

神経において重要な役割を担う Ca²⁺結合タンパク質 NCS-1 の 心臓における役割の解明

国立循環器病研究センター 分子生理部
西谷 友重

1. 背景および目的

細胞内Ca²⁺は様々な細胞応答のキー因子であり、特に心臓においては筋収縮や心肥大形成に寄与することが知られている。例えば成体心筋では、活動電位の変化に伴い電位依存性Ca²⁺チャネルが活性化されると細胞内にCa²⁺が流入し、これが引き金となって筋小胞体 (SR) から大量のCa²⁺が細胞内に放出される。このような細胞内Ca²⁺レベル ([Ca²⁺]_i) 上昇により心筋収縮が惹起される。一方、胎児期や新生児期など未成熟期の心筋細胞は、SRなどの構造が未発達であり、様々なCa²⁺制御タンパク質の発現量などが異なることから、成体とは異なった興奮-収縮相関 (EC-coupling) が行われていると予想されるが、その詳細の全貌は明らかではない。また、心肥大形成の際には、'fetal program gene' と呼ばれる未成熟期特有の一連の遺伝子発現が亢進することが知られているが、心肥大形成機構および未成熟期の心機能調節機構との関連については明らかでない。

細胞内 Ca²⁺の働きは、カルモジュリンのような種々の Ca²⁺結合タンパク質により仲介されるが、私達は本研究により、NCS-1 (Neuronal Ca²⁺ sensor-1) という神経機能に重要な役割をもつ Ca²⁺結合タンパク質が、心筋においても Ca²⁺シグナル制御因子として働き、特に未成熟期の心機能および心肥大形成に寄与するという新規機能を見出した¹。NCS-1 は、神経をはじめとする興奮性細胞に発現している分子量 22 k D の EF ハンド Ca²⁺結合タンパク質で、もともと NCS-1 を高発現するショウジョウバエが過剰な興奮作用を示すことから神経のシナプス伝達に関わる因子として知られていた。その分子メカニズムとして、イノシトールリン酸化酵素 PI4-K を活性化して神経伝達物質の分泌を促進すること、また私達が初めて発見したイオンチャネルの制御因子として働くこと²も知られている。また私達は、NCS-1 が障害を受けた神経細胞においてその発現量が増加するサバイバル因子としても働くことを報告している³。一方、NCS-1 は、今まで神経のみに高発現すると考えられてきたためその機能も神経特異的なものが主であったが、私達は心筋においても特に未成熟期に神経と同じくらい高発現することを見出した⁴。しかし、心臓における NCS-1 の役割については全く不明であった。今回、NCS-1 欠損 (KO) マウスの解析を通して、NCS-1 の心臓における役割、特に未成熟期や病態時における生理的・病態的意義を明らかにし、関連タンパク質同定を含めた分子メカニズムを解明することを研究目的とした。

2. 方法

遺伝子改変動物の作製: 野生型ヒトNCS-1およびCa²⁺との結合力が弱い変異型 (E120Q)、またそれぞれのHA標識体を作製し、これらをコードするアデノウイルスも定法に従い作製した。また、心筋 α -ミオシン重鎖 (α -MHC) プロモータを用いて心筋特異的に発現するトランスジェニック (Tg) マウスを作製した。さらにノックアウト (KO) マウスも共同研究により作製済みである。

心機能解析: M モード左室短軸心エコーにより心機能および心臓形態を測定した。マウスを1-1.5%イソフルラン下で麻酔し、体温および心拍数、心電図をモニターしながら、心機能の指標として左室内径短縮率 (FS) を下記の式にて計算して求めた。FS (%) = {LVDd (左室拡張期内径) - LVDs (左室収縮期内径)} / LVDdx100。

心筋細胞の単離: 成体マウス心筋細胞はランゲンドルフ灌流システムを用いた酵素処理により単離した。一方、培養心筋細胞は生後 1-2 日目の新生児マウスの心室筋よりトリプシン処理を行なってバラバラにした後、繊維雅細胞を取り除き、初代培養を行なった。

細胞内 Ca²⁺濃度の測定: 自動拍動、あるいは電気フィールド刺激した際の Ca²⁺濃度変化 (Ca²⁺トランジェント) は 34 ° C にて、蛍光指示薬 Indo 1-AM を用いた蛍光法により測定した。その際、冷却 CCD 高速カメラ付き AQUACOSMOS システム (浜松フォトニクス) を用いた。また筋小胞体内の Ca²⁺レベルはカフェイン添加による Ca²⁺トランジェントの振幅を指標にした。

免疫蛍光法、免疫沈降法： NCS-1 タンパク質の局在パターンは、丸ごと心臓の連続切片(5 μm)および培養心筋細胞を、免疫蛍光法により可視化し、オリンパス Fluoview FV1000 コンフォーカル顕微鏡を用いて蛍光像観察を行った。また免疫沈降法は、心筋細胞を RIPA buffer で可溶化した後、遠心 (15000rpm, 20 min) した上清を、特異抗体およびプロテイン A セファロース存在下で免疫沈降し、ウェスタンブロットにて相互作用するタンパク質を検出した。

3. 結果 研究成果

NCS-1の心臓における発現パターン。

NCS-1は成体に比べ、胎児および新生児期で発現量が高く、生後2週目ごろから徐々に減少していくことがわかった。また細胞内局在は、形質膜および核膜周辺のほか、SR などのCa²⁺シグナル関連部位に集積していた。

NCS-1の遺伝子欠損 (KO) マウスの個体レベルでの解析。

NCS-1の心臓における機能を明らかにするため、NCS-1の全身KOマウスを手に入れ解析を行なった。興味深いことに、KOマウスでは生後4日目ぐらいまでの死亡率が高くなっていった。

またNCS-1の発現量が未成熟期で高かったことから、成体および生後2週齢の幼若マウスの両方で心エコーによる心機能解析を行ったところ、2週齢のKOマウスでは、弛緩期は変わりなかったものの収縮期の左室内径が大きくなっており、その結果、心機能の指標であるFractional shortening (FS) が顕著に低下していることがわかった。一方、6週齢の成体マウスでは、弛緩期、収縮期共にWTとKOでは変わらず、心機能も変わらなかった。

細胞内Ca²⁺レベルとその制御タンパク質の比較。

未成熟マウスにおける心機能低下の細胞内メカニズムを明らかにするため、新生児由来の培養心筋細胞の細胞内Ca²⁺トランジェントをWTとKOで比較した。その結果、KO心筋では収縮期におけるCa²⁺レベルが顕著に低下しており、その結果amplitudeも低下していた。また、SRのCa²⁺量の指標として、caffeine添加によるCa²⁺トランジェントを較べたところ、SRのCa²⁺量もKO心筋で低下していることがわかった。

次に、どのような分子メカニズムでSR Ca²⁺量が変わったのか明らかにするため、種々の心筋Ca²⁺制御タンパク質の量を生後1週齢のWTとKOマウスで比較した。その結果、電位依存性Ca²⁺チャネル、Na⁺/Ca²⁺ exchanger, calsequestrin, SR Ca²⁺pumpの量はWTとKOでほとんど差は認められなかった。しかしSR Ca²⁺ポンプの制御因子であるフォスフォランバン (PLB) において、PKAではなくCaMKIIによるリン酸化量がKOで顕著に低下していることがわかった。また実際、CaMKIIのリン酸化量もKOで顕著に低下していた。一方、成体心筋では、そのような差は一切、認められなかった。

さらに、SR Ca²⁺ポンプ活性の指標として電気刺激誘発Ca²⁺トランジェントの下降速度を比較したところ、KO心筋で実際SR Ca²⁺ポンプ活性が低下していることがわかった。

以上の結果は、KO心筋では、CaMKII活性およびCaMKII依存性PLB活性が低下することにより、SR Ca²⁺ポンプ活性が低下し、これが、SR Ca²⁺量、細胞内Ca²⁺量、心筋収縮力を低下させている原因と考えられた。

NCS-1とIP₃受容体との相互作用。

次に、WTマウスにおいて、CaMKIIを活性化させているCa²⁺ソースは何かについて検討を行なった。NCS-1は神経や心筋においてIP₃受容体1および2と相互作用することが報告されており、実際、私たちが心筋においてNCS-1とIP₃受容体は免疫沈降することを確認した。しかし、Ca²⁺と結合しにくいNCS-1 mutant E120Qを高発現するトランスジェニックマウスでは結合が認められなかったことより、NCS-1がCa²⁺依存的にIP₃Rと相互作用していることが明らかになった。

さらに、NCS-1がIP₃受容体の機能に影響を与えるか確認するため、ATP添加によるCa²⁺トランジェントを、NCS-1有り無しで比較した。ATP添加により、WTでは弛緩期、収縮期両方のCa²⁺レベルが上昇したが、KO心筋では、WTほど上がらないという現象が認められた。また、形質膜を介するCa²⁺流入をブロックするため細胞外Ca²⁺をフリーにして同様の実験を行ったところ、やはりKOで顕著に低下していることがわかった。これらの結果は、NCS-1が心筋においてもIP₃受容体活性を制御していることを強く示唆している。

NCS-1と心肥大との関連。

未成熟期に高発現するタンパク質は、” fetal program gene” などに代表されるように、その多くが心肥大にも関与することが知られている。また、IP₃受容体も心肥大に寄与することから、NCS-1と心肥大との関連について検討した。培養心筋細胞に、心肥大誘発ホルモンであるフェニレフリンやエンドセリン1を添加すると、NCS-1の発現量が上昇することが明らかとなった。また逆に、NCS-1をアデノウイルスにて高発現させた心筋細胞では、心肥大誘発因子を加えた場合と類似した形態変化や収縮力の増加、また心肥大マーカーであるANFの発現量が顕著に亢進した。すなわち、NCS-1

の高発現は、心肥大を誘導することが示唆された。

それでは、NCS-1のKO心臓ではホルモン刺激による心肥大は抑制されるかについて検討した。in vivo heartにおいて、浸透圧ミニポンプによりフェニレフリンを注入すると、WTでは心筋細胞面積の増加、繊維化、心肥大マーカーの増大を伴う顕著な心肥大が認められたのに対し、KO心筋ではこれら全てが顕著に抑えられることがわかった。これらの結果は、NCS-1がホルモン刺激による心肥大を一部、仲介することを強く示唆している。さらに、Ca²⁺依存性心肥大シグナルとしてCaMKIIとカルシニューリンがあるが、フェニレフリンによるリン酸化CaMKIIおよびMCIP (カルシニューリン制御タンパク質) の発現増加がNCS-1 KOマウスで顕著に抑えられていたことより、NCS-1による心肥大形成には、この両方の経路が関与していることがわかった。

NCS-1、IP₃受容体、CaMKII活性化の機能連関。

HEK293細胞において、CaMKII, NCS-1およびIP₃受容体をそれぞれ発現させると、三者を高発現したものがCaMKIIのリン酸化が最も多く認められた。さらに、NCS-1存在下でアデノフォスチン1によりIP₃受容体の特異的に活性化すると、CaMKIIのリン酸化が増加した。また、CaMKII阻害剤により、WTにおける細胞内Ca²⁺トランジェントがKOなみに減少した。さらに、CaMKII阻害剤、IP₃受容体阻害剤はNCS-1による心肥大を顕著に抑制した。NCS-1、IP₃受容体、CaMKIIいずれも、未成熟期および心肥大の際、高発現することがわかった。

4. 考察 まとめ

NCS-1のKOマウスを用いた研究により、NCS-1の心筋における2つの重要な機能が初めて明らかとなった。それは、NCS-1は未成熟期や心肥大の際、その発現量が増加し、未成熟期の心機能亢進およびサバイバル、また心肥大形成にも寄与することが明らかとなった。前述のように、未成熟期におけるEC-couplingのメカニズムはSRが未熟であることから成体とは異なることが示唆されていたが、依然、SRに依存したものであると考えられていた。従って、その未成熟さを補う未知の因子の存在が示唆されたが、本研究により、それがNCS-1、IP₃受容体、CaMKIIの3者の相互作用によることがわかった。そのメカニズムは、WT心筋においてはこの3者が未成熟期で高発現し、NCS-1がIP₃受容体をCa²⁺依存的に活性化することにより局所の心筋Ca²⁺シグナルが増加し、これがCaMKIIを活性化するCa²⁺ソースとなる。そして、CaMKII依存性PLB活性が活性化することによりSR Caポンプ活性が上昇し、SR Ca²⁺量および細胞内Ca²⁺量が増加して、未成熟なSRの機能を補助することにより、心筋収縮力を増加させていることがわかった。一方、成体においてもホルモン刺激などによりNCS-1の発現量が増加し、IP₃受容体との相互作用によりCaMKIIやカルシニューリンの活性化を介して心肥大形成に寄与することが明らかとなった。これらの知見は、小児科領域の心臓生理の理解のみならず、心肥大発症機構の解明、また心不全の治療などにも役立つことが期待される。

5. 発表論文、参考文献

(私の論文名はNishitaniではなく、Nakamura TYとなっております)

1. Nakamura TY, Jeromin A, Mikoshiba K, Wakabayashi S. Neuronal calcium sensor-1 promotes immature heart function and hypertrophy by enhancing Ca²⁺ signals. *Circ Res*. 2011;109:512-523
2. Nakamura TY, Pountney DJ, Ozaita A, Nandi S, Ueda S, Rudy B, Coetzee WA. A role for frequenin, a Ca²⁺-binding protein, as a regulator of Kv4 k⁺-currents. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:12808-12813
3. Nakamura TY, Jeromin A, Smith G, Kurushima H, Koga H, Nakabeppu Y, Wakabayashi S, Nabekura J. Novel role of neuronal ca²⁺ sensor-1 as a survival factor up-regulated in injured neurons. *J Cell Biol*. 2006;172:1081-1091
4. Nakamura TY, Sturm E, Pountney DJ, Orenzoff B, Artman M, Coetzee WA. Developmental expression of NCS-1 (frequenin), a regulator of Kv4 k⁺ channels, in mouse heart. *Pediatr Res*. 2003;53:554-557