

機関番号：24303

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590863

研究課題名（和文） 心不全、不整脈に関与する筋特異的遺伝子 MURC の結合蛋白質の同定とその機能の解析

研究課題名（英文） Identification and characterization of proteins bound to MURC which is involved in cardiac dysfunction and arrhythmia

研究代表者

上山 知己 (UEYAMA TOMOMI)

京都府立医科大学・医学研究科・講師

研究者番号：80379388

研究成果の概要(和文)：MURCがカベオラに局在しcaveolin-3やPTRF/cavin-1、SDPR/cavin-2、SRBC/cavin-3とMURCが結合することを見出した。さらに、MURCを培養心筋細胞に過剰発現させるとカベオラのサイズが大きくなり、心臓特異的にMURCを発現するトランスジェニックマウス(Tg-MURC)ではカベオラの形態に異常がみられることを示した。

研究成果の概要(英文)：We found that MURC was localized to caveolae at the plasma membrane of cardiomyocytes, and that MURC was associated with caveolin-3, PTRF/cavin-1, SDPR/cavin-2, and SRBC/cavin-3. We also found that overexpression of MURC in cardiomyocytes induced distension of caveolae and transgenic mice expressing MURC in the heart exhibited deformation of caveolae in cardiomyocytes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

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：心不全、不整脈、筋特異的遺伝子、結合蛋白質、MURC

## 1. 研究開始当初の背景

(1). 我々は、心不全発症の分子機構に未だ知られていない遺伝子が関与している可能性を考え、心臓に発現している遺伝子の網羅的な探索を行い、心臓、骨格筋、血管平滑筋にのみ発現している筋細胞特異的遺伝子MURCを単離・同定した。

(2). MURCの心肥大・心不全への関与を検討するため、マウスの大動脈縮搾による圧負荷肥大心を作製し、MURCの発現の変化を検討したところ、肥大心においてMURCの発現が亢進しており、心臓特異的に

MURCを過剰発現するトランスジェニックマウス(Tg-MURC)を作製したところ、Tg-MURCの心臓では間質の線維化の亢進を認め、心エコー検査により心収縮能の低下を認めた。さらに、Tg-MURCでは心電図上PR間隔の延長を認め、心房細動や完全房室ブロックを呈するマウスが存在することを確認している。

## 2. 研究の目的

上記の結果より、MURCが心不全や不整脈に関与していると考えられるが、その分子機序は明らかでない。そこで、本研究

では MURC による心不全や不整脈発症の分子機構を解明するために以下の実験計画により、MURC と結合する蛋白質を同定し、その機能を解析したいと考えている。

### 3. 研究の方法

- (1). MURC と結合する蛋白質を、yeast two-hybrid 法、質量分析法、免疫沈降法を用い同定・単離する。
- (2). MURC 結合蛋白質の細胞内局在を検討する。
- (3). MURC 結合蛋白質の機能を解析する。

### 4. 研究成果

- (1). yeast two-hybrid 法を用い、MURC と結合する候補として SDPR/cavin-2 を得た。そして、免疫沈降法にて SDPR/cavin-2 が MURC と結合することを確認した (図 1 A)。また、心筋細胞を用いた免疫染色にて MURC と SDPR/cavin-2 が共局在することを示した (図 1 B)。

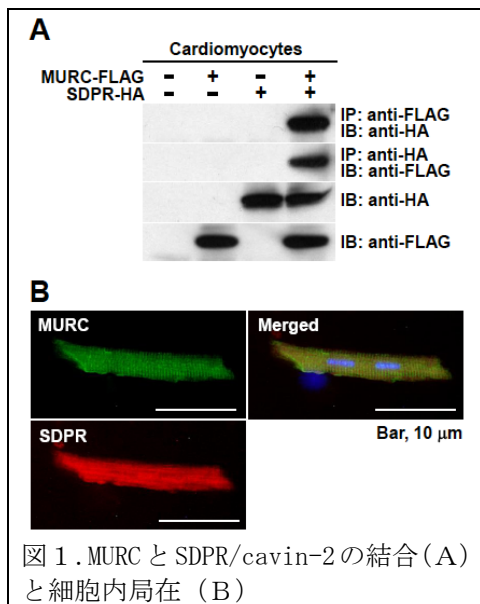


図 1. MURC と SDPR/cavin-2 の結合 (A) と細胞内局在 (B)

- (2). MURC は心筋細胞において心房性ナトリウム利尿ペプチド (ANP) の発現を誘導するが、SDPR/cavin-2 が MURC による ANP プロモーター活性化作用を増強させ (図 2 A)、SDPR/cavin-2 を knockdown すると、MURC による ANP プロモーター活性化は抑制された (図 2 B)。この結果より、MURC が SDPR/cavin-2 と協調して、ANP の発現に作用していることが示唆された。

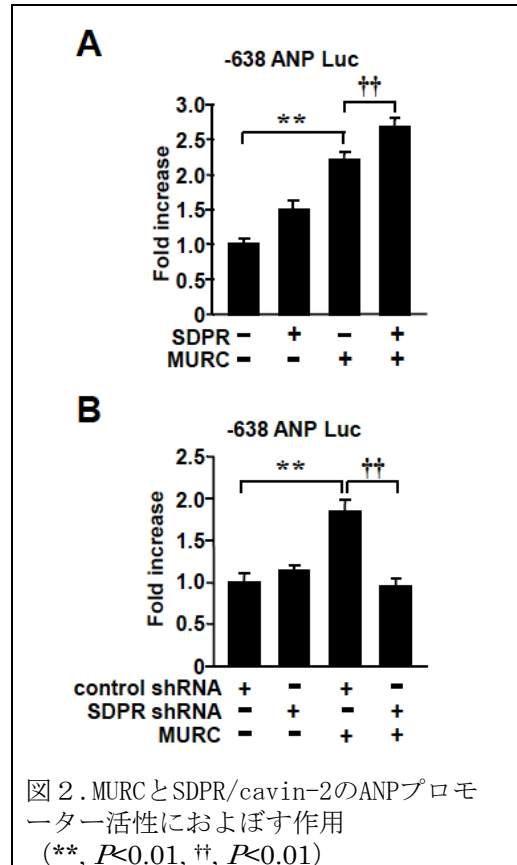


図 2. MURC と SDPR/cavin-2 の ANP プロモーター活性におよぼす作用 (\*\*,  $P < 0.01$ , ††,  $P < 0.01$ )

- (3). 質量分析法を用い、PTRF/cavin-1 を MURC と結合する候補蛋白質として同定し、免疫沈降法を用い、PTRF/cavin-1 が MURC と結合することを確認した。
- (4). PTRF/cavin-1 と SDPR/cavin-2 はカベオラに局在する蛋白質であることより、カベオラ関連蛋白質である caveolin-3 や SRBC/cavin-3 との MURC との結合を検討したところ caveolin-3 や SRBC/cavin-3 とともに MURC は結合することを見出した。
- (5). MURC は caveolin-3 や PTRF/cavin-1、SDPR/cavin-2、SRBC/cavin-3 と共局在することより、心筋細胞の細胞膜、特にカベオラに局在することが明らかとなった。
- (6). MURC のカベオラでの作用を検討するために、培養心筋細胞に過剰発現させたところ、カベオラのサイズが大きくなり、また、心臓特異的に MURC を発現するトランスジェニックマウス (Tg-MURC) ではカベオラの形態に異常が生じることを見出した。

## 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7件)

1. Isodono K, Takahashi T, Imoto H, Nakanishi N, Ogata T, Asada S, Adachi A, Ueyama T, Oh H, Matsubara H. PARM-1 is an endoplasmic reticulum molecule involved in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in rat cardiac myocytes. PLoS ONE. 査読有 2010; 5: e9746.
2. Satomi-Kobayashi S, Ueyama T, Mueller S, Toh R, Masano T, Sakoda T, Rikitake Y, Miyoshi J, Matsubara H, Oh H, Kawashima S, Hirata K, Takai Y. Deficiency of nectin-2 leads to cardiac fibrosis and dysfunction under chronic pressure overload. Hypertension. 査読有 54: 825-831, 2009.
3. Tanaka H, Ishida T, Johnston TP, Yasuda T, Ueyama T, Kojima Y, Kundu RK, Quertermous T, Ishikawa Y, Hirata K. Role of endothelial lipase in plasma HDL levels in a murine model of hypertriglyceridemia. J Atheroscler Thromb. 査読有 16: 327-338, 2009.
4. Nomura T, Ueyama T, Ashihara E, Tateishi K, Asada S, Nakajima N, Isodono K, Takahashi T, Matsubara H, Oh H. Skeletal muscle-derived progenitors capable of differentiating into cardiomyocytes proliferate through myostatin-independent TGF- $\beta$  family signaling. Biochem Biophys Res Commun. 査読有 365: 863-869, 2008
5. Ogata T, Ueyama T, Isodono K, Tagawa M, Takehara N, Kawashima T, Takahashi T, Harada K, Shioi T, Matsubara H, Oh H. MURC, a muscle-restricted coiled-coil protein that modulates the Rho/ROCK pathway, induces cardiac dysfunction and conduction disturbance. Mol Cell Biol. 査読有 28: 3424-3436, 2008
6. Tagawa M, Ueyama T, Ogata T, Takehara N, Nakajima N, Isodono K, Asada S, Takahashi T, Matsubara H, Oh H. MURC, a muscle-restricted coiled-coil protein, is involved in the regulation of skeletal myogenesis. Am J Physiol - Cell Physiol. 査読有 295: C490-C498, 2008
7. Takehara N, Tsutsumi Y, Tateishi K,

Ogata T, Tanaka H, Ueyama T, Takahashi T, Takamatsu T, Fukushima M, Komeda M, Yamagishi M, Yaku H, Tabata Y, Matsubara H, Oh H. Controlled delivery of basic fibroblast growth factor promotes human cardiosphere-derived cell engraftment to enhance cardiac repair for chronic myocardial infarction. J Am Coll Cardiol. 査読有 52: 1858-1865, 2008

[学会発表] (計11件)

1. Naito D, Ogata T, Amano K, Taniguchi T, Isodono K, Adachi A, Imoto H, Nakanishi N, Kangawa H, Takahashi T, Ueyama T, Matsubara H. MURC induces cardiomyocyte hypertrophy through the extracellular signal-regulated kinase pathway. International Symposium on Cardiovascular Endocrinology and Metabolism 2010 Mar 31-Apr 1, Nara, Japan
2. Taniguchi T, Ogata T, Naito D, Nakanishi N, Miyagawa K, Amano K, Isodono K, Imoto H, Tagawa M, Takehara N, Asada S, Adachi A, Morimoto T, Takahashi T, Oh H, Ueyama T, Matsubara H. MURC, muscle-restricted coiled-coil protein, regulates caveolae morphology and induces hypertrophy in cardiomyocytes. American Heart Association (米国心臓病学会) 2010 Nov 13-17, Chicago, USA
3. Adachi A, Takahashi T, Imoto H, Nakanishi N, Kangawa H, Ueyama T, Matsubara H. NFAT5 is essential for mesodermal and cardiomyogenic differentiation through regulating the canonical pathway. 第74回日本循環器学会総会 2010年3月 京都
4. Imoto H, Takahashi T, Adachi A, Nakanishi N, Kangawa H, Ueyama T, Matsubara H. Serglycin, a novel adipokine highly expressed in epicardial adipose tissue. 第74回日本循環器学会総会 2010年3月 京都
5. Isodono K, Takahashi T, Imoto H, Nakanishi N, Ogata T, Asada S, Adachi A, Kangawa H, Ueyama T, Matsubara H. PARM-1, a novel transmembrane molecule involved in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in rat cardiac myocytes. 第74回日本循環器学会総会 2010年3月 京都
6. 林由起子、松田知栄、小川恵、上山知己、小形岳寛、天野克也、松原弘明、榎中征哉、西野一三. PTRF欠損症の臨床病態

- に関する研究. 第 51 回日本神経学会総会 2010 年 5 月 東京
7. 中西直彦、小形岳寛、宮川浩太郎、内藤大督、谷口琢也、天野克也、上山知己、松原弘明. Cavin familyとしてのMURCの役割およびMURCの心筋疾患に及ぼす影響とメカニズムの検討. 第 33 回日本高血圧学会総会 2010 年 10 月 福岡
  8. Asada S, Takahashi T, Isodono K, Imoto H, Adachi A, Ogata T, Ueyama T, Matsubara H, Oh H. Downregulation of Dicer Expression by Serum Withdrawal Sensitizes Human Endothelial Cells to Apoptosis. 第 73 回日本循環器学会総会 2009 年 3 月 大阪
  9. Ogata T, Ueyama T, Isodono K, Imoto H, Tagawa M, Takehara N, Asada S, Adachi A, Takahashi T, Matsubara Hiroaki, Oh H. MURC, a muscle-restricted coiled-coil protein, induces cardiomyocyte hypertrophy through the extracellular signal-regulated kinase pathway. American Heart Association Basic Cardiovascular Sciences Conference 2008 Jul 28-31, Keystone, USA
  10. Ogata T, Ueyama T, Isodono K, Tagawa M, Takehara N, Kawashima T, Shioi T, Takahashi T, Matsubara Hiroaki, Oh H. A novel muscle-restricted coiled-coil protein, MURC, induces cardiac dysfunction accompanied with an altered gene expression profile. 第 72 回日本循環器学会 2008 年 3 月 福岡
  11. Tagawa M, Ueyama T, Ogata T, Nakajima N, Isodono K, Asada S, Takehara N, Takahashi T, Matsubara Hiroaki, Oh H. A novel but evolutionarily conserved muscle-restricted coiled-coil protein, MURC, regulates myogenic differentiation in C2C12 cells. 第 72 回日本循環器学会 2008 年 3 月 福岡

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

上山 知己 (TOMOMI UEYAMA)

京都府立医科大学・医学研究科・講師

研究者番号：80379388