

令和 2 年 5 月 15 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09571

研究課題名(和文)新規心臓特異的プロテインキナーゼが修飾する生理機能の解明

研究課題名(英文)The role of protein kinase N in cardiomyocyte

研究代表者

竹藤 幹人(TAKEFUJI, MIKITO)

名古屋大学・医学系研究科・助教

研究者番号：20709117

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)：心不全は心ポンプ機能が破綻する臨床症候群であり、予後不良の重要な健康課題である。低分子量GTP結合タンパク質RHOAは細胞遊走や細胞増殖を制御し、その標的分子であるRHOA関連タンパク質キナーゼ(ROCK)はタンパク質の病理学的なリン酸化を引き起こし、心血管疾患と深く関連することが報告されている。プロテインキナーゼN(PKN)の機能は不明な点が多く、心不全におけるPKNの役割を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、心筋特異的PKN1, PKN2欠損マウスが圧負荷やアンギオテンシンに促進された心臓機能障害に抵抗性を示すことを証明した。PKNが、MRTFAのリン酸化によりMRTFAとG-アクチンの結合を阻害し、SRFを介した心肥大・線維化関連遺伝子を活性化することが機序と考えられた。PKNはMRTFAのリン酸化によりアクチン結合を介在し、心臓肥大・線維化を制御していることが証明され、心不全の新たな病態の解明、治療標的になることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Heart failure is a complex syndrome that results from structural or functional impairment of ventricular filling or blood ejection. Protein phosphorylation is a major and essential intracellular mechanism that mediates various cellular processes in cardiomyocytes in response to extracellular and intracellular signals. We demonstrated that RHOA activates 2 members of the PKN family of proteins, PKN1 and PKN2, in cardiomyocytes of mice with cardiac dysfunction. Cardiomyocyte-specific deletion of the genes encoding Pkn1 and Pkn2 protected mice from pressure overload induced cardiac dysfunction. Furthermore, we identified MRTFA as a novel substrate of PKN1 and PKN2 and found that MRTFA phosphorylation by PKN was considerably more effective than that by ROCK in vitro. Our results indicate that PKN1 and PKN2 activation causes cardiac dysfunction and is involved in the transition to heart failure, thus providing unique targets for therapeutic intervention for heart failure.

研究分野：循環器内科

キーワード：心不全

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞内では遺伝子発現、分子間結合、糖・脂質代謝などによりシグナルが伝達され、生体の恒常性を維持している。分子間結合は主要な細胞内シグナル伝達であり、共有結合による分子間結合に加え、非共有結合による分子間相互作用は様々な生理機能を調節している。プロテインキナーゼによるタンパク質のリン酸化は非共有結合性のシグナル伝達の代表例であり、*in vitro* および *in vivo* 手法を用いて多様な生理現象との関連が報告されてきた。プロテインキナーゼはタンパク質をリン酸化し、タンパク質の構造・性質を大きく変化させ、タンパク質もしくはシグナル伝達経路全体を活性化もしくは不活性化させている。

何らかの原因によりプロテインキナーゼの酵素活性が低下し、タンパク質リン酸化のバランスが崩れると、正常な生理機能が抑制され、生体の恒常性維持が困難となる。反対に、過剰なリン酸化は、細胞内に病的なシグナルを生じさせ、過剰な細胞増殖や細胞収縮を引き起こし、悪性腫瘍や高血圧などの疾患を発症することが知られている。過剰なリン酸化は疾患発症に関与していることから、プロテインキナーゼは治療のターゲットとしても注目されている。悪性腫瘍が生じる消化管、肺、神経などの臓器ではプロテインキナーゼによるリン酸化について数多くの研究がされてきたが、心臓におけるプロテインキナーゼの役割は不明な点が多い。

2. 研究の目的

心不全は器質的もしくは機能的異常が生じて心ポンプ機能の代償機転が破綻してもたらされる臨床症候群である。近年、心血管疾患の治療は進歩してきているが、未だに心不全は予後不良の疾患である。

低分子量 GTP 結合タンパク質 RHOA は細胞遊走や細胞増殖を制御し、その標的分子である RHOA 関連タンパク質キナーゼ (ROCK / Rho キナーゼ) はタンパク質のリン酸化を引き起こし、心血管疾患と深く関連することが報告されている。プロテインキナーゼ N (PKN) は ROCK と同時期に RHOA の基質として報告されたが、その機能は不明な点が多い。本論文では、心不全における PKN の役割を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

Tamoxifen 誘導性心筋特異的 PKN1, PKN2 欠損 (*cmc-PKN1/2* DKO) マウスを作製し、大動脈弓部を結紮する圧負荷心不全モデル (TAC) を用いて、心不全時の PKN の役割を検討した。

心機能の評価を心エコー検査により行い、心筋肥大や心臓線維化については病理学的手法により検討した。

4. 研究成果

(1) マウス心筋細胞におけるアンジオテンシン II と圧負荷による PKN1 と PKN2 の活性化

心筋細胞における PKN の発現を検討するため、マウス心筋細胞から RNA を抽出し、qRT-PCR 法により PKN1 と PKN2 の発現を確認した。続いて単離したマウス心筋細胞に RHOA 活性化薬とアンジオテンシン II を加えると、PKN1・PKN2 のリン酸化亢進を認め、RHOA 阻害薬ではそのリン酸化が有意に抑制した。

RHOA を活性化させる G-protein である G12/13 を Tamoxifen 誘導性心筋特異的に欠損させたマウスに対し、大動脈弓部結紮する圧負荷心不全モデル (TAC) を作成すると、コントロールマウスでは PKN1 と PKN2 のリン酸化亢進を認め、G12/13 心筋特異的欠損マウスではそのリン酸化が有意に抑制された。

(2) 心筋特異的 PKN1/PKN2 欠損マウスによる圧負荷誘発性心臓機能障害の抑制

Tamoxifen 誘導性心筋特異的 PKN1, PKN2 欠損 (*cmc-PKN1/2* DKO) マウスを作製した。ウェスタンブロットにより、PKN1, PKN2 が欠損することを確認した。

コントロールマウスと *cmc-PKN1/2* DKO マウスに TAC を行い、4 週間後に評価した。コントロールマウスでは心重量の増加を認めたが、*cmc-PKN1/2* DKO マウスではその増加の抑制を認めた。

心臓エコー検査を用いて、心臓の左室収縮能を評価した。*cmc-PKN1/2* DKO マウスではコントロールマウスと比較し、TAC による心収縮能の低下や左室重量の増加が抑制された。続いて、心筋細胞の肥大と線維化を組織染色で評価した。TAC による心筋細胞の肥大と線維化を *cmc-PKN1/2* DKO マウスでは抑制していた。また血清 BNP の増加も有意に抑制していた。

さらに、TAC8 週後、12 週後についても評価し、心収縮能低下と心拡大が *cmc-PKN1/2* DKO マウスでは抑制された。

(3) PKN を介した MRTFA のリン酸化によるアクチン結合の抑制

PKN の活性化と心肥大・線維化の機序を明らかにするために、心不全関連遺伝子を制御する転写因子である serum response factor (SRF)、その共役因子である myocardin-related transcription factor A (MRTFA) に着目した。Myc タグ PKN キナーゼドメイン、ROCK キナーゼドメインを H9C2 細胞に発現させ、ルシフェラーゼアッセイを用いて SRF 活性を測定したところ、

その活性が増強した。アクチン重合が SRF の活性に関与しているという報告があるため、PKN、ROCK、RHOA がアクチン重合に及ぼす影響を評価した。H9C2 細胞に遺伝子導入し、F-アクチン/G-アクチン比を測定すると、ROCK、RHOA ではアクチン重合が促進されたが、PKN ではされなかったことから、PKN はアクチン重合を介さない SRF 活性を制御する事が示唆された。

In vitro の実験では MRTFA のアクチン結合部位である N 末に GST タグを付けたタンパク (GST-MRTFA-NT) を作成し、GST-PKN-cat, GST-ROCK-cat を添加すると GST-PKN-cat で有意にリン酸化され、また有意に MRTFA とアクチンの結合を抑制したことから、PKN は MRTFA をリン酸化することにより SRF の活性を制御することが示唆された。

(4) PKN による MRTFA のリン酸化部位

PKN によりリン酸化されるコンセンサス配列の結果から、MRTFA のアクチン結合部位である Thr26, Ser41, Ser51, Thr57, Ser67 がリン酸化の候補部位とした。同部位をアラニン置換した蛋白を用いて、生化学的手法によりリン酸化を評価したところ、Ser51, Thr57 のアラニン置換では PKN によるリン酸化が有意に低下していた (図 1)。

PKN による MRTFA の Ser51, Thr57 のリン酸化が MRTFA とアクチンの結合に及ぼす影響を評価するため、GST-MRTFA-NT WT と GST-MRTFA-NT 51/57A のタンパク質を精製し、in vitro でのアクチン結合実験を行った。その結果、GST-MRTFA-NT 51/57A では、PKN による MRTFA とアクチンの結合低下を抑制した。

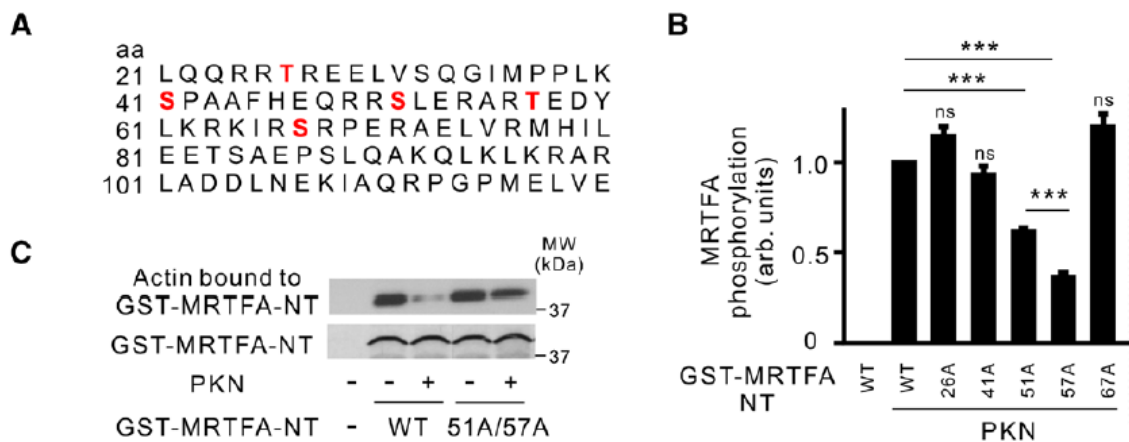


図 1 : MRTFA のリン酸化部位。論文②(Sakaguchi et al. Circulation 2019 年)より。

(5) In vitro, in vivo における PKN1 と PKN2 による MRTFA のリン酸化

PKN による MRTFA のリン酸化を評価するために、抗 pSer51 MRTFA リン酸化抗体と抗 pThr57 MRTFA リン酸化抗体を作成した。ウェスタンブロットにより、リン酸化の強さを評価し、GST-MRTFA-NT は PKN の容量依存性にリン酸化され、Ser51 と Thr57 いずれも PKN の方が ROCK より強くリン酸化された。

続いて in vivo での PKN による MRTFA のリン酸化を検討するために、TAC5 日後、マウスの心臓における MRTFA の Ser51 と Thr57 のリン酸化を調べた。TAC5 日後のコントロールマウスの心臓では、MRTFA Ser51 と Thr57 がリン酸化され、cmc-PKN1/2 DKO マウスではそのリン酸化が抑制されていた。

(6) 心筋特異的 PKN1/PKN2 欠損マウスによるアンギオテンシン II 誘発性心臓機能障害の抑制

他の心不全モデルを用いて PKN1 と PKN2 の役割を検討するため、アンギオテンシン II を介した MRTFA の Ser51, Thr57 のリン酸化を評価した。コントロールマウスより単離した心筋細胞ではアンギオテンシン II の刺激により MRTFA のリン酸化が亢進されたが、cmc-PKN1/2 DKO マウスから単離した心筋細胞ではアンギオテンシン II による MRTFA のリン酸化が抑制された。

次に、アンギオテンシン II 持続投与による心不全モデルでは、4 週間投与後に心機能評価を行った。コントロールマウスでは心重量の増加、エコーでの心収縮能の低下を認めたが、cmc-PKN1/2 DKO マウスではそれらの抑制を認めた。さらに、cmc-PKN1/2 DKO マウスではアンギオテンシン II により促進された心臓線維化の有意な抑制を認めた。

(7) PKN を介した遺伝子発現

PKN が SRF と標的遺伝子との結合を制御するかどうかを評価するために、cmc-PKN1/2wt/wt マウスと cmc-PKN1/2 DKO マウスの心臓に対して抗 MRTFA 抗体を用いたクロマチン免疫沈降を行った。MYH7, Nppa, Ctgf, Tgfb1 のプロモーターと MRTFA との結合は TAC5 日後において促進され、その結合は cmc-PKN1/2 DKO マウスにおいて抑制されていた。これらの結果から PKN の阻害は心

臓において MRTFA/SRF を介した遺伝子発現を抑制し、心臓機能障害を防ぐことが示唆された。

心筋特異的 PKN1, PKN2 欠損マウスが圧負荷やアンジオテンシン II に促進された心臓機能障害に抵抗性を示すことを証明した。これらは、低分子量 GTP 結合タンパク質 RHOA のエフェクタータンパクである PKN が、MRTFA のリン酸化により MRTFA と G-アクチンの結合を阻害し、SRF を介した心肥大・線維化関連遺伝子を活性化することが機序と考えられた (図 2)。PKN-MRTFA-SRF を介した遺伝子発現は心臓機能障害のシグナル伝達において重要な知見となり、PKN は心臓肥大・線維化の制御に重要な役割を果たし、心不全治療の新たな治療標的となり得ると考えられた。

PKN1/2 は MRTFA のリン酸化によりアクチン結合を介在し、心臓肥大・線維化を制御していることが証明され、心不全の新たな病態の解明、治療標的になることが示唆された。

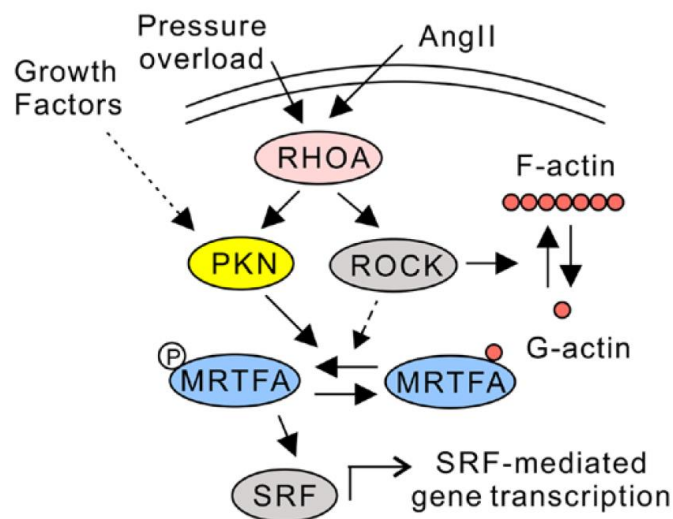


図 2 : 心筋内の PKN シグナルについて。論文②(Sakaguchi et al. Circulation 2019 年)より。

<引用文献>

①Amano M, Mukai H, Ono Y, Chihara K, Matsui T, Hamajima Y, Okawa K, Iwamatsu A, Kaibuchi K.
Identification of a putative target for Rho as the serine-threonine kinase protein kinase N.
Science. : 271 : 1996 年:648-50

②Olson EN, Nordheim A.
Linking actin dynamics and gene transcription to drive cellular motile functions.
Nat Rev Mol Cell Biol. :11: 2010 年: 353-365. doi: 10.1038/nrm2890

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tsuda T, Takefuji M, Wettschureck N, Kotani K, Morimoto R, Okumura T, Kaur H, Eguchi S, Sakaguchi T, Ishihama S, Kikuchi R, Unno K, Matsushita K, Ishikawa S, Offermanns S, Murohara T.	4. 巻 214
2. 論文標題 Corticotropin releasing hormone receptor 2 exacerbates chronic cardiac dysfunction.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 The Journal of Experimental Medicine	6. 最初と最後の頁 1877-1888
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1084/jem.20161924.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔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	天野 睦紀 (AMANO MUTSUKI) (90304170)	名古屋大学・医学系研究科・准教授 (13901)	