

## &lt;研究課題&gt;

## 虚血性心疾患における新規時計調節因子の役割

代表研究者 神戸学院大学薬学部 助教 平岡 義範  
 共同研究者 京都大学大学院医学研究科 特定准教授 西 英一郎  
 神戸学院大学薬学部 教授 久米 典昭

## 【まとめ】

我々が作製した NRDC 欠損マウス (NRDC<sup>-/-</sup>) に心筋梗塞モデルを作成したところ、顕著な梗塞領域の減少が観察された。NRDC<sup>-/-</sup>の心臓では PER2 の発現増加に加えて、HIF-1 $\alpha$ およびその下流の解糖系関連遺伝子群の発現増加が認められた。したがって、NRDC は PER2 および HIF-1 $\alpha$ の安定性制御を介して、虚血時の心筋細胞における代謝リプログラミングを制御している可能性が示唆された。(未発表)。

## 1. 研究の目的

虚血性心疾患は成人の死亡原因の上位に入る重要な疾患である。一方、現代人は概日リズムを乱しやすい社会環境に置かれており、概日リズムの異常が虚血性心疾患、代謝性疾患、がんなど、様々な疾患と関連していることが示唆されているが、その詳しいメカニズムは明らかにされていない。

我々の同定したメタロプロテアーゼ nardilysin (N-arginine dibasic convertase ; NRDC) は、主に細胞質に存在する可溶性のタンパク質であるが、非常にユニークな細胞局在を呈する。シグナルペプチドを持たないにもかかわらず、非古典的な分泌経路を介して細胞外に放出され、その一部は細胞表面に留まる。これまでの研究で NRDC は細胞表面では増殖因子 HB-EGF など広範な膜タンパク質のシェディング活性化因子として働くことを *in vitro* で明らかにした(文献 1-4)、さらに作製した NRDC 欠損マウス (NRDC<sup>-/-</sup>) の解析から、炎症性サイトカイン TNF- $\alpha$  やアミロイド前駆体タンパク質 (APP) のシェディング調節を介して、癌やアルツハイマー病の病態生理において重要な働きをしていることを *in vivo* でも明らかにした(文献 5-7)。一方、NRDC は明確な核移行シグナルを持たないにもかかわらず、細胞質と核の

間をシャトリングすることが報告されており、最近、我々は NRDC が核では転写調節因子として働くことを明らかにした。具体的には、NRDC<sup>-/-</sup>は寒冷環境下 (4 $^{\circ}$ C) では体温を維持できなかったことから、寒冷環境下の適応熱産生を担う褐色脂肪組織 (BAT) を解析したところ、NRDC は核で転写コアクチベーター PGC-1 $\alpha$  と結合して、熱産生を司る脱共役タンパク質 UCP1 の発現を制御し、寒冷環境下の熱産生に必須であることを明らかにした(文献 8)。以上述べたように、NRDC は細胞局在に依存した多機能性(図 1、細胞表面:シェディング調節、核内:転写調節)を有することが分かってきており、この多機能性が NRDC<sup>-/-</sup>の多彩な表現型(低体温、成長遅延、行動異常など)の原因になっているものと考えられる。

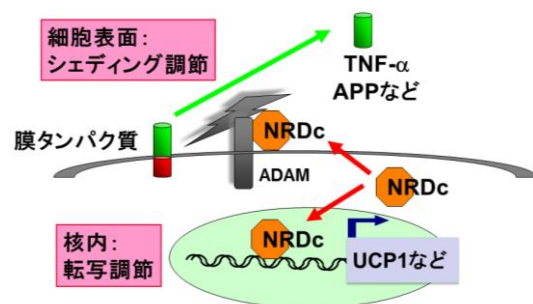


図1. NRDCの細胞局在に依存した多機能性

今回、NRDC<sup>-/-</sup>の行動解析を行い、概日リズム周期を測定したところ、NRDC<sup>-/-</sup>は野生型マウス (NRDC<sup>+/+</sup>) と比べて有意に短周期であったことから、NRDC は新規の時計調節因子であることが明らかになった(未発表)。そこで、予備実験で、NRDC と時計タンパク質との複合体形成を検討したところ、NRDC は時計タンパク質の一つ PER2 と複合体を形成することが分かった。また、NRDC と PER2 のリン酸化酵素

の一つカゼインキナーゼ 1 (CK1) との複合体形成を検討したところ、NRDc は CK1 とも複合体を形成することが分かり、NRDc は PER2 の翻訳後修飾を介して概日リズムを制御している可能性が示唆された。

一方、NRDc<sup>+/+</sup>と NRDc<sup>-/-</sup>に心筋梗塞モデルを作成したところ、NRDc<sup>-/-</sup>において顕著な梗塞領域の減少が認められた。虚血時の NRDc<sup>-/-</sup>の心臓では PER2 の発現が増加しており、これまで、PER2 は虚血時に心保護的に働くという報告があることから、NRDc は PER2 制御を介して、虚血性心疾患を制御している可能性が示唆された。したがって、本研究は下記の 2 つを具体的な目的とし、検討を行った。

1-1 NRDc による概日リズム制御機構の解明

1-2 NRDc による虚血性心疾患制御機構の解明

## 2. 研究方法と経過

2-1 NRDc による概日リズム制御機構の検討

1) NRDc と時計タンパク質との複合体形成の検討

COS7 細胞に NRDc と時計タンパク質 (CLOCK、BMAL1、PER2、CRY2) を強発現し、免疫沈降法 (IP) により、NRDc と時計タンパク質との複合体形成を検討する。

2) NRDc とカゼインキナーゼ 1 (CK1) との複合体形成の検討

COS7 細胞に PER2 のリン酸化酵素の一つ CK1 (CK1δ、および、CK1ε) を強発現し、免疫沈降法 (IP) により、複合体形成を検討する。

3) NRDc による PER2 安定性制御の検討

PER2 および高濃度の CK1 (1.5μg) 存在下で、COS7 細胞に NRDc を強発現し、NRDc による PER2 のリン酸化、分解の違いを検討する。

2-2 NRDc による虚血性心疾患制御機構の検討

1) 心筋梗塞モデル実験

12 週齢の NRDc<sup>+/+</sup>と NRDc<sup>-/-</sup>の冠動脈を結紮して虚血後、解除する方法により、急性心筋梗塞モデルを作製し、梗塞領域の比較を行う。また、虚血心における PER2、および、低酸素誘導性因子 1α (hypoxia-inducible factor-1α : HIF-1α) の発現をウエスタンブロットにより検討し、HIF-1α 下流の解糖系関連遺伝子群 {グルコースの取り込みに関与する glucose transporter 1 (GLUT1)、ピルビン酸を乳酸へ変換する lactate dehydrogenase A (LDHA)、ピルビン酸からアセチル CoA への変換を阻害する pyruvate dehydrogenase (PDH) kinase 1 (PDK1) など (図 2)} の発現はリアルタイム PCR により検討する。

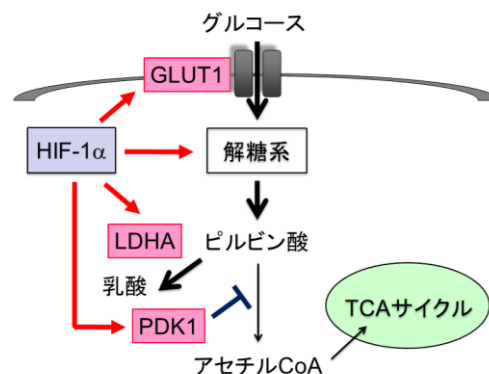


図2. HIF-1α下流の解糖系関連遺伝子群

2) 単離心筋細胞を用いた検討

NRDc<sup>+/+</sup>と NRDc<sup>-/-</sup>の心臓から心筋細胞を単離して低酸素条件下で培養し、PER2、HIF-1α、および、その下流の解糖系関連遺伝子群の発現をウエスタンブロット、および、リアルタイム PCR により検討する。

3. 研究の成果

3-1 NRDc と時計タンパク質との複合体形成の検討

COS7 細胞に NRDc と時計タンパク質を強発現させ、IP により複合体形成を検討したところ、NRDc は PER2 と複合体を形成することが分かった。PER2 は CK1 によりリン酸化された後、ユビキチン-プロテアソーム系で分解されることが知られている。そこで、“NRDc は PER2

の翻訳後修飾を制御し、PER2の安定性を調節している”という仮説を立て、まず、NRDcとCK1の複合体形成の検討を行った。COS7細胞にNRDcとCK1(CK1 $\delta$ , CK1 $\epsilon$ )を強発現させ、IPにより両者の複合体形成を検討したところ、NRDcはCK1 $\delta$ およびCK1 $\epsilon$ と複合体を形成することが分かった。また、NRDc/PER2/CK1をCOS7に強発現させ、IPにより複合体形成を検討したところ、NRDc/PER2/CK1の三者が複合体を形成することも分かった。次に、PER2および高濃度のCK1存在下で、NRDcを強発現し、PER2の安定性を検討したところ、CK1単独よりも、NRDcが存在する方が、PER2分解が亢進する結果が得られた。以上の結果から、NRDcはPER2安定性の調節を介して、概日リズムを制御している可能性が示唆された。(未発表)。

### 3-2 NRDcによる虚血性心疾患制御機構の検討

NRDc<sup>+/+</sup>とNRDc<sup>-/-</sup>に心筋梗塞モデルを作成したところ、NRDc<sup>-/-</sup>はNRDc<sup>+/+</sup>と比べて顕著な心筋梗塞領域の減少が観察された。また、NRDc<sup>-/-</sup>の虚血心ではPER2、および、HIF-1 $\alpha$ の発現が増加していた。さらに、リアルタイムPCRでHIF-1 $\alpha$ 下流の解糖系関連遺伝子群(GLUT1、LDHA、PDK1など)の発現を検討したところ、NRDc<sup>-/-</sup>で有意な発現増加が認められた。一方、単離心筋細胞(NRDc<sup>+/+</sup>、NRDc<sup>-/-</sup>)を低酸素条件下で培養した場合も、虚血心と同様、NRDc<sup>-/-</sup>ではPER2の発現増加、HIF-1 $\alpha$ およびその下流の解糖系関連遺伝子群の発現が増加する傾向が見られた。以上の結果から、NRDcはPER2およびHIF-1 $\alpha$ の安定性制御を介して、虚血時の心筋細胞における代謝リプログラミングを制御している可能性が示唆された。(未発表)

### 4. 今後の課題

前述したように、NRDc<sup>-/-</sup>に心筋梗塞モデルを作成したところ、顕著な梗塞領域の減少が見られたが、NRDc<sup>-/-</sup>は生後3日以内に7~8割が死亡してしまうこと、また生き残ったNRDc<sup>-/-</sup>もNRDc<sup>+/+</sup>に比べて顕著に身体が小さいこと(文献7)から、実験結果に大きなばらつきがあるという問題点がある。現在、我々はNRDc

floxedマウスの作製に成功していることから、今後、 $\alpha$ MHC-Creマウスとの交配により、心筋特異的NRDc欠損マウスを作製して検討する予定である。

### 5. 研究成果の公表方法

「NRDcによる概日リズム制御機構」についてはThe Journal of Biological Chemistryに投稿予定で、「NRDcによる虚血性心疾患制御機構」についてはCirculationに投稿予定である。

### 【参考文献】

1. Nishi E, Prat A, Veronique H, Elenius K. and Klagsbrun M. N-arginine dibasic convertase is a specific receptor for heparin-binding EGF-like growth factor that mediates cell migration *EMBO J.* 20: 3342-50, 2001.
2. Nishi E, Hiraoka Y, Yoshida K, Okawa K. and Kita T. Nardilysin enhances ectodomain shedding of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor through activation of TNF- $\alpha$  converting enzyme, *J. Biol. Chem.* 281: 31164-31172, 2006.
3. Hiraoka Y, Ohno M, Yoshida K, Okawa K, Tomimoto H, Kita T. and Nishi E. Enhancement of  $\alpha$ -secretase cleavage of amyloid precursor protein by a metalloendopeptidase nardilysin. *J. Neurochem.* 102: 1595-1605, 2007.
4. Hiraoka Y, Yoshida K, Ohno M, Matsuoka T, Kita T. and Nishi E. Ectodomain shedding of TNF- $\alpha$  is enhanced by nardilysin via activation of ADAM proteases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 370: 154-158, 2008.
5. Kanda K, Komekado H, Sawabu T, Ishizu S, Nakanishi Y, Nakatsuji M, Akitake-Kawano R, Ohno M, Hiraoka Y, Kawada M, Kawada K, Sakai Y, Matsumoto K, Kunichika M, Kimura T, Seno H, Nishi E and Chiba T. Nardilysin and ADAM proteases promote gastric cancer cell growth by activating intrinsic cytokine signaling via enhanced ectodomain shedding of TNF- $\alpha$ . *EMBO Mol. Med.* 5: 396-411, 2012.
6. Ohno M, Hiraoka Y, Lichtenthaler SF, Nishi K,

- Saijo S, Matsuoka T, Tomimoto H, Araki W, Takahashi R, Kita T, Kimura T and Nishi E. Nardilysin prevents amyloid plaque formation by enhancing  $\alpha$ -secretase activity in an Alzheimer's disease mouse model. **Neurobiol. Aging.** 35: 213-222, 2014.
7. Ohno M, Hiraoka Y, Matsuoka T, Tomimoto H, Takao K, Miyakawa T, Oshima N, Kiyonari H, Kimura T, Kita T and Nishi E. Nardilysin regulates axonal maturation and myelination in the central and peripheral nervous system. **Nat. Neurosci.** 12: 1506-1513, 2009.
8. Hiraoka Y, Matsuoka T, Ohno M, Nakamura K, Saijo S, Matsumura S, Nishi K, Sakamoto J, Chen PM, Inoue K, Fushiki T, Kita T, Kimura T and Nishi E. Nardilysin maintains body temperature homeostasis via regulation of central set point, insulation and adaptive thermogenesis. **Nat. Commun.** 5:3224, 2014. doi: 10.1038/ncomms4224.

以上