

助成番号 0912

Na⁺/H⁺ 交換輸送体と細胞内 Ca²⁺ センサー NCS-1 の相互作用による 心肥大形成シグナルの解析

西谷 友重, 若林 繁夫

国立循環器病センター研究所循環分子生理部

概要 心臓に圧負荷などの力学的負荷がかかると、その負荷に適応するために個々の心筋細胞は肥大する。形質膜 Na⁺/H⁺ 交換輸送体(NHE1)は生理的には細胞内 pH、Na⁺ 濃度、細胞容積の調節を担うトランスポーターであるが、同時に心筋リモデリングに関与することが示唆されていた。私達は活性化型 NHE1 を心筋特異的に高発現するトランスジェニック (TG) マウスを用いた研究により、NHE1 の活性化が心肥大・心不全発症に十分な要因になり得ること、そのメカニズムとして細胞内 Na⁺ 上昇に引き続く Ca²⁺ 濃度上昇が Ca²⁺ 依存性の心肥大シグナルを活性化させ、心筋リモデリングを惹起することを明らかにした。一方、このような細胞内 Ca²⁺ の働きを仲介するものとして様々な Ca²⁺ センサータンパク質が存在する。NCS-1 (Neuronal Ca²⁺ sensor-1) はその一つであり、興奮性細胞特異的に発現し神経機能に重要な役割を持つことが知られているが、心臓における機能は不明であった。私達は NCS-1 欠損 (KO) マウスを用いた研究により、NCS-1 がホルモン刺激による心肥大形成に関与している可能性を見出した。そこで今回、NCS-1 の心肥大形成における役割を明らかにし、その詳細な分子機構を NHE1 の TG マウスと掛け合わせることで明らかにすることを目的とした。その結果、1) NCS-1 は心筋細胞特異的に発現し、形質膜、核膜周辺および Ca²⁺ ストアなど Ca²⁺ シグナル関連部位に集積していた。2) NCS-1 を高発現させると、心肥大誘発因子を加えたのと同様、心筋細胞の自動拍動の強度・速さの増加および形態変化が生じた。3) 逆に NCS-1 を欠損したマウスでは WT に比べ血清除去などによるストレスに弱く、長期間の処理でアポトーシスが生じた。4) NCS-1 KO マウスでは ATP 刺激による Ca²⁺ トランジェントの上昇が顕著に軽減し、また ET1 や PE などの心肥大誘導因子による心肥大が顕著に軽減した。すなわち NCS-1 が Gq coupled 受容体刺激によって生じる心肥大形成経路を仲介している可能性が示唆された。5) NHE1-Tg および NCS-1 KO マウスをかけあわせた実験から、NHE1 の活性化によって引き起こされる心肥大は NCS-1 欠損ではレスキューされないことがわかった。NHE1 活性化による心肥大・心不全は主に CaMKII/HDAC 経路を介して惹起されることから、NCS-1 による心肥大はそれ以外の経路によるものと推測される。Calcineurin/NFAT 経路は、心肥大以外にもサバイバルにも寄与しており、NCS-1 の KO 心筋がストレスに脆弱であることの原因にもなり得ることから、一つの候補としてその寄与を現在検討中である。

1. 研究目的

Na⁺/H⁺ 交換輸送体 1 (NHE1, SLC9) は、細胞内 pH、Na⁺ 濃度、細胞容積の調節など、イオン環境整備に関わる主要なトランスポーターである。NHE1 によるイオン輸送は、ストレス時に分泌されるホルモンやメカニカル刺激などさまざまなシグナルにより活性化されるため、各種心疾患やがんなどにおいて NHE1 の関与が指摘されてきた。私達は NHE1 を心筋特異的に高発現するトランスジェニックマ

ウスを用いた研究により、1) NHE1 の活性化が心肥大・心不全発症に十分な要因になり得ること、2) そのメカニズムとして、細胞内 pH というよりはむしろ細胞内 Na⁺ 上昇に引き続く Ca²⁺ 濃度上昇が Ca²⁺ 依存性の心肥大シグナルを活性化させ、心筋リモデリングを惹起することを明らかにした (**Figure 1**) (Nakamura *et al.*, 2008)。このような重要シグナル分子としての細胞内 Ca²⁺ の働きを仲介するものとしてカルモジュリンに代表される様々な Ca²⁺ センサータンパ

ク質が存在し、時期・部位特異的に Ca^{2+} 依存性の反応を制御している。その一つ NCS-1 (Neuronal Ca^{2+} sensor-1) は、興奮性細胞特異的に発現し神経機能に重要な役割を持つことが知られている。例えば、シナプス伝達・可塑性に寄与すること (Chen *et al.*, 2001; Sippy *et al.*, 2003)、またその分子メカニズムとしてイノシトールリン酸化酵素 PI4-K を活性化して PIP_2 量を増加させ神経伝達物質の分泌促進を行うこと (Weisz *et al.*, 2000; Koizumi *et al.*, 2002) や、各種イオンチャネルの制御因子として働くこと (Weiss *et al.*, 2000; Nakamura *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2001; Tsujimoto *et al.*, 2002) などが知られている。また私達は、

NCS-1 が障害を受けた神経細胞においてその発現量が増加するサバイバル因子として働くという全く新しい重要機能を見出した ((Nakamura *et al.*, 2006), *News section* にも掲載) (Figure 2 参照)。NCS-1 は神経のみならず、心筋にも (特に未成熟期で) 高発現する (Nakamura *et al.*, 2003) が、NCS-1 の心筋における生理的・病態的役割については全く不明である。私達は NCS-1 欠損 (KO) マウスを用いた最近の研究により、①NCS-1 がホルモン刺激による心肥大形成に関与しているらしいこと、②NHE1 の Tg マウス心筋において NCS-1 の発現量が増加していることを見出した。一方、ホルモン刺激の下流には IP_3 受容体活性化による細胞内 Ca^{2+} 上昇が知られているが、NCS-1 と IP_3 受容体が互いに相互作用することが、近年、神経において報告されている (Boehmerle *et al.*, 2006; Schlecker *et al.*, 2006)。また NHE1 も PIP_2 ならびにホルモンによって活性化を受けることが知られている (Aharonovitz *et al.*, 2000)。これらの結果は、ホルモン刺激による心肥大形成に NHE1 と NCS-1 が互いに関わっている可能性を示唆している。

従って本申請の研究目的は、ホルモン刺激による NHE1 の活性化を介した心肥大形成シグナルに、 Ca^{2+} センサー NCS-1 がどのように関連するのか、その分子ネットワークを明らかにすることである。これにより、未だ未知なる NCS-1 の心臓における役割の一端も解明することになる。

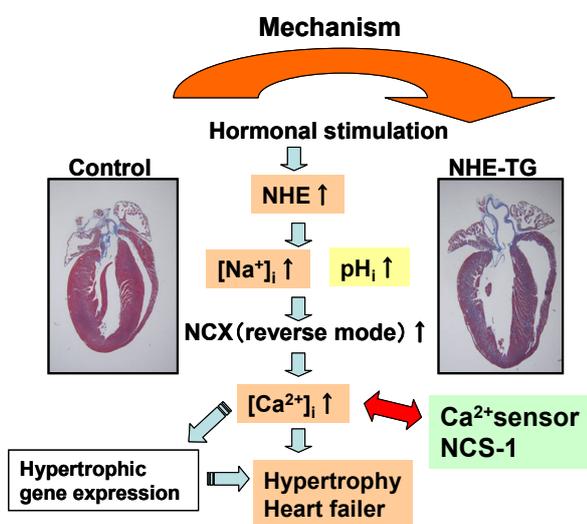


Figure 1. Hypothesis

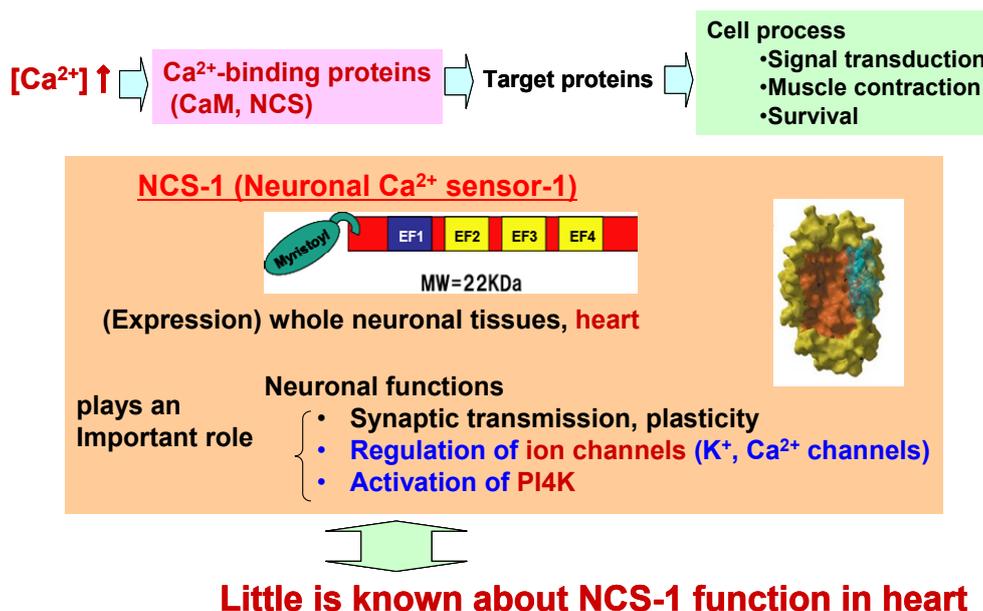


Figure 2. What is NCS-1 ?

2. 研究方法

2.1 NCS-1 遺伝子改変動物の作製

野生型ヒトNCS-1 および Ca^{2+} との結合力が弱い変異型 (E120Q)、また N 末端がミリストイル化されず PL_4K を活性化しない変異型 NCS-1 (G2A)、またそれぞれの HA 標識体は、通常の PCR 法により作製した。さらにこれらをコードするアデノウイルスも定法に従い作製した。また、心筋 α -ミオシン重鎖 (α -MHC) プロモータを用いて心筋特異的に発現するトランスジェニック (Tg) マウスを作製した。さらにノックアウト (KO) マウスも共同研究により、作製済みである (Figure 3 参照)。

2.2 その他の測定

マウス新生児心筋細胞の培養は、生後 1-2 日目の新生児マウスの心臓より心室筋を取り出し、ハサミで細かく切った後、酵素処理 (コラゲナーゼ/トリプシン) を行なってバラバラにした後、繊維芽細胞を取り除き初代培養を行なった。

細胞内 Ca^{2+} 濃度は、自動拍動、あるいは電気フィールド刺激した際の Ca^{2+} 濃度変化 (Ca^{2+} トランジェント) を蛍光指示薬 Indo 1-AM を用いた蛍光法により測定した。その際、冷却 CCD 高速カメラ付き AQUACOSMOS システムを用いた。

心筋細胞の細胞死の判定は、形態および Hoechst 33342 を用いて核染色を行ったものについて、クロモソームの凝集の有無で判定した。

NCS-1 タンパク質の局在パターンは、丸ごと心臓の連続切片 (5 μ m)、培養心筋細胞、あるいは HEK293 細胞に遺伝子導入して高発現させたものを、免疫蛍光法により可視化し、オリンパス Fluoview FV1000 コンフォーカル顕微鏡を用いて蛍光像観察を行った。

心エコーは、インフルレン (1%) 麻酔下にあるマウスの左

室短軸像を M モードで記録した (Vevo2000 ultrasound system, VisualSonics 2100, Toronto, Canada)。

3. 研究結果

まず、心臓における NCS-1 の役割を確認するため、1) 心臓での発現パターン、2) NCS-1 を過剰発現した場合、また 3) NCS-1 を欠損させた場合、心機能やサバイバルにどのような影響を及ぼすかについて、野生型、ドミナントネガティブ変異型 NCS-1 を高発現する Tg マウス、また KO マウス心室筋より単離した培養心筋細胞を用いて検討した。また心肥大との関連についても検討を行なった。

3.1 NCS-1 の心臓での発現パターン

NCS-1 は繊維芽細胞ではなく心筋細胞に高発現し、その細胞内局在は、形質膜、核膜周辺および筋小胞体に集積していることがわかった。また各成長過程では、成体と比べ未成熟期に高発現していた。一方、病的な肥大心筋では、未成熟期と同様に細胞内 Ca^{2+} レベルが高く Ca^{2+} 依存性シグナルが活性化されていると考えられるが、NCS-1 の発現量も上昇していた (Figure 4)。

3.2 NCS-1 を過剰発現したときの影響

NCS-1 を培養心筋細胞にアデノウイルスにより過剰発現させると形態変化が生じ、それは心肥大誘発因子を加えたときと同様の様相を呈するようになった。また自動拍動の速さも Ad-GFP をインフェクションしたものと較べ速くなった。細胞内 Ca^{2+} 濃度を急性単離した成体心筋において測定すると、特に収縮期の細胞内 Ca^{2+} レベルおよび Ca^{2+} トランジェントの振幅が上昇していたが、興味深いことに新生児由来の培養心筋細胞ではこのような増加は認められなかった。

3.3 NCS-1 を欠損させた場合の影響

NCS-1 タンパク質の全身ノックアウト (KO) マウスでは、

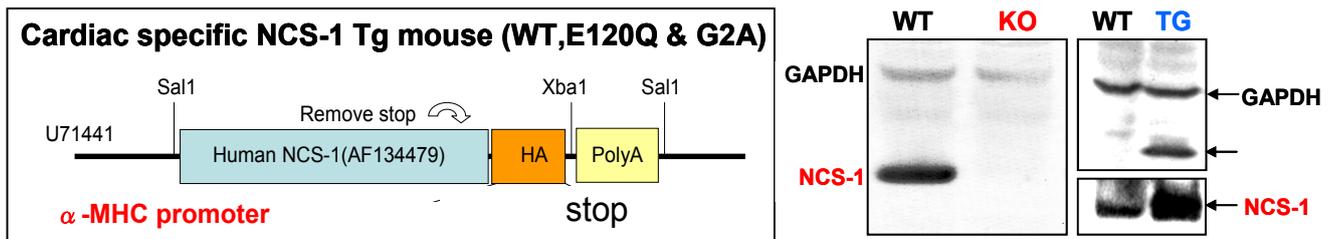
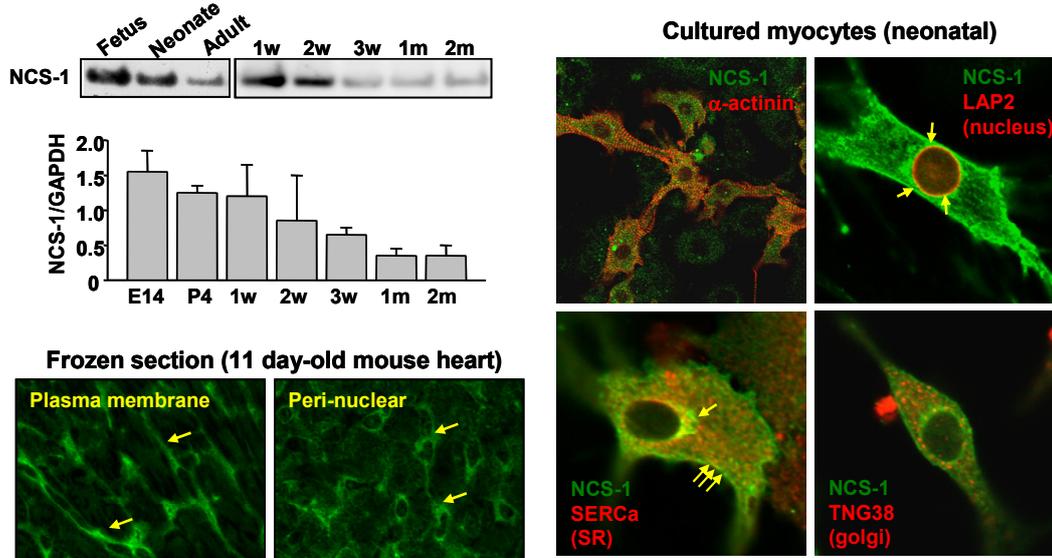


Figure 3. Construction of NCS-1 Tg mouse and confirmation of knocking out of NCS-1

NCS-1 is expressed higher levels in immature heart



NCS-1 is localized to the Ca²⁺-handling organelles

Figure 4. Expression pattern of NCS-1 in the heart

生後4ヶ月以上になると毛並みが非常に悪くなり始めるが、個体の生存率は野生型(WT)とあまり変わらなかった。

心エコー測定により心機能を評価したところ、生後1.5ヶ月の若い成体では収縮期、弛緩期ともにその大きさに有意な差は認められず、従って心機能も変化なかった。しかしNCS-1のKOマウス由来の培養心筋細胞では、特に血清除去などのストレス下において自動拍動の速さが日ごとに低下していき、それに伴い細胞内Ca²⁺濃度の顕著な低下が認められた。さらに日数が経過すると、やがて核の凝集を伴う細胞死が認められた。しかしKOマウス心筋細胞にアデノウイルスによりNCS-1を高発現させると、細胞死からレスキューされることがわかった。

3.4 NCS-1と心肥大との関係

NCS-1の心肥大形成に関する役割を明らかにするため以下の実験をおこなった。培養心筋細胞に様々な心肥大誘発因子を添加したところ、Endothelin-1(ET-1)をはじめとするいくつかのホルモン刺激により、NCS-1の発現量の増加が認められた。一方、培養心筋細胞にET-1を3日間投与するとWTでは顕著な心肥大が生じたが、NCS-1のKO心筋ではそれが軽減されていた。またin vivo heartにおいても、浸透圧ミニポンプを用いたphenylephrin(PE)のinfusionによりWTでは顕著な心肥大が生じたが、KOマ

ウスでは顕著に抑えられていた。以上の結果は、NCS-1がET-1などのホルモン刺激による心肥大形成経路を仲介しているという新たな可能性を示唆している。

3.5 NCS-1と細胞内Ca²⁺トランジエントとの関係

NCS-1が心肥大形成過程に寄与している可能性が示唆されたことから、次にNCS-1と細胞内Ca²⁺トランジエントとの関係を明らかにするため、自動拍動する培養心筋細胞内のCa²⁺トランジエントを受容体刺激前後でWTとKOで比較した。まず受容体刺激前ではKO心筋細胞で、特に収縮期のCa²⁺レベルが低くなっており、これに伴いCa²⁺トランジエントの振幅も低下し、さらに自動拍動のfrequencyが顕著に低くなっていることがわかった。これらの結果は、NCS-1が心筋Ca²⁺シグナル増強に寄与していることを示唆している(Figure 5)。

さらにここに受容体刺激するためATPを加えると、WTでは収縮期ならびに特に弛緩期の細胞内Ca²⁺レベルが上昇し、Ca²⁺トランジエントのFrequencyも上がるという特徴的な変化が認められたが、これがKO心筋ではWTほど上昇しないという現象が認められた。図5のバーグラフはいくつかのデータをまとめたものであるが、収縮期、弛緩期両方においてKOで顕著にATPによるCa²⁺トランジエントの増加が低くなっていることがわかる。すなわち、

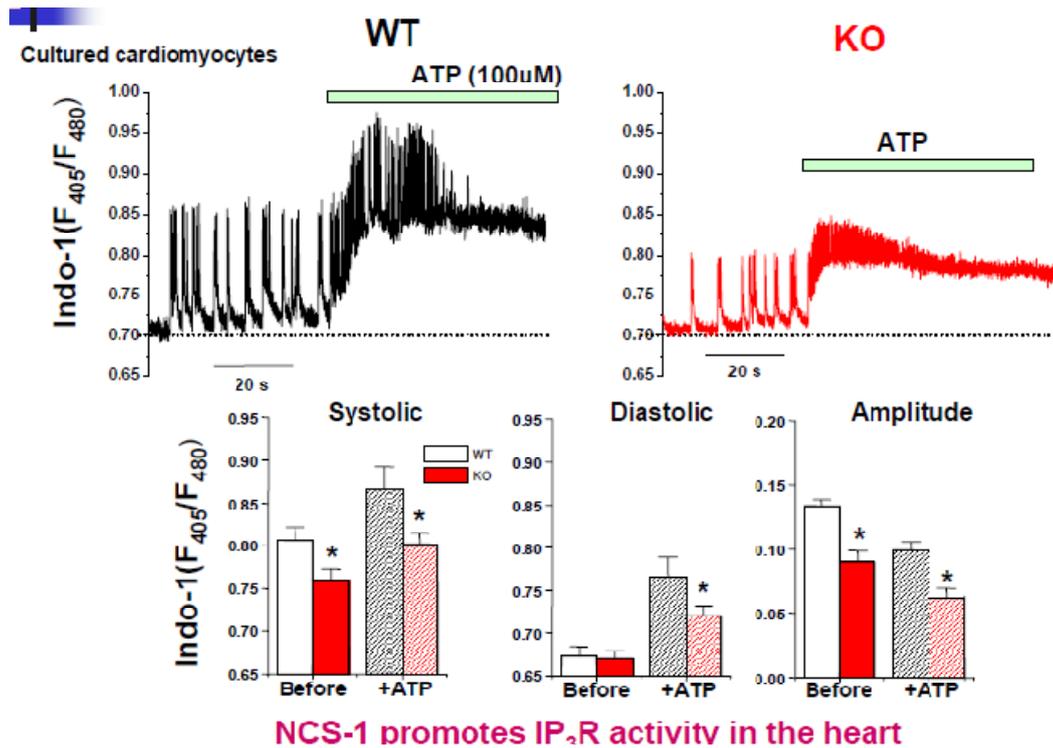


Figure 5. IP₃R stimulation-induced Ca²⁺ transient is diminished in KO myocytes

NCS-1 が受容体刺激の際の Ca²⁺ シグナル増強にも深く関与していることを示している。

3. 6 NHE1 高発現による心肥大と NCS-1 との関係

NCS-1 の KO マウスにおいて、Gq coupled receptor 刺激によって引き起こされる心肥大が軽減されていることから、次に NHE1 の異常な活性化による心肥大が NCS-1 を欠損させることにより軽減できないか検討した。方法は、私たちが以前研究を行なった活性化型 NHE1 を高発現する TG マウスと NCS-1 の KO マウスを掛け合わせることで、それぞれがヘテロの F1 を得た後、F1 どうしを掛け合わせて F2 マウスを得た。その中で、活性化型 NHE1 を高発現し NCS-1 を通常レベル持つ NHE1-TG、および活性化型 NHE1 を高発現し、しかも NCS-1 タンパク質を持たない NHE1-TG/KO、またそれぞれが WT の WT あるいは NHE1 は通常であるが NCS-1 は欠損している KO の 4 種のマウスの心肥大形成作用を比較した。まずこれらマウスの心機能を心エコーで確認したところ、**Figure 6** のような結果が得られた。すなわち、以前の研究と同様、WT マウスに比べ NHE1-Tg マウスでは弛緩期および収縮期での左室内径が大きくなっており、その結果 Fractional shortening (FS) が顕著に減少して収縮機能不全が生じて

いることがわかる。一方、NCS-1 の KO マウスでは WT とそれほど心機能に差は認められなかった。これが NHE1-Tg/KO マウスでは NHE1 による心肥大が抑制されるという可能性を期待したが、予測に反し基本的には NHE1-Tg マウスと同様に特に収縮期における心機能不全が生じていることがわかった。

次に、形態についてもこの 4 種のマウスで解析を行なった。Masson trichrome 法により心臓の形態および繊維化を調べたところ、**Figure 7** に示すように NHE1-Tg で顕著な拡張型の心肥大が生じていることがわかった。これら心筋では繊維化も認められた。一方、NCS-1 の KO 心筋では WT と比べ特に異常は認められなかったが、NHE1-Tg/NCS-1 KO マウスでは、心肥大を軽減するどころか、むしろ悪化させたような顕著な拡張型心肥大が生じており特に心房において激しい繊維化が認められた。

4. 考察

本研究により、心臓に発現しているにもかかわらず、その機能が全くわかっていない Ca²⁺ センサー NCS-1 について以下のことが明らかとなった。

1) NCS-1 は特に未成熟期の心臓に高発現し、その細

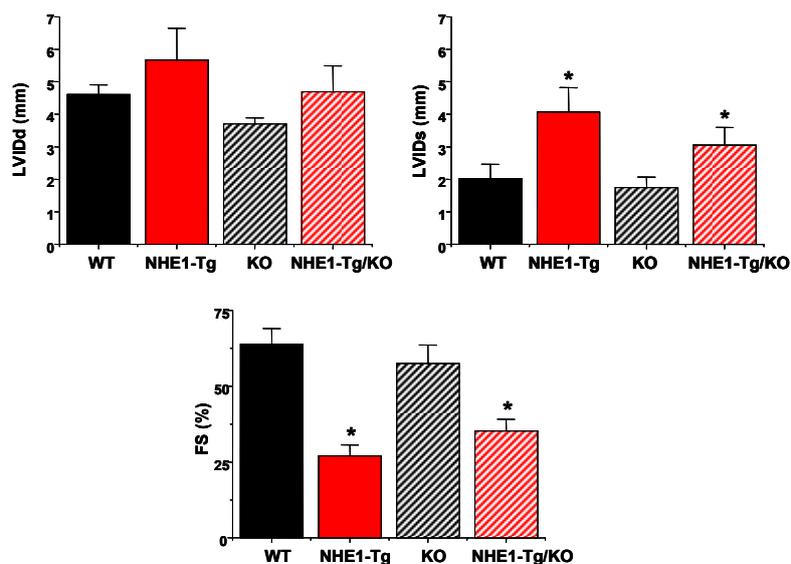


Figure 6. Echocardiographic analysis

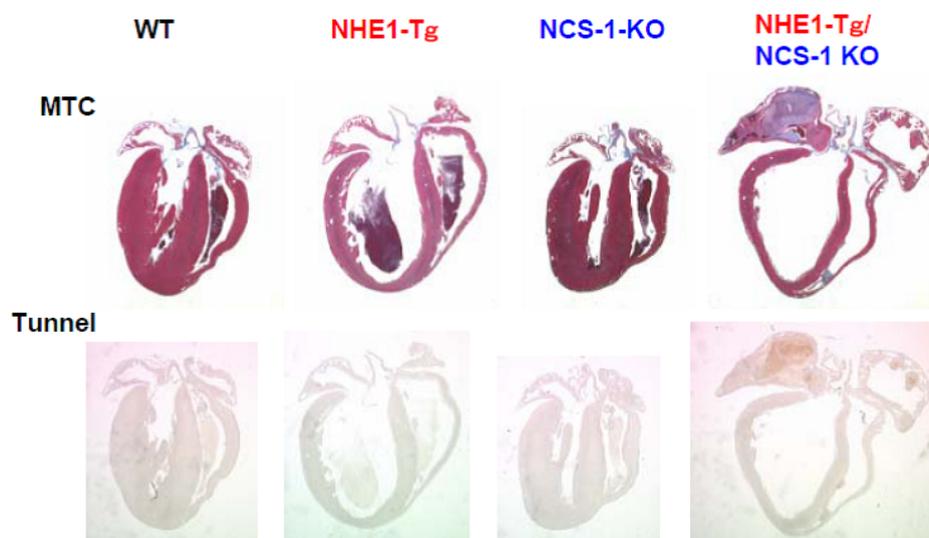


Figure 7. Morphological analysis

胞内局在は形質膜、核膜、SR といった細胞内 Ca^{2+} 制御部位に集積していた。

2) NCS-1 をアデノウイルスにて自動拍動する培養心筋細胞に過剰発現させると、拍動数の増加と共に心肥大誘発因子を加えたときと同様の形態変化が生じた。

3) 逆に NCS-1 を欠損したマウスでは WT に比べ血清除去などによるストレスに非常に弱く、長期間の処理でアポトーシスが生じることがわかったが、NCS-1 添加によりレスキューされた。

4) NCS-1 KO マウスでは ATP 刺激による Ca^{2+} トランジ

エントの上昇が顕著に軽減していた。また ET1 や PE などの心肥大誘導因子を加えても WT のような顕著な心肥大は認められなかった。このことは、NCS-1 が Gq coupled 受容体刺激によって生じる心肥大形成経路に寄与していることを示唆している。

5) NHE1-Tg および NCS-1 KO マウスを掛けあわせた実験から、NHE1 の活性化によって引き起こされる心肥大は NCS-1 欠損ではレスキューされないことがわかった。

これらの結果は、NCS-1 による心肥大仲介経路が NHE1 によるそれとは異なる可能性を示唆している。私達

は以前の研究により、NHE1 活性化により細胞内 Na^+ レベルが上昇し、これが $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換輸送体の活性化を介して細胞内 Ca^{2+} レベルが上昇することを報告した。これが Ca^{2+} 依存性心肥大シグナルである calcineurin-NFAT 経路および CaMKII/HDAC 経路の両方を活性化するが、Tg 心筋では心肥大抑制因子である p38 が特に活性化されているため、主に CaMKII-HDAC 経路を介して心肥大が導かれると考えられた。一方、細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加は、CaMKII による PLB のリン酸化、引き続く SERCA の活性化を介して SR の Ca^{2+} 量を増加させ、この positive feedback が細胞死を引き起こし、心不全へと導くと考えられた (Figure 8 参照)。

これらの結果より、NCS-1 を介する心肥大は少なくとも CaMKII/HDAC 経路以外のものと推定される。一つの可能性は calcineurin-NFAT 経路である。NCS-1 の KO 心筋でこの経路が抑制されれば、PE や ET1 による心肥大は軽減されると考えられる。しかし NHE1 を高発現している場合、例えば calcineurin-NFAT 経路があまり活性化されなくても CaMKII/HDAC 経路の著しい活性化によって心肥大、心不全は生じ得る。一方、calcineurin-NFAT 経路は心肥大形成以外にも細胞のサバイバルを促進させることが知られている。実際、NCS-1 の KO 心筋ではストレスに非常に弱くアポトーシスが生じる。このことから推測すると、NHE1-Tg/NCS-1 KO マウスでは心肥大は生じるが、サバ

イバルが抑制されているため細胞障害が生じ、拡張型心筋症の様相を呈した可能性が考えられる。

5. 今後の課題

NCS-1 を介した心肥大形成経路の詳細な分子機構を探る。まずは calcineurin-NFAT 経路の関与であるが、CaMKII/HDAC 経路の関与の可能性も検討する。方法は、WT マウスで心肥大促進因子で心肥大を起こさせたとき、CaMKII のリン酸化、および calcineurin 活性の指標である MCIP が増加することを確かめた後、同じ条件で KO マウスではどうか検討する。さらに、その先の遺伝子発現についてはどうか検討する。Calcineurin が活性化されると転写因子である NFAT を脱リン酸化し NFAT が核内に移行すること (Crabtree & Olson, 2002)、一方、CaMKII が活性化されると核内に存在する HDAC がリン酸化され核外に出て、結果的に心肥大遺伝子発現を促進すること (Bucks *et al.*, 2006) が知られている。従って、NFAT および HDAC 分子の細胞内局在パターンを調べることにより、calcineurin-NFAT 経路および CaMKII-HDAC 経路の活性化の有無が確認できる。実際、NHE1-Tg 心筋を用いてこれを調べた結果が Figure 9 である。同様の実験を、WT と KO 由来の培養心筋細胞に心肥大誘発因子を投与した場合どうなるかについて、今後検討する予定である。

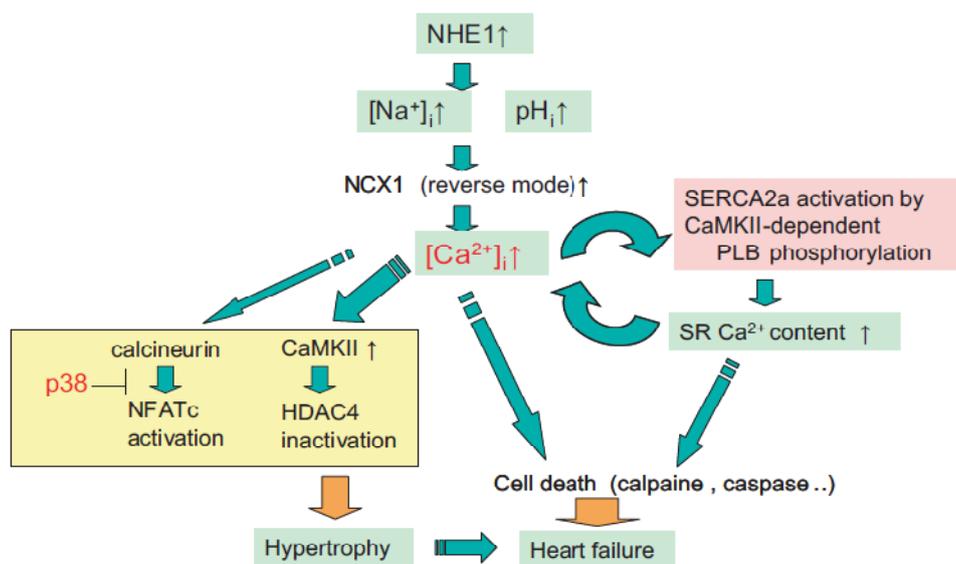


Figure 8. A possible mechanism of NHE1-mediated cardiac hypertrophy

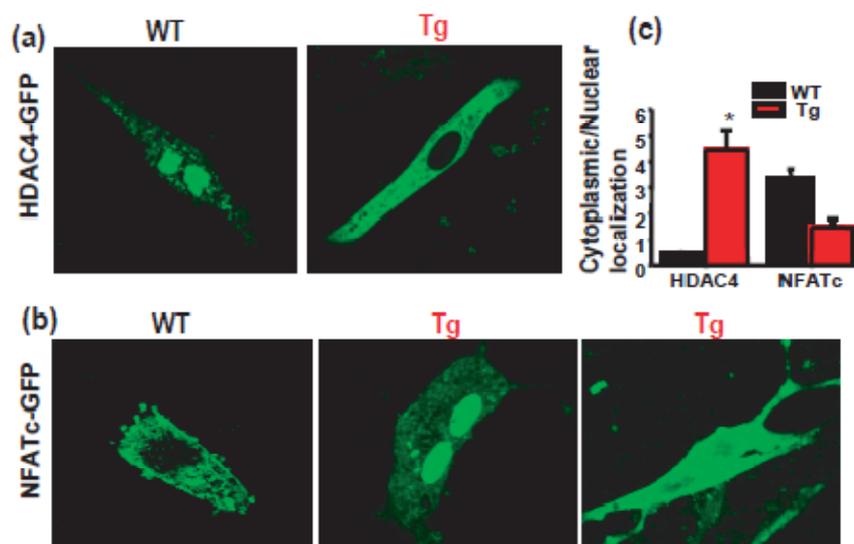


Figure 9. Localization pattern of GFP labeled HDAC and NFAT

文献等

- Aharonovitz O, Zaun HC, Balla T, York JD, Orlowski J & Grinstein S. (2000). Intracellular pH regulation by Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchange requires phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J Cell Biol* **150**, 213-224.
- Backs J, Song K, Bezprozvannaya S, Chang S & Olson EN. (2006). CaM kinase II selectively signals to histone deacetylase 4 during cardiomyocyte hypertrophy. *J Clin Invest* **116**, 1853-1864.
- Boehmerle W, Splittgerber U, Lazarus MB, McKenzie KM, Johnston DG, Austin DJ & Ehrlich BE. (2006). Paclitaxel induces calcium oscillations via an inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and neuronal calcium sensor 1-dependent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 18356-18361.
- Chen XL, Zhong ZG, Yokoyama S, Bark C, Meister B, Berggren PO, Roder J, Higashida H & Jeromin A. (2001). Overexpression of rat neuronal calcium sensor-1 in rodent NG108-15 cells enhances synapse formation and transmission. *J Physiol* **532**, 649-659.
- Crabtree GR & Olson EN. (2002). NFAT signaling: choreographing the social lives of cells. *Cell* **109 Suppl**, S67-79.
- Koizumi S, Rosa P, Willars GB, Challiss RA, Taverna E, Francolini M, Bootman MD, Lipp P, Inoue K, Roder J & Jeromin A. (2002). Mechanisms underlying the neuronal calcium sensor-1-evoked enhancement of exocytosis in PC12 cells. *J Biol Chem* **277**, 30315-30324.
- Nakamura TY, Iwata Y, Arai Y, Komamura K & Wakabayashi S. (2008). Activation of Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ Exchanger 1 Is Sufficient to Generate Ca²⁺ Signals That Induce Cardiac Hypertrophy and Heart Failure. *Circ Res*.
- Nakamura TY, Jeromin A, Smith G, Kurushima H, Koga H, Nakabeppu Y, Wakabayashi S & Nabekura J. (2006). Novel role of neuronal Ca²⁺ sensor-1 as a survival factor up-regulated in injured neurons. *J Cell Biol* **172**, 1081-1091.
- Nakamura TY, Pountney DJ, Ozaita A, Nandi S, Ueda S, Rudy B & Coetzee WA. (2001). A role for frequenin, a Ca²⁺-binding protein, as a regulator of Kv4 K⁽⁺⁾-currents. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 12808-12813.
- Nakamura TY, Sturm E, Pountney DJ, Orenzoff B, Artman M & Coetzee WA. (2003). Developmental expression of NCS-1 (frequenin), a regulator of Kv4 K⁽⁺⁾ channels, in mouse heart. *Pediatr Res* **53**, 554-557.
- Schlecker C, Boehmerle W, Jeromin A, DeGray B, Varshney A, Sharma Y, Szigeti-Buck K & Ehrlich BE. (2006). Neuronal calcium sensor-1 enhancement of InsP3 receptor activity is inhibited by therapeutic levels of lithium. *J Clin Invest* **116**, 1668-1674.

- Sippy T, Cruz-Martin A, Jeromin A & Schweizer FE. (2003). Acute changes in short-term plasticity at synapses with elevated levels of neuronal calcium sensor-1. *Nat Neurosci* **6**, 1031-1038.
- Tsujimoto T, Jeromin A, Saitoh N, Roder JC & Takahashi T. (2002). Neuronal calcium sensor 1 and activity-dependent facilitation of P/Q-type calcium currents at presynaptic nerve terminals. *Science* **295**, 2276-2279.
- Wang CY, Yang F, He X, Chow A, Du J, Russell JT & Lu B. (2001). Ca(2+) binding protein frequenin mediates GDNF-induced potentiation of Ca(2+) channels and transmitter release. *Neuron* **32**, 99-112.
- Weiss JL, Archer DA & Burgoyne RD. (2000). Neuronal Ca²⁺ sensor-1/frequenin functions in an autocrine pathway regulating Ca²⁺ channels in bovine adrenal chromaffin cells. *J Biol Chem* **275**, 40082-40087.
- Weisz OA, Gibson GA, Leung SM, Roder J & Jeromin A. (2000). Overexpression of frequenin, a modulator of phosphatidylinositol 4-kinase, inhibits biosynthetic delivery of an apical protein in polarized madin-darby canine kidney cells. *J Biol Chem* **275**, 24341-24347.

No. 0912

Cardiac Hypertrophic Signaling Mediated by the Interaction between Na⁺/H⁺ Exchanger and the Neuronal Ca²⁺ Sensor NCS-1

Tomoe Nishitani and Shigeo Wakabayashi

Department of Molecular Physiology, National Cardiovascular Center Research Institute

Summary

Activation of the sarcolemmal Na⁺/H⁺ exchanger 1 (NHE1) is increasingly documented as a process involved in cardiac hypertrophy and heart failure (HF). We have previously reported that transgenic (Tg) mice overexpressing a constitutively active form of human NHE1 in hearts, developed cardiac hypertrophy and HF. Elevation of intracellular Ca²⁺ levels followed by increase in Na⁺ level, and subsequent activation of Ca²⁺-dependent hypertrophic signaling is the molecular mechanism of NHE1-induced cardiac hypertrophy (Circ Res 2008).

Like this, intracellular Ca²⁺ regulates variety of cellular processes, including cardiac remodeling and the functions of Ca²⁺ is mediated by Ca²⁺-binding proteins. NCS-1 (Neuronal Ca²⁺ sensor-1) is one of these EF hand Ca²⁺-binding proteins, which plays an important role in neuronal functions. Although NCS-1 is also expressed in the heart, little is known about its functions. Since our preliminary observations using NCS-1 knock-out (KO) mice suggested that NCS-1 is involved in hypertrophy, we studied whether NCS-1 actually mediates cardiac hypertrophy and if so, what the molecular mechanism is, by using both NHE1 Tg and NCS-1 KO mice. Immunofluorescence analysis revealed that NCS-1 is predominantly localized to the Ca²⁺ handling organelles, such as plasma membrane, nuclear envelope and sarcoplasmic reticulum in cardiac muscle. Over-expression of NCS-1 induced cardiac hypertrophy concomitant with increased spontaneous beating rate of cultured myocytes. In contrast, KO myocytes exhibit less sensitive to hypertrophic stimuli; i.e. receptor stimulation-induced increases in intracellular Ca²⁺ transient and cardiac hypertrophy were both prevented in KO hearts, suggesting that NCS-1 mediates hormone-induced cardiac hypertrophy. Mice overexpressing NHE1 but lacking NCS-1 protein, however, had little effect on preventing NHE1-induced hypertrophy. These results suggest that the signaling pathway involving NCS-1-mediating hypertrophy may be different from NHE1-mediating one, where CaMKII/HDAC pathway is the main pathway. We are now investigating the possible involvement of calcineurin/NFAT pathway as a main signaling pathway mediating NCS-1-induced hypertrophy.