



Title	Molecular and Cell Biological Studies on a Protein Kinase C $\beta$ -Scaffolding PDZ-LIM Protein, ENH1, in Cardiomyocytes
Author(s)	中川, 宣孝
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/43603">https://hdl.handle.net/11094/43603</a>
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">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏名	中川宣孝
博士の専攻分野の名称	博士(理学)
学位記番号	第 16768 号
学位授与年月日	平成14年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 理学研究科生物科学専攻
学位論文名	Molecular and Cell Biological Studies on a Protein Kinase C $\beta$ -Scaffolding PDZ-LIM Protein, ENH1, in Cardiomyocytes. (心筋細胞においてプロテインキナーゼC $\beta$ の足場として機能するPDZ-LIMタンパク質、ENH1に関する分子細胞生物学的研究)
論文審査委員	(主査) 教授 谷澤 克行  (副査) 教授 永井 克也    教授 岡田 雅人    助教授 黒田 俊一

## 論文内容の要旨

1996年に酵母 Two-Hybrid 法により PKC $\beta$  (Protein Kinase C $\beta$ ) 結合タンパク質として591アミノ酸残基の ENH1 (Enigma homologue 1) が同定された。本タンパク質はN末端にPDZドメインを1つ、C末端にLIMドメインを3つ有しており、PDZ-LIMファミリーと呼ばれるタンパク質群のひとつであった。ノーザンブロット解析及び *in situ* 免疫抗体法により、ENH1はラット成体において心臓および骨格筋特異的に著量発現し、マウス胎仔では発生初期の循環器系に多く存在することが判明していることから、心筋細胞の発生分化に深く関与しているのではないかと考えられた。

そこで、PKC活性化剤であるホルボールエステルで処理し、心肥大化状態に移行させた新生仔ラット心筋細胞内を蛍光抗体法で観察したところ、ENH1はサルコメア内Z-diskに局在していた。これは、ENH1のPDZドメインがZ-diskの主要タンパク質である $\alpha$ -actininと結合するために観察されたことがpull-downアッセイによって確認された。これまでに我々のグループは、ENH1がLIMドメインを介して特定のPKCサブタイプ( $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\zeta$ )と結合することを報告している。これらからENH1はPKCを心筋細胞内でZ-diskにアンカリングする役割を持っているのではないかと推測した。

一方、PKCのリン酸化活性に対するENH1結合の影響を検討したところ、特にPKC $\beta$ がENH1のLIMドメインと結合することで、そのリン酸化活性は細胞内及び試験管内で数倍に上昇した。他の研究者の薬理的、発生工学的解析により、心不全の主因である心筋肥大にPKC $\beta$ の活性亢進が重要な役割を果たしていることが多数報告されている。さらに最近、我々のグループは心肥大を誘発する液性因子によって肥大化した新生仔ラット心筋細胞内Z-diskにおいて、活性型PKD (Protein Kinase D) とENH1がトランスロケートして共局在することを見出した。またPKDはPKC $\beta$ と直接リン酸化を受けて活性化されることが報告されている。以上から、心筋細胞Z-disk周辺に存在する心肥大化シグナル伝達分子群には、PKC $\beta$ -PKD複合体が含まれており、ENH1が足場タンパク質としてシグナル分子間のクロストークを促進していると推察された。最近、神経細胞において、電位依存性N型カルシウムチャネルの $\alpha 1$ サブユニットがENH1のLIMドメインと結合し、同チャネルのカルシウム透過性を顕著に変化させることが共同研究者により示された。これまでに、様々な要因によって肥大化した心筋細胞内でカルシウム濃度が上昇することもよく知られており、このカルシウム濃度上昇は心筋細胞内で多く発現しているL型カルシウムチャネルによるカルシウム流入が引金になっていると考えられている。このことから、ENH1上で形成されたシグナル伝達分子複

合体が、L型カルシウムチャンネル $\alpha 1$ サブユニットのリン酸化などの修飾を行うことによって同カルシウムチャンネルのイオン透過性を亢進し、心筋細胞内へのカルシウム流入を増加しているのではないかと考えている。今後、さらに ENH1の心筋細胞内での役割を分子レベルで解析することにより、心筋発生および心肥大化機構の解明に寄与されると期待される。

#### 論文審査の結果の要旨

中川 宣孝君は、心筋細胞において足場として機能する PDZ-LIM タンパク質、ENH の分子細胞生物学的研究を行い、ENH が細胞内及び試験管内でプロテインキナーゼ C (PKC) の一種である PKC $\beta$  と結合し、そのリン酸化活性を亢進させることを明らかにした。また、ENH は細胞骨格系タンパク質である  $\alpha$ -actinin と結合し、心筋細胞内のサルコメア構造の一部である Z-disk 上で共局在することを明らかにした。さらに、心筋細胞内 Z-disk 上で ENH が PKC $\beta$  をはじめとするシグナル伝達分子を統括し、これら分子群の足場タンパク質として機能していると推定した。心筋細胞内での PKC $\beta$  リン酸化活性の亢進は心肥大化に密接に関係することから、本研究の成果は、心肥大の発症機構解明に大きな寄与を果たすものであり、博士(理学)の学位論文として十分価値あるものと認める。