

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26650003

研究課題名(和文)力に応答して代謝を調節する因子群の研究と応用的展開

研究課題名(英文)Metabolic regulators that act in response to mechanical stimuli.

研究代表者

小椋 利彦(Ogura, Toshihiko)

東北大学・加齢医学研究所・教授

研究者番号：60273851

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：心臓は変動する脈拍、血圧に適応しつつ循環恒常性を維持している。このためには、心拍維持に必要なATPを産生し続ける。ATP産生のエネルギー代謝が破綻すれば、すなわち死を意味する。これを回避するため、心臓は循環動態に応じてエネルギー代謝を制御する。しかし、この適応メカニズムは解明されていない。我々が同定した力学刺激応答因子は、心拍による力学刺激で核内に移行し、核内受容体のひとつと相互作用する。この結果、転写活性化、エネルギー代謝促進、ATP産生増大を起す。この含目的機構は、変動する循環動態への重要な対応機構であり、循環恒常性維持のエネルギー側面を明確にすることができた。

研究成果の概要(英文)：Beating heart keeps circulatory homeostasis by adapting to changing blood pressure and heartbeat. Energy metabolism (ATP production) of cardiomyocytes is the most fundamental process for this, although molecular mechanisms are largely unknown. We have found that MKL2 shuttles from cytoplasm into nucleus in response to mechanical stimuli. In the nucleus, MKL2 interacts with one of key transcription factors that regulates energy metabolism by enhancing ATP production by burning fat in cardiomyocytes. This novel mechanism we have identified explains how heart adapts to changing circulatory mechanical parameters, such as blood pressure, heartbeat and blood flow. Our studies supported by this grant have revealed an essential and pivotal mechanism of beating heart, an organ that continues to produce ATP to maintain heartbeat even on high circulatory demands.

研究分野：分子生物学

キーワード：エネルギー代謝 力学刺激 転写調節

1. 研究開始当初の背景

心臓は変動する脈拍、血圧に適応しつつ循環恒常性を維持している。このためには、心拍維持に必要な ATP を産生し続けている。心拍に使われる ATP 量はきわめて多いが、ATP 産生のエネルギー代謝が破綻すれば、すなわち死を意味する。これを回避するため、心臓は循環動態に呼応してエネルギー代謝を制御している。骨格筋も、運動動態(力学負荷)によって糖から脂質へエネルギー源を変える。しかし、この適応の分子メカニズムは解明されていない。申請者は、心筋、骨格筋について、力学負荷に反応して糖/脂質代謝を制御する因子を発見した。このような因子は、心不全、心筋症、肥満/糖尿病などの治療薬の創薬ターゲットとなることも考えられることから、医学的応用を視野に入れた研究を展開し、力学負荷と代謝の接点を解き明かす。

2. 研究の目的

正常でも血圧は1日に30~50mmHg程度変動し、脈拍も大きく変化する。また、高血圧は心臓への慢性的圧負荷となる。すなわち、高い圧力に抗って血流を維持するために、心拍に多大のエネルギー(ATP)を消費することになる。しかし、心臓のATPの枯渇は、心不全、最悪の場合心停止を意味する。だから、心臓は、力学負荷に応じて拍動維持のためのエネルギー代謝を調節している。これは、骨格筋にも当てはまる。

正常血圧でも心臓は一拍で0.738ジュール/kg体重のエネルギーを消費するが、60kgの人は一拍あたり1mmol以上のATPを使う。エネルギー代謝の破綻は心不全などの病態に直結しており、心不全末期には心筋内のATPは枯渇寸前である。

しかし、循環の力学刺激からエネルギー代謝に至るシグナル経路は、ほとんど解明されていない。加えて、胎児心臓は糖からATPを産生するが、成体の心臓は主に脂肪からATPを作る。興味深いことに、心不全が進行するとエネルギー源を脂肪から糖に変わる。燃焼しきれない脂肪成分は心筋組織に沈着し、Fatty heartと呼ばれる危機的状況を作る。一方、骨格筋も嫌気的条件下では糖を、好気的条件下では脂質を主に代謝する。このようなエネルギー代謝のスイッチ機構も謎のままである。

このように、循環の恒常性を、エネルギー代謝の観点から考えることが重要である。そして、このメカニズム解明は、例えば、不全心臓のエネルギー産生を糖から効率の良い脂肪に変換させることで循環不全を改善させる治療法につながる。また、骨格筋が効率よく脂質を代謝できれば、肥満、糖尿病の治療にも結びつく。

3. 研究の方法

申請者らが見いだした力学刺激応答性のMKL2経路を構成する分子を解析し、MKL2 KOマウスでメタボライト解析、遺伝子発現解析、プロテオミクス解析を併用して研究する。また、これまでに同定したArid2について解析を行う。Arid2は、MKL2との相互作用があり、KOの表現型に現れている可能性がある。

4. 研究成果

(1) MKL2経路の解析

我々が見いだした転写活性化因子MKL2は、心筋細胞で機械的刺激(とくに圧負荷による心筋細胞への伸展刺激)に反応して細胞質から核内にシャトルする。例えば、マウス大動脈を結紮して左心室に圧負荷をかけると核内のMKL2が増加し、核内移行が確認できる。このシャトル現象は、培養心筋細胞、他の培養細胞の伸展でも確認された。従って、MKL2は圧負荷と遺伝子発現を結びつける因子であると考えられる。この新しい性質に加え、MKL2がT-box転写因子Tbx5を活性化することを見いだした。また、核内受容体をも活性化することも確認できた。活性化された核内受容体は、ミトコンドリアを増やし、酸化リン酸化を促進してATP産生を促すが、力学刺激で核内に移行して転写を活性化するMKL2は、循環動態の変化にエネルギー代謝の側面で大きく寄与することが理解できる。この知見は、脂肪の代謝不全を伴う心不全末期の心臓のエネルギー代謝を改善する薬剤開発を行う糸口になる。また、MKL2は骨格筋でも同様の働きがあるが、これは、MKL2を標的として、運動が起こす生理反応をmimicするexercise pillを見いだす端緒ともなる。

(2) MKL2の新たな相互作用転写因子の同定

MKL2と相互作用する因子として、Arid1a、Arid2を同定した。これらの因子は、

ARID domain を持つクロマチンリモデリング因子で、Swi/Snf 複合体の構成因子である。本研究では、Arid2 のノックアウトマウスの初期解析を行った。このマウスでは、Arid 遺伝子座に LacZ が挿入されており、b-gal 染色によって詳細に Arid2 遺伝子の発現パターンを確認できた。その結果、Arid2 は、心臓を含む、中枢神経系、骨格筋、肺など、多様な器官で強く発現することが確認できた。また、ノックアウトマウスでは、強い浮腫を生じたことから、循環障害があることが予想された。詳細に心臓の形態を調べた結果、心筋層が薄く、低形成であった。また、肺も著しい低形成を示した。この結果は、Arid2 の発現パターンを良く一致している。また、Arid2 ノックアウトマウスの遺伝子発現プロファイルを見た所、Nppa (Anf) の発現が顕著に減少していた。我々は、MKL2 が転写因子 Tbx5 と相互作用して遺伝子発現を調節することを見いだしているが、Nppa (Anf) は、Tbx5 の直接標的であり、我々の結果と良く符合している。現在も Arid2 ノックアウトマウスの詳細な解析を進めている。

(3) 新たな力刺激感受性因子の発見

新たな力刺激感受性因子として Filamin/CBFb を同定した。Filamin C 遺伝子について、ノックアウトマウスの作製を試みたが、ES 細胞の品質に問題があるらしく、ヘテロマウスを得ることができなかった。

また、microarray 解析を行って力刺激に誘導される遺伝子を網羅的に解析した結果、miR-21 を再同定した。我々は、既に miR-21 K0 マウスの作製を終了しており、このマウスについて、心臓に異常があるかどうか、特に力刺激との関連に視点を置いて解析した。しかし、残念ながら、miR-21 K0 マウスの心臓に異常は認められなかった。そのかわり、このマウスでは、皮膚の創傷治癒が速やかに、しかも瘢痕を形成せずに進行することがわかり、興味深い発見となった。

また、MKL2 が核内受容体、Tbx5 と相互作用して遺伝子発現を調節する時、もうひとつの因子が必要であることがわかってきた。この知見は、研究の進展によってもたらされたものである。この未知の因子は、A/T-rich な配列に結合する。本年度は、この A/T-rich 配列をプローブに affinity purification を行って単離、精製を試みた。用いる細胞種、精製条件、プローブ配列など、さまざまな条件を見当して、精製条件を設定した。数回の精製実験から、SDS-PAGE で 2~3 の特異的な

タンパク質バンドを得るまでに至った。今後、このタンパク質の同定を行い、さらに機能解析を進めて行く。

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2件)

1) New BRAF knockin mice provide a pathogenetic mechanism of developmental defects and a therapeutic approach in cardio-facio-cutaneous syndrome.

Inoue SI, Moriya M, Watanabe Y, Miyagawa-Tomita S, Niihori T, Oba D, Ono M, Kure S, Ogura T, Matsubara Y, Aoki Y. *Hum Mol Genet.* 23, 6553-6566, 2014 (査読有)

2) Introducing Micrometer-Sized Artificial Objects into Live Cells: A Method for Cell-Giant Unilamellar Vesicle Electrofusion.

Akira C. Saito, Toshihiko Ogura, Kei Fujiwara, Satoshi Murata, and Shin-ichiro M. Nomura

PLoS ONE 9, e106853. (査読有)

doi; 10.1371/journal.pone.0106853, 2014

[学会発表](計0件)

[図書](計3件)

1) メカノバイオロジー (曾我部正博 編集) (Dojin Bioscience Series、(株)化学同人) (2015/8/15 出版) (ISBN 9784759817218) 第六章 発生のメカノバイオロジー 小椋利彦 73~84 頁

2) 日本臨床 特集 多発性骨髄腫の病態と最新治療 (基礎と臨床の最新情報)

サリドマイド、cereblon と多発性骨髄腫 小椋利彦 日本臨床 第73巻(第1号) 149-145 頁、2015

3) 細胞工学 Vol 33, No. 9, 2014 (秀潤社) 特集 新メカノトランスダクション (工学との融合が明らかにする力学刺激センサーの動作とシグナル伝達) 小椋利彦監修 913~966 頁

〔産業財産権〕
出願状況（計0件）

取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小椋 利彦 (TOSHIHIKO OGURA)
東北大学・加齢医学研究所・教授
研究者番号：60273851

研究者番号：

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：