

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09134

研究課題名(和文)ホスホリラーゼ異常リン酸化による心不全発症機序の解明

研究課題名(英文)Phosphorylase phosphorylation in the heart failure development

研究代表者

今野 哲雄 (Konno, Tetsuo)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：50377389

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、肥大型心筋症におけるホスホリラーゼ異常スレオニンリン酸化の機能的意義を明らかにし、新規心不全発症機序を解明することである。精製したWT-ホスホリラーゼ、ThrXAla-ホスホリラーゼ、ThrXAsp-ホスホリラーゼを用いて機能発現実験を行った。NADPH産生量を指標としたForward反応では、ThrXAsp-ホスホリラーゼ活性はWT-ホスホリラーゼおよびThrXAla-ホスホリラーゼ活性と比較して有意に低下した。ゲル泳動Reverse反応においても、Forward反応と同様にThrXAsp-ホスホリラーゼ活性低下が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We aimed to investigate the role of phosphorylase in the development of heart failure. In vitro forward assay showed that WT-phosphorylase activity was significantly decreased compared with ThrXAla phosphorylase and ThrXAsp phosphorylase. This association was also observed in the reverse gel assay.

研究分野：循環器内科

キーワード：心不全 リン酸化

### 1. 研究開始当初の背景

申請者は肥大型心筋症患者で AMP 活性化プロテインキナーゼ遺伝子変異を同定し、この変異をマウスに導入するとホスホリラーゼに特異的な異常スレオニンリン酸化が生じることを見いだした。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、肥大型心筋症におけるホスホリラーゼ異常スレオニンリン酸化の機能的意義を明らかにし、新規心不全発症機序を解明することである。

### 3. 研究の方法

リン酸化部位のスレオニンを負電荷を持つアスパラギン酸で置換することにより、スレオニン部位が恒常的にリン酸化された擬似状態となる。一方、スレオニンのアラニンへの置換により、脱リン酸化されたスレオニンの擬似状態となる。ホスホリラーゼの野生型および今回同定した X 番スレオニンの置換変異型のタグ融合ホスホリラーゼ蛋白発現コンストラクトを作成し、培養細胞にトランスフェクション後、WT-ホスホリラーゼ、ThrXAla-ホスホリラーゼ、ThrXAsp-ホスホリラーゼを精製した。

### 4. 研究成果

NADPH産生量を指標にIn vitroにてmGP活性を測定したところ (Forward 反応)、ThrXAsp-ホスホリラーゼはWT-ホスホリラーゼおよびThrXAla-ホスホリラーゼと比較して有意にホスホリラーゼ活性が低下することが明らかとなった。この傾向は、試験管内にAMPを添加することにより更に明確となった。Reverse反応(ゲルアッセイによるホスホリラーゼ活性測定系)によって変異型ホスホリラーゼ機能を解析したところ、Forward反応と同様に、

ThrXAsp-ホスホリラーゼはWT-ホスホリラーゼおよびThrXAla-ホスホリラーゼと比較して有意に活性が低下することが明らかとなった。次世代シーケンス手法を用いて、肥大型心筋症発端者30例を対象に更なるAMP活性化プロテインキナーゼ変異のスクリーニングを行ったが、同遺伝子の変異は検出されなかった。以上の結果より、肥大型心筋症におけるホスホリラーゼの新規スレオニンリン酸化は酵素活性低下を来すことが明らかとなり、心筋症・心不全発症進展との関連が示唆された。

### 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 6 件)

[1] Teramoto R, Fujino N, Konno T, Nomura A, Nagata Y, Tsuda T, Tada H, Sakata K, Yamagishi M, Hayashi K, Kawashiri MA.

Late Gadolinium Enhancement for Prediction of Mutation-Positive Hypertrophic Cardiomyopathy on the Basis of Panel-Wide Sequencing. Circ J (査読あり). 2018;82:1139-1148.

[2] Nagata Y, Yamagishi M, Konno T, Nakanishi C, Asano Y, Ito S, Nakajima Y, Seguchi O, Fujino N, Kawashiri MA, Takashima S, Kitakaze M, Hayashi K. Heart Failure Phenotypes Induced by Knockdown of DAPIT in Zebrafish: A New Insight into Mechanism of Dilated Cardiomyopathy. Sci Rep (査読あり) 2017;7:17417.

[3] Tanaka, Y, Konno T, Tamura Y, Tsuda

T, Furusho H, Takamura M, Sakata K, Yamagishi M, Hayashi K.

Impact of T wave amplitude in lead aVR on predicting cardiac events in ischemic and non-ischemic cardiomyopathy patients with an implantable cardioverter defibrillator

Ann Noninvasive Electrocardiol (査読あり) 2017;22. (in press)

[4] Tanaka Y, Konno T, Yoshida S, Tsuda T, Sakata K, Furusho H, Takamura M, Yoshimura K, Yamagishi M, Hayashi K. T wave amplitude in lead aVR as a novel diagnostic marker for cardiac sarcoidosis.

Heart Vessels (査読あり) 2017;32:352-358.

[5] Konno T, Nagata Y, Teramoto R, Fujino N, Nomura A, Tada H, Sakata K, Furusho H, Takamura M, Nakamura H, Kawashiri MA, Yamagishi M, Hayashi K. Usefulness of Electrocardiographic Voltage to Determine Myocardial Fibrosis in Hypertrophic Cardiomyopathy.

Am J Cardiol (査読あり) 2016;117:443-9.

[6] Nagata Y, Konno T, Hayashi K, Kawashiri MA.

Myocardial tissue characterization of left ventricular reverse remodeling in ischemic cardiomyopathy.

Circ J (査読あり) 2016;80:2427-2428.

〔学会発表〕(計 7件)

[1] Konno T, Teramoto R, Fujino N,

Kawashiri MA, Yamagishi M

Impact of genotype on conduction disturbance in patients with hypertrophic cardiomyopathy  
日本循環器学会総会学術集会 2017(金沢, 2017年3月19日)

[2] 今野 哲雄 (シンポジウム演者)  
肥大型心筋症における心筋線維化の評価 : 遺伝子型および心臓 MRI の観点から

日本循環器学会総会学術集会 2017(金沢, 2017年3月18日)

[3] 今野 哲雄  
心筋症の遺伝子診断(シンポジウム演者)  
日本心不全学会 2016  
札幌 2016年10月7日-9日)

[4] Tanaka Y, Konno T, Yoshida S, Tada H, Sakata K, Hayashi K, Furusho H, Takamura M, Kawashiri MA, Yamagishi M. T wave amplitude in aVR as a novel prediction marker for cardiac involvement in patients with sarcoidosis  
European Society of Cardiology, Annual Congress in 2016 (Roma, Italy, 2016年8月28日)

[5] Tanaka Y, Konno T, Tada H, Tsuda T, Hayashi K, Kaneda T, Kato T, Furusho H, Takamura M, Kawashiri MA, Yamagishi M. T wave amplitude in aVR as a novel risk stratification tool for cardiac events in ischemic and non-ischemic cardiomyopathy patients with implantable cardioverter defibrillator  
European Society of Cardiology, Annual

Congress in 2016 (Roma, Italy, 2016  
年 8 月 28 日)

[6] 今野 哲雄 (シンポジウム演者)  
Assessment of myocardial fibrosis in  
hypertrophic cardiomyopathy:  
viewpoints from genetics and cardiac  
MRI

日本心筋症研究会 2016(兼 難治性疾患  
等政策研究事業班会議) (松本, 2016 年  
5 月 14 日)

[7] Tanaka Y, Konno T, Yoshida S, Tsuda  
T, Sakata K, Hayashi K, Furusho H,  
Takamura M, Yamagishi M.

The utility of T wave amplitude in lead  
aVR on the clinical diagnosis of  
cardiac sarcoidosis

American College of Cardiology,  
Scientific Sessions in 2016 (Chicago,  
U.S.A, 2016 年 4 月 2-4 日)

〔図書〕(計 1 件)

[1] 藤野 陽、今野 哲雄、林 研至、寺  
本 了太、山岸 正和

心筋症遺伝子のコホート研究

Heart View 第 20 巻 2 号 p76-81、2016  
年 メジカルビュー社 東京.

〔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

金沢大学循環病態内科学

<http://intmed2.w3.kanazawa-u.ac.jp/>

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

今野 哲雄 (KONNO, Tetsuo)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号 : 50377389

### (2)研究分担者

林 研至 (HAYASHI, Kenshi)

金沢大学・附属病院・助教

研究者番号 : 00422642

### (3) 研究分担者

小田 彰史 (ODA, Akifumi)

名城大学・薬学部・教授

研究者番号 : 50433511

### (4)研究連携者

脇本 博子 (WAKIMOTO, Hiroko)

ハーバード大学