

平成 22 年 5 月 1 日現在

研究種目：基盤研究（B）
研究期間：2007～2010
課題番号：19390211
研究課題名（和文）強心作用に関する新しい分子機序の解明、病態との関連解析と新しい治療法への応用
研究課題名（New molecular mechanism for cardiotoxic action, its involvement in heart disease and application for therapy）
研究代表者
伊藤 正明（MASAAKI ITO）
三重大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：00223181

研究代表者の専門分野：循環器内科学
科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学
キーワード：心筋ミオシン、リン酸化、ミオシン軽鎖キナーゼ、ミオシンホスファターゼ、心不全

1. 研究計画の概要

心筋におけるミオシン軽鎖(RLC)リン酸化は、収縮のCa²⁺感受性を亢進させ強心作用に結びつくこと、リン酸化を触媒する酵素であるミオシン軽鎖キナーゼ(MLCK)の発現動態が心不全などの病態で変化することも報告されなど注目を集め、その制御が治療法としても応用できる可能性も考えられる。しかしながら心筋におけるRLCリン酸化に関して、リン酸化に関与する分子、そのin vivoをはじめとする機能、病態との関連など多くの不明な点が残されている。そこで、以下の3点を中心として検討し、心筋RLCリン酸化の心臓における機能、病態との関連を解明し、その制御が心不全などに対する新しい治療法になりうる否かを解析する。

(1)心筋ミオシン軽鎖に関与すると考えられる分子の同定とその生化学的性状解析

(2)心筋 RLC リン酸化レベルの in vivo での機能解析を目的として、リン酸化 RLC を脱リン酸化させるミオシンホスファターゼ(MP)や心筋型 MLCK の心筋特異的トランスジェニックマウスの作成とそのフェノタイプ解析

(3)心不全などの病態、心負荷をあたえる in vivo でのアゴニスト刺激などにおける、心臓の RLC リン酸化レベルとその心臓の形態、機能との関連を解析

2. 研究の進捗状況

(1)心筋 RLC のリン酸化を触媒する酵素として、平滑筋型 MLCK と最近発見された心

筋型 MLCK の 2 分子が考えられる。心筋型 MLCK はバキュロウイルスを用いたリコンビナント蛋白、平滑筋型 MLCK は鶏砂囊よりの精製蛋白質を用いて、心筋 RLC のリン酸化部位、その親和性や、最大反応速度など酵素学的性状を解析した。また培養心筋細胞を用いて、siRNA による心筋型および平滑筋型 MLCK を各々ノックダウンした際の種々のアゴニスト刺激における RLC リン酸化レベルを解析して、各々の MLCK の RLC リン酸化への関連を現在検討中である。

(2)MP のトランスジェニックマウスでは、心筋 RLC のリン酸化レベル低下、心室腔の拡大、心収縮ならびに拡張能の低下をきたし、RLC のリン酸化レベルが心機能維持にとって重要であることが明らかとなった。心筋型 MLCK のトランスジェニックマウスは複数系統作成できたが、MLCK 蛋白の心筋特異的発現は見られるものの活性を検出することができず、活性のある MLCK のトランスジェニックマウスは作成に成功することができなかった。今後は、心筋型 MLCK のノックアウトマウスあるいはその発現が少ないマウス種などのスクリーニングを行い、MLCK 発現が抑制された場合の心機能、病態との関連につき検討を進める予定である。

(3)心不全モデルおよびフェニレフリン負荷ラットにおける心筋 RLC リン酸化レベル、心筋型および平滑筋型 MLCK の発現動態につき検討を行っている。

3. 現在までの達成度

②

研究(2)において MLCK トランスジェニックマウスの作成ができなかったため、計画の変更が必要になり、この点で計画がやや遅れている。また計画(3)の心不全モデルなどでの検討も大学院生のマンパワーの減少により解析が少し遅れている。

4. 今後の研究の推進方策

(2)心筋型 MLCK のノックアウトマウスあるいはその低下したマウスを用いて、心筋型 MLCK の発現が低下した場合の *in vivo* での心筋 MLCK の機能を解析する方向で研究を進める。
(3)心筋型 MLCK の発現誘導をおこなうアゴニストのスクリーニングを終えており、現在ミニポンプによるこれらアゴニスト刺激における *in vivo* での心筋 MLCK の発現動態、RLC リン酸化レベル、心臓の形態・機能の変化などについて解析を進める予定である。

5. 代表的な研究成果

(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 5 件)

- ① Mizutani H., Okamoto R., Moriki N., Konishi K., Taniguchi M., Fujita S., Dohi K., Onishi K., Suzuki N., Satoh S., Makino N., Itoh T., Hartshorne D. J., Ito M. Overexpression of myosin phosphatase reduced Ca^{2+} sensitivity of contraction and impairs cardiac function. *Circ J.* 74, 120-128, 2010 (査読あり)
- ② Kato S., Onishi K., Yamanaka T., Dohi K., Yamada N., Wada H., Ito M. Exaggerated hypertensive response to exercise in patients with diastolic heart failure. *Hypertens. Res.* 31, 679-684, 2008 (査読あり)
- ③ Yamashiro S., Yamakita Y., Totsukawa G., Goto H., Kaibuchi K., Ito M., Hartshorne D. J., Matsumura F. Myosin phosphatase targeting subunit regulates mitosis by antagonizing polo-like kinase1. *Developmental Cell* 14, 787-794, 2008 (査読あり)
- ④ Dohi K., Onishi K., Gorcsan III J., López-Candales A., Takamura T., Ota S., Yamada N., Ito M. Role of adial strain and displacement imaging to quantify wall motion dyssynchrony in patients with left ventricular mechanical dyssynchrony and chronic right ventricular pressure overload. *Am J. Cardiol.* 102, 1206-1212, 2008 (査読あり)
- ⑤ Kurita T., Onishi K., Dohi K., Tanabe M., Fujimoto N., Tanigawa T., Setsuda M., Isaka N., Nobori T., Ito M. Impact of heart rate on mechanical dyssynchrony

and left ventricular contractility in patients with heart failure and normal QRS duration. *Eur. J. Heart Fail.* 9, 637-643, 2007 (査読あり)

[学会発表] (計 2 件)

- ① 小西克尚、岡本隆二、藤田聡、谷口正弥、伊藤正明。ラット高血圧自然発症モデルに対する種々の降圧薬の効果とミオシン軽鎖リン酸レベルの変化とその機序に関する検討、第 39 回日本心臓血管作動物質学会、2010 年 2 月 5 日、名古屋
- ② 水谷英夫、森木宣行、岡本隆二、井阪直樹、中野起、伊藤正明、大西勝也、鈴木昇、佐藤真司、牧野直樹、David J. Hartshorne。心筋ミオシンホスファターゼの分子性状とその機能、第 37 回日本心臓血管作動物質学会、2008 年 2 月 2 日、仙台