27487–27499.), 発現ユニットの構成によっては発現量が非常に低く、また、心筋壁に注入することにより感染して発現する細胞はごく一部であるため総じて内在性の発現量には達せず (Heckmann, et al., *Gene Ther.* (2016) 23: 673–679.), 心機能の変化などは非常に検出しにくい点が挙げられる。実際に、上記引用論文のように本研究においても各種 N-WASP 変異体なども構築して発現を試みたものの、発現量および感染効率ともに解析に充分とはいえず、いずれもはっきりとした評価系を得るには適さなかった。したがって今後はこれらの問題点を解決すべく CRISPR/Cas9 を用いてすべての心筋細胞に時期特異的に高発現できる遺伝子改変マウスの作製を中心に進め

るよう努めていく。

一方、N-WASP に結合するタンパク質を pull-down assay により同定したところ、amphiphysin-2/BIN-1 (Amph2) を得た。Amph2 は BAR ドメイン膜変形タンパク質であり、細胞膜に結合して筋収縮に必要な T 菅の形成を引き起こすことが知られており (Lee, et al., *Science* (2002) 297: 1193-1196.), また、遺伝性筋疾患である中心核病の原因遺伝子でもある (Nicot, et al., *Nat. Genet.* (2007) 39: 1134-1139., Claeys, et al., *Neurol.* (2010) 74: 519-521.). さらに、BAR ドメイン膜変形タンパク質の一部では WIP による N-WASP の不活性化を解除することを我々はこれまでに明らかにしている (Takano, et al., *EMBO J.* (2008) 27: 2817–28.). そこで pull-down assay により N-WASP との結合の様式を調べたところ、N-WASP は Amph2(wt) とは結合するものの、SH3 ドメインに欠失変異が導入された Amph2(K436X) には結合しなかった。したがって、Amph2 は Nebl と同様に SH3 ドメインを介して N-WASP と結合するため、N-WASP-Nebl 複合体形成および心筋における筋原線維形成は Amph2 により制御を受ける可能性が示唆された。一方、N-WASP は Amph2 を介した骨格筋における周辺核化にも関与する可能性が明らかになった。

## 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 3 件)

- (1) Maeda, R., Tamashiro, H., Takano, K., Takahashi, H., Suzuki, H., Saito, S., Kojima, W., Adachi, N., Ura, K., Endo, T. and Tamura, TA. TBP-like Protein (TLP) Disrupts the p53-MDM2 Interaction and Induces Long-lasting p53 Activation. *J. Biol. Chem.* (2017) 292(8): 3201–3212. Doi: 10.1074/jbc.M116.763318. (査読あり)
- (2) Watanabe-Takano, H., Takano, K., Hatano, M., Tokuhisa, T. and Endo, T. DA-Raf-Mediated Suppression of the

Ras-ERK Pathway Is Essential for TGF- $\beta$ 1-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition in Alveolar Epithelial Type 2 Cells. *PLoS One* (2015) 10(5): e0127888. Doi: 10.1371/journal.pone.0127888. (査読あり)

- (3) Watanabe-Takano, H., Takano, K., Sakamoto, A., Matsumoto, K., Tokuhisa, T., Endo, T. and Hatano, M. DA-Raf-dependent inhibition of the Ras-ERK signaling pathway in type 2 alveolar epithelial cells controls alveolar formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (2014) 111(22): E2291-2300. Doi: 10.1073/pnas.1321574111. (査読あり)

[学会発表](計 14 件)

- (1) 高野和儀, 久光憧志, 渡邊-高野晴子, 遠藤剛 横紋筋肥大・再生時の筋原線維形成および核配置における N-WASP の役割 第 89 回日本生化学会大会 ポスター (仙台国際センター/東北大学川内北キャンパス 2016 年 9 月 25 日~27 日)
- (2) 山中菜々子, 守越彩乃, 渡邊-高野晴子, 高野和儀, 遠藤剛 BMP2 による M-Ras を介した骨芽細胞への分化転換のシグナル伝達機構 第 89 回日本生化学会大会 ポスター (仙台国際センター/東北大学川内北キャンパス 2016 年 9 月 25 日~27 日)
- (3) 高野和儀, 菅野英美里, 菅波晃子, 田村裕, 遠藤剛 DA-Raf による Ras-ERK カスケード阻害の分子機構 第 68 回日本細胞生物学会大会 ポスター (京都テルサ 2016 年 6 月 15 日~6 月 17 日)
- (4) 川崎修, 菅野英美里, 高野和儀, 遠藤剛 DA-Raf によるがん化抑制におけるストレスファイバー回復の分子機構 第 68 回日本細胞生物学会大会 ポスター (京都テルサ 2016 年 6 月 15 日~6 月 17 日)
- (5) 渡邊-高野晴子, 高野和儀, 幡野雅彦, 徳久剛史, 遠藤剛 DA-Raf による
- Ras-ERK 経路の抑制は TGF- $\beta$ による 2 型肺胞上皮細胞の EMT に必須である BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会大会 / 第 88 回日本生化学会大会 合同大会) ポスター (神戸ポートピアホテル・神戸国際会議場・神戸国際展示場・神戸商工会議場 2015 年 12 月 1 日~4 日)
- (6) 永野貴大, 高野和儀, 遠藤剛 Ras-ERK カスケードを阻害する DX-Raf タンパク質群の同定 BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会大会 / 第 88 回日本生化学会大会 合同大会) ポスター (神戸ポートピアホテル・神戸国際会議場・神戸国際展示場・神戸商工会議場 2015 年 12 月 1 日~4 日)
- (7) 佐藤広崇, 細野淳一, 福田陽一, 高野和儀, 遠藤剛 増殖因子と BMP の細胞間シグナル伝達に働く細胞突起の形成機構 BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会大会 / 第 88 回日本生化学会大会 合同大会) ポスター (神戸ポートピアホテル・神戸国際会議場・神戸国際展示場・神戸商工会議場 2015 年 12 月 1 日~4 日)
- (8) 前田亮, 玉城寛之, 高野和儀, 鈴木秀文, 浦聖恵, 遠藤剛, 田村隆明 MDM2 との結合競合を介した転写因子 TLP による p53 安定化機構 BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会大会 / 第 88 回日本生化学会大会 合同大会) ポスター (神戸ポートピアホテル・神戸国際会議場・神戸国際展示場・神戸商工会議場 2015 年 12 月 1 日~4 日)
- (9) 佐藤広崇, 細野淳一, 福田陽一, 高野和儀, 遠藤剛 多様なシグナル分子の細胞間シグナル伝達に働く細胞突起の形成機構 第 67 回日本細胞生物学会大会 ポスター (タワーホテル船堀 2015 年 6 月 30 日~7 月 2 日)
- (10) 高野和儀, 中村拓彦, 遠藤剛 DA-Raf による Ras-ERK カスケード阻害の分子機構 第 67 回日本細胞生物学会大会 ポスター (タワーホテル船堀 2015 年 6 月 30 日~7 月 2 日)

(11) 渡邊-高野晴子, 高野和儀, 坂本明美, 徳久剛史, 幡野雅彦, 遠藤剛 2型肺胞上皮細胞における DA-Raf 依存的 Ras-ERK カスケードの抑制が肺胞形成を制御する 第 87 回日本生化学会大会ポスター  
(国立京都国際会館・グランドプリンスホテル京都 2014 年 10 月 16 日~18 日)

(12) 中村拓彦 高野和儀 遠藤剛 Ras-ERK 経路を阻害する DA-Raf のドミナントネガティブ作用の分子機構 第 87 回日本生化学会大会 ポスター  
(国立京都国際会館・グランドプリンスホテル京都 2014 年 10 月 16 日~18 日)

(13) 今野太貴, 中村拓彦, 高野和儀, 遠藤剛 DA-Raf によるがん化抑制: ストレスファイバー回復の分子機構 第 87 回日本生化学会大会 ポスター  
(国立京都国際会館・グランドプリンスホテル京都 2014 年 10 月 16 日~18 日)

(14) 高野和儀, 渡邊-高野晴子, 遠藤剛 N-WASP と nebulin は心筋肥大における筋原線維形成を制御する 第 87 回日本生化学会大会 ポスター  
(国立京都国際会館・グランドプリンスホテル京都 2014 年 10 月 16 日~18 日)

〔図書〕(計 1 件)

Endo, T. and Takano, K. Actin Filament Formation in Myofibrils and Cell Protrusions Regulated by Signal Transduction. *Protein Modifications in Pathogenic Dysregulation of Signaling*. (2015) 4: 287-307. Doi: 10.1007/978-4-431-55561-2\_18. (査読なし)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 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 0 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  
研究室ホームページ  
<http://life.s.chiba-u.jp/telab/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高野 和儀 (TAKANO KAZUNORI)  
千葉大学・大学院融合科学研究科・助教  
研究者番号: 60466860

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

遠藤 剛 (ENDO TAKESHI)  
千葉大学・大学院理学研究科・教授  
研究者番号: 30194038

高野 晴子 (TAKANO HARUKO)  
千葉大学・大学院医学研究院・学振 PD  
研究者番号: 40532891

(4) 研究協力者

久光 憧志 (HISAMITSU SHOSHI)  
千葉大学・理学部・生物学科・学部生

栗原 優介 (KURIHARA YUSUKE)  
千葉大学・理学部・生物学科・学部生