

Title	c-Src Regulates the Interaction between Connexin-43 and ZO-1 in Cardiac Myocytes
Author(s)	赤松, 義樹
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/42659
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	あか まつ よし 樹 赤 松 義 樹
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 16093 号
学位授与年月日	平成13年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科内科系専攻
学位論文名	c-Src Regulates the Interaction between Connexin-43 and ZO-1 in Cardiac Myocytes (心筋細胞内において c-Src はコネキシン43と ZO-1 の結合を制御する)
論文審査委員	(主査) 教授 多田 道彦 (副査) 教授 祖父江憲治 教授 的場 梁次

論文内容の要旨

【目的】

ギャップ結合は、隣接する細胞が狭い間隙を隔てて相対する部分に存在するチャンネルで、径 2 nm の通路を通して隣接細胞間を直接に連絡する。1つの細胞の細胞膜にはギャップ結合の半分のヘミチャンネルが存在し、隣接細胞のヘミチャンネルと結合してギャップ結合が形成される。ギャップ結合のヘミチャンネルはコネキシンの6量体より構成され、イオンや情報伝達物質が内部の親水性の孔を通過して細胞間の情報伝達を可能にする。心筋ではコネキシン43(Cx43)で構成されたギャップ結合が介在板に存在し、心筋細胞の膜電位変化を瞬時に伝搬して各細胞の興奮の同期性に寄与している。このギャップ結合の通過性は pH、膜電位、細胞内のセカンドメッセンジャーによっても調節を受ける。

我々は Cx43 の機能解析により (i) Cx43 の 2 つの細胞外ループがギャップ結合の形成に重要であること (ii) ギャップ結合の心筋細胞介在板での局在が細胞内 ZO-1 との結合により制御されること (iii) 心筋症ハムスターにおける Cx43 の機能低下は c-Src による Cx43 のチロシンリン酸化により惹起され、心筋細胞介在板においてギャップ結合の局在が低下することを見いだした。今回、我々は心筋細胞介在板での Cx43 と細胞内 ZO-1 との結合が c-Src によりいかに制御されるかについて検討した。

【方法ならびに成績】

(1) c-Src によるチロシンリン酸化が Cx43 と細胞内 ZO-1 との結合に及ぼす効果

培養ラット心筋細胞に活性型 c-Src (c-Src (Y527F) : kinase 活性抑制部位欠損) ないし不活性型 c-Src (c-Src (delta83-142)、c-Src (delta143-245)、c-Src (K295M) : kinase 活性部位欠損) を遺伝子導入し、この心筋細胞の溶解物において抗 ZO-1 抗体、抗 Cx43 抗体で免疫沈降とウエスタンブロットを行い、ZO-1 と Cx43 の結合に及ぼす c-Src 活性の効果を検討した。活性型 c-Src は Cx43 をリン酸化すると共に ZO-1 との結合を解離した。この際、リン酸化と同時に c-Src と Cx43 の結合が認められた。

(2) c-Src による Cx43 のリン酸化部位の同定と Cx43 と ZO-1 の結合に及ぼす効果

HEK293 細胞に種々のリン酸化部位の変異した Cx43 を遺伝子導入し、細胞内 ZO-1 との結合を活性型 c-Src の存在、非存在下において検討した。方法は抗 ZO-1 抗体、抗 Cx43 抗体による免疫沈降とウエスタンブロットを用いた。ZO-1 との結合は Cx43 の 303-382 残基を欠損させると失われた。さらに Cx43 (Y265F) (265 番目のチロシン

をフェニルアラニンへ変異) および Cx43 (P277/280/283/284A) (c-Src の SH 3 ドメインとの結合候補部位のプロリンをアラニンに変異) では活性型 c-Src による ZO-1 との結合解離は抑制された。

(3) Cx43の ZO-1 結合ドメインと ZO-1 の Cx43結合ドメインの結合に対する c-Src の制御機構の検討

Cx43の ZO-1 結合ドメイン (227-382残基) と ZO-1 の Cx43結合ドメイン (143-245残基) を PCR により作成し、T7-、ポリヒスチジン融合蛋白質として精製した。この2つの蛋白質の結合を精製 c-Src 酵素の存在、非存在下において検討した。両者の結合は、c-Src による Cx43の ZO-1 結合ドメインのリン酸化とそれに続く Cx43と c-Src の SH 2 ドメインの結合により解離することが確認された。

(4) 細胞内および細胞表面に存在する Cx43蛋白質の半減期に及ぼす c-Src の効果

種々のリン酸化部位の変異した Cx43が発現した HEK293細胞を作成した。細胞内および細胞表面に存在する Cx43蛋白質の半減期は、 ^{35}S メチオニンで新製蛋白質をラベルした後メチオニン存在下で培養を行い ^{35}S の減少曲線より検討した。細胞表面の Cx43は細胞表面蛋白質のビオチン化とビオチン化蛋白質のアビチン・アガロースによる精製、および抗 Cx43抗体による免疫沈降、SDS-PAGE での分離と、 ^{35}S のオートラジオグラフにより評価した。c-Src 存在下では Cx43の半減期は細胞内と細胞表面の両方で減少した。c-Src に対するチロシンリン酸化部位の欠損した Cx43の半減期は正常であった。また ZO-1 結合部位欠損 Cx43では c-Src 非存在下でも半減期の減少を認めた。

(5) Cx43と ZO-1 の結合とその c-Src による制御が Cx43の機能に及ぼす効果

種々のリン酸化部位が変異した Cx43発現 HEK293細胞において、顕微鏡下で2隣接細胞への刺入電極より細胞間の電気的コンダクタンス (G_j) を計測した。c-Src 存在下では Cx43発現細胞は G_j の減少を示したが、c-Src に対するチロシンリン酸化部位の欠損した Cx43発現細胞では c-Src による G_j の減少はわずかであった。MAPK に対するセリンリン酸化部位の欠損した Cx43発現細胞では G_j の減少を認めた。また ZO-1 結合部位欠損 Cx43発現細胞では c-Src 非存在下でも G_j の減少を認めた。

【総括】

Cx43の機能において ZO-1 との結合は重要であり、この結合は c-Src により制御されている。c-Src による Cx43のチロシンリン酸化と SH 2 ドメインを介する c-Src と Cx43の結合が ZO-1 との解離を惹起することが判明した。

論文審査の結果の要旨

本研究は、心筋細胞介在板において細胞間の情報伝達や膜電位変化の伝搬を担うギャップ結合を構成する Cx43と細胞内 ZO-1 との結合が c-Src によりいかに制御されるかについて検討したものである。

c-Src は Cx43をリン酸化すると共に ZO-1 との結合を解離し、このとき Cx43と c-Src の結合が出現した。一方、303-308残基の欠損した Cx43では ZO-1 との結合は失われた。c-Src 存在下では Cx43の半減期は細胞内と細胞表面の両方で減少し、ZO-1 結合部位の欠損した Cx43は c-Src 非存在下でも半減期が減少した。また、c-Src 存在下では Cx43発現細胞間の電気的コンダクタンスも減少し、ZO-1 結合部位の欠損した Cx43の発現細胞間では c-Src 非存在下でも減少した。

以上より、Cx43の機能において ZO-1 との結合は重要であり、この結合は c-Src による Cx43のチロシンリン酸化と c-Src と Cx43の結合により解離されることが明らかになった。

本研究は、心不全におけるギャップ結合の機能の低下については心筋収縮力の低下や不整脈発生の機序の解明に貢献するものであり、学位に値するものと考えられる。