幼少期の心機能を制御する新しい Ca^{2+} 調節タンパク質の発見とその分子機構

中村(西谷)友重, 若林 繁夫

国立循環器病研究センター研究所・分子生理部

Keywords :

 Ca^{2+} sensor, Ca^{2+} regulation, excitation-contraction coupling, immature heart, cardiac hypertrophy**Role of Neuronal Calcium Sensor-1 as a Regulator of Immature Heart Function and Cardiac Hypertrophy**

Tomoe Y. Nakamura-Nishitani, Shigeo Wakabayashi

Department of Molecular Physiology, National Cerebral and Cardiovascular Center, Osaka, Japan

Calcium (Ca^{2+}) is an important intracellular messenger that regulates myocyte contraction via excitation-contraction (E-C) coupling and gene transcription underlying cardiac hypertrophy. The mechanisms of E-C coupling in immature hearts are believed to be different from those in adult hearts because of the structural immaturity of the sarcoplasmic reticulum (SR) and T-tubules in an immature heart; however, the details of these mechanisms are not completely understood. Neuronal Ca^{2+} sensor-1 (NCS-1) is an EF-hand Ca^{2+} -binding protein, which is an important regulator of neuronal functions. Although NCS-1 is expressed in high levels in immature hearts, only little is known about its cardiac functions. In this study, two novel functions of NCS-1 in cardiac tissue was discovered by characterizing the cardiac phenotypes of knockout (*Ncs1*^{-/-}) mice. NCS-1 was found to be a regulator of contraction in immature hearts and that of hypertrophy in adult hearts. NCS-1 promotes Ca^{2+} release from the inositol trisphosphate receptors (IP₃Rs), followed by Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II signaling, which results in a large increase in the SR Ca^{2+} content in an immature heart. In addition, NCS-1 expression increased during the early stages of hypertrophy in the adult heart; and phenylephrine-induced cardiac hypertrophy was largely attenuated in *Ncs1*^{-/-} hearts. Our results revealed a novel mechanism of E-C coupling in immature hearts and another regulatory mechanism involved in the progression of receptor stimulation-elicited cardiac hypertrophy.

要 旨

心臓の収縮や心肥大・心不全の発症を調節するものとして、細胞内カルシウム(Ca^{2+})の増減が重要なカギとなっている。しかし、胎児期や幼少期などの未成熟期の心臓では、細胞内 Ca^{2+} 貯蔵装置である筋小胞体(SR)の構造が成体と比べはるかに未発達であることから、どのように Ca^{2+} による収縮調節を行っているのか不明な点が多かった。今回、特に未成熟期の心臓に高発現する Ca^{2+} 結合タンパク質(Neuronal Ca^{2+} Sensor-1: NCS-1)に注目し、遺伝子欠損(KO)マウスを解析した結果、NCS-1 が幼少期の構造的な未熟さを補う新しい心筋収縮調節タンパク質であることを見出した。詳しい解析から、NCS-1 は細胞内に Ca^{2+} を放出するイノシトール三リン酸(IP₃)受容体と協同して Ca^{2+} シグナルを増強させることにより、幼少期の心筋収縮に寄与することを明らかにした¹⁻³⁾。また、NCS-1 は幼少期のみならず心肥大の際にも発現量が上昇し、心肥大を調節することがわかった。本稿では、心臓における NCS-1 を介した細胞内シグナルとその役割について、最近の知見をもとに概説する。

特別寄稿：第 16 回日本小児心血管分子医学研究会特別講演より

2013 年 12 月 16 日受付 別刷請求先：〒 565-8565 大阪府吹田市藤白台 5-7-1

2014 年 2 月 14 日受理 国立循環器病研究センター研究所・分子生理部 中村(西谷)友重

成体心筋における興奮収縮連関 (E-C カップリング)

心臓は、主に心筋細胞とそれ以外の線維芽細胞などから構成されているが、成体の心筋細胞は、核、ミトコンドリア以外に筋原線維と呼ばれる収縮性の細胞内小器官、網目状の発達した筋小胞体(SR)、そしてT管と呼ばれる細胞膜が陥入してできた管状の膜構造から成り立っている(Fig. 1A)。T管はSRと各所で接触しているため、細胞膜の活動電位を速やかにSRに伝達し、筋原線維が一斉に収縮を引き起こすのに効率のよい構造をとっている。成体心筋におけるE-Cカップリングの機構をまとめると、まず心筋細胞に活動電位が発生すると、T管に局在する電位依存性L-タイプカルシウム(Ca^{2+})チャネルが開口し Ca^{2+} が流入する。これが引き金となってSRから Ca^{2+} 遊離チャネルであるリアノジン受容体(RyR)を通して大量の Ca^{2+} が放出され(Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release), 大きな細胞内 Ca^{2+} の増加が認め

られる。この Ca^{2+} が筋原線維の中のトロポニンCと結合し、筋収縮が起こる。その後、 Ca^{2+} は再びSRに取り込まれるか、 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換輸送体(NCX)により細胞外へとくみ出され、筋弛緩が生じる。このように、成体ではSRが収縮のための主な Ca^{2+} 供給源であり、SR依存的なE-Cカップリングの機構が存在する(Fig. 1B)。

幼少期と成体の心臓の違い

一方、胎児期や幼少期などの未成熟期では、心筋細胞の微細構造、ならびに細胞内 Ca^{2+} 濃度調節を行うタンパク質の発現様式が成体とは異なることが報告されている。このことから成体とは異なるE-Cカップリングの機構が存在するのではないかと考えられているが、詳細は不明である

たとえばFig. 2Aは、成体および生後1週齢の幼少期マウスの心筋細胞のT管を染色したものである(ここでは、マウスを用いた実験系において、生後1日目か

Fig. 1 The structure and the proposed mechanism of excitation-contraction (E-C) coupling in adult cardiomyocytes.
A: Heart and cardiomyocytes: structure.
B: E-C coupling mechanism of mature cardiomyocytes.
Ica: L-type Ca^{2+} channels, RyR: Ryanodine receptor, SERCA: sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase, PLB: phospholamban, NCX: $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger

Fig. 2 Structural differences observed between adult and neonatal mouse cardiomyocytes.
A: T-tubule staining with di-8-ANEPPS of ventricular myocytes from adult and 1-week-old mice.
B: Ultrastructure of cardiomyocytes from adult and 1-day-old mice.
Note that immature cardiomyocytes have less T-tubules and SR.

ら2週齢までを“幼少期”，また生後6週齢以降を“成体”と呼ぶこととする）。成体でははっきりとした $2\mu\text{m}$ 毎の繰り返し構造が認められるのに対し，幼少期ではほとんどT管が認められない。またさらに詳細な電顕像で，成体では数多く認められたSRが，生後1日目のマウスでは非常にまばらであり，また筋原線維の配列も不整であることがわかった(Fig. 2B)。これらの微細構造の違いから，幼少期マウスの心筋細胞ではSRに依存したE-Cカップリングは起こりにくいのではないかと予測される。さらに，胎児期，幼少期などの未成熟期では，種々の Ca^{2+} 濃度調節タンパク質の発現パターンが異なることが知られている⁴⁾。たとえば，成体においてE-Cカップリングの主要な役割を担うL-タイプ Ca^{2+} チャネルやRyRの発現は胎児期や出生直後では低く，逆にT-タイプ Ca^{2+} チャネルやNCXの発現量は高い。実際，NCXの Ca^{2+} 流入モードの活性化により出生直後の心筋が収縮したこと⁵⁾，胎児期や出生直後では，SRからの Ca^{2+} 放出よりもNCXなどを介した形質膜からの Ca^{2+} 流入が心筋収縮により大きな寄与をするのではないかと考えられてきた。しかし，それ以降の幼少期では，T管やSRの構造が未発達であるにもか

わらず，SRからの Ca^{2+} 遊離を阻害すると収縮が障害されることから，SRがやはり収縮のための大きな Ca^{2+} 供給源であることは疑いない。このことは，幼少期には構造的な未熟さを補う未知なる調節因子が存在することを示唆している。本研究により，幼少期に高発現する Ca^{2+} 結合タンパク質(Neural Ca^{2+} Sensor-1: NCS-1)が，その調節因子の一つであることが明らかとなった^{1,2)}。

NCS-1 とは

心臓において，細胞内 Ca^{2+} はさまざまな生体応答のキー因子である。しかし，多くのタンパク質は単独では Ca^{2+} に結合することはできないため，カルモジュリンなどの Ca^{2+} 結合タンパク質との結合を介して，細胞内 Ca^{2+} 濃度変化を感知し，収縮や遺伝子発現などを調節している。

NCS-1は，このような Ca^{2+} 結合タンパク質の一つであるが，すべての組織に普遍的に存在するカルモジュリンとは異なり，神経をはじめとする興奮性組織に特に高発現している。そのため，その役割も興奮性細胞

特異的な機能の調節に関わっていると考えられる。分子量 22kDa の小さなタンパク質で、分子内に 4 つの EF ハンド (Ca^{2+} 結合) モチーフを持つ。アミノ末端は脂質修飾 (ミリスチル化) されており、膜への結合に必須とされている (Fig. 3A)。

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性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。また、NCS-1 はシグナル伝達で重要な役割を担うイノシトールリン酸化酵素 PI4K の活性化や、さまざまなイオンチャネルの活性制御⁶⁾を介して神経の興奮性を調節し、シナプスの可塑性や記憶などにも関与していることが報告されている³⁾。私たちは、障害を受けた神経の生存率を上げる働きがあることを報告している⁷⁾。さらに、NCS-1 は神経のみならず、未成熟期の心筋においても高発現することを見出していたが⁸⁾、心臓における NCS-1 の役割については全く不明であった。

幼少期の心筋における NCS-1 の役割

NCS-1 の心臓における役割、特に幼少期における役割を明らかにするため、各発達段階における発現量を比較したところ、NCS-1 は胎児期や幼少期などの未成熟期に発現量が高く、次第に減少していくことがわかった (Fig. 3B)。また NCS-1 は、生後マウスの心筋細胞内で形質膜および核膜周辺のほか、SR などの Ca^{2+} シグナル関連部位に集積していたことから、NCS-1 が幼少期の心筋細胞の Ca^{2+} シグナル調節に関与していることが示唆された。

NCS-1 の心臓における役割を明らかにするため、全身遺伝子欠損 (KO) マウス (Fig. 3C inset) を用い種々の解析を行った。興味深いことに、KO 群では出生したマウスの 30% が生後 4 日目までに死亡した (Fig. 3C)。また心エコーにより心機能を解析した結果、生後 2 週齢の幼少期のマウスでは、左室の収縮率が顕著に低下していた (Fig. 3D)。一方、6 週齢の成体マウスでは、WT と KO で収縮率に違いは認められなかった。次に、幼少期マウスの心機能低下の原因として、細胞内 Ca^{2+} トランジェントに違いがあるか WT と KO で比較したところ、KO 心筋では収縮期における Ca^{2+} レベルが顕著に低下していた (Fig. 3E)。また、SR の Ca^{2+} 貯留量も WT と比べかなり低くなっていた (Fig. 3E)。すなわち KO 心筋は、SR の Ca^{2+} 貯留量が低下することにより、細胞内 Ca^{2+} トランジェントおよび筋収縮力が低下していると考えられたので、次にどのような機序で SR の Ca^{2+} 貯留量が低下しているのかを解析した。

SR の Ca^{2+} 貯留量は、SR から Ca^{2+} を放出する RyR および SR へ Ca^{2+} を取り込む Ca^{2+} ポンプの活性によって決まる。また SR Ca^{2+} ポンプの活性は、その調節タンパク質であるフォスフォランバン (PLB) のリン酸化の程度によって決まるが、そのリン酸化を起こす酵素は Ca^{2+} /カルモジュリン依存性キナーゼ II (CaMKII) あるいは PKA である。PLB がこれらリン酸化酵素によりリン酸化されれば SR Ca^{2+} ポンプの活性が高くなり、その結果 SR の Ca^{2+} 貯留量が高くなる。詳しい解析から、KO 心筋では、PLB の CaMKII によるリン酸化量が顕著に低下しており、また実際、CaMKII のリン酸化そのものも、さらに SR Ca^{2+} ポンプ活性も低下していることがわかった。一方、心筋内のほかの多くの Ca^{2+} 関連タンパク質、たとえば電位依存性 L-タイプ Ca^{2+} チャネル、T-タイプ Ca^{2+} チャネル、NCX、カルセクエストリンなどの量は WT と KO 間で差は認められなかった¹⁾。以上の結果から、NCS-1 は心筋において CaMKII を活性化し、CaMKII による PLB のリン酸化を介して SR Ca^{2+} ポンプ活性を上昇させ、SR Ca^{2+} 貯留量を上昇させることにより、構造的に未熟な SR でありながらも細胞内 Ca^{2+} レベルおよび心筋収縮力を上昇させているのではないかと考えられた (Fig. 4A)。

次に、NCS-1 がどのようにして CaMKII を活性化するのかについて、NCS-1 の標的タンパク質を探索した。細胞内 Ca^{2+} レベルを上昇させ、しかも NCS-1 と結合するタンパク質として、イノシトール三リン酸 (IP_3) 受容体が有力な候補として浮上した。 IP_3 受容体は、RyR と同じく SR 上の Ca^{2+} 遊離チャネルであるが、心筋においては RyR と比べ発現量が顕著に低いため、その役割が長らく不明であった。しかし近年、 IP_3 受容体は未成熟心筋の発生や、心肥大・心不全に関連することが報告されている⁹⁻¹¹⁾。 IP_3 受容体は 1～3 の 3 つのアイソフォームが存在するが、タイプ 1 がほとんどすべての細胞に存在するのに対し、タイプ 2 が心筋の主要なアイソフォームである。最近、NCS-1 が神経において IP_3 受容体タイプ 1 と結合することが報告されていることから、心筋でも同様な NCS-1 との相互作用が起こるか検討した。その結果、NCS-1 と IP_3 受容体 (タイプ 1 と 2) は Ca^{2+} 依存的に免疫沈降した。また、脂質二重膜を用いた IP_3 受容体タンパク質の再構築系において、精製 NCS-1 タンパク質の添加は、 IP_3 受容体チャネルの開閉確率を増加させることが報告されているが^{12, 13)}、実際、KO 心筋を用いた系で、 IP_3 受容体刺激による Ca^{2+} 上昇が軽減された¹⁾。さらに、NCS-1、 IP_3 受容体、CaMKII を高発現させた細胞系において、 IP_3 受容体アゴニストによってリン酸化 CaMKII の量が顕著に上昇し、それ

Fig. 3 Characterization of NCS-1 deficient mice.

A: The schematic structure of NCS-1.

B: The expression levels of NCS-1 during the development of the mouse heart. E14, 14-day-old embryos; P4, 4-day-old neonates; 1 to 3 w, 1 to 3 week-old juveniles; and 1 to 2 m, 1- to 2-month-old adults.

C: Survival curve of KO mice indicating reduced survival rate.

D: M-mode echocardiographic images from 2-week-old mice. LVIDd and LVIDs indicate left ventricular diastolic and systolic internal dimension, respectively.

E: Electrical stimulation-elicited Ca^{2+} transients measured with Fluo-4 AM. Caffeine-induced Ca^{2+} transients (shown inside the dotted circles) were also measured to estimate the SR Ca^{2+} -content. Panels B-E are reprinted from the Circ Res 2011; 109: pp512-523.

Fig. 4 Role of NCS-1 in the heart.

A: NCS-1 acts as a positive regulator of contraction in an immature heart.

B: The expression level of various genes (NCS-1, IP₃Rs, CaMKII, etc.) upregulated during the development increases at cardiac hypertrophy.

C: Phenylephrine-induced cardiac hypertrophy was largely attenuated in the KO mice. Reprinted from the Circ Res 2011; 109: pp512-523.

が IP₃ 受容体阻害剤で抑制された¹⁾。以上の結果より、NCS-1 が心筋において IP₃ 受容体のチャネル活性を亢進させ、引き続き CaMKII を活性化させていることが明らかとなった (Fig. 4A)。このような、幼少期マウスにおける NCS-1、IP₃ 受容体、CaMKII の機能連関による心筋収縮力の増大は、これらすべてのタンパク質が幼少期にそろって高発現していること¹⁾からも理解できる。また、培養マウス心筋細胞では自動拍動の際の細胞内 Ca²⁺ トランジェントは KO に比べて WT のほうが大きい⁸⁾、CaMKII の阻害剤添加により KO なみに減少した¹⁾。すなわち WT と KO の細胞内 Ca²⁺ トランジェントの差は、CaMKII 活性に依存していることから、NCS-1、IP₃ 受容体、CaMKII の機能連関の存在が示唆される。一方、成体心筋では SR や T 管が発達し、これらタンパク質に依存しなくても効率のよい E-C カップリングを行えるため、WT と KO マウスで心筋収縮力に

あまり差が認められなかったのではないかと推測できる。

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、その多くが心肥大の際にも誘導され心肥大形成を調節することが知られている¹⁴⁾ (Fig. 4B)。NCS-1 が肥大大心筋において発現量が亢進し、さらに IP₃ 受容体も心肥大に寄与することから⁹⁾、次に NCS-1 と心肥大との関連について検討した。

その結果、① NCS-1 は、心肥大誘発因子であるフェニレフリンやエンドセリン 1 により、発現量が上昇し¹⁾、また② NCS-1 の KO 心臓ではフェニレフリン刺激による心肥大が抑制された (Fig. 4C)。以上の結果は、NCS-1 が IP₃ 受容体活性化などを介してホルモン刺激

による心肥大を亢進させることを強く示唆している。

このように、いくつかの Ca^{2+} 結合タンパク質は心肥大に関与していることが報告されている。たとえば S100B と呼ばれる Ca^{2+} 結合タンパク質は、心筋梗塞の際に細胞外に分泌され心肥大を抑制する¹⁵⁾。一方、CIB1 と呼ばれる Ca^{2+} 結合タンパク質は、カルシニューリンと相互作用することにより心肥大を亢進させる¹⁶⁾。興味深いことに、CIB1 は NCS-1 と同様に未成熟期と心肥大の際、高発現している。

以上のように、NCS-1、 IP_3 受容体、CaMKII の 3 者は、いずれも未成熟期および心肥大の際に発現量が増加することから、これらの時期に共通した Ca^{2+} 制御のメカニズムが存在するのかもしれない。

おわりに

KO マウスを用いた研究により、NCS-1 の心筋における機能が初めて明らかとなった。NCS-1 は、幼少期の心筋の Ca^{2+} シグナルを増加させ、収縮機能を亢進させる¹⁾。幼少期の心臓は、T 管や SR が成体と比べ、はるかに未発達であるにもかかわらず SR に依存した E-C カップリングが行われていることから、幼少期特有の未知なる Ca^{2+} シグナル調節機構の存在が予測されていた。本研究により、その 1 つとして NCS-1、 IP_3 受容体、CaMKII の 3 者の機能連関によって成立する巧妙な機構が幼少期に存在することが示唆された。すなわち、幼少期の心筋ではこの 3 者が高発現し、NCS-1 が IP_3 受容体を活性化することにより局所の心筋 Ca^{2+} シグナルが増加する。これが CaMKII を活性化する Ca^{2+} 供給源となり、下流のシグナルの活性化 (CaMKII による PLB のリン酸化 → SR Ca ポンプ活性の上昇 → SR Ca^{2+} 貯留量の上昇) により、グローバルな細胞内 Ca^{2+} トランジェントが増加し心筋収縮力を増加させるのではないかと考えられる (Fig. 4A)。この研究によって、今まであまり研究がなされていなかった幼少期の E-C カップリングの機構に新たな 1 ページを加えることができたと思われる。なお、胎児期、生後直後に高発現し、この時期の Ca^{2+} トランジェントへの関与が高いと報告されている T-タイプ Ca^{2+} チャネルや NCX などの発現量は、今回、WT と KO で大きく差はなかったものの、NCS-1 との物理的・機能的相互作用に関しては今後の課題である。

一方、NCS-1 は幼少期の心機能亢進作用のみならず、病的な心肥大が形成される時期にも発現量が増加し、病態にも寄与することを私たちは明らかにした¹⁾。これらの知見は、小児科領域の心臓生理を理解するのみな

らず、病的な心肥大を軽減する薬物開発にも役立つ可能性がある。この研究を契機に、広く心筋 Ca^{2+} シグナル調節機構についてさらなる理解を深めていきたい。

謝 辞

IP_3 受容体 1 ～ 3 のクローンの提供、ならびに IP_3 受容体を用いた実験に関してご助言をいただいた、理化学研究所脳科学総合研究センターの御子柴克彦先生、また NCS-1 の KO マウスの共同入手に関わった Andreas Jeromin 博士に、深く感謝いたします。

【参考文献】

- 1) Nakamura TY, Jeromin A, Mikoshiba K, et al: Neuronal calcium sensor-1 promotes immature heart function and hypertrophy by enhancing Ca^{2+} signals. *Circ Res* 2011; **109**: 512-523
- 2) Nakamura TY, Wakabayashi S: Role of neuronal calcium sensor-1 in the cardiovascular system. *Trends Cardiovasc Med* 2012; **22**: 12-17
- 3) Nakamura TY, Wakabayashi S: Diverse functions of neuronal calcium sensor-1 (NCS-1) in excitable cells. *Trends in Cell & Molecular Biology* 2012; **7**: 99-110
- 4) Wetzel GT, Klitzner TS: Developmental cardiac electrophysiology recent advances in cellular physiology. *Cardiovasc Res* 1996; **31**: E52-E60
- 5) Haddock PS, Coetzee WA, Cho E, et al: Subcellular $[\text{Ca}^{2+}]_i$ gradients during excitation-contraction coupling in newborn rabbit ventricular myocytes. *Circ Res* 1999; **85**: 415-427
- 6) Nakamura TY, Pountney DJ, Ozaita A, et al: A role for frequenin, a Ca^{2+} -binding protein, as a regulator of Kv4 K^+ -currents. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; **98**: 12808-12813
- 7) Nakamura TY, Jeromin A, Smith G, et al: Novel role of neuronal Ca^{2+} sensor-1 as a survival factor up-regulated in injured neurons. *J Cell Biol* 2006; **172**: 1081-1091
- 8) Nakamura TY, Sturm E, Pountney DJ, et al: Developmental expression of NCS-1 (frequenin), a regulator of Kv4 K^+ channels, in mouse heart. *Pediatr Res* 2003; **53**: 554-557
- 9) Kocksamper J, Zima AV, Roderick HL, et al: Emerging roles of inositol 1,4,5-trisphosphate signaling in cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 2008; **45**: 128-147
- 10) Uchida K, Aramaki M, Nakazawa M, et al: Gene knock-outs of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors types 1 and 2 result in perturbation of cardiogenesis. *PLoS One* 2010; **5**
- 11) Nakazawa M, Uchida K, Aramaki M, et al: Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors are essential for the development of the second heart field. *J Mol Cell Cardiol* 2011; **51**: 58-66
- 12) Schlecker C, Boehmerle W, Jeromin A, et al: Neuronal calcium sensor-1 enhancement of InsP3 receptor activity is

- inhibited by therapeutic levels of lithium. *J Clin Invest* 2006; **116**: 1668-1674
- 13) Zhang K, Heidrich FM, DeGray B, et al: Paclitaxel accelerates spontaneous calcium oscillations in cardiomyocytes by interacting with NCS-1 and the InsP3R. *J Mol Cell Cardiol* 2010; **49**: 829-835
- 14) Heineke J, Molkentin JD: Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006; **7**: 589-600
- 15) Tsoporis JN, Marks A, Haddad A, et al: S100B expression modulates left ventricular remodeling after myocardial infarction in mice. *Circulation* 2005; **111**: 598-606
- 16) Heineke J, Auger-Messier M, Correll RN, et al: CIB1 is a regulator of pathological cardiac hypertrophy. *Nat Med* 2010; **16**: 872-879