

Title	Cardiac-specific overexpression of a High Ca ²⁺ affinity mutant of SERCA2a attenuates in vivo pressure overload cardiac hypertrophy
Author(s)	中山, 博之
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43890
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	中 山 博 之
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 17590 号
学位授与年月日	平成 15 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科情報伝達医学専攻
学位論文名	Cardiac-specific overexpression of a high Ca^{2+} affinity mutant of SERCA2a attenuates in vivo pressure overload cardiac hypertrophy (心筋特異的な高カルシウム親和性 SERCA2a の過剰発現は生体における圧負荷心肥大を抑制する)
論文審査委員	(主査) 教授 堀 正二 (副査) 教授 谷口 直之 教授 祖父江憲治

論 文 内 容 の 要 旨

[背景ならびに目的]

心臓において Ca^{2+} は、興奮収縮連関における最も重要なセカンドメッセンジャーであり細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇は収縮力の増加を惹起する。また心筋細胞において細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇はプロテインキナーゼ C (PKC) 等の Ca^{2+} 依存性情報伝達分子を活性化し心筋細胞肥大を引き起こす。この事より心機能の増大と心肥大の抑制は両立しえない現象のように考えられる。心臓 Ca^{2+} ATPase (SERCA2a) は拡張期に細胞質から筋小胞体内へ Ca^{2+} を能動輸送する。その過剰発現は心筋の収縮弛緩を増強させる事が報告されている。ホスホランパン (PLN) は、SERCA2a の Ca^{2+} 親和性を低下させる事によりその活性を抑制している。SERCA2a と PLN の相互作用部位は、in vitro の検討により細胞質部位と膜貫通部位の 2ヶ所にある事が示されているが、細胞質における SERCA2a-PLN 相互作用の in vivo における意義は明らかではない。本研究の目的は、1) 細胞質ドメインの SERCA2a-PLN 相互作用の in vivo における生理学的意義を明らかにし、2) SERCA2a-PLN 相互作用を抑制する事の圧負荷心肥大における病態学的意義を検討する事である。

[方法ならびに成績]

1. トランスジェニックマウス (TG) の作成及び同定

α myosin heavy chain promoter を用いて細胞質内相互作用部位における PLN との相互作用を消失させた変異型 SERCA2a の心筋特異的 TG をマイクロインジェクション法にて作成した。TG の同定は polymerase chain reaction (PCR)、及び Western blot にて行った。SERCA に対する PCR により、5 系統の TG を同定した。各系統において SERCA2a 特異抗体を用いた Western blot を施行したところ、non-transgenic littermate control (NLC) に比して有意な SERCA2a の蛋白発現レベルの増大 (1.59 倍) を認める系統が得られ、以後の実験において同系統の TG 及びその NLC を用いた。

2. SERCA2a-PLN 相互作用の評価

筋小胞体への Ca^{2+} 取り込みを $^{45}Ca^{2+}$ を用いた Millipore filtration 法を用いて測定し最大酵素反応速度 V_{max} ならびに Ca^{2+} 親和性の指標としての EC_{50} を算出した。TG において V_{max} は有意な変化は認めなかったが EC_{50} は

有意に低値であった。この結果より SERCA2a が PLN と細胞質部位において機能的に相互作用を持つ事が *in vivo* において示された。

3. 単離心筋細胞の評価

10 週齢の TG 及び NLC からランゲンドルフ法を用いて心筋細胞を単離し edge detection 法にて収縮弛緩を評価した。又 fura-2 を用いて単離心筋細胞における Ca^{2+} transient を測定した。その結果 TG において Ca^{2+} 放出の増大とそれに伴う収縮性の増大を認めた。また細胞内 Ca^{2+} 減少時定数の短縮および弛緩時間の短縮を示し拡張性が増大していることが示された。

4. 生理的条件下における心機能評価

In vivo における心機能の評価のためマウスの左心室にカテーテルを挿入し心拍数、左室収縮期圧、左室拡張末期圧、最大並びに最小の dp/dt を測定した。その結果 TG において収縮性の指標である最大の dp/dt の増大並びに拡張性の指標である最小の dp/dt の低下を認め生理的に心機能の増大している事が示された。

5. 圧負荷心肥大の評価

Transverse Aortic Constriction operation を用いて TG に圧負荷を作成し 1 週間後における心肥大を検討した。左心室の負荷の指標として左右内頸動脈の圧較差を測定し、心肥大の指標として生体における左室重量脛骨長比及び心室筋における心房利尿ホルモン (ANF) の発現を検討した。その結果圧較差に有意な差を認めなかったが左室重量脛骨長比の増大は TG において有意に抑制された。また ANF の心室筋における mRNA 発現は、TG において NLC に比して有意に抑制された。以上より TG において圧負荷心肥大が抑制される事が示された。

6. PKC translocation assay

心筋をホモジナイズし細胞質分画と膜分画に分離した。各分画を用いて Western blot にて 3 種類の PKC isoform (α , β_1 , ϵ) の translocation を検討した。その結果 Ca^{2+} 依存性の PKC である PKC α 及び β_1 の活性化は TG において抑制されていた。また Ca^{2+} 非依存性である、PKC ϵ の活性化は TG において NLC と差を認めなかった。この結果より心機能が亢進した TG において Ca^{2+} 依存性 PKC の活性化が抑制されることが示唆された。

[総 括]

本研究において SERCA2a と PLN が細胞質部位において機能的に相互作用を持つ事が示された。またこの相互作用の抑制は、心機能を増大しかつ圧負荷心肥大を抑制する事が示された。

論文審査の結果の要旨

本研究において野生型及び、*in vitro* においてホスホランパンと相互作用を持たない事が報告されている、変異型の心臓カルシウム ATP アーゼ (以下 SERCA2a) を心筋特異的に過剰発現させたトランスジェニックマウスを作成した。両トランスジェニックマウスを用いた検討により、SERCA2a が、生体内で細胞質部位においてホスホランパンと機能的相互作用を持つ事が示された。両トランスジェニックマウスは、SERCA2a の過剰発現に伴い共に *in vitro* 及び *in vivo* の検討で収縮性と拡張性が亢進している事が示された。次いで両トランスジェニックマウスを圧負荷モデルを用いて心肥大における SERCA2a とホスホランパンの相互作用の病態学的意義を検討した。野生型 SERCA2a のトランスジェニックマウスはコントロールとに比して心肥大に差を認めなかったが、変異型の SERCA2a のトランスジェニックマウスにおいては圧負荷による心肥大が有意に抑制され、本相互作用を抑制する事により生体内において心肥大の形成が抑制される事が示された。さらに心肥大が抑制された機序を検討するために、プロテインキナーゼ C の活性化を圧負荷前後の心臓において検討した。野生型の SERCA2a のトランスジェニックマウスでは、カルシウム依存性のプロテインキナーゼ C の活性化は圧負荷前後においてコントロールと差を認めなかったが、変異型の SERCA2a のトランスジェニックマウスにおいてはカルシウム依存性のプロテインキナーゼ C の活性化が有意に抑制されており、心肥大が抑制された機序としてカルシウム依存性心肥大関連分子の抑制が示唆された。本研究により、SERCA2a とホスホランパンの相互作用を抑制することにより、心機能の亢進と圧負荷による心臓のリモデリングの抑制が同時に起こる事が明らかとなった。この結果は、学位の授与に値すると考えられる。