

令和元年6月10日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K01385

研究課題名(和文)筋弾性蛋白質コネクチンの心臓におけるメカノセンサー機能解明

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanosensing function in heart by a muscle elastic protein connectin

研究代表者

花島 章 (Hanashima, Akira)

川崎医科大学・医学部・助教

研究者番号：70572981

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：心臓には力学的情報を感知してポンプ機能を最適化させるメカノセンサーが存在すると考えられ、心筋細胞に存在する弾性タンパク質コネクチンがその有力候補であるが、その仕組みは十分に解明されていない。本研究では、コネクチン弾性領域発現心筋細胞の構築、コネクチン弾性領域の比較生物学的解析、コネクチン弾性領域に結合するメカノトランスダクション関連蛋白質の探索を通じて、コネクチンがメカノセンサーとして機能する仕組みの解明を進め、心臓の力学動態を規定する構造機能とコネクチン弾性領域の長さに関連性があることなどを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

巨大弾性蛋白質コネクチンの変異は、拡張型心筋症などの様々な心疾患の主要な原因となっている。本研究によって、心臓の力学動態を規定する構造機能とコネクチン弾性領域の長さの関連性が示されたことは、コネクチン弾性領域の長さを適切に変化させ心疾患の病態の緩和を目指す新しい治療法開発につながる可能性を秘めている。また、心臓構造とコネクチンとの比較生理学的解析を通じて、各動物種それぞれの環境に最適化した心臓構造とコネクチン分子から構成されるシステムを明らかにしたことは、動物界の生体機能を模倣して利用するバイオメティクスの観点から、心不全など臨床的なフィードバックが視野に入る点で重要である。

研究成果の概要(英文)：The mechanosensor that senses mechanical information in the heart and optimizes the pump function is thought to exist, and the elastic protein Connectin present in cardiac muscle cells is a strong candidate, but its mechanism has not been fully elucidated. In this study, we investigated how connectin functions as a mechanosensor through construction of connectin elastic region expressing cardiomyocytes, comparative biological analysis of connectin elastic region, and search for mechanotransduction related proteins that bind to connectin elastic region. We found that there is a relationship between structural functions that define the dynamics of the heart and the length of the connectin elastic region.

研究分野：分子生理学

キーワード：コネクチン 心臓 メカノセンサー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

心臓は血液循環を通して全身への栄養や酸素を供給しており、血圧や血液拍出量など力学的環境に応じて、ポンプ機能を最適化させている。この適応機構には力学的情報を感知するメカノセンサーが必要である。弾性タンパク質コネクチンは心筋内微小機能単位である筋節の Z 線から M 線までを 1 分子で繋ぐ生体内最大のタンパク質あり、筋弛緩時に受動的張力を発生させ、筋節の構造を維持している。コネクチンの変異は拡張型心筋症などの心疾患を引き起こすことが報告され、その発症機序の解明が求められているが、コネクチンが直接的に力学的負荷を容受する特性より、これらの病態生理にはコネクチンを介したメカノトランスダクションが関与している可能性が高い。しかし、その全容は未解明である。

2. 研究の目的

心臓の力学的環境の変化を感知するメカノセンシングが、内部にバネ様の弾性領域をもつ巨大分子：筋弾性蛋白質コネクチンによって行われていることを明らかにすることで、心不全の病態解明や新しい心不全治療法開発に貢献することを目的とする。

3. 研究の方法

新規巨大蛋白導入法や生体工学的手法によるコネクチン分子の力学特性評価など学際的なアプローチによりコネクチンメカノセンシング機構を解明する。特に、一般的な生物学的研究手法である、組織染色、免疫蛍光顕微鏡観察、電子顕微鏡観察、タンパク質電気泳動、ウエスタンブロット、遺伝子構造解析、PCR、リアルタイム PCR、遺伝子クローニング法や、医学的な研究手法である心エコー解析等などとともに、単離心筋細胞解析、新規コネクチン結合タンパク質の探索と解析、バキュロウイルスを用いた哺乳類細胞におけるコネクチン弾性領域発現系の構築、光ピンセット顕微鏡による弾性測定、比較生理学的解析を通じたバイオメティクスの観点からの心不全など臨床的なフィードバック等の方法を用いて研究を行う。

4. 研究成果

(1) コネクチン弾性領域発現心筋細胞の構築

コネクチンメカノセンシング機能を解析するためのツールとして、コネクチンの最小アイソフォーム NovexIII をコードする DNA (16,000bp) を GFP 遺伝子の下流にクローニングし、改変バキュロウイルスベクターに導入し、単離心筋細胞に感染させる系を確立した (Hashimoto et al. 2018)。

(2) コネクチン弾性領域の比較生物学的解析

各動物の心臓や心筋とコネクチン構造との関係を比較生理学的に調べることで、コネクチンメカノセンシングに重要な保存された領域を明らかにするために、哺乳類・鳥類・爬虫類・両生類・魚類の心臓構造・心筋・心筋細胞・コネクチンの大きさ・コネクチン遺伝子の構造・心臓で発現しているコネクチンの配列等を調べた。特に、魚類ゼブラフィッシュのコネクチンアイソフォームを複数同定し、その弾性領域は哺乳類とは大きく異なることを明らかにした (Hanashima et al. 2017)。また、爬虫類のカメのコネクチン分子から心臓構造までを多階層的に解析し、カメの心臓は柔らかく伸展性が高く、コネクチン分子の弾性領域も長いことを明らかにした (Honda et al. 2018)。

(3) コネクチン弾性領域に結合するメカノトランスダクション関連タンパク質の探索

心筋の cDNA ライブラリーからコネクチンバネ領域に結合するメカノセンシング関連蛋白質の探索を行い、2つの候補を得た。これらの候補の心筋における機能解析については継続中である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

- 1) Hashimoto K, Kodama A, Sugino M, Yobimoto T, Honda T, **Hanashima A**, Ujihara Y, Mohri S. Nuclear connectin novex-3 promotes proliferation of hypoxic foetal cardiomyocytes. **Scientific Reports**. 17(8(1)) 12337 (2018). 査読有 DOI: 10.1038/s41598-018-30886-9
- 2) Honda T, Ujihara Y, **Hanashima A**, Hashimoto K, Tanemoto K, and Mohri S. Turtle spongy ventricles exhibit more compliant diastolic property and possess larger elastic regions of connectin in comparison to rat compact left ventricles. **Kawasaki Medical Journal**. 44: 1-17 (2018). 査読有 DOI: 10.11482/KMJ-E44(1)1
- 3) Hashimoto K, Kodama A, Honda T, **Hanashima A**, Ujihara Y, Murayama T, Nishimatsu SI, Mohri S. Fam64a is a novel cell cycle promoter of hypoxic fetal cardiomyocytes in mice. **Scientific Reports**. 7: 4486 (2017). 査読有 DOI: 10.1038/s41598-017-04823-1
- 4) **Hanashima A**, Hashimoto K, Ujihara Y, Honda T, Yobimoto T, Kodama A, Mohri S. Complete primary structure of the I-band region of connectin at which mechanical property is modulated in zebrafish heart and skeletal muscle. **Gene**. 596:19-26 (2017). 査読有 DOI: 10.1016/j.gene.2016.10.010

〔学会発表〕(計 32 件)

- 1) **Hanashima A**, Ujihara Y, Tada M, Iwasa M, Kodama A, Honda T, Hashimoto K, Mohri S. “Evolutional relationship between hearts and elastic protein connectins” 9th FAOPS congress. 2P-101. Kobe, Japan. March 30, 2019. (ポスター発表)
- 2) Ujihara Y, **Hanashima A**, Honda T, Kodama A, Hashimoto K, Mohri S. “Comparison of cardiomyocyte kinetics of rat left ventricle and turtle ventricle” 9th FAOPS congress. 2P-076. Kobe, Japan. March 30, 2019. (ポスター発表)
- 3) Hashimoto K, Kodama A, Sugino M, Yobimoto T, Honda T, **Hanashima A**, Ujihara Y, Mohri S. “Nuclear connectin novex-3 is essential for proliferation of hypoxic fetal cardiomyocytes” 9th FAOPS congress. 1P-071. Kobe, Japan. March 29, 2019. (ポスター発表)
- 4) **花島章**, 木村澄子「動物間における弾性タンパク質コネクチンの多様性」生体運動研究合同班会議 2019 2019年1月6日
- 5) 氏原嘉洋, **花島章**, 本田威, 橋本謙, 毛利聡「ラットとカメの心筋細胞のカルシウム動態と弾性タンパク質コネクチンの比較から探る心臓拡張機能の進化」日本機械学会第31回バイオエンジニアリング講演会 2018年12月14日
- 6) **花島章**, 氏原嘉洋, 岩佐真衣, 多田麻友子, 児玉彩, 本田威, 橋本謙, 毛利聡「軟骨魚類冠循環心臓とコネクチンの独自進化」日本動物学会第89回大会 2018年9月13日
- 7) **花島章**, 氏原嘉洋, 多田麻友子, 岩佐真衣, 児玉彩, 本田威, 橋本謙, 毛利聡「軟骨魚類心臓の構造と弾性蛋白質コネクチンの独自進化」日本進化学会第20回大会 2018年8月22日

- 8) **花島章**, 氏原嘉洋, 本田威, 多田麻友子, 岩佐真衣, 児玉彩, 橋本謙, 毛利聡「心室における筋弾性蛋白質コネクチンの脊椎動物種間比較と生理学・進化的意義」第4回日本筋学会学術大会 2018年8月10日
- 9) 橋本謙, 児玉彩, 杉野充希, 呼元知子, 本田威, **花島章**, 氏原嘉洋, 毛利聡「コネクチン novex-3 は低酸素下の胎児期心筋細胞の分裂を促進する」第57回日本生体医工学会大会 2018年6月19日
- 10) 氏原嘉洋, **花島章**, 本田威, 児玉彩, 橋本謙, 毛利聡「ラットとカメの心室心筋細胞の引張特性の比較」第57回日本生体医工学会大会 2018年6月19日
- 11) **花島章**, 橋本謙, 氏原嘉洋, 児玉彩, 呼元知子, 杉野充希, 毛利聡「Extension restriction of coronary circulation hearts by shortening of the elastic protein connectin」第57回日本生体医工学会大会 2018年6月19日
- 12) 氏原嘉洋, **花島章**, 本田威, 児玉彩, 橋本謙, 毛利聡「ラットの緻密心筋とカメのスポンジ状心筋の拡張性の比較」日本生理学会第94回大会、高松、2018年3月30日、(ポスター発表)
- 13) **花島章**, 橋本謙, 氏原嘉洋, 本田威, 児玉彩, 呼元知子, 杉野充希, 毛利聡「冠循環心臓におけるコネクチン弾性構造の短縮」日本生理学会第94回大会、高松、2018年3月29日、(ポスター発表)
- 14) 橋本謙, 児玉彩, 呼元知子, 杉野充希, **花島章**, 氏原嘉洋, 毛利聡「低酸素環境を起点とする多階層の心筋分裂・再生機構解析」日本生理学会第94回大会、高松、2018年3月28日、(ポスター発表)
- 15) **花島章**, 橋本謙, 氏原嘉洋, 毛利聡「コネクチンI帯弾性領域の構造と脊椎動物心臓進化」 「生体運動研究合同班会議2018」、東京、2018年1月6日、(口頭発表)
- 16) **花島章**, 橋本謙, 氏原嘉洋, 本田威, 児玉彩, 呼元知子, 杉野充希, 毛利聡「脊椎動物コネクチンの弾性構造決定による冠循環心臓の進化解明」日本動物学会第88回大会、富山、2017年9月23日、(ポスター発表)
- 17) **花島章**, 橋本謙, 氏原嘉洋, 本田威, 児玉彩, 呼元知子, 杉野充希, 毛利聡「脊椎動物心臓進化とコネクチン弾性構造」日本進化学会第19回大会、京都、2017年8月24日、(ポスター発表)
- 18) 本田威, 田村太志, **花島章**, 氏原嘉洋, 山澤隆彦, 古川博史, 橋本謙, 渡部芳子, 柚木靖弘, 田淵篤, 種本和雄, 毛利聡「伸びることを拒んできた私達哺乳類の心臓：心室拡張機能の進化的考察」第110回日本循環器学会中国・四国合同地方会、高知、2017年6月30日、(口頭発表)
- 19) **花島章**, 橋本謙, 氏原嘉洋, 本田威, 児玉彩, 呼元知子, 杉野充希, 毛利聡「冠循環の血流特性による心臓弾性蛋白質コネクチンの短縮」第40回日本バイオレオロジー学会年会、倉敷、2017年5月27日、(口頭発表)
- 20) 毛利聡, **花島章**, 氏原嘉洋, 橋本謙「脊椎動物の心臓進化：冠循環の血流特性と心臓メカニクスからの推測」日本生理学会第94回大会、浜松、2017年3月30日、(公募シンポジウム口頭発表)
- 21) 橋本謙, 児玉彩, 呼元知子, 本田威, **花島章**, 氏原嘉洋, 毛利聡「コネクチン novex-3 アイソフォームはマウスにおいて胎児心筋細胞の分裂を促進する」日本生理学会第94回大会、浜松、2017年3月28日、(ポスター発表)
- 22) **花島章**, 橋本謙, 氏原嘉洋, 本田威, 児玉彩, 毛利聡「脊椎動物の冠循環心臓及び非冠

循環心臓におけるコネクチン弾性構造の決定」日本生理学会第 94 回大会、浜松、2017 年 3 月 28 日、(ポスター発表)

- 23) **花島章**, 橋本謙, 氏原嘉洋, 本田威, 児玉彩, 毛利聡「コネクチンの弾性構造解析による脊椎動物心臓進化解明」『生体運動研究合同班会議 2017』、神戸、2017 年 1 月 8 日、(口頭発表)
- 24) 木村澄子, **花島章**, 山口真紀, 山澤徳志子, 大野哲生, 中原直哉, 田口美香, 竹森重「ウニのコネクチン様タンパク質の構造解析」『生物物理学会』、岡山、2016 年 11 月 27 日、(ポスター発表)
- 25) **Hanashima A**, Hashimoto K, Ujihara Y, Honda T, Yobimoto T, Kodama A, Mohri S. “Relationship between heart evolution and elastic structure of connectin in vertebrate” The 22nd International congress of zoology. #412. Okinawa, Japan. November 17, 2016. (ポスター発表)
- 26) 橋本謙, 本田威, **花島章**, 氏原嘉洋, 毛利聡「Fam64a は哺乳類出生時の心筋細胞分裂停止に関与する」『第 68 回日本生理学会中国四国地方会』、岡山、2016 年 11 月 6 日、(口頭発表)
- 27) 毛利聡, **花島章**, 本田威, 氏原嘉洋, 橋本謙「哺乳類と鳥類の心臓は独立して進化し、同じ形に辿り着いた：パネ分子コネクチンによる心室機械特性からの考察」『第 68 回日本生理学会中国四国地方会』、岡山、2016 年 11 月 6 日、(口頭発表)
- 28) **花島章**, 橋本謙, 氏原嘉洋, 本田威, 呼元知子, 児玉彩, 毛利聡「巨大弾性蛋白質コネクチンを指標とした脊椎動物心臓進化解析」『日本進化学会第 18 回大会』、東京、2016 年 8 月 25 日、(ポスター発表)
- 29) 毛利聡, **花島章**, 氏原嘉洋, 橋本謙「心筋パネ分子コネクチンによる肺呼吸脊椎動物における冠循環心臓進化の検討」『日本進化学会第 18 回大会』、東京、2016 年 8 月 25 日、(口頭発表)
- 30) **花島章**, 橋本謙, 氏原嘉洋, 本田威, 児玉彩, 呼元知子, 毛利聡「ゼブラフィッシュ横紋筋コネクチンの一次構造」『日本筋学会第 2 回学術集会』、東京、2016 年 8 月 5 日、(ポスター発表)
- 31) **花島章**, 橋本謙, 氏原嘉洋, 本田威, 呼元知子, 毛利聡「冠循環及び非冠循環心臓におけるコネクチンの弾性構造」『第 55 回日本生体医工学会大会』、富山、2016 年 4 月 28 日、(ポスター発表)
- 32) 橋本謙, 本田威, **花島章**, 氏原嘉洋, 毛利聡「Fam64a は低酸素によって誘導される哺乳類胎児心筋細胞の増殖に必須である」『第 55 回日本生体医工学会大会』、富山、2016 年 4 月 27 日、(ポスター発表)

[その他]

- 1) **Hanashima A**. Obituary: Sumiko Kimura 1947–2018. *Journal of Muscle Research and Cell Motility* 39: 149-151 (2018). 査読有・招待有 DOI: 10.1007/s10974-019-09506-0

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：毛利 聡

ローマ字氏名：(MOHRI Satoshi)

所属研究機関名：川崎医科大学
部局名：医学部
職名：教授
研究者番号（**8**桁）：**00294413**

研究分担者氏名：橋本 謙
ローマ字氏名：**(HASHIMOTO Ken)**
所属研究機関名：川崎医科大学
部局名：医学部
職名：講師
研究者番号（**8**桁）：**80341080**

研究分担者氏名：氏原 嘉洋
ローマ字氏名：**(UJIHARA Yoshihiro)**
所属研究機関名：名古屋工業大学
部局名：工学（系）研究科（研究院）
職名：准教授
研究者番号（**8**桁）：**80610021**

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。