

activation of a futile protein turnover cycle. *Cell Metab* 6: 181-194, 2007.

44. **Shimizu N, Ouchida R, Yoshikawa N, Hisada T, Watanabe H, Okamoto K, Kusuhara M, Handa H, Morimoto C, and Tanaka H.** HEXIM1 forms a transcriptionally abortive complex with glucocorticoid receptor without involving 7SK RNA and positive transcription elongation factor b. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 8555-8560, 2005.
45. **Stojadinovic O, Lee B, Vouthounis C, Vukelic S, Pastar I, Blumenberg M, Brem H, and Tomic-Canic M.** Novel genomic effects of glucocorticoids in epidermal keratinocytes: inhibition of apoptosis, interferon-gamma pathway, and wound healing along with promotion of terminal differentiation. *J Biol Chem* 282: 4021-4034, 2007.
46. **Sun H, Sheveleva E, Xu B, Inoue H, Bowden TG, and Chen QM.** Corticosteroids induce COX-2 expression in cardiomyocytes: role of glucocorticoid receptor and C/EBP-beta. *American journal of physiology* 295: C915-922, 2008.
47. **Testa M, Rocca B, Spath L, Ranelletti FO, Petrucci G, Ciabattini G, Naro F, Schiaffino S, Volpe M, and Reggiani C.** Expression and activity of cyclooxygenase isoforms in skeletal muscles and myocardium of humans and rodents. *J Appl Physiol* 103: 1412-1418, 2007.
48. **Walker BR.** Glucocorticoids and cardiovascular disease. *Eur J Endocrinol* 157: 545-559, 2007.
49. **Wang JC, Shah N, Pantoja C, Meijsing SH, Ho JD, Scanlan TS, and Yamamoto KR.** Novel arylpyrazole compounds selectively modulate glucocorticoid receptor regulatory activity. *Genes Dev* 20: 689-699, 2006.
50. **Wang L, Feng ZP, and Duff HJ.** Glucocorticoid regulation of cardiac K⁺ currents and L-type Ca²⁺ current in neonatal mice. *Circulation research* 85: 168-173, 1999.
51. **Whitehurst RM, Jr., Zhang M, Bhattacharjee A, and Li M.** Dexamethasone-induced hypertrophy in rat neonatal cardiac myocytes involves an elevated

L-type Ca(2+)current. *J Mol Cell Cardiol* 31: 1551-1558, 1999.

52. **Yoshikawa N, Makino Y, Okamoto K, Morimoto C, Makino I, and Tanaka H.** Distinct interaction of cortivazol with the ligand binding domain confers glucocorticoid receptor specificity: cortivazol is a specific ligand for the glucocorticoid receptor. *J Biol Chem* 277: 5529-5540, 2002.

53. **Yoshikawa N, Yamamoto K, Shimizu N, Yamada S, Morimoto C, and Tanaka H.** The distinct agonistic properties of the phenylpyrazolosteroid cortivazol reveal interdomain communication within the glucocorticoid receptor. *Molecular endocrinology* 19: 1110-1124, 2005.

Figure Legends**Fig. 1. Characterization of endogenous GR in rat cardiomyocytes and effects of synthetic and endogenous corticosteroids.**

A, subcellular localization of GR in neonatal rat cardiomyocytes. After treatment of the cardiomyocytes with or without 100 nM of each corticosteroid for 1 h as indicated, cytosolic extracts (C) and nuclear extracts (N) were prepared, Western immunoblotting for GR were performed, and signal intensity of the band for GR relative to that for α -actinin of each extract was quantified as described in Materials and Methods. Mean \pm SEM of three independent experiments and representative photographs are shown. *, $P < 0.05$ vs. cytosolic extract treated with vehicle. **, $P < 0.05$ vs. nuclear extracts treated with vehicle. CVZ, cortivazol; COR, corticosterone; ALD, aldosterone.

B, effect of corticosteroids on GRE-dependent reporter gene expression in neonatal rat cardiomyocytes. The cardiomyocytes were transfected with 2 μ g of reporter plasmids p2xGRE-LUC and treated with 100 nM of each ligand as indicated in the presence (gray boxes) or absence (white boxes) of 10 μ M RU486 for 24 h. Results are expressed as relative expression levels to the vehicle treated samples and mean \pm SEM of three independent experiments are shown. *, $P < 0.05$ vs. cells treated with vehicle. **, $P < 0.05$ vs. RU486 (-).

C, ligand specificity of rat GR and MR – nuclear translocation. COS7 cells expressing either FLAG-tagged rat GR or MR were cultured with or without 100 nM of each ligand as indicated for 2 h, and immunofluorescent analysis was performed as described in Materials and Methods. Experiments were repeated three times with almost identical results and representative results are shown.

D, ligand specificity of rat GR and MR – reporter gene assay. COS7 cells were cotransfected with 2 μ g of reporter plasmids p2xGRE-LUC and 100 ng of either

p3xFLAG-rGR or p3xFLAG-rMR, and were cultured with 100 nM of each ligand as indicated in the presence (gray boxes) or absence (white boxes) of 10 μ M RU486 for 24 h. Results are expressed as relative light units (RLU) per μ g of protein in the extract and mean \pm SEM of three independent experiments are shown. *, $P < 0.05$ vs. cells treated with vehicle. **, $P < 0.05$ vs. RU486 (-).

Fig. 2. Venn diagrams of corticosteroid-induced (A) or -repressed (B) genes and Gene Ontology analysis (C).

A, B, Venn diagrams. After isolation of total RNA from neonatal rat cardiomyocytes treated with either CVZ, COR, or ALD, with or without RU486, DNA microarray analysis was performed and data mining was done as described in Materials and Methods. Venn diagrams illustrate the overlaps in CVZ, COR, and ALD target genes. The category numbers (C1 to C14) and the number of up-regulated (> 1.5 fold vs. vehicle, panel A) and down-regulated (< 0.5 fold vs. vehicle, panel B) genes are depicted (See Table 1 and Supplemental Table 1 for details).

C, Gene Ontology. The gene set induced by each corticosteroid was functionally classified according to Gene Ontology (GO) terms by using ExPain software as described in Materials and Methods, and results are shown as a boxed chart.

Fig. 3. Time course of mRNA expression of glucocorticoid-regulated genes in rat cardiomyocytes.

Total RNA was isolated from neonatal rat cardiomyocytes after treatment with 100 nM CVZ (circles), COR (squares), or ALD (triangles) for the indicated time periods, and was analyzed in qRT-PCR as described in Materials and Methods. mRNA expression levels were normalized to *Gapdh* and relative expression levels to the 0 h samples are presented, and

mean±SEM of three independent experiments are shown. *, $P < 0.05$ vs. cells treated with each ligand at 0 h.

Fig. 4. KLF15 is a GR-target gene involved in amino acid catabolic pathway in rat cardiomyocytes.

A, time course of mRNA expression of KLF15 and its target genes. Total RNA was isolated from neonatal rat cardiomyocytes after treatment with 100 nM of CVZ (circles), COR (squares), or ALD (triangles) for the indicated time periods, and was analyzed in qRT-PCR as described in Materials and Methods. mRNA expression levels were normalized to *Gapdh*, and relative expression levels to the 0 h samples are presented, and mean±SEM of three independent experiments are shown. *, $P < 0.05$ vs. cells treated with each ligand at 0 h.

B, concentration-dependent regulation of KLF15 gene expression by glucocorticoids. Total RNA was isolated from neonatal rat cardiomyocytes after treatment with the indicated concentrations of CVZ (circles) or COR (squares) for 3 h. mRNA expression levels were normalized to *Gapdh* and relative expression levels to the vehicle-treated samples are presented, and mean±SEM of three independent experiments are shown. *, $P < 0.05$ vs. cells treated with vehicle.

C, effect of GR knockdown on glucocorticoid-dependent induction of mRNA expression of KLF15 and BCAT2. The cardiomyocytes were transfected with control siRNA or siRNA oligonucleotides for GR, KLF15 as indicated and cultured for 24 h. Then, the cells were treated with vehicle or 100 nM CVZ for 12 h and total RNA was analyzed with qRT-PCR. Results were normalized to *Gapdh*, and relative expression levels to vehicle-treated samples are presented and mean±SEM of three independent experiments are shown. *, $P < 0.05$ vs. vehicle-treated cells.

D, Western blot analysis for KLF15 protein. Control siRNA, siRNA against GR

(si-GR), siRNA against KLF15 (si-KLF15), Cre-expressing adenoviruses (Ad-Cre, MOI=5), and floxed FLAG-tagged KLF15-expressing adenoviruses (Ad-KLF15, MOI=10) were introduced into cardiomyocytes and were cultured in the presence or absence of 5 μ M MG132 for 12 h as indicated. Then, whole cell extracts were prepared and Western immunoblot was performed with anti-KLF15 antibodies (*left and right panels*) and anti-FLAG antibodies (*middle panel*). Experiments were repeated three times with almost identical results and representative photographs are shown.

E, induction of mRNA expression of BCAT2 and GLUT4 by KLF15. Ad-Cre and Ad-KLF15 were infected into rat cardiomyocytes as indicated and the cells were cultured for 24 h. Total RNA was prepared and analyzed with qRT-PCR. Results were normalized to *Gapdh* and results are expressed as relative expression levels to Ad-KLF15(-) cells, and mean \pm SEM of three independent experiments are shown. *, $P < 0.05$ vs. Ad-KLF15(-) cells.

Fig. 5. Effects of glucocorticoid on intracellular concentration of amino acids.

A, overexpression of KLF15 reduces intracellular concentration of BCAA in cardiomyocytes. Ad-Cre and Ad-KLF15 were infected into cultured rat cardiomyocytes and the cells were cultured with fresh medium for 24 h. Measurement of amino acid concentration was performed as described in Materials and Methods and results are presented with mean \pm SEM of three independent experiments. *, $P < 0.05$ vs. Ad-KLF15(-) cells.

B, glucocorticoid differentially modulates amino acid concentration in rat cardiomyocytes. The cardiomyocytes were transfected with siRNA oligonucleotides for KLF15 (K) or control (C) as indicated and cultured for 24 h. Then, the cells were treated with vehicle or 100 nM CVZ for 24 h. Results are presented with mean \pm SEM of three independent experiments. *, $P < 0.05$ vs. vehicle-treated cells.

Fig. 6. Glucocorticoids regulate prostaglandin metabolism in the cardiomyocytes.

A, time course of mRNA expression of *Ptgs2* (cyclooxygenase-2; COX-2) and *Pla2g4a* (cytoplasmic phospholipase A2; PLA2) in neonatal rat cardiomyocytes. The cells were cultured in the presence of each ligand for the indicated time periods, and mRNA expression of COX-2 and PLA2 was determined with qRT-PCR as described in Materials and Methods. mRNA expression levels were normalized to *Gapdh* mRNA and relative expression levels to the vehicle-treated samples at each time point are presented as fold (mean \pm SEM of three independent experiments are shown). RU, RU486. *, $P < 0.05$ vs. cells treated with vehicle.

B, concentration-dependent regulation of *Ptgs2* and *Pla2g4a* gene expression by glucocorticoids. Total RNA was isolated from neonatal rat cardiomyocytes after treatment with the indicated concentrations of CVZ (circles) or COR (squares) for 3 h, and analyzed in qRT-PCR as described in Materials and Methods. *, $P < 0.05$ vs. cells treated with vehicle.

C, effect of GR knockdown on glucocorticoid-dependent induction of mRNA expression of COX-2 and PLA2. Neonatal rat cardiomyocytes were transfected with siRNA oligonucleotide for GR or control siRNA as indicated and cultured for 24 h. Then, the cells were treated with vehicle or 100 nM CVZ and COR for 12 h. Total RNA was prepared and analyzed with qRT-PCR. *, $P < 0.05$ vs. vehicle-treated cells.

D, effects of glucocorticoids on COX-2 protein expression in neonatal rat cardiomyocytes. Rat cardiomyocytes (left panel) or cardiac fibroblasts (right panel) were treated with vehicle or 10 ng/ml IL-1 β , 100 ng/ml lipopolysaccharide (LPS), 100 nM each of estradiol (E2), progesterone (PROG), CVZ, COR, ALD, or 10 μ M RU486 (RU). Whole cell extracts were prepared and 10 μ g of protein was separated in SDS-PAGE. Protein expression of COX-2 and α -actinin was analyzed in Western blot as described in Materials and Methods.

Experiments were repeated 3 times with almost identical results and representative results are shown.

Table 1. Classification of corticosteroid-induced and -repressed genes in DNA microarray analysis

Number of up-regulated genes							
Category	Total	CVZ		COR		ALD	
		RU-sensitive	RU-insensitive	RU-sensitive	RU-insensitive	RU-sensitive	RU-insensitive
C1	180	164	16	0	0	0	0
C2	30	0	0	19	11	0	0
C3	16	0	0	0	0	8	8
C4	103	98	5	82	21	0	0
C5	3	0	0	1	2	2	1
C6	12	8	4	0	0	6	6
C7	56	53	3	42	14	23	33
Total	400	323	28	144	48	39	48

Number of down-regulated genes							
Category	Total	CVZ		COR		ALD	
		RU-sensitive	RU-insensitive	RU-sensitive	RU-insensitive	RU-sensitive	RU-insensitive
C8	44	38	6	0	0	0	0
C9	4	0	0	2	2	0	0
C10	1	0	0	0	0	0	1
C11	6	6	0	4	2	0	0
C12	0	0	0	0	0	0	0
C13	1	0	1	0	0	0	1
C14	1	0	1	0	1	0	1
Total	57	44	8	6	5	0	3

This table depicts the number of genes grouped by the category classified in Venn diagrams as shown in Fig. 2 together with the presence or absence of antagonism by RU486 (RU-sensitive or -insensitive, respectively) for up-regulated (> 1.5 fold) or down-regulated (< 0.5 fold) genes in DNA microarray analysis as described in Materials and Methods. The definition of "RU486-sensitive" is $([X+RU486]-1)/([X]-1) < 0.5$, and that of "RU-insensitive" is $([X+RU486]-1)/([X]-1) > 0.5$ (X is either CVZ, COR, or ALD, and figures in the square brackets depict fold induction in Supplemental Table 1).

Table legends for supplementary materials

Supplemental Table 1. Corticosteroid-induced or -repressed genes and the effect of RU486 pretreatment in neonatal rat cardiomyocytes

The table lists such genes, expression of which were significantly induced (> 1.5 fold change) or repressed (< 0.5 fold change) after treatment with the indicated corticosteroids, in DNA microarray analysis as described in Materials and Methods. Category column indicates the cluster number in Fig. 2A (C1 to C7) or Fig. 2B (C8 to C14). $[X]/[X+RU]$ (X is either CVZ, COR, or ALD) column denotes the value of induction ratio with X vs. vehicle treatment (left) and $X+RU486$ vs. vehicle treatment (right). The cells colored with light blue indicate such genes, expression of which was antagonized by RU486 ($([X+RU]-1)/([X]-1)$ is less than 0.5). The cells colored with red indicate genes without antagonistic effect of RU486 ($([X+RU]-1)/([X]-1)$ is more than 0.5). When the value is $0.5 \leq [X] \leq 1.5$, $[X]$ is blank and the cells are colored with yellow.

Supplemental Table 2. The gene sets categorized into major cellular functions according to Gene Ontology

The significantly induced genes by each corticosteroid are functionally classified according to Gene Ontology (GO) terms as described in Materials and Methods.

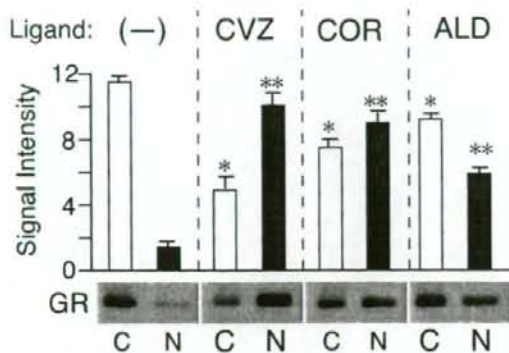
Supplemental Table 3. The gene list of Ingenuity networks generated by mapping the focus genes regulated by glucocorticoid in rat cardiomyocytes

The gene networks of the gene set regulated by COR and CVZ (categories 4 and 7 in Table 1) were generated by Ingenuity Pathways Analysis software. Each potential network is given a score, which is a probabilistic fit between the networks and a list of biological functions

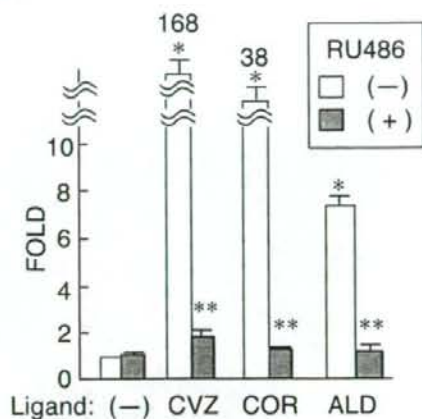
stored in the Ingenuity Pathways Knowledge Base. These scores are used to rank the networks. A score > 10 was considered significant and networks with score > 10 are listed.

Fig.1

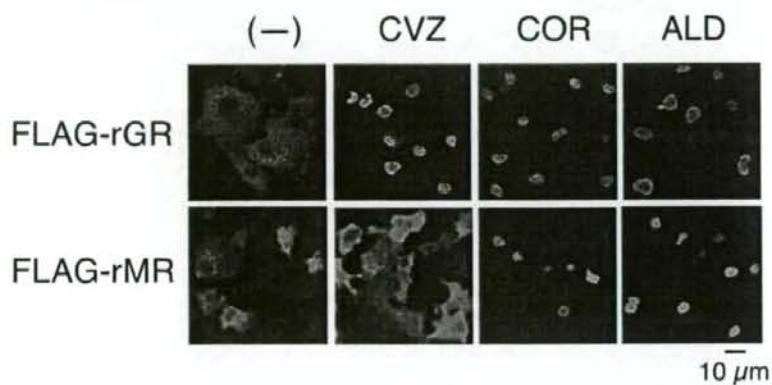
A



B



C



D

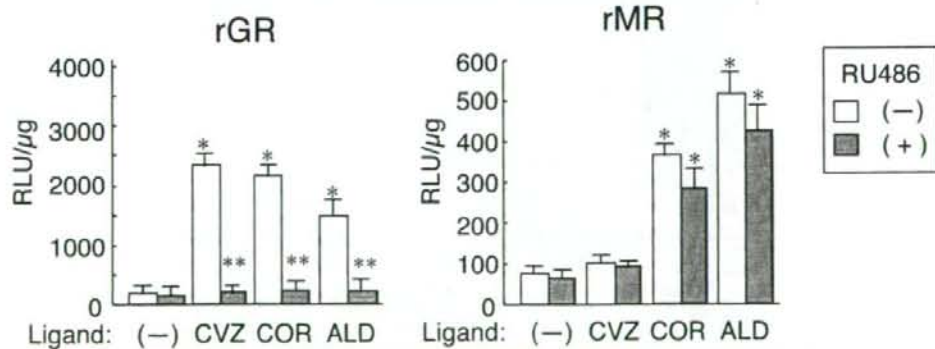
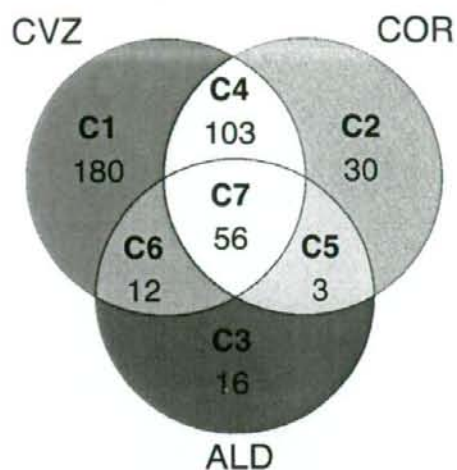
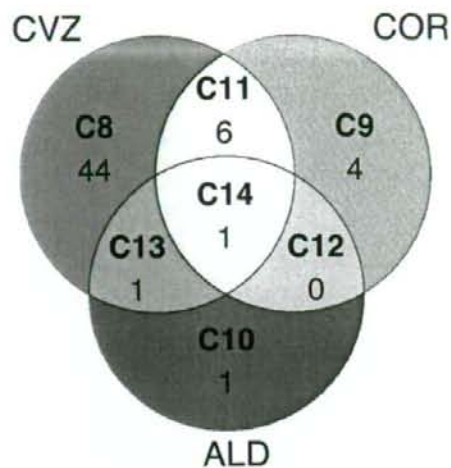


Fig. 2

A Up-regulated genes



B Down-regulated genes



C

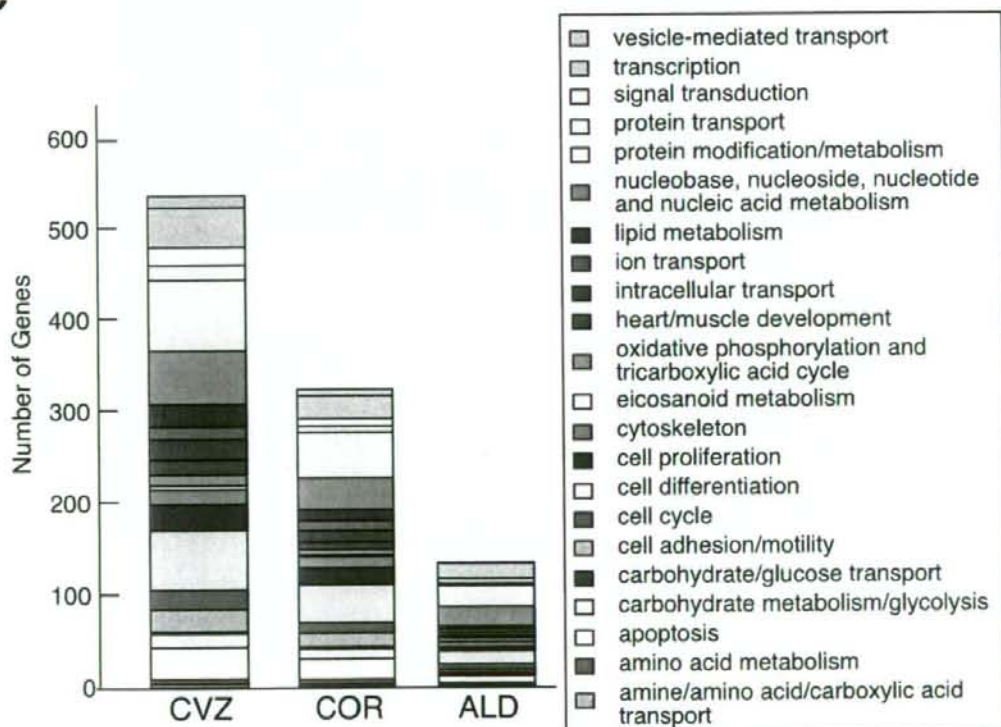


Fig. 3

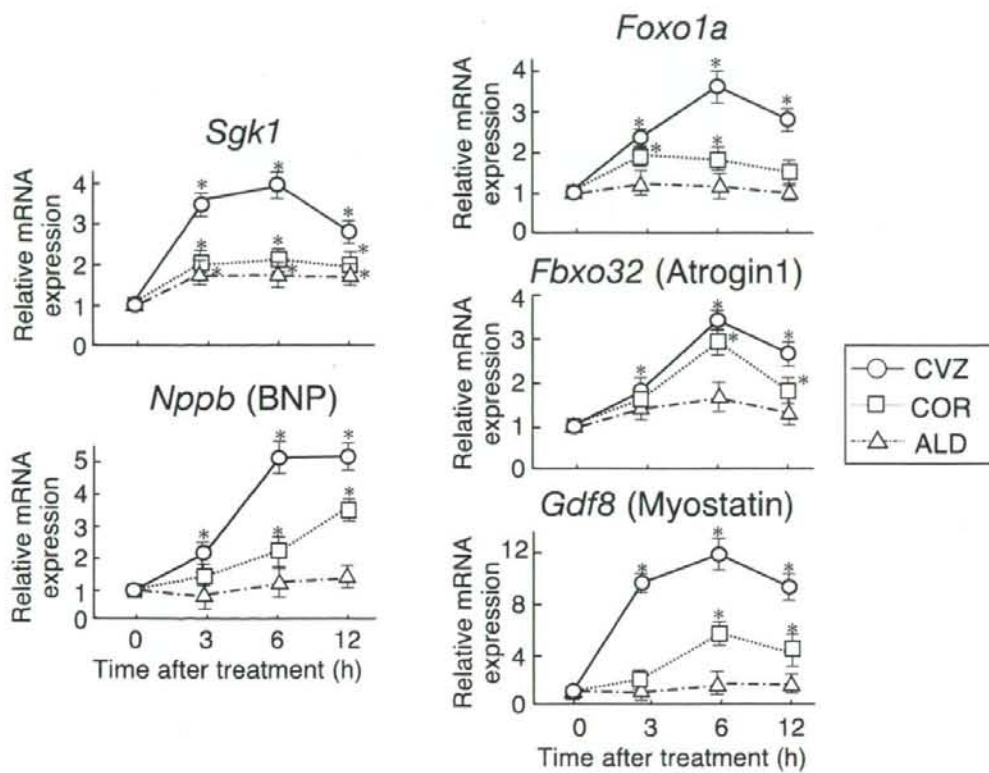
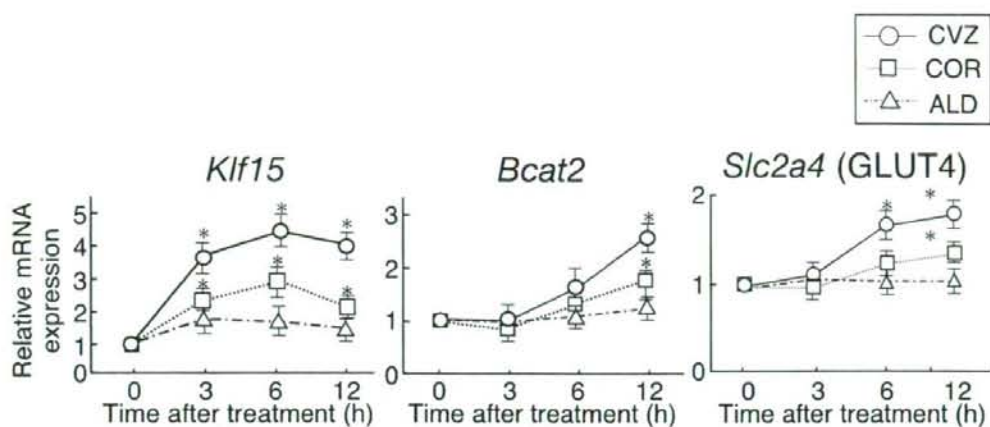
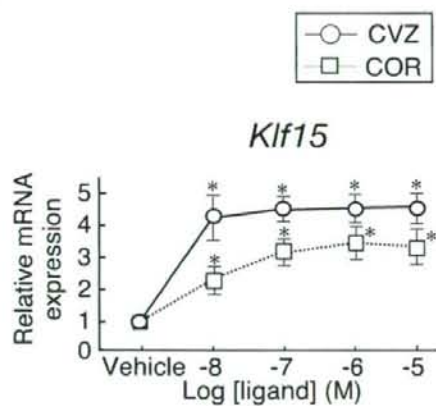


Fig. 4

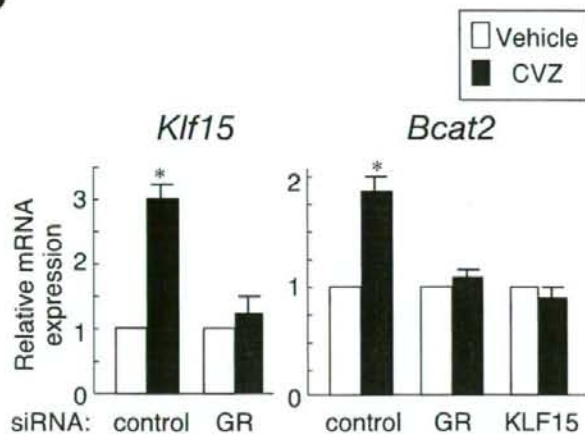
A



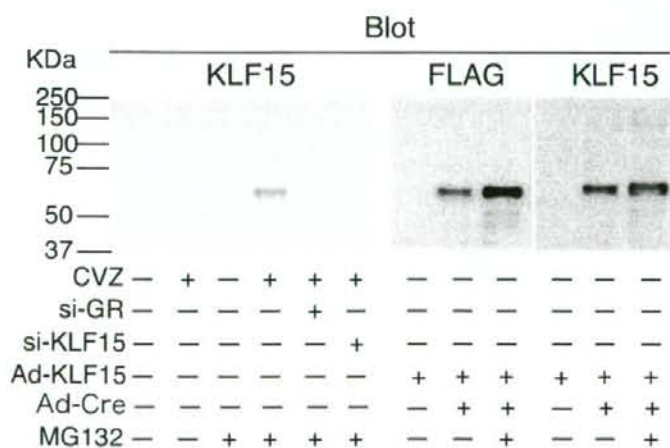
B



C



D



E

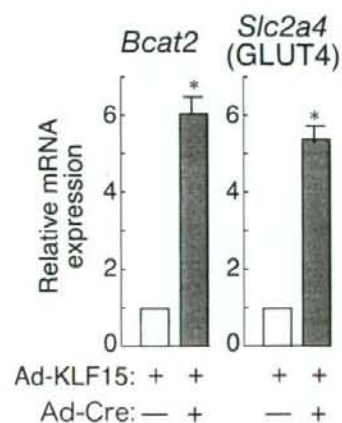
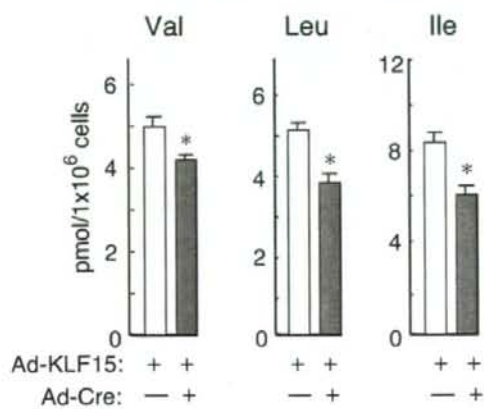


Fig. 5

A



B

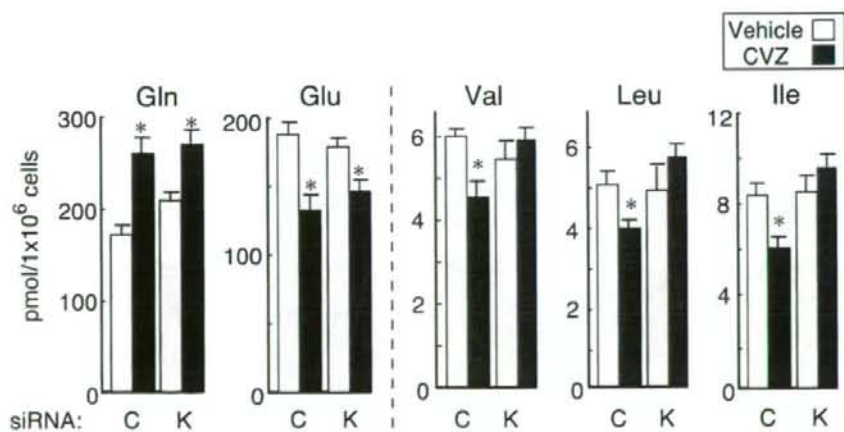
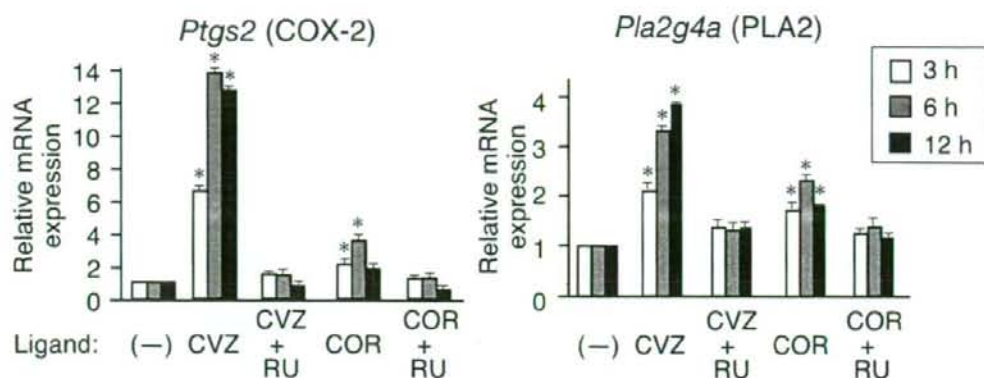
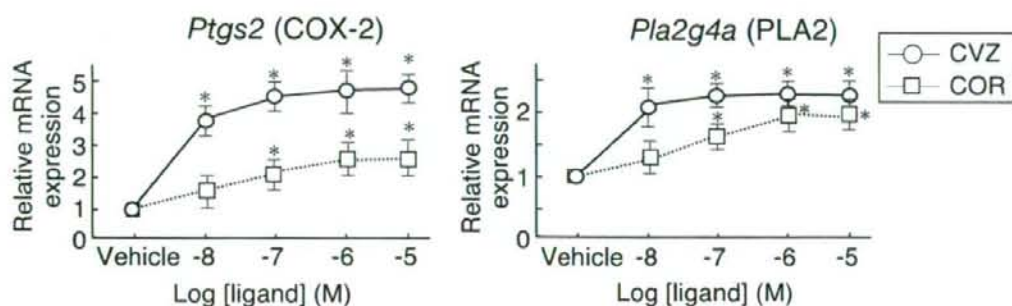


Fig. 6

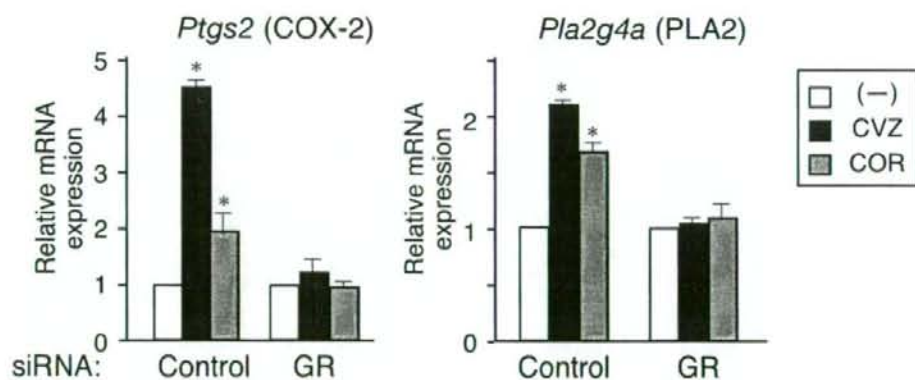
A



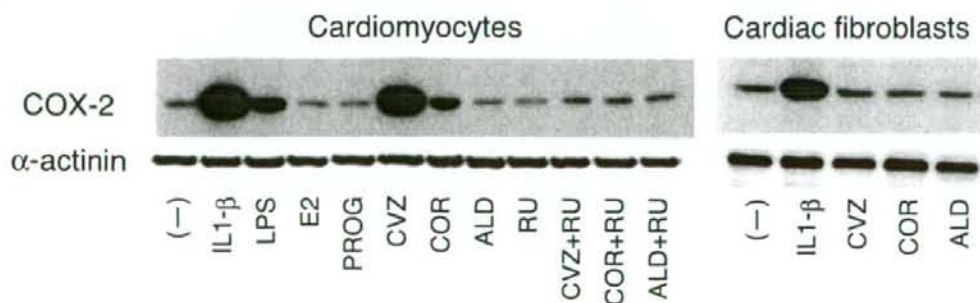
B



C



D



新しい心不全治療の標的分子としての Cdk9 の役割とその活性制御機構

Activity Control Mechanism and Pathophysiological Significance of Cdk9 as a Novel Therapeutic Target of Heart Diseases

佐野元昭, 清水宣明, 吉川賢忠, 徳留さとと, 田中廣壽, 福田恵一

Motoaki Sano, Noriaki Shimizu, Noritada Yoshikawa, Satori Tokudome, Hirotohi Tanaka, Keiichi Fukuda

Cdk-9はRNAポリメラーゼIIのC末端ドメイン(CTD)のリン酸化を介してmRNA合成を包括的に活性化させ心筋細胞肥大を惹起しているだけでなく、転写レベルでのミトコンドリアエネルギー代謝制御因子であるPGC-1 α の発現を抑制することによってエネルギー産生障害を引き起こし、心不全への進展にも深く関与している可能性が示唆される。このCdk9の活性は7SK snRNAを介するHEXIM1/2タンパク質との結合・解離によって制御されている。心臓に対する血行力学的なストレスによって活性化されているCdk9が心不全の発症を予防・遅延させうる新規治療戦略の標的分子となりうるか、筆者らの実験結果を踏まえて考察する。



RNAポリメラーゼII, 転写伸長, Cdk9, 心不全, HEXIM1/2, グルココルチコイド受容体

はじめに

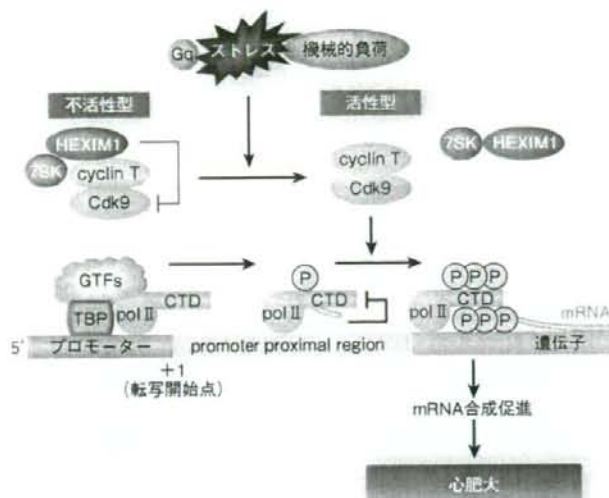
心臓を構成している心筋細胞は高度に特殊化した細胞であり、生後まもなく分裂能力を失う。また、心臓局所あるいは骨髄由来の幹細胞から新たに心筋細胞を再生する能力は限られている。したがって、持続性の高血圧や心筋梗塞による作業心筋の喪失に基づく血行力学的負荷に対して心臓は、新しい心筋細胞を作って心筋細胞の数を増やすのではなく、すでに存在する個々の心筋細胞容積の増大、すなわち“肥大”という形で反応する¹⁾。この心筋肥大反応は従来、物理的に壁厚の増大によって心筋壁応力を軽減するための適応反応と見なされてきた。しかし、肥大した心筋は、収縮力低下から内腔の拡大、壁のひ薄化を来し早晩心不全へと移行する。また、疫学的調査結果からも心肥大が心不全や心臓突然死の発症を増加させる独立した危険因子であることが示されてきた。したがって、心肥大が必ずしも血行力学的な負荷に対する適応反応ではなく、心疾患の予後に悪影響を及ぼす不適切な反応で、それ自体が治療の対象になりうると思われる。

心筋細胞の肥大、すなわち個々の心筋細胞容積の増大という現象は細胞あたりのRNA/タンパク質量の増加の結果、引き起こされると考える。しかし、これまで心肥大において観察される細胞あたりのRNA/タンパク質量の増加の分子メカニズムは十分に理解されていなかった。

I CTDのリン酸化を介した RNAポリメラーゼIIの転写機能制御

発生段階あるいは臓器特異的遺伝子発現は、主として“転写因子”によって制御されている。転写因子が標的遺伝子のプロモーター上に結合することによってクロマチン構造のリモデリングが起こり、メディエーター複合体の動きを介してRNAポリメラーゼIIが基本転写因子とともにプロモーター上に取り込まれ、転写が開始されるという現象は広く知られている。しかし、これら一連の出来事は遺伝子の発現過程においてはプロローグにすぎない。その後の長い転写伸長反応(RNA鎖をつないでいく反応)と終結反応、さらにこれらと同時に進行するpre-mRNAのプロセッシング(キャップ形成、スプライシング、ポリアダニル化)の段階を経て成熟したmRNAが合成されていく。近年、この転写の伸長段階における遺伝子発現制御に関してかなり研究が進んできた。そして、この転写の伸長段階における遺伝子発現制御の鍵を握っているのがRNAポリメラーゼIIのC末端ドメイン(C-terminal domain: CTD)と呼ばれるドメインである。

RNAポリメラーゼIIは12個のサブユニットからなる0.5MD以上の巨大な複合体であるが、その最大サブユニットRpb1のCTDには7つのアミノ酸(Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser)の単位がヒトではじつに52回も繰り返された特殊な構造が存在している。このCTDの7つのアミノ酸の反復構造の中で特に2番目と5番目のセリンが転写伸長反応の進行過程で2つのcyclin依存性キナーゼによって順次リン酸化を受け、このリン酸化されたCTDを足場として様々な転写制御因子が取り込まれることによって、転写伸長反応や



■図1 Cdk9は心肥大反応に必須のRNAポリメラーゼIIリン酸化酵素である。心肥大刺激は内因性Cdk9阻害物質である7SK snRNA (7SK small nuclear RNA)/HEXIM1を解離させることによってCdk9を活性化する。活性化されたCdk9はCTDをリン酸化することによってRNAポリメラーゼII (pol II)を活性化する。

mRNAのプロセッシングが制御されているというモデルが提唱されている³⁾。

簡単に説明すると、まず非リン酸化型のRNAポリメラーゼIIがプロモーター上に取り込まれて転写開始前複合体を形成し転写が開始する。転写開始直後にRNAポリメラーゼIIのCTDの7つのアミノ酸の反復構造の中で5番目のセリンが基本転写因子TF II HのCdk7によってリン酸化される。mRNA鎖が50bpほど合成されたところで陰性の転写伸長因子の働きによってRNAポリメラーゼIIはいったんmRNAの合成を休止する (promoter proximal pausing)。この間に5番目のセリンがリン酸化されたCTDを足場としてキャッピング酵素複合体が取り込まれ、作り始められたmRNAの5'側にキャッピングが行われる。その後、陽性転写伸長因子 [pTEFb (positive transcription elongation factor b) (Cdk-9/cyclin T1)] のサブユニットであるCdk-9 (cyclin-dependent kinase-9) によって2番目のセリンがリン酸化されると、陰性転写伸長因子が解離してRNAポリメラーゼIIはmRNAの合成を再開する³⁾。

II 心肥大におけるCdk9の役割

筆者らは心肥大において転写が非特異的に活性化されて

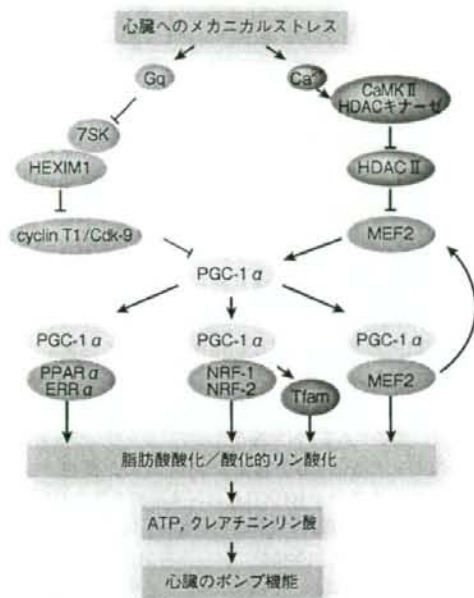
いるという現象を見つけていたが⁴⁾、大動脈縮窄による圧負荷に伴う心肥大やsmall Gタンパク質 (Gq) やカルシニューリンの心筋特異的過剰発現による心肥大モデルマウスにおいて、高度リン酸化型のRNAポリメラーゼIIの比率が増加していることが確認された。CTDのリン酸化は活発にmRNAを合成しているRNAポリメラーゼIIの特徴であるから、この結果は心肥大においてRNAポリメラーゼIIによるmRNA合成能が上昇していることを意味する。さらに、肥大した心筋において高度リン酸化型のRNAポリメラーゼIIの比率が増加に伴って2つのRNAポリメラーゼIIリン酸化酵素Cdk9とCdk7の活性の上昇も認められた。

そこで、培養心筋細胞を用いて、Cdk9とCdk7のRNAポリメラーゼIIリン酸化と心肥大反応への関与を検討した。培養心筋細胞をET-1 (endothelin-1) で刺激すると、RNA

ポリメラーゼIIリン酸化と心筋細胞容積の増大 (心肥大) が観察される。Cdk9阻害剤DRB (5,6-dichloro-1-beta-d-ribofuranosylbenzimidazole) やCdk9の優勢抑制型変異体によってCdk9の活性を抑制すると、ET-1によるRNAポリメラーゼIIリン酸化や心肥大は抑制された。しかし、Cdk7の優勢抑制型変異体によってCdk7の活性を抑制してもRNAポリメラーゼIIリン酸化や心肥大は抑制されなかったことから、Cdk7の活性は少なくとも*in vitro*での系では心筋細胞肥大には関与していないと考えられた。さらに、Cdk9のcyclinパートナーであるcyclin T1を心筋に過剰発現させたトランスジェニック (TG) マウスを作製したところcyclin T1の発現量に比例して心筋Cdk9活性の上昇と心筋肥大を認めたことから、Cdk9の活性化は心肥大の形成に必要なかつ十分であることがわかった³⁾ (図1)。

III 心不全の病態形成におけるCdk9の役割

心肥大反応は、血行力学的負荷に対して心筋壁応力を軽減し、心拍出量を維持するための適応現象 (代償性心肥大) とも見せるが、負荷が取り除かれなければ不可避免的に心不全に陥る。Cdk9は心筋に対する様々なストレス刺激に反応し活性化されるが、その活性は不全心においても高いま



■図2 Cdk9は心臓におけるPGC-1 α の発現を抑制する
心臓におけるPGC-1 α の発現は、Ca²⁺シグナル→CaMK II→HDAC II→MEF2経路によって正に制御されている。病的な心肥大過程においても、Ca²⁺シグナル→CaMK II→HDAC II→MEF2経路は活性化されているにもかかわらず、PGC-1 α の発現は逆説的に減少している。病的な心肥大過程におけるCdk9の活性化は、PGC-1 α の発現を負に制御する。

ま維持され続けている。この現象は病的な心肥大や心不全を早める様々な遺伝子操作マウスモデルだけにとどまらずヒトにおいても確認された。すなわち、拡張型心筋症の患者から抽出された心筋組織において、Cdk9活性が健康心と比べて有意に上昇していた。このことは、Cdk9の活性化が単に心筋細胞肥大を惹起するだけでなく、代償性心肥大から不全心の移行にも深く関与している可能性を示唆している。

Cdk9の活性化がストレス刺激に対する適応反応なのか、あるいは有害な反応なのかを見極めるために負荷をかけた状態でのcyclin T1 TGマウスの心臓を観察した。cyclin T1 TGマウスは負荷がない定常状態では、心筋収縮機能が野生型と同程度に維持されていた。このcyclin T1 TGマウスを心筋特異的Gq-TGマウスと掛け合わせることでGq結合型受容体からのシグナルが恒常的に活性化されているcyclin T1 TGマウスは心筋壁の著明な薄化を呈し、生後4週齢までに全例心不全死した。また、大動脈縮窄による圧負荷をかける術後早期の高い死亡率を呈し生存し得たものは、強い求心性心肥大(心室腔の容積はあまり増加せず心

室壁が肥厚する)と心収縮力の低下を認めた。興味深いことに負荷をかけた状態でのcyclin T1 TGマウスの心筋では、心筋細胞のアポトーシスによる細胞死の増加を認めた。以上の結果から、ストレス刺激下での慢性的なCdk9の活性化が心筋細胞肥大のみならず、心筋収縮力の低下や心筋細胞のアポトーシスに対する感受性の亢進を引き起こし心不全へ進展に重要な役割を果たしていることが推測された⁵⁾。

Cdk9を活性化によって引き起こされるストレス刺激下での心筋収縮不全やアポトーシスによる細胞死に対する感受性亢進の分子生物学的背景を探索するためにマイクロアレイを用いてcyclin T1 TGマウスの遺伝子発現変化を網羅的に解析した。Cdk9の活性化が純粋にすべての遺伝子の転写伸長反応を均等に活性化するだけならば、遺伝子発現様式には影響を及ぼさず包括的にmRNAの合成だけが增加しているという結果が期待された。しかし、実際には、cyclin T1の過剰発現により多彩な遺伝子発現様式の変化が観察された。驚いたことにミトコンドリアにおけるエネルギー代謝を司る遺伝子群、すなわち脂肪酸の β 酸化、TCAサイクル、呼吸鎖に関与する酵素群やミトコンドリアの酸化作用物質、ミトコンドリアDNAの複製・転写に関わる転写因子、ミトコンドリアのリボソームタンパク質などの発現が包括的に抑制されていた。遺伝子発現レベルだけでなく実際にcyclin T1 TGマウスの心臓ではミトコンドリアの呼吸鎖複合体I~Vの酵素活性がすべて有意に低下していた。この潜在的ミトコンドリア機能低下はcyclin T1 TGマウスの心臓がストレスに対して代償不全を引き起こしやすい現象を概念的に説明しようと考えられた。

ミトコンドリアの代謝機能に関与する遺伝情報はミトコンドリアと核のDNA双方にコードされている。ミトコンドリアDNAには13個の電子伝達系に関与する酵素の遺伝子が含まれているだけで、それ以外のエネルギー代謝を司る酵素の遺伝子は核のDNAに組み込まれている。この核内DNAからの遺伝子発現は心筋に豊富に存在する転写活性化因子PGC-1 α (PPAR γ coactivator 1 α)により包括的に制御されている。PGC-1 α の発現は、エネルギー需要の増加に応じて誘導され、心筋細胞では生後の成長過程や生理的運動負荷により発現量が増加することが知られている。PGC-1 α 発現量の増加は心筋エネルギーリザーブを高め、疲れにくく突然の機械的仕事量の増加に耐え得る成熟した心筋細胞を構築する。反対に心肥大や不全心においては、PGC-1 α の発現量が低下していることから、これらの病態で観察される“エネルギー枯渇状態”の形成に深く関わっていることが示唆される。筆者らは、Cdk9の活性化による包括的なミトコンドリア代謝を司る遺伝子群の発現低下がPGC-1 α の機能異常もしくは発現低下によって説明されようと考えた。実際、PGC-1 α の発現はcyclin T1 TGマ