

平成22年6月10日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20790174

研究課題名（和文） 心室筋細胞におけるT管の構造・機能を司る分子群の解析

研究課題名（英文） Analysis of molecules related to structure and function of T-tubule in cardiac myocytes

研究代表者

中田 勉 (NAKADA TSUTOMU)

信州大学・医学部・助教

研究者番号：70452141

研究成果の概要（和文）：心室筋および骨格筋は、Transverse tubule (T管)と呼ばれる細胞膜が陥入した特徴的な構造を持つ。心筋細胞のT管形成・維持に関与する分子を探索し、候補分子としてPacsin3に注目した。Pacsin3の機能を明らかにするために変異体を作製し解析を行った結果、Pacsin3のC末端を欠損した変異体は、チューブリンと共局在し、微小管の形態を変化させることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：Transverse-tubule (T-tubule) is invagination of plasma membrane, only found in ventricular and skeletal myocytes, and have important role for excitation and contraction coupling. To identify molecules involved in formation and maintain of T-tubule structure in cardiac myocyte, mRNA expression of candidate genes were determined by Northern blotting. Among the genes tested, Pacsin3, a member of F-BAR protein family, was highly expressed in adult ventricular myocyte. To reveal the functions of Pacsin3, several deletion mutants was transiently transfected in COS7 cell. C-terminal deletion mutant of Pacsin3 was co-localized with alpha-tubulin, and changed form of microtubule network.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生理学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：T管, 循環器, 心筋

1. 研究開始当初の背景

T管は心室筋及び骨格筋細胞に見られる細胞膜がチューブ状に陥入した構造であり、こ

の構造上にはL型Ca²⁺チャネル、Na⁺-Ca²⁺交換機構などが存在することが知られている。またT管の先端の近傍にはリアノジン受容体を有する筋小胞体が存在する。これらのCa²⁺

代謝装置が協調して働くことにより、迅速に細胞膜の興奮が細胞内に伝播され、心室筋の興奮収縮連関をすばやく一様に起こすことが可能となる。T管は胎生期及び新生児期の心室筋細胞には存在しないが、生後数週間の内に急速に形成される。一方で心肥大や心不全などの病的条件下でT管構造が乱れることも報告されている。このように心室筋細胞のT管は生理学的に非常に重要な役割を担っているが、その形成・維持に関する分子機構は全く分かっていない。

近年になり、BARドメインと呼ばれる領域を持つタンパク質ファミリーが同定された。このドメインを持つタンパク質を細胞に強制発現させると、細胞内に管状の構造が形成される。これらのタンパク質の多くはWASPファミリーと呼ばれる分子群を介して、アクチンの重合を促進させ細胞形態を変化させることが知られている。BARドメインタンパク質についてのこれまでの報告は、エンドサイトーシスなどの膜輸送に関するものがほとんどであり、心筋細胞での役割については全く知られていない。しかし細胞膜を陥入させるという特異な活性から、これらの分子の相互作用がT管形成・維持に重要な役割を果たす可能性は極めて高いと考えられる。また、上で述べた様々なイオン輸送体のT管への局在についても、これらのタンパク質による足場形成が関係していることが予想される。

2. 研究の目的

本研究の目的は心筋細胞のT管(Transverse tubule)形成・維持の分子基盤を明らかにすることにある。T管は心室筋・骨格筋細胞に見られる、細胞膜がチューブ状に陥入した構造であり、心室筋の興奮収縮連関を正確かつ効率的に引き起こすのに必要不可欠な構造である。骨格筋のT管形成に関わる可能性の高い分子として、BARドメインタンパク質ファミリーであるAmphiphysin 2が同定されている。Amphiphysin 2を培養細胞に強制発現させると、細胞膜が管状に陥入すること、骨格筋のT管に局在することなどから、同分子が骨格筋のT管形成に重要な役割を果たすこと示唆されている。これまでの検討により、Amphiphysin 2は心筋にも発現が見られるが、これは骨格筋に発現するものと異なるアイソフォームであることが明らかしている。この心筋型Amphiphysin 2はリン脂質に結合するドメインを欠いているため、COS7細胞に強制発現させても管状構造を形成することができない。この結果から、心筋のT管形成にはAmphiphysin 2以外のBARドメインタンパク質が関与することを予想した。本研究では、心筋に発現するBARドメインタンパク質ファ

ミリーおよびに着目し、T管構造の形成、機能維持についての分子基盤明らかにしていく。本研究により得られる知見は、心臓の生理・病態生理の解明のみならず、再生医療や創薬にも多いに貢献できると考えられる。

3. 研究の方法

(1) 心室筋に発現するBARドメインタンパク質の特定

心室筋におけるT管の形成・維持に関わる分子を探索するために、ノーザンブロッティング法によりBARドメインタンパク質について網羅的に発現量を調べた。ゲノム上に存在する既知のBARドメインタンパク質62種類の部分cDNA配列をRT-PCR法により単離しプローブとした。ラットの骨格筋、心房筋、心室筋からそれぞれRNAを単離し、アガロースゲル電気泳動後、メンブレンにブロッティングした。その後、³²Pによってラベルした各プローブをハイブリダイズさせ、シグナルを検出した。ノーザンブロッティングの結果から得られた候補分子については、RT-PCR法によって全長cDNAを単離し、pEGFP-C1ベクターにサブクローニングした。

(2) Pacsin3変異体の解析

ラット心筋よりRT-PCR法によりPacsin3の全長cDNAを単離した。単離した遺伝子はインフレームになるようにpEGFP-C1ベクターにサブクローニングした。各種欠失変異体はsite-directed mutagenesisにより終止コドン挿入することで作製した。

各遺伝子をリポフェクション法によりCOS7細胞に導入し、48時間培養後、抗Pacsin3抗体による免疫染色を行った。細胞膜の染色にはdi-8-ANEPPSを用いた。細胞骨格系タンパク質の染色には、ファロイジン、抗ビメンチン抗体、抗チューブリン抗体、抗ケラチン抗体を用いた。観察には共焦点レーザー顕微鏡を用いた。

(3) 心室筋細胞の免疫染色

ラット心臓を摘出し、逆行性に還流シランゲンドルフ心とした。その後、コラゲナーゼ処理によって細胞を単離し、免疫染色を行った。観察には共焦点レーザー顕微鏡を用いた。

4. 研究成果

(1) 心室筋に発現するBARドメインタンパク質の特定

ゲノム上に存在するBARドメインタンパク質について、心房筋、心室筋、骨格筋における発現量をノーザンブロッティング法により比較した。その結果、Endophilin A2, Endophilin B1, GRAF2, ARHGAP26, Pacsin2, Pacsin3, SNX30などが心室筋で比較的高い発現を示すことが明らかになった。しかし、心

室筋特異的に発現する分子は確認出来なかった。

骨格筋のT管形成に関わる分子として知られる Amphiphysin 2 を培養細胞に強制発現すると、細胞膜が管状に陥入することが知られている。そこで、心室筋に発現するこれらの遺伝子の全長 cDNA を RT-PCR 法により単離し、GFP 融合タンパク質として COS7 細胞にトランスフェクションした。しかし、これらの分子による細胞膜の変化は、Amphiphysin 2 を導入した細胞と比べて軽微なものであった。

(2) Pacsin3 変異体の解析

今回単離した分子の中で、心室筋における発現量が比較的高いものは Pacsin3 であったため、同分子について解析を進めた。Amphiphysin 2 などの BAR ドメインタンパク質の多くは、分子内に SH3 ドメインを持ち、この領域が活性の調節に重要であると考えられている。Pacsin3 も C 末端に SH3 ドメインを持つ。そこで、この領域を中心とした変異体を作製し、COS7 細胞に強制発現させ細胞の形態変化を観察した (図 1)。

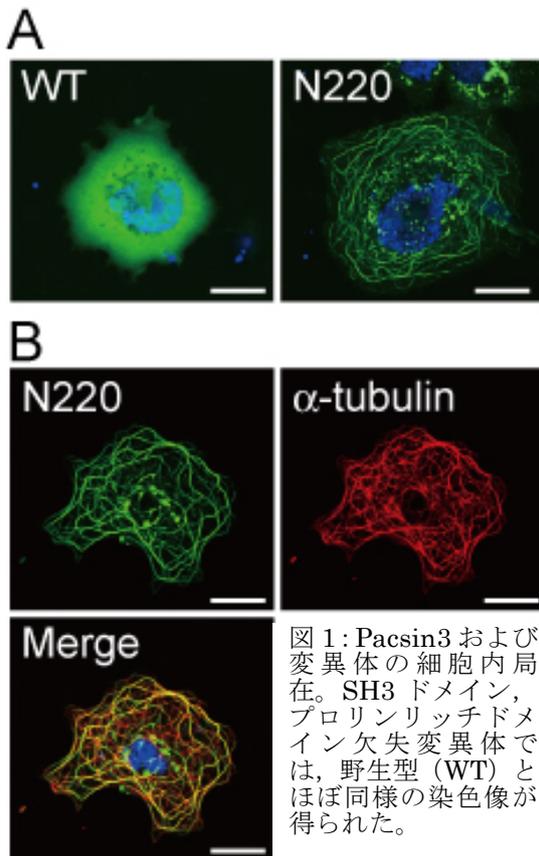


図 1: Pacsin3 および変異体の細胞内局在。SH3 ドメイン、プロリンリッチドメイン欠失変異体では、野生型 (WT) とほぼ同様の染色像が得られた。

初めに野生型 Pacsin3, SH3 ドメイン, プロリンリッチドメインを欠損した変異体について検討した結果、これらの分子は主に細胞質に局在していた (図 1A)。更に、N 末端から 220 アミノ酸以降を欠損させた変異体 (Pacsin3 N220) を解析した結果、細胞質内

に管状の構造物が観察された。この構造物は Amphiphysin 2 による細胞膜の陥入による管とは形態が異なり、核を円周状に取り囲む形状であった。また、この構造物は細胞膜染色色素である di-8-ANEPPS では染色されなかった。その形状から、この管状構造物が細胞骨格系に関係していることが予想されたため、ファロイジンおよび各種抗体 (抗ビメンチン抗体, 抗チューブリン抗体, 抗ケラチン抗体) との二重染色を行った。その結果、この管状構造物が抗チューブリン抗体で染色される微小管であることが明らかになった (図 1B)。

(3) 心室筋細胞の免疫染色

Pacsin3 の心室筋細胞内での局在を明らかにするために、免疫染色を行った (図 2)。その結果 Pacsin3 は一部で微小管と共局在することが明らかになった。また、T 管上にもシグナルが観察された。

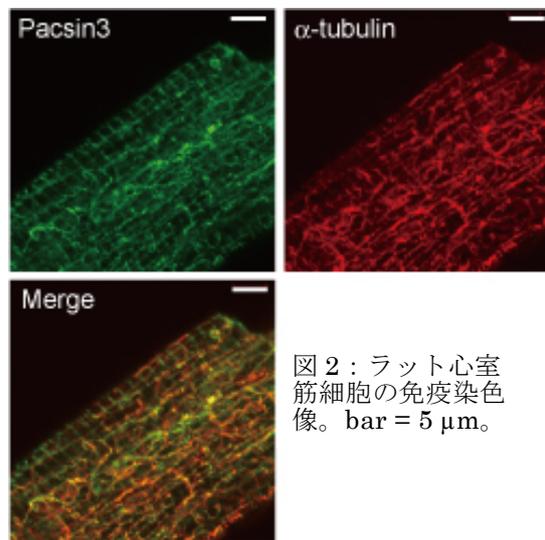


図 2: ラット心室筋細胞の免疫染色像。bar = 5 μ m。

(4) 考察

本研究では、心室筋細胞の T 管ネットワークの形成・維持に関わる分子の探索を行った。今回の検討では、心室筋特異的に発現する BAR ドメインタンパク質は確認出来なかったが、数種類の遺伝子が骨格筋、心房筋と共通して発現していることが明らかになった。その中でも、Pacsin3 は比較的多く発現していた。免疫染色の結果、Pacsin3 は心室筋細胞内で微小管と T 管の両方に局在が観察された。また Pacsin3 の C 末端領域を欠損した変異体が、微小管のみに共局在し、その形態を変化させることが明らかになった。T 管と微小管の関連については明確ではないが、Pacsin3 が双方の形態維持に関与する可能性もあり、現在より詳細な解析を進めている。

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 9 件)

① Hirose M, Yano S, Nakada T, Horiuchi-Hirose M, Tsujino N, Yamada M. Nicorandil ameliorates impulse conduction disturbances during ischemia in isolated arterially perfused canine atria. *Int. J. Cardiol.*, In press

② Yano S, Hirose M, Nakada T, Nakayama J, Matsuo K, Yamada M. Selective α 1A-adrenoceptor stimulation induces Mueller's smooth muscle contraction in an isolated canine upper eyelid preparation. *Curr. Eye Res.*, 35, 363-369. (2010) (査読有)

③ Nakada T, Westhoff CM, Yamaguchi Y, Hyodo S, Li X, Muro T, Kato A, Nakamura N, Hirose S. Rhesus glycoprotein p2 (Rhp2) is a novel member of the Rh family of ammonia transporters highly expressed in shark kidney. *J. Biol. Chem.*, 285, 2653-2664. (2010) (査読有)

④ Kato A, Chang MH, Kurita Y, Nakada T, Ogoshi M, Nakazato T, Doi H, Hirose S, Romero MF. Identification of renal transporters involved in sulfate excretion in marine teleost fish. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 297, R1647-R1659. (2009) (査読有)

⑤ Hirose M, Takeishi Y, Niizeki T, Shimojo H, Nakada T, Kubota I, Nakayama J, Mende U, Yamada M. Diacylglycerol kinase ζ inhibits $G\alpha_q$ -induced atrial remodeling in transgenic mice. *Heart rhythm*, 6, 78-84. (2009) (査読有)

⑥ Kurita Y, Nakada T, Kato A, Doi H, Mistry AC, Chang MH, Romero MF, Hirose S. Identification of intestinal bicarbonate transporters involved in formation of carbonate precipitates to stimulate water absorption in marine teleost fish. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 294, R1402-R1412 (2008) (査読有)

⑦ Hirose M, Tsujino N, Nakada T, Yano S, Imamura H, Yamada M. Mechanisms of preventive effect of nicorandil on ischemia-induced ventricular tachyarrhythmia in isolated arterially perfused canine left ventricular. *Basic Clin. Pharmacol.*, 102, 504-514. (2008) (査読有)

[学会発表] (計 4 件)

① 生 暁娜, 中田 勉, 柏原俊英, 弘瀬雅教, 青山俊文, 山田充彦. ニフェジピンは超遅延性膜電位依存性不活性化を安定化して L 型

Ca^{2+} チャネルを抑制する。第 83 回日本薬理学会年会, 大阪 (2010 年 3 月)

② 柏原俊英, 呉林なごみ, 堀内美和, 中田 勉, 生 暁娜, 弘瀬雅教, 山田充彦. 不完全心室筋細胞の T 管の L 型 Ca^{2+} チャネル電流密度の減少に百日咳毒素感受性 G 蛋白質 (G_i/o) が果たす役割。第 83 回日本薬理学会年会, 大阪 (2010 年 3 月)

③ 弘瀬雅教, 竹石恭知, 新関武史, 久保田 功, 中田 勉, 山田充彦. DGK ζ は, 活性型 G プロテイン α_q 強発現マウスの心房細動発生を抑制する。第 82 回日本薬理学会年会, 横浜 (2009 年 3 月)

④ 堀内美和, 植田秀穂, 中田 勉, 弘瀬雅教, 山田充彦. イソプロテレノール誘発性心肥大による T 管 L 型カルシウム電流密度の変化. 第 82 回日本薬理学会年会, 横浜 (2009 年 3 月)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中田 勉 (NAKADA TSUTOMU)

信州大学・医学部・助教

研究者番号: 70452141