

令和元年6月27日現在

機関番号：34401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15583

研究課題名(和文) 心筋収縮調節因子PLNと相互作用するユビキチンリガーゼの同定および機能解析

研究課題名(英文) Identification and functional analysis of ubiquitin ligases that interact with PLN.

研究代表者

横江 俊一 (Yokoe, Shunichi)

大阪医科大学・医学部・助教

研究者番号：40454756

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト不全心筋では、ユビキチン化タンパク質の過剰な蓄積が認められ、心不全病態増悪の一因と考えられる。今回、心不全モデルマウスの心臓において、ユビキチンリガーゼであるvon Hippel-Lindau (VHL) の発現量が野生型マウスと比較して増加しており、また、VHLと心筋小胞体カルシウムポンプ(SERCA2a)の制御因子であるホスホランパン(PLN)の結合が顕著に増加していた。さらに、PLN発現HEK293細胞のVHL遺伝子をノックダウンしたところ、正常および酸化ストレス環境下において、PLNの発現量は増加した。以上より、VHLを標的とした新たな心不全治療戦略を構築できる可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

超高齢化の時代となり、心不全を始めとした心疾患への対策がますます求められている。今回、心臓の律動的な拍動に重要な働きを行なっている心筋収縮調節因子であるPLNに着目し、その分解に関与しているユビキチンリガーゼの探索を試みたところ、VHLがPLNのユビキチン化ならびに分解の一旦を担っていることを明らかにできた。そのため、将来的にVHLを標的とした心不全治療戦略を立てることが可能となり、心不全症状の改善や治療法の向上を目指す上でとても意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The E3 ubiquitin ligase, von Hippel-Lindau (VHL), regulates protein expression by polyubiquitination. Although the protein VHL (pVHL) was reported to be involved in the heart function, the underlying mechanism is unclear. Here, we show that pVHL was upregulated in hearts from two types of genetically dilated cardiomyopathy (DCM) mice models. In comparison with the wild-type mouse, both DCM mice models showed a significant reduction in the expression of phospholamban (PLN), a potent inhibitor of sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase, and enhanced interaction between pVHL and PLN. Furthermore, the co-transfection of VHL and PLN in HEK293 cells decreased PLN expression under oxidative stress, whereas knockdown of VHL increased PLN expression both under normal and oxidative stress conditions. Together, we propose that oxidative stress upregulates pVHL expression to induce PLN degradation in failing hearts.

研究分野：循環器病学

キーワード：ユビキチンリガーゼ 心不全

1. 研究開始当初の背景

「2015 年人口動態統計」によると、心疾患は日本における死因の第 2 位になっている。医療技術が目覚しく発展してきた現代においても、死亡者数・死亡率ともに一貫して増加し続けており、今後、超高齢化社会を迎えるにあたり、心不全を始めとした心疾患に対する効果的な予防・治療法の確立（創薬を含めて）が急務となっている。これまで心不全に関する研究は、カルシウムシグナリング異常に起因するものと、タンパク分解系の異常に起因するものの二つに大別され、それぞれについて多くの報告があるが、どちらかの異常だけで心不全が決定付けられ、予防や治療の標的に結びつくことはほとんど無かった。ところが申請者は最近、心臓のカルシウムシグナリング分子とタンパク質の分解に関与している分子の直接の結合を見出したことから、心不全発症機序や病態生理学的意義について新たな知見が得られると期待される。

2. 研究の目的

申請者はこれまで、心臓の律動的な拍動を担っている心筋小胞体カルシウムポンプ (Sarco(end)oplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase, SERCA2a)ならびにその調節因子であるホスホランパン (Phospholamban, PLN)の機能解析を行ってきており、最近、ポリユビキチン化の亢進した PLN がユビキチン-プロテアソーム分解系 (ubiquitin proteasome system, UPS) を介して分解されることを明らかにし、PLN が心不全で減少している原因であることを報告した。そのため、PLN をユビキチン化の標的としている E3 リガーゼが存在する可能性が示唆された。一方で、心臓が極度の血流量不足や栄養不足によって低酸素 (Hypoxia) 状態に陥ると、心臓血管系の機能に障害をきたすことは既知の事実であるが、通常 Hypoxia では、低酸素誘導因子 (Hypoxia Inducible Factor, HIF-1) とよばれる転写因子が誘導され、血管新生や細胞増殖などを活性化することで心機能を保とうとしている。HIF-1 は、von Hippel-Lindau (VHL) とよばれる E3 リガーゼによって負の制御を受けているが、興味深いことに、VHL を心臓特異的に欠損させたマウスでは、HIF-1 の蓄積による血管新生や細胞増殖の亢進以外に、心筋細胞の線維化や心収縮に必要な筋節 (サルコメア) の減少が見られ、著明な心肥大が起こることが報告されている (Li et al, Mol Cell Biol (11): 3790-3803, 2008) が、その機序は未だに不明である。そのため申請者は、VHL が HIF-1 以外に、心機能関連分子の制御に寄与している可能性に着目した。以上の背景を踏まえると、VHL は HIF-1 以外に PLN を標的としてその分解系の制御に寄与し、心機能の維持に重要である可能性が導かれた。その考えのもと、VHL が PLN と直接結合しているかどうかをまず観察するために、PLN を導入した HEK293 細胞を用いて VHL との共沈実験を行ったところ、VHL と PLN は直接結合していることが観察された。さらに興味深いことに、心不全モデルマウス (PLN^{R9C} 変異発現マウス、tgPLN^{R9C}) の心臓ホモジネートを用いた共沈実験において、野生型よりも顕著に結合が強まっていることが観察され、心不全との強い関連が示唆された。また申請者は以前、心臓の結合組織の構成成分の一つである Collagen I が VHL による部分的分解を受けていることを報告しており、本申請研究にて VHL が PLN 分解系にも寄与していることを明らかにできれば、VHL が心不全の予防・治療の標的因子としての重要性を示せると期待できる。

3. 研究の方法

心不全の重篤度によって VHL と PLN の結合、および PLN のユビキチン化がどの程度変動するのかを明らかにするために、ミトコンドリア膜電位を低下させる脱共役剤 (CCCP) や過酸化水素

(H₂O₂) を作用させた PLN 強発現 HEK293 細胞、ならびに遺伝学的背景の異なる二種類の心不全モデルマウス (PLN^{R9C} 変異発現マウス (tgPLN^{R9C})、Na⁺/H⁺交換輸送体発現マウス (tgNHE1)) の心臓切片やホモジネート、単離した心筋細胞を用いて共局在性や相互作用、PLN 発現レベルの変化、心収縮能等を検証する。

4 . 研究成果

CCCP処理したPLN強発現HEK293細胞では、VHLとPLNの抗体を用いた免疫沈降実験により両者の強い結合が観察され、その結合は、ROSスカベンジャーとして用いたN-アセチルシステイン (NAC) により減弱した。また、VHL遺伝子をsiRNAでノックダウンさせたPLN強発現HEK293細胞は、コントロールsiRNA群と比較してPLNの発現が増加し、H₂O₂処理による分解も抑制された。ユビキチン抗体とPLN抗体を用いて共沈実験を行ったところ、VHLノックダウン細胞ではPLNのユビキチン化が減少していたことから、VHLがPLNのユビキチン化ならびに分解に寄与していることが示唆された。一方、二種類の心不全モデルマウスの心臓では、ともにVHLの発現量が野生型マウスと比較して増加しており、さらに、VHLとPLNの結合も顕著に増加していることが観察された。重篤な心不全ではPLNの発現量が減少することが知られているが、その一因として、心不全で発現の増加してくるVHLがPLNを標的としてユビキチン化の亢進、ならびに分解促進の一端を担っていることが示唆された。

以上の結果より、心収縮能調節因子である PLN をユビキチン化しているユビキチンリガーゼの一つとして、新たに VHL の寄与を示すことができ、心不全症状を呈する場合には、PLN 分解系の亢進にも寄与していることを見出した。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Yokoe S, Asahi M, Phospholamban is downregulated by pVHL-mediated degradation through oxidative stress in failing heart. *Int J Mol Sci*, 査読有, 2017, 18(11), pii: E2232.

〔学会発表〕(計 4 件)

横江俊一 他、Phospholamban is degraded by VHL E3 ubiquitin ligase in failing hearts. WCP2018 KYOTO, 2018

横江俊一 他、Phospholamban is regulated by ubiquitin-proteasome system through interaction with the pVHL. *ConBio2017*, 2017

横江俊一 他、心筋収縮調節因子ホスホランバンは、pVHL により分解の制御を受けている、第 38 回日本循環制御医学会総会・学術集会、2017

横江俊一 他、Phospholamban is degraded via ubiquitin-proteasome pathway by pVHL in failing hearts. 第 90 回日本薬理学会年会、2017

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.osaka-med.ac.jp/deps/pha/index.htm>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

該当なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：友田 紀一郎

ローマ字氏名： (TOMODA, kiichiro)

研究協力者氏名：伊井 正明

ローマ字氏名： (II, masaaki)

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。