

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 30 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009 年～2011 年

課題番号：21590934

研究課題名（和文）ナトリウムチャネルのリモデリングを制御するオンコジーン TRE の分子機能

研究課題名（英文）Oncogene TRE regulates voltage-gated Na⁺ channel remodeling

研究代表者

小野 克重（ONO KATSUSHIGE）

大分大学・医学部・教授

研究者番号：40253778

研究成果の概要（和文）：心筋細胞では不整脈の持続によって細胞膜表面に発現するイオンチャネルに構造的変化が生じ、不整脈の持続を来すイオンチャネルリモデリングが生じる。電位依存性 Na⁺チャネルは心筋細胞内のカルシウムの病的蓄積によってカルモデュリン機能が賦活化され、その結果チャネルの脱ユビキチン化に関与する TRE17 が抑制される。その後、チャネルのプロテアソームによる分解の促進によってチャネル蛋白の生成に比べて分解量が増し、結果として心筋の興奮性を制御する Na⁺チャネルの機能低下が惹起されることが明らかにされた。

研究成果の概要（英文）：In cardiomyocytes, as a long term influence of the arrhythmias, ion channels such as voltage-dependent Na⁺ channel may suffer from remodeling. As a consequence of cellular calcium overload, calmodulin is highly activated to suppress TRE17 functions to deubiquitinate the channel. Although Na⁺ channel synthesis was intact, channel degradation ration exceeds the protein life span, which leads the down-regulation of Na⁺ channels in the heart as a long-term impact on the cardiac excitability.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・分子心臓病態学

キーワード：Na チャネル、不整脈、リモデリング、Ca 過負荷

1. 研究開始当初の背景

心房細動は最も発症の多い不整脈の 1 つで有りながらその治療戦略は未だに確立していない。それは心房細動の発症と維持の機序が明確に理解されていないことに起因する。心房細動が発症しそれが持続すると、仮に洞調律に復したとしても再度心房細動の発症する確率が高まる。この現象は、「Atrial fibrillation begets atrial

fibrillation（心房細動は心房細動を生む）」と呼ばれているが、その理由は心房細動の持続によって心房筋はイオンチャネルの発現が変化し不応期が短縮したり伝導が遅延したりしやすくなるような病的性質を獲得することが原因であるとされている。この病態は心房筋の構造的リモデリング、及び電気的リモデリング（イオンチャネルのリモデリング）として理解されている。このような電気

的、構造的リモデリングの成立が心房細動を初めとする持続性不整脈の治療を困難にしている。しかし、リモデリングに関わる細胞内シグナルとその分子基盤に関しては不明な点が多く、リモデリングの成立機序の解明が心房細動等の不整脈の発症予防と治療戦略に大きく寄与する。

2. 研究の目的

心房細動を発症させた実験動物の心筋ではリモデリングによって電位依存性 Na⁺チャンネルが減少しており、そのために興奮伝導の低下が生じることが多くの研究者によって報告されている。興奮伝導の低下によってリエントリー回路が形成され易くなり、心房細動は停止は困難になる。一方、我々は、心筋細胞をプロテアソーム活性化剤(SDS)存在下で長時間培養すると Na⁺チャンネル電流は減少するという予備実験データを有していた。一方、カルモデュリン阻害剤を含む培養液で培養した心筋細胞の Na⁺チャンネル電流は大きく増大する。この予備実験データ、及び上記の研究背景に基づき、本研究では、「心筋細胞の Na⁺チャンネル蛋白は細胞内の Ca²⁺-カルモデュリン系により制御されている。カルモデュリンの活性化によって恐らく Na⁺チャンネルは分解が亢進し、その過程にはカルモデュリンによって活性化される未知の分子が関わる。」という仮説を立て、その検証を目的とした。

3. 研究の方法

遺伝子(TRE17, Nedd-4)組換えアデノウイルスを作成する。本研究の成否を左右する遺伝子組換えアデノウイルスの作成法を右図に示す。シャトルベクターとして pAdTrackCMV を用いるが、本ベクターはプロモータ領域に GFP 色素蛋白遺伝子を挿入しており、本研究室独自の構造である。更に紅色色素蛋白 (RFP) を組み込んだシャトルベクターを構築することで発現遺伝子を可視的に判別することが可能となりパッチクランプ法を実施する上で好都合となる。我々は既に Csx/Nkx2.5 組換えアデノウイルス (Ad-Csx/Nkx2.5)、及び GATA4 組換えアデノウイルス (Ad-GATA4) の作成を通して組換えアデノウイルス作成法を会得している (J Mol Cell Cardiol 42: 1045-1053, 2007)。同手法を用いて同様に oncogene TRE17、及びユビキチンリガーゼ Nedd-4 の組換えアデノウイルスを作成する。以下にその作成法を概略する (adeno-TRE17 の作成のみを記す)。

- 1) TRE17 を含む plasmid (pEFSA-HA-TRE17) から TRE17 の部分を切り出す。
- 2) 同部を pAdTrack-CMV と ligation して TRE17-pAdTrack-CMV という plasmid を作る。
- 3) リニア化した TRE17-pAdTrack-CMV とウイ

ルスの backbone plasmid (pAdEasy-1) を competent cell (BJ5183) に co-transfect し環状ウイルス DNA を作成する。

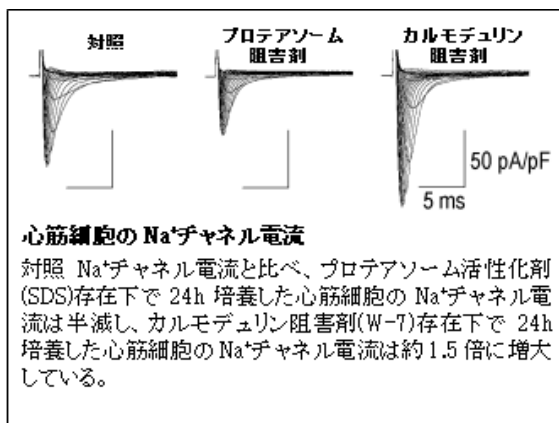
- 4) リニア化した TRE17-pAdEasy-1 を HEK 細胞に transfect してウイルスを収穫する。
- 5) 組換えアデノウイルスを増殖させ、MOI を測定してウイルス懸濁液を作る。
- 6) Na⁺チャンネルのユビキチン化と脱ユビキチン化の定量: Na⁺チャンネル抗体 (Ant-NaV1.5) とユビキチン抗体を用いてチャンネルのユビキチン状態を定量評価する。
- 7) TRE17 強制発現細胞の Na⁺チャンネル電流の測定: 組換えアデノウイルス (adeno-TRE17) をラット (マウス) 由来心筋細胞に感染させ、マーカー蛋白の発現を目安に Na⁺チャンネル電流をパッチクランプ法で記録する。その電流密度は空ベクターアデノウイルス感染細胞と比較する。
- 8) Nedd-4 強制発現細胞の Na⁺チャンネル電流の測定: 組換えアデノウイルスの作成を目指す。しかし、adeno-Nedd-4 の作成に予定以上の時間がかかる場合は、Nedd-4 をリポフェクトアミン法で心筋細胞に強制発現させた後にパッチクランプ法で 9) Na⁺チャンネル電流を記録する。同時に、TRE17 をリポフェクトアミン法で導入した心筋細胞の Na⁺チャンネル電流を記録して、導入方法による発現効率を考慮しつつ Nedd-4 導入心筋細胞の Na⁺チャンネル電流密度を評価する。
- 9) Na⁺チャンネルのユビキチン化と TRE17、及び Nedd-4 の関連: TRE 強制発現した心筋細胞のユビキチン化が僅少であり、同時に Na⁺チャンネル電流密度が小さいことを確認する。更に、Nedd-4 強制発現細胞ではユビキチン化が亢進しており Na⁺チャンネル電流密度が増大していることを示す。
- 10) 心筋細胞カルモデュリン活性の評価と TRE 活性の評価: カルモデュリン活性を細胞内 Ca²⁺濃度とカルモデュリン阻害剤を用いて評価し、カルモデュリン活性上昇が TRE17 蛋白の減少をもたらすこと、カルモデュリン活性上昇がユビキチン化 Na⁺チャンネルの増加を伴うこと、カルモデュリン活性上昇が Nedd-4 (mRNA 及び蛋白質) の発現に作用しないこと、TRE17 とユビキチンの蛋白-蛋白作用を pull-down assay で評価し、カルモデュリン活性上昇が TRE17-ユビキチン複合体を増加させて結果的に TRE17 蛋白発現量を減少させていること、を示しカルモデュリン活性が Na⁺チャンネルのユビキチン化には関与せず、脱ユビキチン化に関わることを証明する。
- 11) 病態心筋モデルの作成と TRE17 の活性に関わる Na⁺チャンネルユビキチン化定量
成獣ラット心耳にセルフィンを用いて電気的頻回刺激を繰り返し、心房細動モデル心筋を作成する。作成した病態心筋の、{細胞内 Ca²⁺濃度}、{TRE17、あるいは truncated

TRE17onco 蛋白)、{Na⁺チャンネル-ユビキチン複合体)を測定し、同時にパッチクランプ法で記録する Na⁺チャンネル電流密度の低下が TRE17 活性によって制御されていることを示すことで、持続性頻脈性不整脈(心房細動等)の Na⁺チャンネルの減少が、という仮説経路に基づくことを動物実験的に証明する。

4. 研究成果

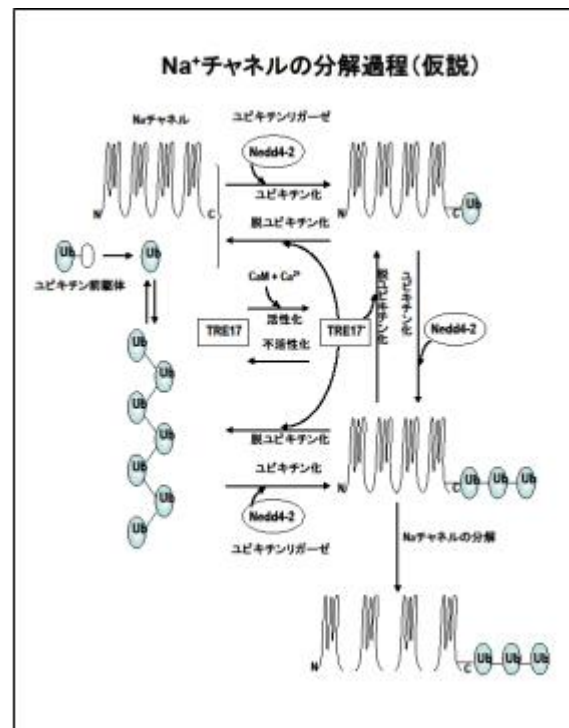
がん細胞等での蛋白分解に oncogeneTRE17 が関与することが知られている。よって我々は心筋の Na⁺チャンネル蛋白の分館に関わる酵素が TRE であると考え Na⁺チャンネル分解経路を想定した。その中で Na⁺チャンネル蛋白のユビキチン化と脱ユビキチン化の平衡によって Na⁺チャンネルが維持され、脱ユビキチン化には oncogeneTRE17 が関与することを心筋細胞を用いて示した。すなわち、oncogeneTRE17 を心筋細胞に強制発現させ、TRE17 の発現量と Na⁺チャンネルの脱ユビキチン量が相関することを示し、この経路にカルモデュリン活性が関わることを示した。次に、Na⁺チャンネルのユビキチン化と脱ユビキチン化を Na⁺チャンネル抗体とユビキチン抗体を用いて定量評価した。同時にパッチクランプ法で Na⁺チャンネル電流の増減が Na⁺チャンネルのユビキチン化量に比例することを確認した。この実験はラット心筋細胞を 24 時間してその Na⁺チャンネル電流の大きさを測定してチャンネル蛋白の条件に依存する増減を評価するものである。対照に比べ、プロテアソーム阻害剤 SDS を添加した培養液で培養した心筋細胞の細胞全体 Na⁺チャンネル電流量は 30%の減少が認められた。この減少はプロテアソーム阻害剤 SDS の急性作用では記録されず、チャンネル蛋白の分解系に作用した中～長期的な制御作用によるものであることが確認された。

このプロテアソームを介するイオンチャンネルの分解制御機構を明らかにするため、ユビキチンリガーゼの関与を検討した。際オブ内にカルシウムを負荷した心筋では Na⁺チャンネルの発現が低下しており、カルシウムに依存する制御系が示唆されたため、カルシウム



ム結合蛋白の 1 つであるカルモジュリンの作用を念頭において以下の実験を施工した。まず、心筋細胞を培養しカルモジュリンの作用を遮断した群(W-7 群)とカルモジュリンキナーゼを遮断した群(KN-93 群)を作成した。その両群と対照群細胞に対してパッチクランプ法を施行して細胞全体 Na⁺チャンネル電流を測定した結果、KN-93 群は対照群と同等の Na⁺チャンネル電流を示したのに対して、W-7 群では対照群より有意に大きな Na⁺チャンネル電流が記録された(*33%)。非特異的カルモジュリン阻害剤であるペプリジルの存在下でも同様に Na⁺チャンネル電流の増大が記録され、カルモジュリンの Na⁺チャンネル制御機構への関与が確かめられた。

最後に、カルモデュリン活性を細胞内 Ca²⁺濃度とカルモデュリン阻害剤を用いて評価し、カルモデュリン活性が Na⁺チャンネルのユビキチン化には関与せず、脱ユビキチン化に関わることを示した。Na⁺チャンネルはユビキチン化されたあと、脱ユビキチン化されて再度、細胞膜へ移行して機能するチャンネルとして働くが、このユビキチン化と脱ユビキチン化の平衡状態に細胞内カルシウムとカルモジュリンが関わり、その結果心筋筋力の電気的興奮性が長期的に制御されることが示された。以上の結果より、細胞内 Ca²⁺過負荷等の病的条件下では、Na⁺チャンネルのユビキチン化が進むことで分解の促進が生じるのではなく、一端ユビキチン化された Na⁺チャンネル平衡状態で脱ユビキチン化される過程が阻害されることで、最終的に分解速度が増してタンパク量が減少するという新規メカニズムが明らかとなった。



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 K. Ono, Sodium channel as a target for molecular arrhythmia. *J Arrhythmia* 27: 91-95, 2011.
- ② R. Srisawat, N. Komalamisra, Y. Eshita, M. Zheng, K. Ono, T. Q. Itoh, A. Matsumoto, S. Petmitr, Y. Rongsriyam, Point mutations in domain II of the voltage-gated sodium channel gene in deltamethrin-resistant *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Appl Entomol Zool* 45: 275-282, 2010.
- ③ A. Hattori, K. Mawatari, S. Tsuzuki, E. Yoshioka, S. Toda, M. Yoshida, S. Yasui, H. Furukawa, M. Morishima, K. Ono, T. Ohnishi, M. Nakano, N. Harada, A. Takahashi, Y. Nakaya, β -Adrenergic-AMPK Pathway Phosphorylates Acetyl-CoA Carboxylase in a High-epinephrine Rat Model, *SPORTS. Obesity* 18: 45-54, 2010.
- ④ M. Morishima, S. Tahara, Y. Wang, T. Kaku, K. Ono, Nonapeptide hormones oxytocin and vasopressin distinctly regulate $Ca_v1.2$ L-type Ca^{2+} channel expression in cardiomyocytes. *J Arrhythmia* 26: 111-118, 2010.
- ⑤ M. Zheng, Y. Wang, L. Kang, T. Shimaoka, F. Marni, K. Ono, Intracellular Ca^{2+} - and PKC-dependent upregulation of T-type Ca^{2+} channels in LPC-stimulated cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 48: 131-139, 2010.
- ⑥ M. Morishima, Y. Wang, Y. Akiyoshi, S. Miyamoto, K. Ono, Telmisartan, an angiotensin II type 1 receptor antagonist, attenuates T-type Ca^{2+} channel expression in neonatal rat cardiomyocytes. *Eur J Pharmacol* 609: 105-112, 2009
- ⑦ F. Marni, Y. Wang, M. Morishima, T. Shimaoka, T. Uchino, M. Zheng, T. Kaku, K. Ono, 17β -estradiol modulates expression of low-voltage-activated $Ca_v3.2$ T-type Ca^{2+} channel via ERKs pathway in cardiomyocytes. *Endocrinology* 150: 879-888, 2009

[学会発表] (計 13 件)

- ① 王岩, 森島真幸, 賀来俊彦, 小野克重, エタノールは肺静脈細胞の T 型 Ca^{2+} チャンネルの発現を増加させる "第 20 回日本病態生理

学会大会 2010. 1. 23-24, 奈良"

- ② 王岩, 森島真幸、嶋岡徹, 小野克重, Protein kinase C as an upstream signal to activate $Csx/Nkx2.5$ and nFAT transcription to accelerate $Cav3.2$ Ca^{2+} channel expression, "第 7 回日本循環器学会学術集会 2010. 3. 5-7, 京都"
- ③ Ono K, Morishima M, Wang Y, Transcription factor $Csx/Nkx2.5$ and nFAT regulate expression of $Cav3.2$ T-type Ca^{2+} channel via protein kinase C actions "第 8 回日本薬理学会年会 2010. 3. 16-18, 大阪"
- ④ Morishima M, Wang Y, Akiyoshi Y, Ono K, Effects of physical exercise on cardiac Ca^{2+} channel expression in SPORTS rat, a novel rat-strain featured by high levels of voluntary wheel-running activity (第 20 回 ISHR 世界大会 2010 京都) 2010. 5. 13-16, 京都"
- ⑤ 森島真幸, 王岩, 秋吉裕子, 小野克重, アンジオテンシン受容体を介した心筋 T 型カルシウムチャンネルの発現抑制 "第 8 回日本生理学会大会 2010. 5. 19-21, 盛岡"
- ⑥ 王岩, 森島真幸, 賀来俊彦, 嶋岡徹, 康林, 小野克重, PKC は新生ラットと心筋細胞の T 型 Ca^{2+} チャンネルの Subtype 変換を制御する, "第 19 回日本病態生理学会大会, 2009. 1. 24-25, 所沢"
- ⑦ 森島真幸, 田原慎太郎, 王岩, 秋吉裕子, 賀来俊彦, 小野克重, Oxytocin による心筋 L 型 Ca^{2+} チャンネルの転写制御機, "第 19 回日本病態生理学会大会, 2009. 1. 24-25, 所沢"
- ⑧ 小野克重 (シンポジウム) "第 26 回日本心電学会学術集会 2009. 7. 2-4, 京都"
- ⑨ 森島真幸, 田原慎太郎, 秋吉裕子、王岩, 賀来俊彦, 小野克重, "Oxytocin は幼若ラット心筋細胞において転写因子 CREB を介して L 型 Ca^{2+} チャンネル ($Ca_v1.2$) 発現を抑制する", 第 26 回日本心電学会学術集会 2009. 7. 2-4, 京都"
- ⑩ 王岩, 森島真幸, 康林, 賀来俊彦, 小野克重, "エタノールは肺静脈心筋細胞の T 型 Ca^{2+} チャンネルの発現を増加させる "第 26 回日本心電学会学術集会 2009. 7. 2-4, 京都"
- ⑪ Wang Y, Morishima M, Kang L, Kaku T, Ono K, Protein kinase C as a key modulator to

switch isoforms from Cav3.2 to Cav3.1 of the T-type Ca²⁺ channel in neonatal rat cardiomyocytes. "APHS 2009 (2nd Asia Pacific Heart Rhythm Society Scientific Sessions 5th Asia Pacific Atrial Fibrillation Symposium) Beijing International Convention Center, China"

⑫ 王岩, 森島真幸, 賀来俊彦, 小野克重, PKC 活性に依存する新生ラット心筋細胞 T 型 Ca²⁺ チャンネルの Subtype 変換, "第 60 回西日本生理学会 2009.11.6-7, 福岡"

⑬ Morishima M, Wang Y, Kaku T, Ono K, Nonapeptide hormone oxytocin regulates Cav1.2 L-type calcium channel expression in cardiomyocytes, "第 26 回 ISHR 日本部会総会 2009.12-4-5, 札幌"

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小野克重 (ONO KATSUSHIGE)

大分大学・医学部・教授

研究者番号: 40253778

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし