

ADAMファミリータンパク質のドメイン構造

1. はじめに

各種サイトカイン・増殖因子は膜貫通領域を持つ前駆体として細胞表面に発現された後、細胞外プロテアーゼによる切断により活性化され、細胞間のシグナル伝達を担う。ADAM (a disintegrin and metalloproteinase) ファミリータンパク質はこのような細胞表層でのプロテオリシスに関与する分子として知られ、また他方で細胞外環境でのタンパク質間相互作用にも寄与し、発生・分化の過程や様々な病態への関与が示唆されている一群のタンパク質である。哺乳類 ADAM の多くは分子 C 末端側に膜貫通領域を持つ I 型膜タンパク質で、亜鉛イオンを触媒部位に持つプロテアーゼドメイン、血小板凝集阻害物質ディスインテグリンと相似のドメインなど細胞外に特徴的なドメインを持つモジュラータンパク質である。興味深いことにマムシやハブなどの出血性のヘビ毒には膜型 ADAM の細胞外ドメイン部に相当するタンパク質が数多く存在し、これらは出血による主要な致死因子（出血因子）として知られている。最近、筆者らはヘビ毒由来のこれら哺乳類 ADAM ホモログの X 線結晶構造解析に成功した^{1,2)}。本稿では ADAM ファミリーに共通したドメイン構造について紹介する。

2. ADAM ファミリータンパク質

1992年に受精の膜融合に関わる分子として最初の哺乳類由来 ADAM、ファーティリンが報告された³⁾。精子先端の細胞膜に発現するこの分子の中には RGD 配列は含まれないものの、ハブなどの出血性ヘビ毒に見出されたディスインテグリンと非常に相同性の高い領域が含まれ、インテグリンを介した精子-卵間相互作用の可能性に興味を持たれた（特徴的な突き出たループ部に RGD 配列を持つディスインテグリンは血小板上の主要なフィブリノーゲン受容体であるインテグリン α IIb β 3 に結合し、インテグリンへのフィブリノーゲン結合を阻害することで血小板凝集を阻

害すると考えられている)。その後、筋管形成に関わる分子としてファーターリンと非常に良く似たドメイン構造を持つメルトリンが報告された⁴⁾。これらの分子群について当初想定された膜融合への直接関与は証明されていないが、細胞間相互作用に関わる新規タンパク質分子としてのADAMが特徴付けられた。1997年にはTNF- α 切断酵素(TACE)としてADAM17が報告され^{5,6)}、ADAMは各種の増殖因子前駆体やその受容体等の膜タンパク質細胞外ドメイン(エクストドメイン)を切断遊離(シェディング)する酵素として注目されるようになった。現在までに線虫からヒトに至る多細胞生物および分裂酵母で30種を超えるADAM遺伝子が発見され、その内ヒトでは20種の存在が分かっている⁷⁾。他方、ヘビ毒出血因子は1990年前後から様々な種由来のものについて一次構造の決定が相次いでなされた^{8,9)}。触媒部にコラゲナーゼやサーモリシン等、他の亜鉛エンドペプチダーゼと類似の亜鉛配位配列を持つが、それ以外の部分に配列の相同性が見られない。哺乳類ADAM遺伝子の相次ぐクローニングにより、これらヘビ毒のメタロプロテアーゼが哺乳類ADAMと共通の新規の亜鉛エンドペプチダーゼファミリーを形成することが明らかになった。ファミリーの分子群については両者の由来に基づいて reprotolysin あるいは adamalysin, また後述のドメイン構造に由来してMDCタンパク質などとも呼ばれるが、ここでは広く用いられているADAMを用いる。ADAMの亜型として分子内にトロンボスポンジンI型モチーフを持つADAMTS (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif)ファミリーが知られるが、メタロプロテアーゼドメイン以降の分子C末端側のアミノ酸配列の相同性が低く、現状ではADAMと同等のドメイン構造を持つかが明確ではない。したがって、本稿ではADAMTSについては取り扱わない。

3. ADAMのドメイン構造

ADAMは分子N末端より①プロ(P)ドメイン、②メタロプロテアーゼ(M)ドメイン、③ディスインテグリン(D)ドメイン、④システインリッチ(C)ドメインを共通して持ち、膜結合型では⑤EGF様ドメイン、⑥膜貫通領域、⑦細胞内ドメインが続く(図1)。Pドメインは分子成熟に必要なシャペロンの役割とプロテアーゼを不活性に保つ機能を持つが、分泌過程でMドメインとの境界で切断・除去され、ADAMは活性化される。Mドメインは約200アミノ酸から成り、亜鉛イオンに配位する三つのヒスチジンと活性基として機能するグルタミン酸を含む配列

(HEXXHXXGXXHD), Metターンと呼ばれる触媒基を基部から支える保存されたメチオニン残基を持つ。不思議なことにヒトを含め約半数の膜結合ADAMでは実はこの配列が変化しプロテアーゼ活性が消失していると考えられるが、これらプロテアーゼ活性を消失したADAMがどのように機能しているかはほとんど分かっていない。Mドメインの下流には約90アミノ酸から成るディスインテグリン様のDドメインが存在する。Dドメインの下流にはシステインに富んだ約100アミノ酸のCドメインが存在するが、既知の配列との相同性がなく、その機能はほとんど知られていない。多くの膜結合型ADAMは約60アミノ酸から成るEGF様のドメインを介して膜貫通領域へと続くが、ヘビ毒ホモログではMDCドメインのみの可溶型で毒腺中に存在する。膜貫通型の分子C末端の細胞内ドメインは配列の保存性が極めて低く、長さも様々であるが、プロリンに富んだSH3結合モチーフやリン酸化部位が存在し、シグナル伝達を介したプロテアーゼ活性の制御が示唆されている。

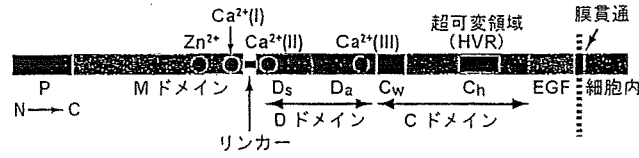
4. VAPの結晶構造解析

我々は北米産ガラガラヘビ(*Crotalus atrox*)毒よりADAMホモログであるVAP1およびVAP2を精製・結晶化し、X線構造解析を行った¹⁰⁾。VAP1はMドメイン同士がジスルフィド結合した二量体であり、VAP2は単量体であるが、基本構造はほとんど同一である。VAPの諸性質についてここでは述べないので原著を参考にして頂きたい¹⁰⁾。VAPは膜結合型ADAMのMDCドメイン相当部分を含み、ヒトの各膜型ADAMとおおよそ40%程度のアミノ酸同一性を持つ。

5. C字型MDCドメイン構造

VAPのX線結晶構造解析から、ADAM分子はM, D, CドメインがアルファベットのC字型に配置した構造を持つことが明らかになった(図2A)。Mドメイン部はヒトADAM33のMドメイン¹¹⁾と基質結合ポケット周辺の若干の違いを除くと主鎖レベルではほぼ同一の構造を持つ。Znイオンを中心とする触媒部はC字型の一端に位置している。D, Cドメイン部分は得られた複数の異なるパッキングの結晶構造の比較から構造的なコアとなる領域とその間の可動部の存在が明らかになり、腕の関節構造に対応させて、ショルダー(D_s)、アーム(D_a)、リスト(C_w)およびハンド(C_h)とサブドメインを定義した。D_s部はMドメイン触媒部の正反対の位置から突き出て、その根元の付

膜結合型 ADAM 前駆体



ヘビ毒タンパク質

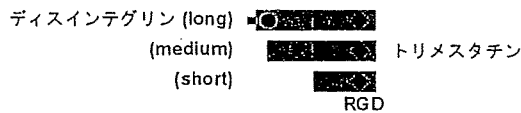
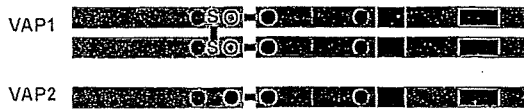


図1 ADAM ファミリータンパク質のドメイン構成
各サブドメインを色分けして示す。亜鉛イオンおよびカルシウムイオン結合領域をそれぞれ赤丸、黒丸で示す。VAP1は例外的に202番目のグルタミン酸がリジンに置き換わっており、カルシウムイオン(I)の位置をリジンのアミノ基が占めている。

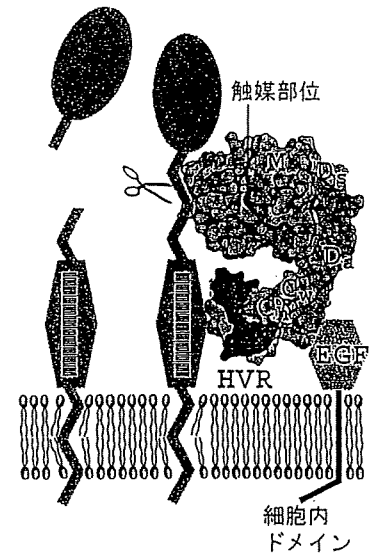


図3 膜結合型 ADAM によるエクストドメインシェーディングのモデル
HVR がシェーディングを受ける基質の切断部位以外の領域と結合することで基質認識を行う可能性を模式的に示す。

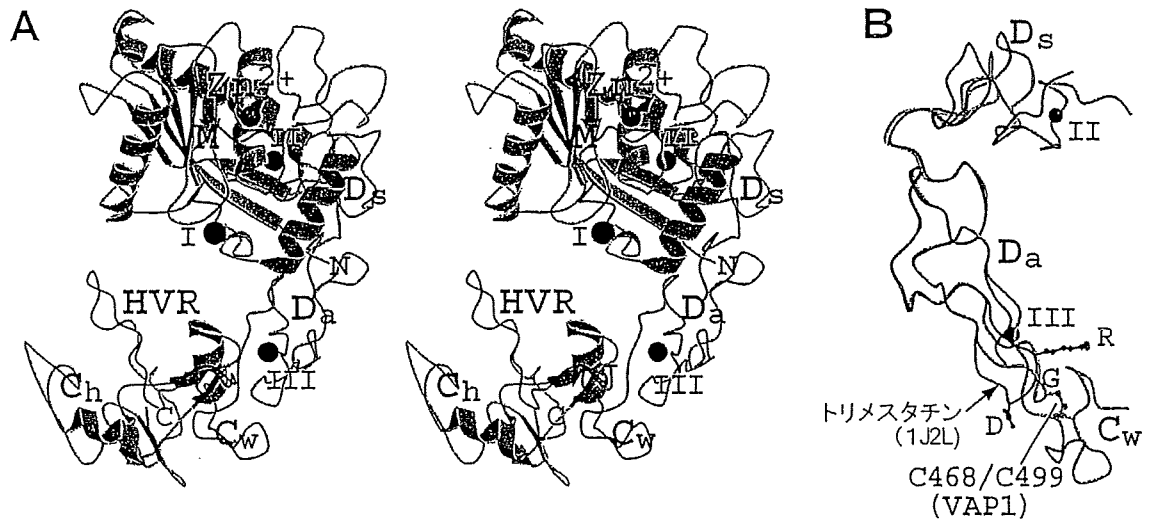


図2 VAP1 の結晶構造
A, MDC ドメイン構造のステレオ図。VAP1 二量体の内的一方を取り出し、糖鎖と ADAM 間で保存されていない N 末端領域を除き、Lys202 のアミノ基の位置にカルシウムイオン(I)を置いた図を示す。各サブドメインは図1に対応して色付けし、N および C 末端位置を示す。B, VAP1 の D_s/D_a/C_w 部とトリスチアチン (1J2L) との重ね合わせ。トリスチアチン (赤) のインテグリン結合部位 RGD 配列 (青)、および ADAM 間で保存された D_s/C_w 間のジスルフィド結合を示す。

け根に保存されたカルシウムイオン結合部位 (I) が存在する。D₁ および D₂ 部分はほとんど二次構造を持たず、多数のジスルフィド結合とカルシウムイオンの結合 (結合部位 II および III) により構造形成されており、それらに関わるアミノ酸残基およびその間隔は ADAM 間で非常に高く保存されている。D₃ 部分はディスインテグリン、トリメスタチン¹³⁾ と類似の構造を持つ (図 2B)。前述のようにディスインテグリンは突き出したディスインテグリン (D) ループの RGD 配列を介してインテグリンと結合すると考えられる。一方、ほぼ全ての ADAM において D ループに RGD 配列がなく、代わりに ADAM 間で保存されたシステイン残基を含む。構造解析によりこのシステイン残基は続く C₁ ドメイン内のシステイン残基とジスルフィド結合を形成し、D ループ部分全体も C₁ と相互作用していた (図 2B)。これらのことから ADAM の D ループは直接インテグリンのリガンドとして働く可能性は低いと考えられた。これまで多くの研究が ADAM とインテグリンの相互作用に着目しそれを支持する結果が得られていたことから、ADAM の D ループが直接インテグリンと結合するとの認識が浸透しているが、ADAM とインテグリンの相互作用については再検討が必要であると思われる。

6. 超可変領域 (HVR)

C ドメインについては立体構造においても他のタンパク質との相同性が見出せないことから新規な構造モチーフと考えられた。C ドメインが D ドメインと共役してタンパク質間相互作用に関与するという報告がいくつかあるが、その作用規序は全く不明である。MDC ドメイン部は全体として C 字型を示し、その一端に M ドメインの触媒部位が位置することを述べたが、もう一方の端に C ドメインの一部が位置し、その部分について結晶構造から興味深い点が明らかになった。C 字構造の末端部に位置する領域は ADAM 間で最も配列が可変で長さも多様な領域であり、我々は超可変領域、HVR (hyper-variable-region) と名づけた。HVR は C₁ の末端部分で比較的平坦な面の中央部を横切り、C 字型の分子構造により M ドメイン触媒部と対面する。詳しくは原著¹⁴⁾を参考して頂きたいが、HVR は構造解析を行った全ての結晶において結晶中での隣分子とのパッキングに大きく関わり、その構造はインデュードフィットによって形成された可能性が高く、逆に溶液中ではフレキシブルなループを形成すると考えられる。先に報告された ADAM10 の DC ドメイン部の結晶構造¹⁵⁾と VAP の構造との比較ではアミノ酸レベルの相同性がほとんどな

いに関わらず C ドメイン部も共通の骨格を持つことが明らかになったが、HVR の構造は大きく異なっていた¹⁴⁾。我々は触媒部位と対面した立体配置やタンパク質間相互作用に適した構造的特長から、HVR が異なる ADAM が異なる基質を結合・認識する部位である可能性 (図 3) を提案したが、その実験的な検証は今後の大きな課題となっている。

7. おわりに

ADAM は様々な膜タンパク質のエクトドメインシェディングに関わるが、生理的にどの ADAM がどの基質をどのように見分け切断するか、その分子メカニズムはほとんど不明である。いくつかの基質分子では切断配列が決定されているが、それらには共通配列が認められず、切断配列とは別の基質特異性を決める要因の存在が示唆されている。不活性 M ドメインを有する ADAM の存在について触れたが、活性型 M ドメインを持つ ADAM においても翻訳後のプロセッシングにより P ドメインのみならず M ドメインや D ドメインを欠いた多様な分子種が細胞膜上に存在して機能していることが示され、シゲダーゼ以外の ADAM の機能、特にタンパク質間相互作用分子としての機能にも興味を持たれる。ヘビ毒ホモログの結晶構造より得た新しい知見により今後 ADAM 研究が進展することを期待したい。

- 1) Takeda, S., Igarashi, T., Mori, H., & Araki, S. (2006) *EMBO J.*, 25, 2388-2396.
- 2) Igarashi, T., Araki, S., Mori, H., & Takeda, S. (2007) *FEBS Lett.*, 581, 2416-2422.
- 3) Blobel, C.P., Wolfsberg, T.G., Turck, C.W., Myles, D.G., Primakoff, P., & White, J.M. (1992) *Nature*, 356, 248-252.
- 4) Yagami-Hiromasa, T., Sato, T., Kurisaki, T., Kamijo, K., Nabeshima, Y., & Fujisawa-Sehara, A. (1995) *Nature*, 377, 652-656.
- 5) Black, R.A., Rauch, C.T., Kozlosky, C.J., Peschon, J.J., Slack, J.L., Wolfson, M.F., Castner, B.J., Stocking, K.L., Reddy, P., Srinivasan, S., Nelson, N., Boiani, N., Schooley, K.A., Gerhart, M., Davis, R., Fitzner, J.N., Johnson, R.S., Paxton, R.J., March, C.J., & Cerretti, D.P. (1997) *Nature*, 385, 729-733.
- 6) Moss, M.L., Jin, S.L., Milla, M.E., Bickett, D.M., Burkhart, W., Carter, H.L., Chen, W.J., Clay, W.C., Didsbury, J.R., Hassler, D., Hoffman, C.R., Kost, T.A., Lambert, M.H., Leesnitzer, M. A., McCauley, P., McGeehan, G., Mitchell, J., Moyer, M., Pahl, G., Rocque, W., Overton, L.K., Schoenen, F., Seaton, T., Su, J.L., Warner, J., Willard, D., & Becherer, J.D. (1997) *Nature*, 385, 733-736.
- 7) Seals, D.F. & Courtneidge, S.A. (2003) *Genes Dev.*, 17, 7-30.
- 8) Takeya, H., Miyata, T., Nishino, N., Omori-Satoh, T., &

- Iwanaga, S. (1993) *Methods Enzymol.*, 223, 365-378.
- 9) Fox, J.W. & Serrano, S.M. (2005) *Toxicon*, 45, 969-985.
- 10) Masuda, S., Hayashi, H., & Araki, S. (1998) *Eur. J. Biochem.*, 253, 36-41.
- 11) Orth, P., Reichert, P., Wang, W., Prosise, W.W., Yarosh-Tomaine, T., Hammond, G., Ingram, R.N., Xiao, L., Mirza, U. A., Zou, J., Strickland, C., Taremi, S.S., Le, H.V., & Madison, V. (2004) *J. Mol. Biol.*, 335, 129-137.
- 12) Fujii, Y., Okuda, D., Fujimoto, Z., Horii, K., Morita, T., & Mizuno, H. (2003) *J. Mol. Biol.*, 332, 1115-1122.
- 13) Janes, P.W., Saha, N., Barton, W.A., Kolev, M.V., Wimmer-Kleikamp, S.H., Nievergall, E., Blobel, C.P., Himanen, J.P., Lackmann, M., & Nikolov, D.B. (2005) *Cell*, 123, 291-304.

武田 壮一

(国立循環器病センター研究所心臓生理部)

Domain structure of ADAM family proteins

Soichi Takeda (Department of Cardiac Physiology, National Cardiovascular Center Research Institute, 5-7-1 Fujishiro-dai, Suita, Osaka 565-8565, Japan)

蛇毒メタロプロテアーゼの結晶構造と ADAM ファミリーの基質認識機構

国立循環器病センター研究所 武田壮一

Soichi TAKEDA: Crystal Structures of Snake Venom Metalloproteinase and Implication for the Molecular Mechanism of Substrate Recognition by ADAM Family Proteins

ADAMs (A disintegrin and Metalloproteinases) are major sheddases possessing extracellular metalloproteinase/disintegrin/cysteine-rich (MDC) domains. ADAMs uniquely display both proteolytic and adhesive functions on the cell surface, however, most of their physiological targets and adhesion mechanisms remain unclear. Crystal structures of vascular apoptosis-inducing protein-1 (VAP1), a snake venom homolog of mammalian ADAMs, reveal ADAMs' MDC domain architecture and a potential target recognition site. The C-shaped structure implies interplay between the ADAMs' proteolytic and adhesive domains and suggests a molecular mechanism for ADAMs' target recognition for shedding.

1. はじめに

毒蛇の毒腺にはさまざまなタンパク性の生理活性物質が存在し、それらは獲物である小動物の体内に毒牙を通して注入され多様な標的タンパク質と作用し致命的なダメージを与える。毒の作用は時に人を含め大動物を死に落とし入れるほど非常に劇的であり、そこに含まれる成分の研究は生物・医学の面から非常に興味深くこれまで多くの研究がなされてきた。コブラやウミヘビの類には中枢神経系に作用する神経毒が多く含まれている。他方、マムシやハブなどの出血性蛇毒には出血を引き起こしたり血栓形成を促進したりする成分や、血小板凝集を阻害あるいは逆に亢進したり、循環器系に障害を与える成分などが多く含まれている。出血性蛇毒の出血に直接かかわる成分(出血因子)としては触媒部位に亜鉛イオンをもつ一群のメタロプロテアーゼ (snake venom metalloproteinase (SVMP)) が中心的な役割を担っていることがわかっている。しかし、これら SVMP がどのようなメカニズムで血管を破壊し出血を引き起こすか依然不明である。蛇毒 SVMP は哺乳動物の細胞膜に存在するシェディング (Shedding) 酵素である ADAM (A disintegrin and metalloproteinase) ファミリータンパク質群と高いアミノ酸配列の相同性を示す。¹⁾ ADAM は細胞膜上に提示された各種の増殖因子やサイトカインの前駆体を切断遊離 (シェディング) する。例えば、ADAM17 は関節リウマチなど炎症性疾患に関与する TNF α をシェディングする酵素 (TNF α converting enzyme (TACE)) として同定された。^{2),3)} また、ADAM はそれら増殖因子やサイトカインのレセプター分子やカドヘリン

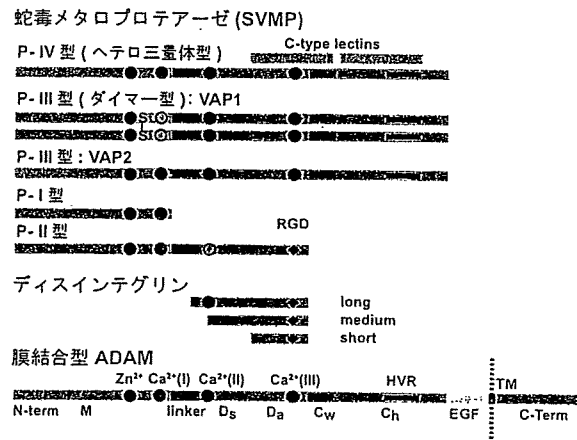


図1 ADAM ファミリータンパク質のドメイン構成。(Domain structure of ADAM family proteins.) 保存された金属イオン結合部位を●(一部保存されていない場合を含むものを○)で示す。

などの接着分子も切断し、発生・分化の過程やさまざまな病態にも深くかかわることがわかっている。^{4),5)} 多くの ADAM は分子 C 末側に一回膜貫通領域をもつ I 型膜タンパク質である(図1)。ADAM の細胞外の主要ドメインは出血蛇毒 SVMP と相同な構造をもち、これらを含めより広範な ADAM/adamalysin/reprolysin ファミリーを形成する。¹⁾ ファミリーの名前については前述の構造からの由来以外に、哺乳動物の最初の ADAM、精巣・精子 (male reproductive tract) のファーティリンが受精の鍵タンパク質として発見されたこと、⁶⁾ 象徴的な意味合い (アダムと

イブにかけて)、相同タンパクが爬虫類 (reptile) にあること、北米生息の毒蛇 (*Crotalus adamanteus*), 加水分解酵素であること (-lysin), などに由来する。一般に repolysin が主に SVMP に使われることが多いのに対し, ADAM は哺乳動物膜プロテアーゼ群に限定した狭義の意味で用いられることが多いが, 本論説では SVMP を含めた広義のファミリーとして一括して ADAM として取り扱う。哺乳動物で発生分化やさまざまな病態にかかわる分子が他方で蛇の毒腺で独特の進化を遂げている事実は非常に興味深く, われわれの構造研究への動機付けとなった。

ADAM ファミリーの分子群は分子内に多数のジスルフィド結合を有することからリコンビナントタンパク質の大量発現が非常に困難であり, 全体の分子構造は明らかにされていない。われわれは構造解析に必要な量の試料が比較的容易に入手できることに着目し, 蛇毒より血管内皮細胞アポトーシス誘導因子 1 (Vascular apoptosis-inducing protein-1 (VAP1)) を単離精製し X 線結晶構造解析を行った⁷⁾ この SVMP の構造解析により ADAM ファミリータンパク質の基本構造と基質認識・分解機構に関しての新しい知見が得られたので本稿で紹介する。

2. SVMP と ADAM ファミリータンパク質

マムシやハブ, ガラガラヘビなど咬傷により顕著な出血が見られる出血性蛇毒には血管内皮細胞に特異的に作用し細胞の自爆 (アポトーシス) を引き起こす成分が存在することが知られ, 出血機構との関連で興味もたれている。⁸⁾ 単離されたこれらの成分は VAP と名付けられ, その cDNA 解析から P-III 型 SVMP に属するタンパク質であることが判明している。⁹⁾ SVMP は①メタロプロテアーゼドメイン (M ドメイン) のみからなる P-I 型, ②血小板凝集阻害活性を有し RGD 配列をもつデイスインテグリンの前駆体と考えられ, M ドメインとデイスインテグリンドメイン (D ドメイン) からなる P-II 型, ③ M および D ドメイン, さらに C 末端側下流にシステイン残基を多く含むシステインリッチドメイン (C ドメイン) をもつ P-III 型, ④ P-III 型にさらに分子進化的にレクチン様ドメインが付加された P-IV 型の 4 つのクラスに分類される。¹⁰⁾ この中で P-III 型が特に強い出血活性をもつと考えられている。¹¹⁾ 一方, 哺乳動物の ADAM の多くは膜結合型であり, 細胞外ドメインとして P-III 型 SVMP と相同の MDC ドメイン部と多くはその下流に EGF 様の構造を介した後, 細胞膜に貫入する。図 1 はこれら ADAM ファミリーのタンパク質群のドメイン構造を模式的にまとめた物である。多くの膜結合型に存在する EGF 様構造の生理的機能は明らかにされていないが, これまで報告されたさまざまな実験結果は MDC ドメイン部に重要な機能が集約されていることを示唆している。^{4), 5)}

3. VAP1 の結晶構造

3.1 VAP1 の X 線結晶構造解析

北米に生息するクサリヘビ科のニシキダイヤガラガラヘビ (*Crotalus atrox*) 由来の VAP1 は分子量約 55 キロダルトンのポリペプチド鎖 2 本が M ドメインどうし 1 つの SS 結合で結ばれたホモダイマー型 SVMP である。¹⁰⁾ われわれはホモダイマー型分子であること, すなわち分子内に対称性を有することが結晶化および構造解析の双方で有利と考え, 多数報告がある P-III 型 SVMP の中から特にユニークなダイマー構造をもつ VAP1 に着目して研究を進める戦略をとった。実際に通常の結晶化キットを用いたスクリーニングで結晶が容易に得られ,¹¹⁾ 比較的短期間に構造解析に着手することができた。VAP1 はモノマー当たり 427 アミノ酸残基からなるが, 機知構造とほぼ相同と考えられる領域が分子 N 末端部の M ドメイン (197 アミノ酸残基) に限られ, 重原子置換体の作成が必須と考えられた。しかし, 有効な重原子置換体ができずにあくせくする一方, M ドメインのサーチモデル (同一アミノ酸残基約 50%) を起点としてモデルの寄与をできるだけ排除することを心がけて徐々にモデル構築・精密化を進めた所, 最終的に分子全体のモデル構築を完成するに至った。既知構造と相同性のない新規の構造モチーフ (C ドメイン, 約 100 アミノ酸残基), 二次構造のほとんどない領域 (リンカー/D ドメイン, 約 100 アミノ酸残基) をそれぞれ分子全体の約 4 分の 1 ずつ含み, このような構造が分子置換法による解析で解けたことはある意味非常に幸運な結果であったと思われる。これにはモデリングの過程において非対称単位内の 2 つのモノマー分子間の非結晶学的二回対称 (non-crystallographic symmetry (NCS)) を有効に使えた効果が大きく, ここでもダイマー型の VAP1 を選択したメリットが活かせることになった。解析の詳細は原著⁷⁾ を参照されたい。最終的には SPring-8 の BL45XU-PX で得た 2 つの異なる結晶系 (斜方晶系および正方晶系) の Native 結晶データを用いてそれぞれ 2.5 Å 分解能での構造精密化を行った。それぞれの結晶は非対称単位に 1 つのダイマー分子を含んでいた。

3.2 C 字型 MDC ドメイン構造

ADAM は活性部位に Zn²⁺ を配位する 3 つのヒスチジン残基と活性触媒基であるグルタミン酸残基を含む配列 (HEXGHXXGXXHD), さらに下流にあるメチオニン残基 (立体構造的に 3 つのヒスチジン残基を下から支える Met ターンと呼ばれる構造) が保存されたメタロプロテアーゼドメインをもつ (図 3)。同様な配列と構造は細胞間マトリックスタンパク質を分解するコラゲナーゼなどにも見られるが, これらとの構造的な違い, 活性部位や M ドメインの立体構造の詳細はほかで詳しく述べられている¹²⁾ ので本稿では省く。図 2a に NCS 軸方向から見た VAP1 の

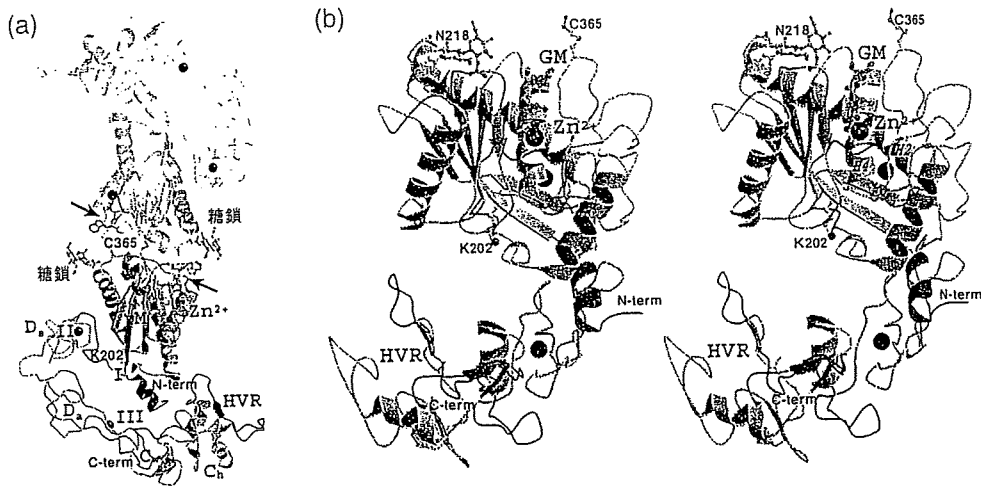


図2 VAP1の結晶構造。(Crystal structure of VAP1) (a) NCS方向から見たダイマー構造。結合した阻害剤(GM6001)を矢印で示す。(b)モノマーの構造(ステレオ図)。結合した金属イオン(Ca²⁺およびZn²⁺)を●で示す。

Protein	Residue	Sequence	Residue	Sequence	Residue	Sequence	Residue	Sequence									
VAP1	184	QSNLTPEQRYLVNKKYK	202	ELFLVADYIMYLKYGRI	218 (糖鎖修飾部位)	LVAVRTRMYD	235	LVVQSSADVTLDFAKW									
ADAM9	206	AVLPQTRVLEIVVQK	202	ELFLVADYIMYLKYGRI	218	LVAVRTRMYD	235	LVVQSSADVTLDFAKW									
ADAM12	208	ETLKATRYVLEIVVQK	202	ELFLVADYIMYLKYGRI	218	LVAVRTRMYD	235	LVVQSSADVTLDFAKW									
ADAM15	207	DVVTETKTVLEIVVQK	202	ELFLVADYIMYLKYGRI	218	LVAVRTRMYD	235	LVVQSSADVTLDFAKW									
ADAM19	202	MKRDLSMKRYVLEIVVQK	202	ELFLVADYIMYLKYGRI	218	LVAVRTRMYD	235	LVVQSSADVTLDFAKW									
ADAM28	199	VQHEKRYVLEIVVQK	202	ELFLVADYIMYLKYGRI	218	LVAVRTRMYD	235	LVVQSSADVTLDFAKW									
ADAM33	204	EARTRKRYVLEIVVQK	202	ELFLVADYIMYLKYGRI	218	LVAVRTRMYD	235	LVVQSSADVTLDFAKW									
VAP1	310	LTGINFNGPTAGLGLVGGI	330-345	ENTMYSAGIVQDHSKIH	350	352	357	365	374	380	393	Ca結合部位(I)	404				
ADAM9	415	VLKKGFGG-TAGMAFVGV	415	ESRSHAGGINVFGQIT	415	415	415	415	415	415	415	Ca結合部位(I)	415				
ADAM12	422	VSGVYFQGTTHGAPIMS	422	GTADQSGGIVNDSNPL	422	422	422	422	422	422	422	Ca結合部位(I)	422				
ADAM15	422	VTGTSFSGPTVGHAIQNS	422	IESPDSFGGVNDSHST	422	422	422	422	422	422	422	Ca結合部位(I)	422				
ADAM19	418	ITGMSFHTTILGLAPLMA	418	GSVQSGGVNDSHSENA	418	418	418	418	418	418	418	Ca結合部位(I)	418				
ADAM28	418	ITATELAGTTVGLAFMST	418	SP-YSVGVQDSNMLLR	418	418	418	418	418	418	418	Ca結合部位(I)	418				
ADAM33	418	LTGRAFQGATVGLAFVQ	418	GRASSGGVSDHSELP	418	418	418	418	418	418	418	Ca結合部位(I)	418				
VAP1	406	VOGQYFVYVQEGEGSP	425	DPDATTETKLRGQAQ	443	448	449	452	461	468	474	481	492	499	504	511	515-517
ADAM9	534	SGCKLEVDAQEEEDG	534	ETPKFEDLDGQEGST	534	534	534	534	534	534	534	534	534	534	534	534	534
ADAM12	541	SGCKRLEVDEEEDG	541	ETPKFEDLDGQEGST	541	541	541	541	541	541	541	541	541	541	541	541	541
ADAM15	536	SGCKRLEVDEEEDG	536	ETPKFEDLDGQEGST	536	536	536	536	536	536	536	536	536	536	536	536	536
ADAM19	526	SGCKRLEVDEEEDG	526	ETPKFEDLDGQEGST	526	526	526	526	526	526	526	526	526	526	526	526	526
ADAM28	526	SGCKRLEVDEEEDG	526	ETPKFEDLDGQEGST	526	526	526	526	526	526	526	526	526	526	526	526	526
ADAM33	536	SGCKRLEVDEEEDG	536	ETPKFEDLDGQEGST	536	536	536	536	536	536	536	536	536	536	536	536	536
VAP1	526	SQDAQFO-FHRECHNIVY	533	QNTKICEPQDVKGR	549	556	561	572	581	592	598	603	610				
ADAM9	643	APKDFTEVNSKGRITD	643	GFSG-ENYIKKATGNAL	643	643	643	643	643	643	643	643	643	643	643	643	643
ADAM12	654	APFLQFERNVAGPFPY	654	NGKVSFKAKEMRDAK	654	654	654	654	654	654	654	654	654	654	654	654	654
ADAM15	652	AAPLQFQANTRGNATFS	652	GRNPSGYSVGTFRDAI	652	652	652	652	652	652	652	652	652	652	652	652	652
ADAM19	626	APDLQFQVNVAGITF	626	GRNPSGYSVGTFRDAI	626	626	626	626	626	626	626	626	626	626	626	626	626
ADAM28	626	ADKSQYN-RNNGSKYV	626	ERRV-DDTLIPKANDT	626	626	626	626	626	626	626	626	626	626	626	626	626
ADAM33	626	APEAQFQVNSAGDAH	626	NGQDSQEGFLFQAGR	626	626	626	626	626	626	626	626	626	626	626	626	626
VAP1	610	-----	610	ENKKNPQNIYYSP	610	610	610	610	610	610	610	610	610	610	610	610	610
ADAM9	723	-----	723	IQFTRSGRTKHWGVDF	723	723	723	723	723	723	723	723	723	723	723	723	723
ADAM12	735	-----	735	IQFTRSGRTKHWGVDF	735	735	735	735	735	735	735	735	735	735	735	735	735
ADAM15	722	-----	722	IQFTRSGRTKHWGVDF	722	722	722	722	722	722	722	722	722	722	722	722	722
ADAM19	730	-----	730	IQFTRSGRTKHWGVDF	730	730	730	730	730	730	730	730	730	730	730	730	730
ADAM28	685	-----	685	IQFTRSGRTKHWGVDF	685	685	685	685	685	685	685	685	685	685	685	685	685
ADAM33	728	-----	728	IQFTRSGRTKHWGVDF	728	728	728	728	728	728	728	728	728	728	728	728	728

図3 VAP1とヒト膜結合型ADAMのアミノ酸配列。(Sequence alignments of VAP1 and human ADAMs.)

全体構造と一方のモノマーのステレオ図2bを示す。VAP1はほかのADAMにないMドメイン内のシステイン残基(Cys365)を介してホモダイマーを形成し、このジスルフィド結合がNCS上に存在する。2つのモノマーはドメイン間の揺らぎ(図5b)を除くとほぼ同一の構造をもち、メタロプロテアーゼの基質結合部(図1ではアプタド様骨格をもつヒドロキサム酸阻害剤GM6001の結合構造を示している)がNCS軸に直交して互いに反対方向を向いて

開くように配置している。すでに構造が解かれているヒトのADAM33¹³⁾のMドメインと比較すると基質結合ポケットを形成する領域に若干の構造違いが見られたが(図4a)、この領域はアミノ酸配列上も可変な領域であり(図3)、切断部位周辺での基質認識に直接かかわると考えられる。その他は非常によく似た構造をもつといえる。

それぞれのモノマーはM、D、Cドメインが全体としてアルファベットのC字型になるよう配置している。D、C

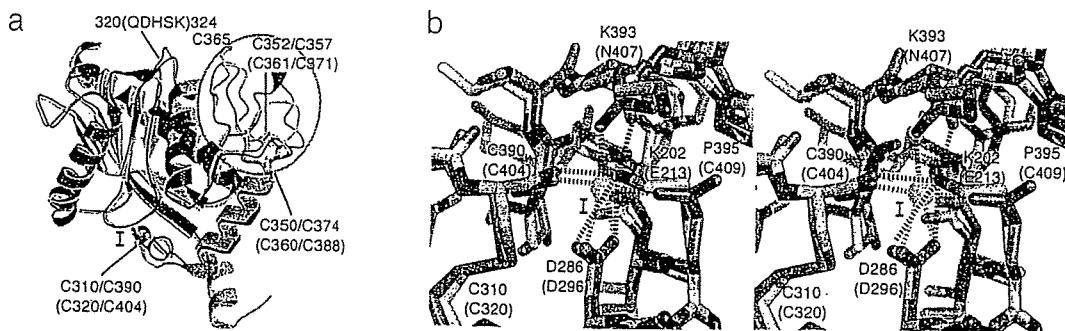


図4 VAP1 (薄いグレー) と ADAM33 (濃いグレー) の M ドメインの構造比較. (Superposition of the M-domains of ADAM33 and VAP1.) (a) M ドメイン全体像. 大きく構造の異なる領域を楕円で囲んでいる. VAP1 (カッコ内は ADAM33) のアミノ酸残基を示す. (b) Ca^{2+} 結合部位 (I) の構造.

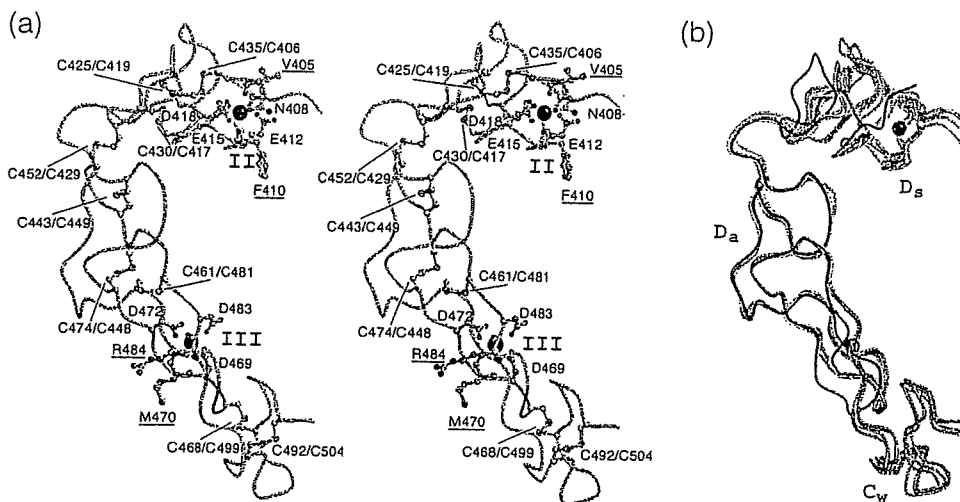


図5 D ドメイン部の構造. (D domain structure.) (a) D ドメイン部のステレオ図. SS 結合およびカルシウム結合にかかわるアミノ酸残基を示す. ディスインテグリンループの DECD 配列を黒で示す. (b) VAP1 モノマー 4 分子 (グレー) およびトリメスタチン (1J2L, 黒で示す) の構造重ねあわせ.

ドメインはドメイン間の揺らぎやジスルフィド結合のパターンなどから構造的に人体の腕の関節構造に対応させ、ショルダー (D_s)、アーム (D_a)、リスト (C_w)、ハンド (C_h) とさらに細かくサブドメインに分けられる (図3). D_s 部は M ドメインの Zn^{2+} 結合部位と正反対の位置から突き出ている、その根元 M ドメイン側に ADAM で保存されたカルシウム結合部位 (I) が存在する (VAP1 では例外的に Ca^{2+} に配位するグルタミン酸残基がリジン残基 (Lys202) に変わっていて、側鎖のアミノ基が Ca^{2+} の位置を占めている (図4b)). D_s および D_a 部はほとんど二次構造をもたないが、多数のジスルフィド結合と Ca^{2+} 結合により構造形成されており (図5a)、それらにかかわるアミノ酸残基およびその間隔は ADAM で非常によく保存されている (図3).

D_s 部は血小板凝集阻害活性のあるディスインテグリン、トリメスタチン¹⁴⁾ と類似の構造をもつ (図5b). RGD 配列をもつディスインテグリンは血小板上の主要なフィブリ

ノーゲン受容体であるインテグリン $\alpha IIb\beta 3$ に結合し、インテグリンへのフィブリノーゲン結合を阻害することで血小板凝集を阻害すると考えられる. しかし VAP1 の RGD に相当する配列は DECD であり、RGD タイプにない Ca^{2+} 結合部位 (III) をもつ. このディスインテグリンループ (D ループ) と称されるループ先端部のシステイン残基はジスルフィド結合 (Cys468/Cys499) を形成し、またループ部全体も次に続く C_w 部と相互作用しており (図5)、インテグリンへのリガンドとして働くことは不可能と考えられる. ADAM の D ドメインが RGD ディスインテグリン群とアミノ酸配列上の高い類似性を持ち、またこれまで多くの研究が ADAM とインテグリンの相互作用に着目し、またそれを支持する結果を得られていたことから、必然的に D ループが直接インテグリン結合するとの認識が浸透している. VAP1 の結晶構造は ADAM とインテグリンの相互作用について再検討が必要であることを示した.

3.3 超可変領域 (HVR)

Cドメイン(C_n/C_w)についてアミノ酸配列からはほかのタンパク質との相同性が見出されず、機能についてもほとんど理解されていない。C_n/C_w部の構造を図6aに示すが、データベース上で類似構造を見出せないことから新規のホールドと考えられた。さらに結晶中での分子の配置から興味深いことがわかった。2つの異なる結晶系において共通した分子パッキングが見られ、それらは隣り合う2分子のC_nどうしが手を取り合うように相互作用しNCSを形成しているものであった(図6b)。このC_n部どうしの接触面積は860 Å²で、ダイマーを形成するモノマー間の接触面積の800 Å²より大きい。すなわち、結晶中では見かけ上MとC_n部で分子が珠数つなぎの状態にある。溶液中でのVAP1分子の振る舞いとしてポリマーを形成している兆候はないのでC_nどうしの結合は結晶化によって誘導された構造と考えられる。接触にかかわる部分の中心をなすのは562から583番目のアミノ酸残基からなる領域でこの部分はファミリー分子のアミノ酸配列をアラインメントした際に最も可変(保存性、長さ(16-55アミノ酸残基)とも)な領域であること(図3)が判明し、超可変領域

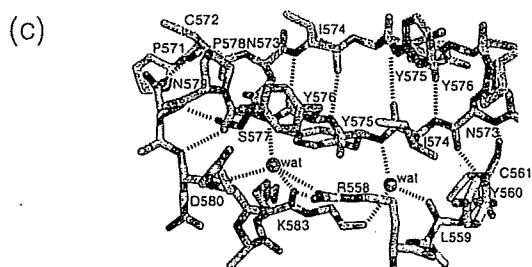
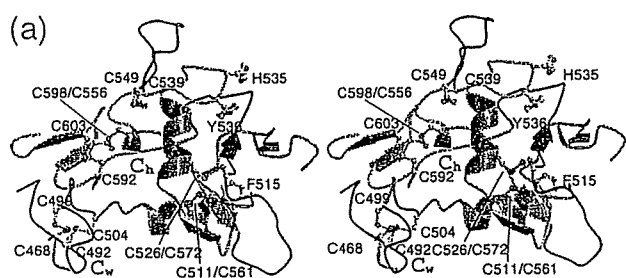


図6 Cドメインの構造とHVR。(C-domain architecture and HVR.) (a) Cドメイン(C_w/C_n)のリボン図(ステレオ)。 (b) 結晶中での分子パッキング。HVRを濃いグレーで示す。 (c) HVRの詳細構造。

(Hyper variable region (HVR))と名付けた。HVRの構造をよく見てみると、中央部で隣り合うNCS分子間でβシート構造を形成している(図6c)。分子間は主鎖どうしの水素結合を形成しているのに対し、HVRの裏打ちは主として水分子を介した水素結合ネットワークで保持されている。βシート形成部は比較的低い温度因子を示すが、HVRの両端部の温度因子は高い。さまざまなADAMの配列を用いて二次構造予測を行ったところ、いずれにおいてもこのHVRの中央部はβシートと予測されない。さまざまな視点からNCS分子間のHVRを中核とした比較的大きな相互作用はインデュードフィットによるものと結論付けられた。すなわち、溶液中では(中央付近で572-526残基間のジスルフィド結合でC_nの残りの部分に固定されているものの)HVRは全体として動きやすいループを形成しており、タンパク質間相互作用に都合のよい構造をもつと考えられる。

4. ADAM ファミリーの基質認識機構

VAP1モノマーはC字型の構造をもち、HVRと触媒部位周辺がC字のそれぞれ両端を占め、分子内で二者が対面する(図2b)。立体構造においてHVRの中心部と亜鉛イオンの間の距離は約3.5 nmである。上述のようにこれら2つの領域は配列が可変であり、C字型の構造は保存されたジスルフィド結合とカルシウム結合により形成されたADAMに共通した基本骨格といえる。この構造からHVRが触媒部位以外に基質認識を行う部位(エクソサイト)である可能性が直感的に見出される。すなわち異なるADAMが異なるターゲットを認識するのに2つの離れた部位を利用している、という考えである。この可能性を基にした膜結

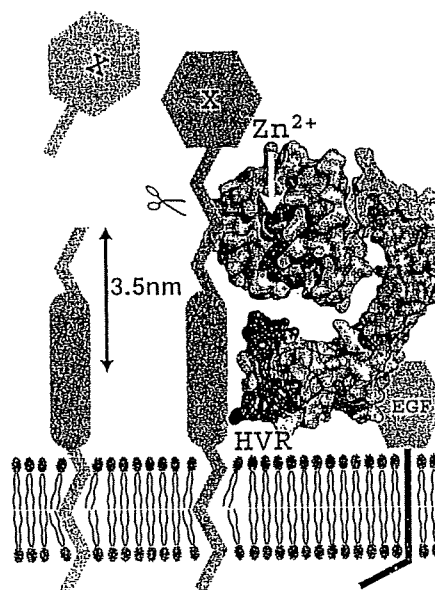


図7 膜型ADAMによるシェディング機構のモデル。(Model for ADAM's shedding.)

合型ADAMが膜結合型タンパク質を切断遊離するモデルを図7に示す。ここではXは増殖因子前駆体などの分子をイメージしているが、分子Xの切断部位から離れたある領域をADAMがHVR(エクソサイト)を介して認識し、切断する。場合によってはHVRがほかのタンパク分子Yと結合し、分子Yに結合する分子Xを切断するケースなども想定することもできる。ここでは鎖状の分子Xを切断するモデルを描いたが、HVRと亜鉛イオンの位置関係は一般的な分子量数万の球状タンパク(あるいは球状ドメイン)を直接結合して切断するにも都合のよい距離と考えられる。構造の比較により、各サブドメイン間に揺らぎがあることを述べたが、この揺らぎは活性基とエクソサイトとの位置の微調整、あるいは活性の調節機構に重要なものかもしれない。この点の検証は今後の課題である。

5. おわりに

ADAMはシェダーゼとして重要な機能を担っているが、その基質認識機構やマルチドメイン構造の生理的意味についてはこれまでほとんど何もわかっていない。プロテアーゼドメインのみでは高い基質特異性が発揮されないことからエクソサイトの存在が示唆されてきたが、VAP1の構造はADAMの機能を理解するうえで重要な足がかりを与えたといえる。HVRがエクソサイトであることはあくまで仮説の段階であり、変異体などを使った実験の裏付けや基質複合体の立体構造を解くことなどが今後の課題となる。VAP1はホモダイマーであることが結晶化、構造解析を有利に導いたが、反面に結晶中で数珠繋ぎ構造をとるために各サブドメイン間の動きに制約を生じている可能性が指摘される。この点については、モノマーP-III型SVMPの複数の結晶構造を得て、構造比較によるドメイン間の動きを解析した結果を最近報告した¹⁶⁾

VAP1の論文を執筆中にADAM10のD/Cドメイン部分の結晶構造が報告された¹⁵⁾この構造とVAP1の相当部分と比較すると非常に興味深いことにC_w/C_h間がまるで手首を捻ったように180度向きを変えていること、両者にC_h部のアミノ酸配列の相同性がほぼない(ADAM10はADAM17とともにほかのファミリー分子とC_h部の相同性がきわめて悪い)にかかわらず共通の基本骨格があることが見出された。VAP1の結晶構造説明によりすべてのADAM分子について同一の構造基盤で語ることが可能になった。この点について詳しくは原著¹⁵⁾を参照されたい。

ADAMをはじめ細胞外で機能するタンパク質は多数のSS結合や構造的なCa²⁺結合により細胞内タンパク質とは異なる構築原理で安定な構造が維持されるものが多い。このような対象は一般的に構造解析に必須の大量発現系の構築がボトルネックとなる。本研究は天然物由来の類似構造に着目して進めたが、このような大量発現が困難な、しかし生理的に重要なタンパク質群をいかにして構造解析

していくかがポストタンパク3000の大きな課題の1つであるといえよう。

本研究は国立循環器病センター研究所、五十嵐智子氏、盛 英三博士および名古屋大学大学院理学研究科、荒木聡彦博士との共同研究の成果である。

文 献

- 1) J. W. Fox and S. M. Serrano: *Toxicon* 45, 969 (2005).
- 2) R. A. Black, C. T. Rauch, C. J. Kozlosky, J. J. Peschon, J. L. Slack, M. F. Wolfson, B. J. Castner, K. L. Stocking, P. Reddy, S. Srinivasan, N. Nelson, N. Boiani, K. A. Schooley, M. Gerhart, R. Davis, J. N. Fitzner, R. S. Johnson, R. J. Paxton, C. J. March and D. P. Ceretti: *Nature* 385, 729 (1997).
- 3) M. L. Moss, S. L. Jin, M. E. Milla, D. M. Bickett, W. Burkhart, H. L. Carter, W. J. Chen, W. C. Clay, J. R. Didsbury, D. Hassler, C. R. Hoffman, T. A. Kost, M. H. Lambert, M. A. Leesnitzer, P. McCauley, G. McGeehan, J. Mitchell, M. Moyer, G. Pahel, W. Rocque, L. K. Overton, F. Schoenen, T. Seaton, J. L. Su, J. D. Becherer, *et al.*: *Nature* 385, 733 (1997).
- 4) J. M. White: *Curr. Opin. Cell Biol.* 15, 598 (2003).
- 5) D. F. Seals and S. A. Courtneidge: *Genes Dev.* 17, 7 (2003).
- 6) C. P. Blobel, T. G. Wolfsberg, C. W. Turck, D. G. Myles, P. Primakoff and J. M. White: *Nature* 356, 248 (1992).
- 7) S. Takeda, T. Igarashi, H. Mori and S. Araki: *Embo J.* 25, 2388 (2006).
- 8) S. Araki, T. Ishida, T. Yamamoto, K. Kaji and H. Hayashi: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 190, 148 (1993).
- 9) S. Masuda, T. Ohta, K. Kaji, J. W. Fox, H. Hayashi and S. Araki: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 278, 197 (2000).
- 10) S. Masuda, S. Araki, T. Yamamoto, K. Kaji and H. Hayashi: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 235, 59 (1997).
- 11) T. Igarashi, Y. Oishi, S. Araki, H. Mori and S. Takeda: *Acta Crystallograph. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* 62, 688 (2006).
- 12) F. X. Gomis-Ruth: *Mol. Biotechnol.* 24, 157 (2003).
- 13) P. Orth, P. Reichert, W. Wang, W. W. Prosser, T. Yarosh-Tomaine, G. Hammond, R. N. Ingram, L. Xiao, U. A. Mirza, J. Zou, C. Strickland, S. S. Taremi, H. V. Le and V. Madison: *J. Mol. Biol.* 335, 129 (2004).
- 14) Y. Fujii, D. Okuda, Z. Fujimoto, K. Horii, T. Morita and H. Mizuno: *J. Mol. Biol.* 332, 1115 (2003).
- 15) P. W. Janes, N. Saha, W. A. Barton, M. V. Kolev, S. H. Wimmer-Kleikamp, E. Nievergall, C. P. Blobel, J. P. Himanen, M. Lackmann and D. B. Nikolov: *Cell* 123, 291 (2005).
- 16) T. Igarashi, S. Araki, H. Mori and S. Takeda: *FEBS Lett.* 581, 2416 (2007).

プロフィール



武田 壮一 Soichi TAKEDA
 国立循環器病センター研究所
 National Cardiovascular Center Research Institute
 〒565-8565 大阪府吹田市藤白台5-7-1
 5-7-1 Fujishirodai, Suita, Osaka 565-8565, Japan
 e-mail: stakeda@ri.ncvc.go.jp
 最終学歴：名古屋大学大学院理学研究科博士課程
 後期課程修了
 専門分野：構造生物学
 現在の研究テーマ：循環器疾患にかかわるタンパク質の構造解析



Gab family proteins are essential for postnatal maintenance of cardiac function via neuregulin-1/ErbB signaling

Yoshikazu Nakaoka,¹ Keigo Nishida,² Masahiro Narimatsu,³ Atsunori Kamiya,⁴ Takashi Minami,⁵ Hirofumi Sawa,⁶ Katsuya Okawa,⁷ Yasushi Fujio,⁸ Tatsuya Koyama,¹ Makiko Maeda,⁸ Manami Sone,¹ Satoru Yamasaki,² Yuji Arai,⁹ Gou Young Koh,¹⁰ Tatsuhiko Kodama,⁵ Hisao Hirota,¹¹ Kinya Otsu,¹¹ Toshio Hirano,^{2,3} and Naoki Mochizuki¹

¹Department of Structural Analysis, National Cardiovascular Center Research Institute, Osaka, Japan. ²Laboratory for Cytokine Signaling, RIKEN Research Center for Allergy and Immunology (RCAI), Yokohama, Japan. ³Laboratory of Developmental Immunology, Osaka University Graduate School of Frontier Biosciences and Graduate School of Medicine, Osaka, Japan. ⁴Department of Cardiovascular Dynamics, National Cardiovascular Center Research Institute, Osaka, Japan. ⁵Laboratory for System Biology and Medicine, Research Center for Advanced Science and Technology, University of Tokyo, Tokyo, Japan. ⁶Department of Molecular Pathobiology, Hokkaido University Research Center for Zoonosis Control, Sapporo, Japan. ⁷Horizontal Medical Research Organization, Kyoto University Graduate School of Medicine, Kyoto, Japan. ⁸Department of Clinical Evaluation of Medicines and Therapeutics, Osaka University Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka, Japan. ⁹Department of Bioscience, National Cardiovascular Center Research Institute, Osaka, Japan. ¹⁰Biomedical Research Center and Department of Biological Sciences, Korea Advanced Institute of Science and Technology, Daejeon, Republic of Korea. ¹¹Department of Cardiovascular Medicine, Osaka University Graduate School of Medicine, Osaka, Japan.

Grb2-associated binder (Gab) family of scaffolding adaptor proteins coordinate signaling cascades downstream of growth factor and cytokine receptors. In the heart, among EGF family members, neuregulin-1 β (NRG-1 β , a paracrine factor produced from endothelium) induced remarkable tyrosine phosphorylation of Gab1 and Gab2 via erythroblastic leukemia viral oncogene (ErbB) receptors. We examined the role of Gab family proteins in NRG-1 β /ErbB-mediated signal in the heart by creating cardiomyocyte-specific Gab1/Gab2 double knockout mice (DKO mice). Although DKO mice were viable, they exhibited marked ventricular dilatation and reduced contractility with aging. DKO mice showed high mortality after birth because of heart failure. In addition, we noticed remarkable endocardial fibroelastosis and increase of abnormally dilated vessels in the ventricles of DKO mice. NRG-1 β induced activation of both ERK and AKT in the hearts of control mice but not in those of DKO mice. Using DNA microarray analysis, we found that stimulation with NRG-1 β upregulated expression of an endothelium-stabilizing factor, angiopoietin 1, in the hearts of control mice but not in those of DKO mice, which accounted for the pathological abnormalities in the DKO hearts. Taken together, our observations indicated that in the NRG-1 β /ErbB signaling, Gab1 and Gab2 of the myocardium are essential for both maintenance of myocardial function and stabilization of cardiac capillary and endocardial endothelium in the postnatal heart.

Introduction

Dilated cardiomyopathy (DCM) is a common cause of heart failure. Epidemiological studies suggest that 25%–30% of DCM is inherited. Among the mutations associated with DCM in humans and mice, several involve genes encoding cytoskeletal proteins and sarcomere-related proteins (1); however, mutations in these known genes account for only a minor proportion of the heritable cardiomyopathies in humans. Cardiac function is maintained by cytokine- and growth factor-triggered intracellular signaling. Genetically modified mice, in which intracellular signaling molecules are either activated or perturbed, also exhibit cardiac

dysfunction, suggesting that coordination of signal transduction systems is critical for the preservation of cardiac function (2).

The Grb2-associated binder (Gab) family proteins, which serve as scaffolding adaptor proteins, crucially intervene between receptors and intracellular signaling molecules to coordinate the signaling cascades of cytokines, growth factors, antigens, and numerous other molecules (3–5). Multiple phosphorylated tyrosine residues of Gab proteins become docking sites for Src homology-2 domain-containing molecules. Docking of Gab to tyrosine phosphatase SHP2 and the p85 regulatory subunit of PI3K leads to the activation of ERK and AKT, respectively (4, 5). Three Gab family members, Gab1, Gab2, and Gab3, have been identified in mammals and are structurally similar (4, 5). Conventional Gab1 knockout (Gab1KO) mice display embryonic lethality with impaired development of heart, placenta, skin, and muscle (6, 7). Gab2KO mice do not show any obvious developmental defects but display impaired allergic responses and osteoclast defects (8–11). Gab3KO mice exhibit no obvious phenotype (12).

We previously demonstrated the importance of Gab1-ERK5 signaling in cardiomyocyte hypertrophy through the leukemia inhibitory factor-gp130-dependent (LIF-gp130-dependent)

Nonstandard abbreviations used: AngI, angiopoietin 1; ANP, atrial natriuretic peptide; DCM, dilated cardiomyopathy; DKO, cardiomyocyte-specific Gab1/Gab2 double knockout; EFE, endocardial fibroelastosis; EphA4, Eph receptor A4; ErbB, erythroblastic leukemia viral oncogene; Gab, Grb2-associated binder; Gab1CKO, cardiomyocyte-specific Gab1 conditional knockout; Gab1KO, conventional Gab1 knockout; HB-EGF, heparin-binding EGF-like growth factor; LIF, leukemia inhibitory factor; α -MHC, α -myosin heavy chain; NRG-1, neuregulin-1; α -SKA, skeletal α -actin; TSP1, thrombospondin 1.

Conflict of interest: The authors have declared that no conflict of interest exists.

Citation for this article: *J. Clin. Invest.* 117:1771–1781 (2007). doi:10.1172/JCI30651.

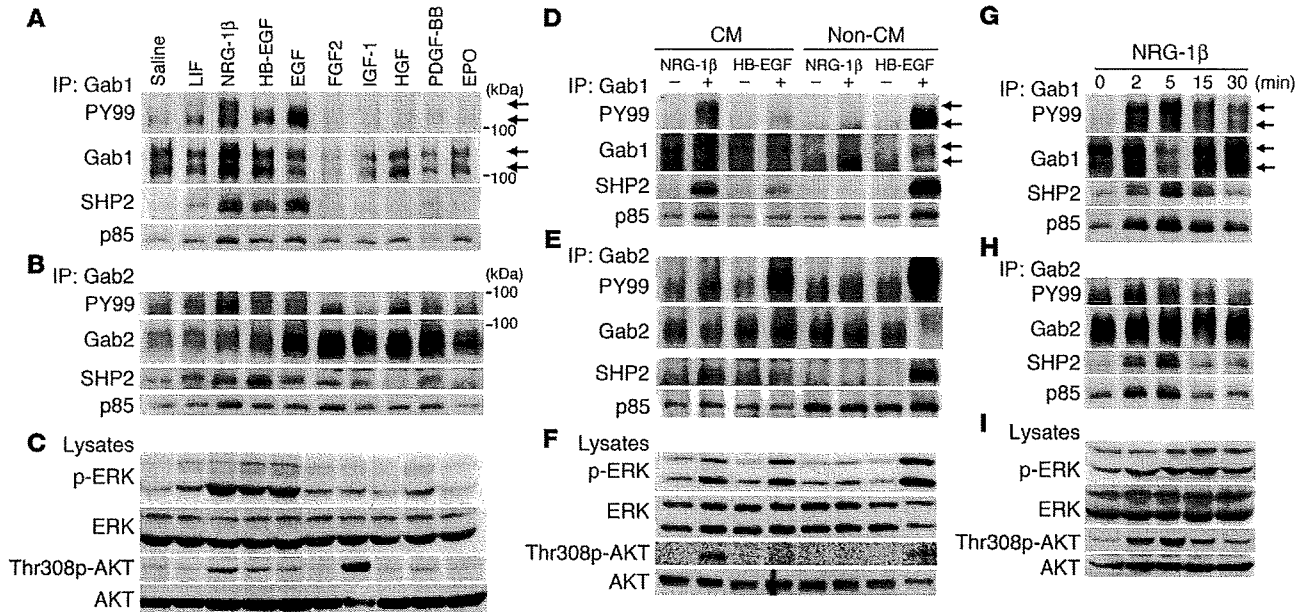


Figure 1

Gab1 and Gab2 are engaged in coordination of NRG-1 β /ErbB signaling pathway in the myocardium. Tyrosine phosphorylation of Gab1 (A) and Gab2 (B) and their association with SHP2 and p85 were analyzed by IP of the heart lysates. Mouse heart lysates were prepared at 5 minutes after injection with the cytokines and growth factors listed at top. Heart lysates were subjected to IP with anti-Gab1 (A) or anti-Gab2 (B) serum, followed by IB analysis using the Ab indicated at the left. (C) Activation levels of ERK and AKT were assessed by phospho-specific Ab. Tyrosine phosphorylation of Gab1 (D) Gab2 (E) and their association with SHP2 and p85 was examined by IP of cell lysates from neonatal rat cardiomyocytes (CM) or noncardiomyocytes (non-CM) stimulated with either NRG-1 β (50 ng/ml) or HB-EGF (50 ng/ml) for 5 minutes. IP complexes were subjected to IB using the Ab indicated at the left. (F) NRG-1 β - and HB-EGF-dependent activation of ERK and AKT was examined in CM and non-CM as in C. Tyrosine phosphorylation of Gab1 (G) and Gab2 (H) and their association with SHP2 and p85 in the mouse hearts were analyzed after injection with 5 μ g of NRG-1 β as in A and B, respectively. Heart lysates were prepared at the indicated time after injection. Gab1 and Gab2 underwent tyrosine phosphorylation and associated with SHP2 and p85 in a time-dependent manner upon NRG-1 β stimulation. (I) Activation of ERK and AKT were assessed as in C. Arrows denote 2 isoforms of Gab1. Representative blots of 3 experiments are shown. PY99, antibody recognizing phospho-tyrosine.

signaling pathway (13). Gab family proteins are also involved in EGF family-erythroblastic leukemia viral oncogene (EGF family-ErbB) receptor family signaling (6, 14, 15). EGF family-ErbB receptor signaling plays crucial roles in heart development and preservation of adult cardiac function (16, 17). Among the EGF family members, neuregulin-1 (NRG-1) (18) and heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) (19) are particularly important agonists for ErbB receptors on cardiomyocytes. NRG-1 serves as a paracrine factor that is shed from the endothelium and activates the ErbB4 homodimer or ErbB2/ErbB4 (also known as HER2/HER4) heterodimer on cardiomyocytes (16, 17, 20, 21). NRG-1-, ErbB2-, and ErbB4-deficient mice display embryonic lethality and similar defects in ventricular trabeculation (22–24). HB-EGF-deficient mice also display abnormal valvular development and cardiac dysfunction (25, 26).

The importance of ErbB signaling in the adult heart was first revealed by the unforeseen adverse effects of trastuzumab (Herceptin), a monoclonal Ab against ErbB2 used in the treatment of breast cancer. Trastuzumab induces heart failure when combined with anthracycline treatment (17, 27, 28). In addition to this clinical evidence, cardiomyocyte-specific ErbB2- and ErbB4-deficient mice both exhibit DCM (29–31). However, the precise intracellular signaling responsible for ErbB-regulated cardiac function is still unclear.

In the present study, we used myocardium-specific deletion of Gab family proteins in the mice to demonstrate that Gab1 and Gab2 in the myocardium are essential for transmitting the signal from NRG-1 β /ErbB to directly maintain myocardial function and to subsequently stabilize capillary and endocardial endothelium in the postnatal heart.

Results

Gab1 and Gab2 are engaged in coordination of NRG-1 β /ErbB signaling pathway in the myocardium. We aimed at exploring the function of Gab family proteins in the heart. Thus, we first examined the expression of Gab family transcripts by RT-PCR and detected the mRNA of Gab1 and Gab2, but not that of Gab3, in the murine heart (Supplemental Figure 1; supplemental material available online with this article; doi:10.1172/JCI30651DS1). To elucidate how Gab1 and Gab2 are involved in the intracellular signaling in the heart, mice were injected with various cytokines and growth factors. Among these agonists, ErbB receptor-activating agonists, including NRG-1 β , HB-EGF, and EGF, induced strong tyrosine phosphorylation of Gab1 and Gab2 and the subsequent association of Gab1 and Gab2 with SHP2 and p85 (Figure 1, A and B). We identified 2 Gab1 isoforms, high-molecular weight (high-MW) Gab1 (120–130 kDa) and low-MW Gab1 (100 kDa). Notably, the high-MW Gab1 underwent tyrosine phosphorylation

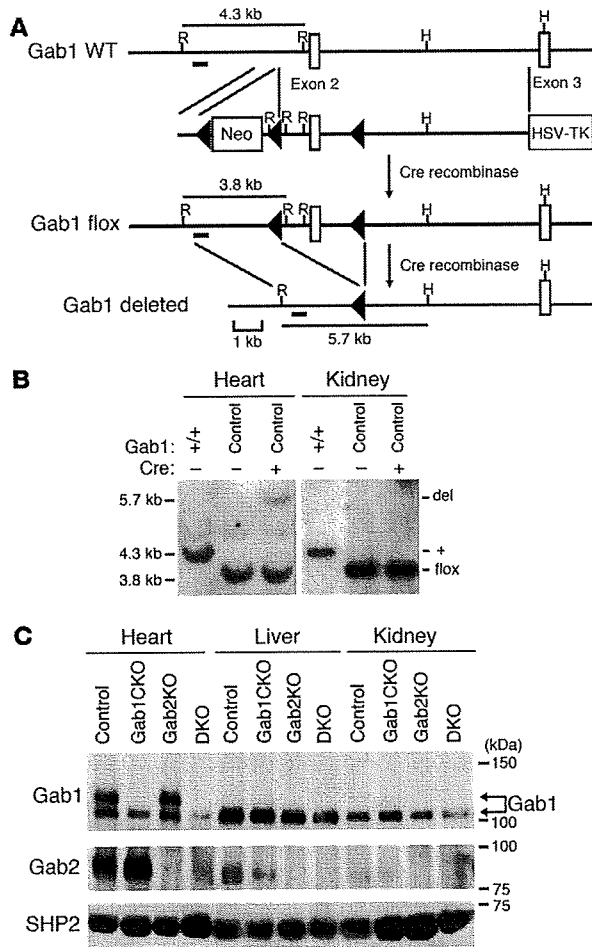


Figure 2

Generation of DKO mice. **(A)** Schematic illustration of genomic structure of the *Gab1* wild-type, *Gab1* flox, and *Gab1*-deleted alleles and a targeting vector. *loxP* sequences are indicated by black triangles. Restriction enzyme sites for *EcoRI* and *HindIII* are indicated as R and H, respectively. Fragments detected by the probe (short bold line) used for Southern blot analysis after digestion of genomic DNA with *EcoRI* and *HindIII* are indicated as solid lines measuring 4.3 kb, 3.8 kb, and 5.7 kb. HSV-TK, herpes simplex virus–thymidine kinase. **(B)** Southern blot analysis demonstrated recombination of the *Gab1^{flox/flox}* allele in the heart, but not in the kidney, of *Gab1^{flox/flox}* mice, which possessed the α -MHC-Cre allele. **(C)** Following IP, expression of Gab1 and Gab2 was examined by IB using anti-Gab1 (top row) and anti-Gab2 (middle row) serums. SHP2 was examined as a loading control (bottom row). Note that 2 isoforms of Gab1 were detected at the different MW exclusively in the heart (arrows) and that the high-MW Gab1 isoform in the heart was completely depleted in Gab1CKO and DKO. The low-MW Gab1 was also reduced by 80% in the heart of Gab1CKO and DKO mice compared with control and Gab2KO mice.

upon stimulation exclusively with NRG-1 β , while low-MW Gab1 was phosphorylated by NRG-1 β , HB-EGF, and EGF (Figure 1A). We confirmed that the high-MW Gab1 is a cardiac-specific isoform using molecular mass spectrometric analysis, which showed that the high-MW band that was recognized by anti-Gab1 Ab in Western blot analysis indeed contained the partial amino acid sequence of Gab1 (Supplemental Figure 2, A–C). Activation of both ERK and AKT was found only when stimulated with NRG-1 β , HB-EGF, and EGF (Figure 1C), although activation of AKT was most strongly induced by IGF-1.

We examined whether the difference in Gab1 phosphorylation was due to the diversity of the cell types. To distinguish the signaling processes in cardiomyocytes from those in noncardiomyocytes, including fibroblasts, endothelial cells, and vascular smooth muscle cells in the heart, we analyzed the action of NRG-1 β and HB-EGF in neonatal rat cardiomyocytes and noncardiomyocytes that had been isolated using the Percoll gradient method (32). NRG-1 β induced tyrosine phosphorylation of Gab1 and Gab2, the subsequent association of Gab1 and Gab2 with SHP2 and p85, and the activation of ERK and AKT in cardiomyocytes but not in noncardiomyocytes (Figure 1, D–F). In clear contrast, HB-EGF induced those changes more strongly in noncardiomyocytes than in cardiomyocytes (Figure 1, D–F). It should be noted that tyrosine phosphorylation of the high-MW Gab1 in cardiomyocytes was induced after stimulation with NRG-1 β but not with

HB-EGF (Figure 1D). These findings suggest that NRG-1 β acts as a highly selective agonist for cardiomyocytes, in agreement with previous reports (33).

Therefore, we focused on the NRG-1 β -dependent signaling pathway through Gab1 and Gab2 in the murine hearts. Gab1 and Gab2 underwent tyrosine phosphorylation and associated with SHP2 and p85 after injection with NRG-1 β in a time-dependent manner (Figure 1, G and H). In addition, both ERK and AKT were also activated by NRG-1 β in a time-dependent manner (Figure 1I). We also checked the activation of ErbB family receptors of murine hearts stimulated with NRG-1 β . NRG-1 β induced tyrosine-phosphorylation of ErbB2 and ErbB4 but not that of ErbB1 (EGFR) or ErbB3 in accordance with a previous report in which cardiomyocytes were used in vitro (Supplemental Figure 3, A–D) (21). Furthermore, Gab1 associated with ErbB4 in a phosphorylation-dependent manner after injection with NRG-1 β (Supplemental Figure 3E). These data suggest the engagement of Gab family proteins in the coordination of NRG-1 β /ErbB signaling pathway.

Generation of cardiomyocyte-specific Gab1 conditional knockout mice. To elucidate the function of Gab family proteins in myocardium, we first generated cardiomyocyte-specific *Gab1* conditional knockout (Gab1CKO) mice using the Cre-*loxP* system. Using homologous recombination in embryonic stem cells, we created a *Gab1^{flox}* allele by introducing 2 *loxP* sites into introns flanking exon 2, which encodes part of the pleckstrin homology domain

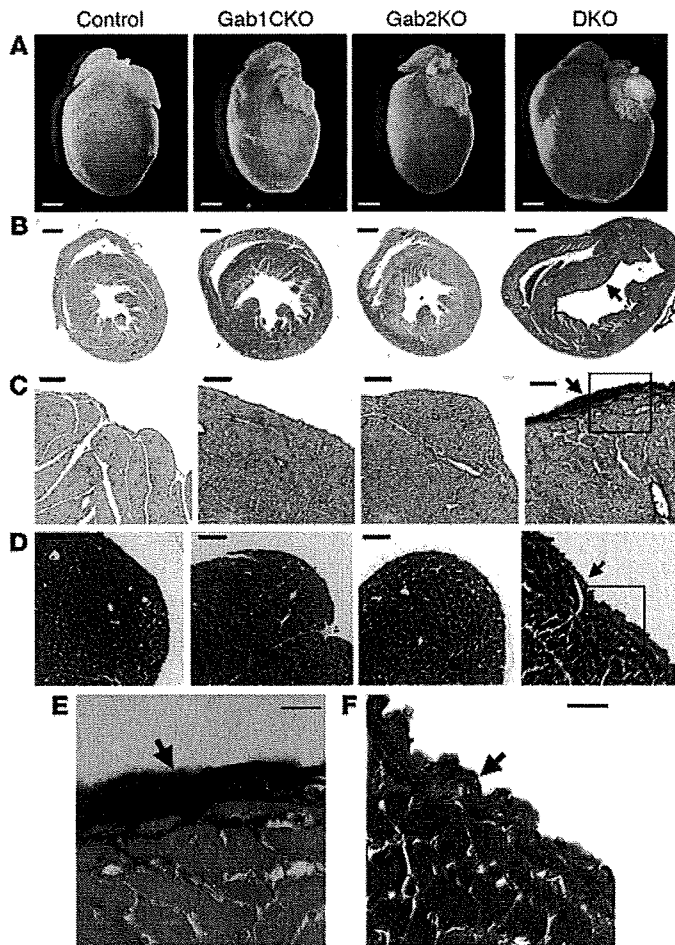


Figure 3

DKO mice display dilated cardiomyopathic features accompanied by EFE. (A) Representative images of whole hearts from 4 groups at 10 weeks of age. (B) Transverse sections of the hearts were stained using the elastica van Gieson method. DKO hearts showed marked biventricular dilation and slight wall thinning compared with the other 3 groups of hearts. (C and E) Higher magnification of elastica van Gieson-stained section of DKO heart shows the focal accumulation of elastic fibers (black) in the endocardium (arrows in B and C). (D) Masson's trichrome-stained section of DKO heart shows focal accumulation of collagen (blue) in the endocardium (arrow in D). (E and F) Boxed regions of C and D, respectively, are enlarged. Scale bars: 1 mm (A and B); 20 μ m (C–F).

diomyocytes and noncardiomyocytes isolated from neonatal rat hearts (32) and detected the high-MW isoform of Gab1 exclusively in cardiomyocytes (Supplemental Figure 2D).

In Gab1CKO mice, the high-MW Gab1 was completely deleted and the low-MW Gab1 was reduced to about 20% of control (*Gab1^{fllox/fllox}*) littermates. The residual low-MW Gab1 protein might be attributed to the noncardiomyocytes present in the heart. These data indicated the successful depletion of Gab1 in the cardiomyocytes (Figure 2C), because α -MHC promoter functions exclusively in the myocardium. In 3-day-old Gab1CKO mouse hearts, we detected an extent of Gab1 protein depletion similar to that of 3- or 10-week-old mice (Supplemental Figure 4B).

Generation of cardiomyocyte-specific Gab1/Gab2 double knock-out mice. In murine hearts, mRNAs of Gab1 and Gab2 were detected by RT-PCR (Supplemental Figure 1). Gab2 can rescue the loss of Gab1 for activation of ERK in the EGF signaling pathway (36). We thus assumed that Gab2 might compensate for the deletion of Gab1 in the cardiomyocytes of Gab1CKO mice.

To completely deplete Gab family proteins in cardiomyocytes, Gab1CKO mice were crossed with Gab2KO mice. We created *Gab1^{fllox/fllox}Gab2^{-/-} α -MHC-Cre(+)* mice by crossing *Gab1^{+/fllox}Gab2^{-/-} α -MHC-Cre(+)* mice with *Gab1^{fllox/fllox}Gab2^{-/-} α -MHC-Cre(-)* mice in the final breeding. The offspring of these crossings were recovered at expected Mendelian ratios as follows: *Gab1^{+/fllox}Gab2^{-/-} α -MHC-Cre(-)* ($n = 44$; 24.6%); *Gab1^{+/fllox}Gab2^{-/-} α -MHC-Cre(+)* ($n = 46$; 25.7%); *Gab1^{fllox/fllox}Gab2^{-/-} α -MHC-Cre(-)* ($n = 39$; 21.8%); *Gab1^{fllox/fllox}Gab2^{-/-} α -MHC-Cre(+)* ($n = 50$; 27.9%). Thereafter, we analyzed the following 4 groups of mice: *Gab1^{fllox/fllox}Gab2^{+/+} α -MHC-Cre(-)* (control); *Gab1^{fllox/fllox}Gab2^{+/+} α -MHC-Cre(+)* (Gab1CKO); *Gab1^{fllox/fllox}Gab2^{-/-} α -MHC-Cre(-)* (Gab2KO); and *Gab1^{fllox/fllox}Gab2^{-/-} α -MHC-Cre(+)* (DKO). Both Gab2KO and DKO mice displayed normal appearance and normal cardiac morphology at birth (Supplemental Figure 5A). Gab2 protein was completely depleted in the Gab2KO and DKO mice, indicating the successful depletion of Gab1 and Gab2 in the cardiomyocytes of DKO mice (Figure 2C).

DKO mice display dilated cardiomyopathic features accompanied by endocardial fibroelastosis. We performed gross morphological examination of the hearts of the 4 groups at 10 weeks of age because we did not find any morphological abnormalities in the hearts of Gab1CKO, Gab2KO, or DKO mice at birth (Supplemental Figure 5A). Although there was no morphological difference among Gab1CKO, Gab2KO, and control mice (Figure 3A), DKO mice exhibited significantly higher heart weight-to-body weight ratios

(Figure 2A). The protein expression of Gab1 in all tissues of mice homozygous for the *Gab1-loxP*-targeted allele (*Gab1^{fllox/fllox}* mice) was almost the same level as in wild-type mice (data not shown). To cause recombination of the floxed allele exclusively in cardiomyocyte lineage, *Gab1^{fllox/fllox}* mice were crossed with transgenic mice expressing α -myosin heavy chain promoter-driven Cre recombinase (α -MHC-Cre mice) (34, 35) (Figure 2A). We confirmed the Cre-mediated recombination during embryogenesis (E10.5 and E14.5) by crossing α -MHC-Cre mice with enhanced GFP reporter mice (Supplemental Figure 4A). The Gab1CKO (*Gab1^{fllox/fllox} α -MHC-Cre(+)*) mice were born normally at the expected Mendelian frequency, whereas Gab1KO mice were embryonically lethal (6). In addition, the Gab1CKO mice displayed normal appearance and normal cardiac morphology at birth (Supplemental Figure 5A).

We observed the expected genetic recombination at the *Gab1* locus in the ventricles of Gab1CKO mouse hearts but not in other tissues (Figure 2B). In order to estimate the expression of Gab1 protein, immunoblot analyses were performed using the extracts from heart, liver, and kidney (Figure 2C). As described above, 2 isoforms of Gab1 proteins were detected in hearts, while low-MW Gab1 was commonly detected, suggesting that the high-MW Gab1 is a cardiac-specific isoform. Moreover, high-MW Gab1 protein was deleted in Gab1CKO hearts, suggesting that high-MW Gab1 is a product of the same *Gab1* gene that has low MW. In addition, we used Percoll gradient centrifugation to analyze the expression of Gab1 in car-

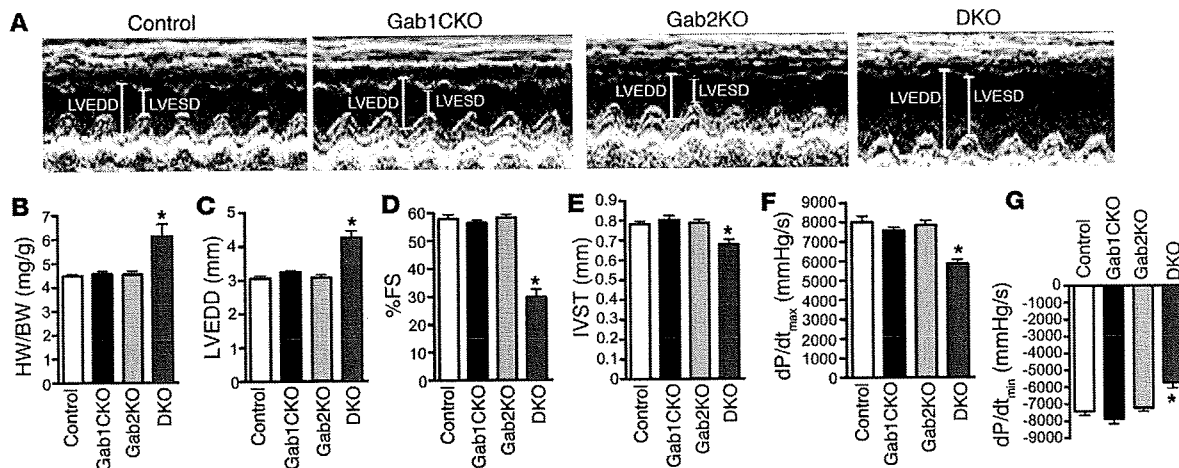


Figure 4

DKO mice exhibit dilated cardiomyopathic features. (A) Representative examples of M-mode echocardiographic images of LV from each group of mice at 10 weeks of age. LVEDD, LV end-diastolic dimension; LVESD, LV end-systolic dimension. (B) Heart weight/body weight (HW/BW) ratio of control mice ($n = 9$), Gab1CKO mice ($n = 6$), Gab2KO mice ($n = 6$), and DKO mice ($n = 10$) at 10 weeks of age. (C) LVEDD, (D) fractional shortening (%FS), and (E) interventricular septal thickness (IVST) of control mice ($n = 8$), Gab1CKO mice ($n = 8$), Gab2KO mice ($n = 7$), and DKO mice ($n = 14$) at 10 weeks of age. There were no significant differences in BW or heart rate among the 4 groups. (F) The maximum first derivative of LV pressure (LV dP/dt_{max}) and (G) the minimum first derivative of LV pressure (LV dP/dt_{min}) were obtained by catheterization of LV from right carotid artery in control mice ($n = 7$), Gab1CKO mice ($n = 6$), Gab2KO mice ($n = 7$), and DKO mice ($n = 7$) at 12 weeks of age. * $P < 0.01$ compared with all other genotypes.

than the other 3 groups without significant differences in body weight (Figure 3A and Figure 4B). Histological examination also demonstrated both left and right ventricular enlargement in DKO mice similar to DCM (Figure 3B).

A significant accumulation of elastic fibers and collagen was observed exclusively in the endocardium of DKO mice (Figure 3, B–F), while fibrotic replacement was not found in the interstitial spaces of the ventricles of DKO mice (Supplemental Figure 6, A and B). There was no significant increase in the number of apoptotic myocardial cells in the hearts of DKO mice compared with those of control mice (Supplemental Figure 7, A and B). The endocardial deposition of elastic fibers and collagen was not found in the neonates of DKO, but was found to some extent in all of the DKO mice after 3 weeks (Supplemental Figure 5A and data not shown). These endocardium-specific changes were coincident with the pathological features of endocardial fibroelastosis (EFE), the genetic causality of which has not been fully elucidated to date (37, 38). We further examined the vasculature in the heart by immunostaining with anti-vWF Ab. Intriguingly, we found abnormally dilated vessels positively stained with anti-vWF Ab exclusively in the LV of DKO mice but not in those of control, Gab1CKO, or Gab2KO mice (Figure 5A). These dilated vessels in DKO mice exhibited the impairment in recruitment of α -SMA-positive VSMCs (Figure 5, B and C). These findings indicate that the maintenance system for both endocardial and vascular endothelium might be disturbed in the DKO mouse hearts. Furthermore, EFE and increased abnormal vessels in the hearts of DKO mice were indirectly ascribed to the lack of Gab1 and Gab2 in the myocardium because there was no abnormality in the other 3 groups.

We assessed *in vivo* cardiac function by echocardiography and cardiac catheterization. Echocardiography revealed a significant increase in LV end-diastolic dimension (Figure 4, A and C), decreased fractional shortening (Figure 4, A and D), and decreased interventricular septal wall thickness (Figure 4E) in 10-week-old

DKO mice compared with age-matched mice of the other 3 groups. Although we did not find a significant changes of LV end-diastolic dimension or fractional shortening between the DKO and control mice at 3 weeks of age, we did observe these changes after 6 weeks of age (Supplemental Figure 8, A and B). Consistent with the echocardiographic findings, cardiac catheterization at 12 weeks of age revealed a marked reduction of the maximum first derivative of LV pressure exclusively in DKO (Figure 4F), demonstrating a reduction in myocardial contractility of the DKO hearts. The accompanying reduction of the minimum first derivative of LV pressure in the DKO mouse hearts indicated the impairment of LV relaxation (Figure 4G). There were no significant differences in heart rate or LV peak pressure among the 4 groups (data not shown). This relaxation failure was supported by the electron microscopic findings. We noticed that sarcomere length was reduced in the DKO mouse hearts, which indicated the hypercontraction phenotype (39), although we could detect slight changes in the mitochondria of DKO mouse hearts (Supplemental Figure 7, C and D). In agreement with the reduced contractility and relaxation reflecting heart failure, the fetal cardiac gene program was reactivated, as evidenced by the significant increase in both *atrial natriuretic peptide (ANP)* and *skeletal α -actin (α -SKA)* mRNAs in DKO mice (Figure 6, A–C).

Approximately 70% of the DKO mice died, presumably of heart failure accompanied by pleural effusion, between 3 and 72 weeks of age (Figure 6D). We observed remarkably dilated ventricles in DKO mice that had died of heart failure (Supplemental Figure 5B, right panel). The other 3 groups of mice lived normally during the observation period of 500 days (Figure 6D). In agreement with this survival analysis, we did not observe any enlargement of the hearts of Gab1CKO and Gab2KO mice at 300 and 500 days of age. (Supplemental Figure 5B and data not shown). These data indicate that depletion of both Gab1 and Gab2 in the myocardium result in DCM-like phenotype accompanied by EFE.

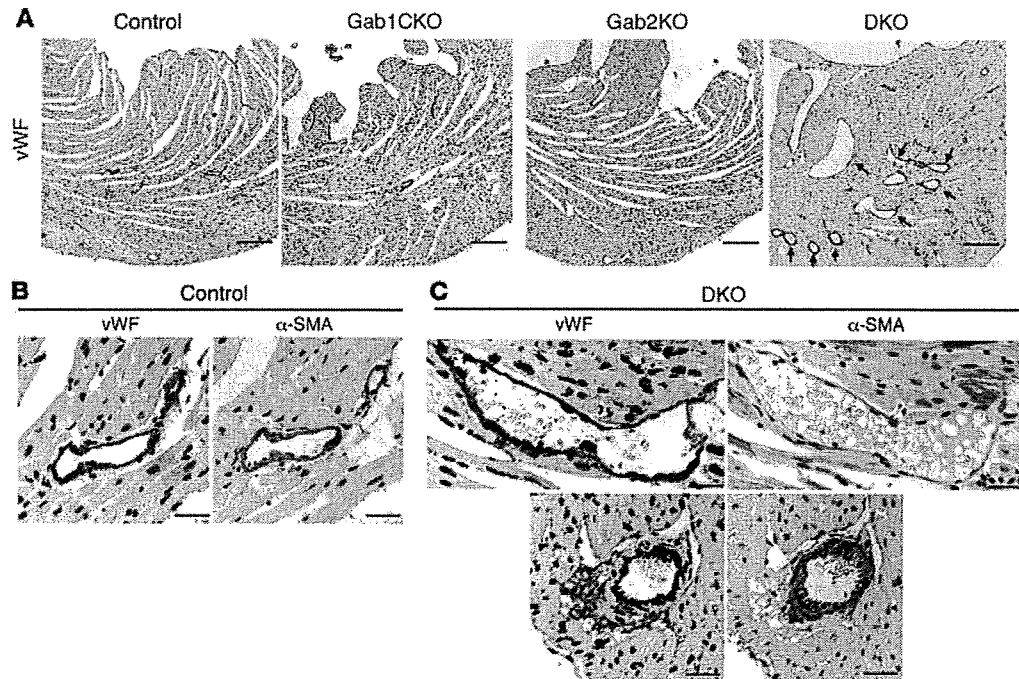


Figure 5

DKO mice display vascular abnormalities in the ventricles. (A) Heart sections from 4 groups of mice at 6 weeks of age were immunostained with anti-vWF Ab. vWF-positive, abnormally dilated vessels were observed in the left ventricles of DKO mice (arrows) but not in those of control, Gab1CKO, or Gab2KO mice. Representative photographs are shown. (B and C) Heart sections from control (B) and DKO (C) mice at 6 weeks of age were immunostained with anti-vWF and anti- α -SMA Abs. The abnormally dilated vessels in DKO mice were not surrounded by α -SMA-positive VSMCs in most cases (C, top panels), although vessels of normal diameter near the epicardium in DKO mice were surrounded by α -SMA-positive VSMCs (C, bottom panels) as observed in control mice (B). Representative images are shown. Scale bars: 200 μ m (A); 20 μ m (B and C).

Gab1 and Gab2 are required for NRG-1 β /ErbB signaling in the heart. To determine requirements of Gab1 and Gab2 in NRG-1 β -triggered signaling in the myocardium, we examined the activation of ERK and AKT after injection of NRG-1 β . NRG-1 β -induced activation of ERK and AKT was completely abrogated in DKO mice but not in the other 3 groups (Figure 7, A-C), suggesting a compensatory function of Gab1 and Gab2 in the heart. Consistently, tyrosine phosphorylation of Gab1 and subsequent association with SHP2 and p85 were observed in control and Gab2KO mice but not in Gab1CKO or DKO mice (Figure 7D). Tyrosine phosphorylation of Gab2 and subsequent association with SHP2 and p85 were conversely observed in control or Gab1CKO mice but not in Gab2KO or DKO mice (Figure 7E). Tyrosine phosphorylation of ErbB2 and ErbB4 was comparable among the 4 groups (Figure 7F). IGF-1- and HB-EGF-dependent activation of ERK and AKT were not affected in the hearts of DKO mice (Supplemental Figure 9, A and B). These data indicate that Gab1 and Gab2 are required exclusively for NRG-1 β /ErbB signal-dependent activation of ERK and AKT in the heart.

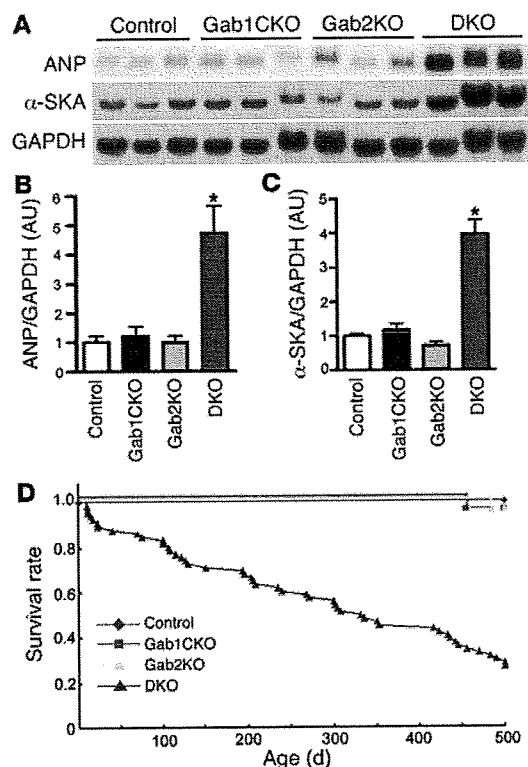
Angiopoietin 1 upregulation induced by NRG-1 β is impaired in Gab1/Gab2-deficient myocardium. Because we observed no cardiac abnormalities in Gab2KO mice, we determined that the primary cause of EFE and abnormal vessels in DKO mouse hearts was not the lack of Gab2 in endothelial cells. To identify the potential signal defect that caused EFE and malformed vessels downstream of the NRG-1 β /ErbB-Gab1/Gab2 signaling pathway in the myocardium, we used microarrays to carry out a global survey of mRNA in control and DKO mice treated with or without NRG-1 β for 8 hours.

We found several transcripts that were upregulated by stimulation with NRG-1 β in the hearts of control mice but not in those of DKO mice (Figure 8A). Among these transcripts presented in the cluster diagram, we considered thrombospondin 1 (TSP1) and angiopoietin 1 (Ang1) to be potential paracrine factors from myocardium and Eph receptor A4 (EphA4) to be important for the intercellular communication between cardiomyocytes and surrounding cells.

To address the pathogenesis of endocardial and vascular abnormalities observed in DKO mouse hearts, we focused on Ang1 because it has an important role in maturation of both vascular endothelium and endocardial endothelium *in vivo* (40–42). We confirmed by northern blot analysis that NRG-1 β upregulated *Ang1* mRNA in the hearts of control mice, but not DKO mice (Figure 8, B and C). NRG-1 β consistently induced significant upregulation of *Ang1* mRNA in cultured cardiomyocytes but not in noncardiomyocytes (Figure 8, D–F). In association with defective expression of Ang1, CD31-positive capillary density was significantly decreased in the LV of DKO mice compared with control (Figure 8, G and H). Taken together, these findings suggest that the lack of NRG-1 β -induced upregulation of Ang1 might be one of the possible causes for pathogenesis of EFE and abnormal vasculatures in DKO mouse hearts.

Discussion

To our knowledge, the present study is the first to reveal the essential roles of Gab family proteins for NRG-1 β /ErbB signaling pathway in the heart. Gab1 and Gab2 were markedly tyro-

**Figure 6**

DKO mice die of heart failure. (A) Northern blot analyses of the hearts from control, Gab1CKO, Gab2KO, and DKO mice ($n = 3$ for each group) at 12–14 weeks of age showed the increased expression of mRNAs for ANP and α -SKA in DKO mice. GAPDH mRNA was also measured for sample loading control. (B and C) The relative levels of ANP and α -SKA mRNA (normalized to GAPDH mRNA levels) were quantified from 3 mouse hearts in each group. (* $P < 0.01$ compared with all other groups.) (D) Kaplan-Meier curves showing survival rate in control mice ($n = 30$), Gab1CKO mice ($n = 30$), Gab2KO mice ($n = 30$), and DKO mice ($n = 66$) mice by 500 days. The number of dead DKO mice was 48 (72.7%); $P < 0.001$ for DKO versus control, Gab1CKO, and Gab2KO mice by log-rank test.

diomyocytes (19), the heart failure observed in HB-EGF-deficient mice might have resulted from abnormal signaling in the development of the valvular apparatus. Therefore, the cardiac phenotypes observed in DKO mice were mainly ascribable to the defects of the NRG-1 β /ErbB signaling pathway in the myocardium. Consistent with this, similar DCM-like phenotypes are found in cardiac-specific ErbB2- and ErbB4-deficient mice (29–31).

NRG-1 β activates both ERK and PI3K/AKT pathways in cardiomyocytes in vitro, both of which have been implicated in modulation of cell survival and protein synthesis (21, 43). NRG-1 β actually induced strong activation of ERK and AKT in the hearts of control, but not DKO, mice. This finding provides what we believe to be the first in vivo evidence that Gab1 and Gab2 are required for transmission of the NRG-1 β /ErbB signal to downstream signaling pathways, ERK and AKT. DKO mice progressively developed DCM phenotypes, demonstrating clearly that Gab1 and Gab2 were essential for maintenance of myocardial function through transmission of NRG-1 β /ErbB signaling pathway (Figure 9).

DKO mice also exhibited abnormal deposition of elastic fibers and collagen specifically in the endocardium, reminiscent of the pathological features observed in primary EFE. Clinically, primary EFE is found mainly in infants, children, and adolescents and is frequently accompanied by contractile deterioration similar to DCM. Although there have been some reports suggesting the heritable causality of primary EFE (37, 38), the precise pathogenetic mechanisms have not been elucidated to date. These DKO mice may provide the first mouse model of EFE. Further genetic analysis of cardiac-specific isoform of Gab1 will certainly contribute to our understanding of the pathogenesis of EFE.

DKO mouse hearts also displayed abnormal vasculatures as well as EFE. Microarray analysis enabled us to identify several transcripts that were upregulated by NRG-1 β in the control hearts but not in DKO hearts. Among these transcripts selected in the cluster analysis, TSP1, EphA4, and Ang1 have been reported to be involved in the intercellular-dependent vascular regulation (40, 44, 45). Intriguingly, NRG-1 β /ErbB2/ErbB4 signaling, Ang1/Tie2 signaling, VEGF/VEGFR2 signaling, and serotonin-mediated (5-HT_{2B}-mediated) signaling are required for the proper maturation of endocardium (16, 17, 40, 46, 47). Moreover, Ang1- or Tie2-deficient mice exhibit embryonic lethality accompanied by abnormally dilated vessels as well as defects in the endocardium (40, 42, 48). Furthermore, we demonstrated for the first time that postnatal cardiomyocytes are important Ang1-producing cells, whereas Ang1 has been believed to be mainly secreted from vascular mural cells such as pericytes and VSMCs (40, 41). Thus, we could pro-

sine phosphorylated in the myocardium after stimulation with NRG-1 β among various growth factors and cytokines. Tyrosine-phosphorylated Gab1 and Gab2 subsequently associated with SHP2 and p85, resulting in strong activation of both ERK and AKT in the myocardium. NRG-1 β -dependent activation of ERK and AKT was almost completely abrogated in the DKO mouse hearts. In agreement with NRG-1 β -dependent downstream signaling defects, DKO mice displayed DCM-like phenotypes and EFE with aging. Interestingly, DKO mouse hearts also displayed abnormally dilated vessels with the loss of VSMCs. To address the mechanism for the abnormality in endocardial/vascular endothelium in DKO mouse hearts, we performed DNA microarray analysis and found several vasculature-regulating gene transcripts, such as Ang1, upregulated by NRG-1 β in control, but not in DKO, mouse hearts. Thus, Gab family proteins mediate NRG-1 β -dependent stabilization of endocardial/vascular endothelium through the paracrine system from cardiomyocytes in the heart.

Gab1 and Gab2 are specifically required for coordination of NRG-1 β /ErbB-dependent signaling pathway in the myocardium. NRG-1 β shed from endothelial cells activates ErbB2/ErbB4 heterodimer or ErbB4 homodimer on the cardiomyocytes (16, 17, 21). Consistent with this notion, we found that NRG-1 β induced prominent tyrosine phosphorylation of Gab1 and Gab2 in cardiomyocytes but not in noncardiomyocytes. In addition, the cardiomyocyte-specific, high-MW isoform of Gab1 was tyrosine phosphorylated after stimulation with NRG-1 β but not with other agonists including HB-EGF and EGF. It has been reported that HB-EGF-deficient mice develop heart failure (25, 26). Given that HB-EGF induced a much stronger tyrosine phosphorylation of Gab1 and Gab2 in noncardiomyocytes than in cardiomyocytes in our study and that valvular structures are developed from noncar-

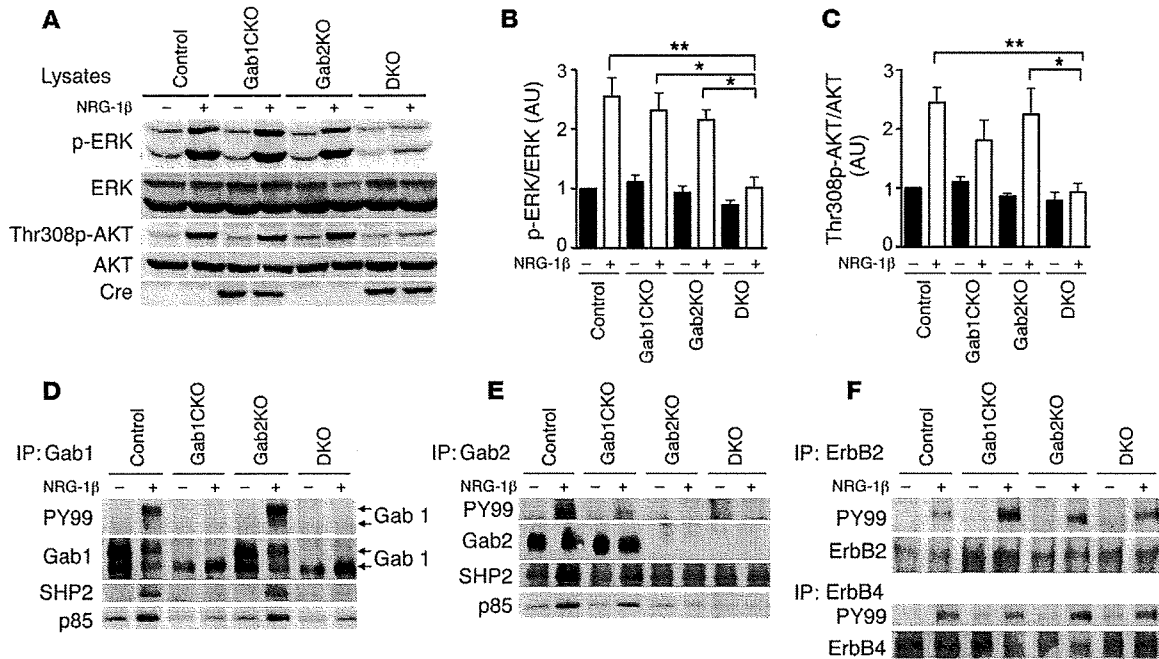


Figure 7

Gab1 and Gab2 are required for NRG-1 β -dependent ERK and AKT activation in the heart. (A) NRG-1 β -induced activation of ERK and AKT in the hearts from the indicated mice was assessed using phospho-specific Abs. Activation of ERK and AKT was exclusively attenuated in DKO hearts compared with the other 3 groups. Representative blots of 4 experiments are shown. (B) Phosphorylation of ERK was quantified against total ERK ($n = 4$). (C) Phosphorylation of AKT was quantified against total AKT ($n = 4$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ for the indicated groups. Tyrosine phosphorylation of Gab1 (D) and Gab2 (E) and their association with SHP2 and p85 in hearts from the 4 groups of mice after injection with NRG-1 β was examined as in Figure 1, A and B. Arrows in D denote the 2 isoforms of Gab1. (F) Tyrosine phosphorylation of ErbB2 (upper panels) and ErbB4 (lower panels) in hearts from the 4 groups were assessed at 5 minutes after NRG-1 β injection. Tyrosine phosphorylation of ErbB receptors in the murine hearts upon NRG-1 β stimulation was examined by IP with anti-ErbB2 or anti-ErbB4 Ab, followed by IB with the Abs indicated at the left.

pose that the defective expression of Ang1 might be involved in the pathogenesis of EFE and abnormal vessels in DKO hearts, though we cannot exclude the possibility that other vasculature-regulating genes, such as TSP1 and EphA4, play important roles in endothelial maintenance. Cardiac-specific gene ablation of Ang1 would be helpful to understand its importance in cardiomyocyte-endothelial cell interactions.

So far, it has been well established that NRG-1 functions as a cytoprotective growth factor in cardiomyocytes (17, 21, 43). Here, our findings propose a novel function of NRG-1; NRG-1 regulates vascular homeostasis through the paracrine expression of endothelium stabilization factors, such as Ang1, via Gab family proteins. Importantly, accumulating evidence has revealed that normal endothelial function is required for the maintenance of myocardial function (16). Collectively, Gab1 and Gab2 in the myocardium are essential for both maintenance of myocardial function and stabilization of capillary or endocardial endothelium through transmission of NRG-1 β /ErbB signaling (Figure 9).

Methods

Materials. Anti-phospho-p44/p42 ERK (Thr202/Tyr204), anti-phospho-AKT (Thr308), and anti-AKT Abs were purchased from Cell Signaling Technology. The use of anti-Gab1 and anti-Gab2 serums in IP was described previously (13, 49). The Abs against Gab1, Gab2, and p85 used in IB analysis were from Millipore; Abs against antibody recognizing phospho-tyro-

sine (PY99), ERK1, ERK2, and SHP2 were from Santa Cruz Biotechnology Inc.; Abs against vWF and α -SMA were from Dako; the Ab against CD31 was from BD Biosciences – Pharmingen; and the Ab against Cre was from EMD Biosciences. Collagenase, Percoll, recombinant NRG-1 β (NRG-1 β EGF domain; sold as heregulin- β 1), HGF, and PDGF-BB were from Sigma-Aldrich. HB-EGF and EGF were from R&D Systems. FGF2 was from EMD Biosciences. LIF was from Millipore. IGF-1 and erythropoietin were kindly provided by Astellas Pharma and Chugai Pharmaceutical Co., respectively.

Cell cultures. Primary cultures of neonatal rat cardiomyocytes were prepared from ventricles of 1- to 2-day-old Wistar rats (Kiwa Jikken Dobutsu) on Percoll gradient as described previously (32). Briefly, ventricles were isolated from neonatal rats and treated with trypsin and collagenase for 30 minutes at 37°C. Isolated cells were suspended in 58.5% Percoll in HBSS (20 mM HEPES, 116 mM NaCl, 12.5 mM NaH₂PO₄, 5.6 mM glucose, 5.4 mM KCl, 0.8 mM MgSO₄; pH 7.35) and added to the discontinuous gradient consisting of 40.5% and 58.5% Percoll in HBSS. After centrifugation at 1,400 g for 30 minutes at 15°C, the cardiomyocytes were collected from the interface of the discontinuous Percoll gradient and further enriched by preplating for 60 minutes on noncoated dishes. Unattached cells were cultured as cardiomyocytes in M-199 (Invitrogen) with 10% FBS. Attached cells were cultured as noncardiomyocytes in DMEM with 10% FBS. Immunocytochemical examination with anti-sarcomeric α -actinin Ab (Sigma-Aldrich) revealed that more than 95% cultured cells in the cardiomyocyte fraction were sarcomeric α -actinin-positive cardiomyocytes (data not shown). The population of non-cardiomyocytes is described in the supplemental information.

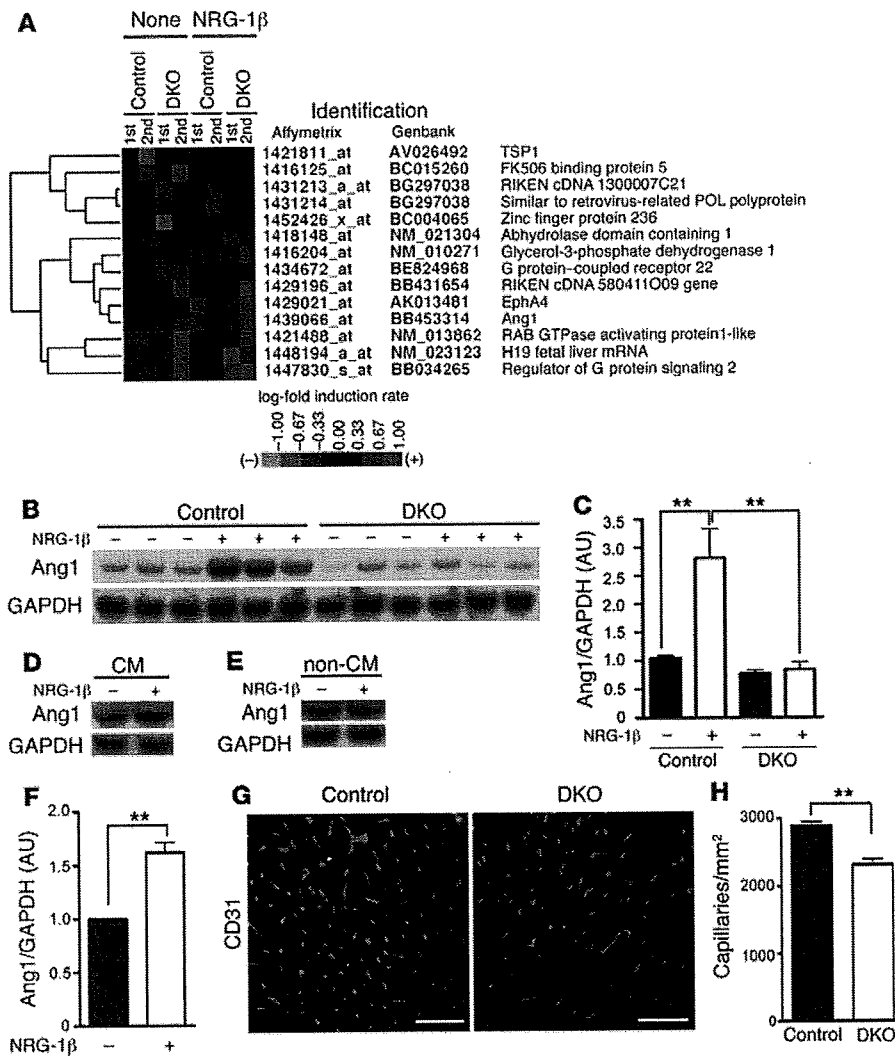


Figure 8

Gab1 and Gab2 are required for the NRG-1 β -induced Ang1 upregulation and endothelial stabilization in the heart. (A) RNAs from the ventricles of control and DKO mice ($n = 3$ per group) were prepared 8 hours after injection with NRG-1 β or vehicle. This preparation was performed twice. We used pooled RNAs from 3 mice and performed Affymetrix DNA microarrays independently 2 times (indicated as 1st and 2nd). Cluster analysis was performed of upregulated (red) and downregulated (green) genes in NRG-1 β -treated control and DKO mice. Color intensity is relative to the median (black). (B) Northern blot analysis demonstrated the upregulation of *Ang1* mRNA in the hearts of control mice but not in those of DKO mice following injection with NRG-1 β ($n = 3$ per group). *GAPDH* mRNA was checked for gel loading. (C) Quantitative analysis of *Ang1* mRNA (normalized to *GAPDH* mRNA) ($n = 3$ per group; ** $P < 0.01$ between the indicated groups). (D and E) *Ang1* expression was upregulated in cardiomyocytes but not in noncardiomyocytes after stimulation with NRG-1 β . (F) Quantitative analysis of *Ang1* mRNA normalized to *GAPDH* mRNA ($n = 4$; ** $P < 0.01$). (G) Cryosections of the hearts from control and DKO mice were immunostained with anti-CD31 Ab. Representative results are shown. Scale bars: 50 μ m. (H) Capillary densities were counted from the number of capillaries per square millimeter. ** $P < 0.01$.

Biochemical analyses. Mice (body weight, approximately 20 g) were injected with following agonists: LIF (1×10^4 U), NRG-1 β (5 μ g), HB-EGF (5 μ g), EGF (5 μ g), FGF2 (2 μ g), IGF-1 (5 μ g), HGF (2 μ g), PDGF-BB (5 μ g), and erythropoietin (600 IU). Briefly, mice anesthetized by avertin were injected i.v. via the inferior vena cava with various growth factors and cytokines dissolved in 100 μ l of normal saline. The hearts were isolated 5 minutes after injection and washed with ice-cold 4 $^\circ$ C PBS. After removing both atria, the ventricles were snap-frozen in liquid nitrogen. The ventricles were homogenized in lysis buffer containing 50 mM HEPES, 100 mM sodium fluoride, 2 mM sodium orthovanadate, 4 mM EDTA, 1% Tween-20, 0.1% SDS, and a protease inhibitor cocktail Complete (Roche Applied Science) using a polytron homogenizer as described previously (50). The lysates were cleared by centrifugation at 17,000 g for 30 minutes. Protein concentration was measured with BCA protein assay kit (Pierce). Lysates of cultured cells were prepared essentially as described previously (13). After stimulation, cells were immediately lysed in ice-cold lysis buffer (20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1 mM sodium vanadate, 1 mM dithiothreitol, and a protease inhibitor cocktail Complete). The cleared lysates were subjected to IP and IB following standard procedures as described previously (13).

Creation of a conditional *Gab1* mutant allele. Genomic DNA fragments of *Gab1* were isolated from a λ -FixII 129/Sv mouse strain genomic library, and

a targeting construct was engineered using a triple-*loxP* system (provided by W. Reith, Department of Pathology and Immunology, University of Geneva Medical School, Geneva, Switzerland). We flanked exon 2, which encodes part of pleckstrin homology domain with 2 *loxP* sites (which codes for amino acids 25–123). The linearized construct DNA was introduced into R1 embryonic stem cells by electroporation. G418-resistant cell colonies were screened for homologous recombination by PCR, as reconfirmed by Southern blot analysis. Embryonic stem cell clones with a *loxP*-floxed exon 2 (*Gab1^{lox}*) without the TK-neo cassette were obtained by transient transfection with a pCre-Pac (provided by T. Yagi, Osaka University) (51). The engineered embryonic stem cells were injected into C57BL/6J blastocysts.

Generation of *Gab1CKO* and *DKO* mice. *Gab1^{lox}* allele was generated in 129/Sv-C57BL/6J mixed background. The transgenic mice expressing Cre recombinase under the control of α -MHC promoter in C57BL/6J background (α -MHC-Cre mice) were generated as previously reported (35). *Gab1^{lox/lox}* mice were crossed with α -MHC-Cre mice to generate *Gab1CKO* mice (*Gab1^{lox/lox}Gab2^{+/-} α -MHC-Cre(+)*). We had also previously created *Gab2KO* mice and reported that these mice are viable and display defects in mast cells (9, 11). We further crossed *Gab1CKO* mice with *Gab2KO* mice to create *DKO* mice (*Gab1^{lox/lox}Gab2^{-/-} α -MHC-Cre(+)*). PCR primers used for mouse genotyping are listed in the supplemental information. All mice