



Title	Molecular and Cell Biological Studies on the ENH1-PKC $\epsilon$ -PKD1 Complex Involved in the Cardiac Hypertrophic Signaling Cascade
Author(s)	岩田, 美紀
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/45591">https://hdl.handle.net/11094/45591</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=" <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> ">大阪大学の博士論文について</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	岩田 美紀
博士の専攻分野の名称	博士(理学)
学位記番号	第 19228 号
学位授与年月日	平成17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 the ENH1-PKC ε -PKD1 Complex Involved in the Cardiac Hypertrophic Signaling Cascade (心肥大化シグナル伝達機構に関わる ENH1-PKC ε -PKD1 複合体の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

はじめに 心筋細胞の肥大化を惹き起こすシグナル伝達経路にはプロテインキナーゼC(PKC)が深く関与すると考えられ、欧米では PKC 阻害剤が心肥大を素因とする心不全の治療薬として応用され、臨床試験も行われている。1996年、当研究グループは酵母 Two-Hybrid 法により PKC 結合タンパク質、ENH1 (Enigma homologue 1) を同定した。ENH1 mRNA は、ラット成体において心臓及び骨格筋特異的に著量存在し、マウス胎仔では ENH1 は heart tube に多く発現していた。また、PDZ-3LIM 蛋白質である ENH1 は PDZ ドメインを介して  $\alpha$ -actinin と相互作用してラット新生仔由来心筋細胞のサルコメア Z-disc 上に局在し、LIM ドメインは各種 PKC サブタイプと相互作用してリン酸化活性を調節することが判明した。哺乳類 PKC には約 10 種類のサブタイプが存在し、様々な刺激により細胞内の異なる部位で各種基質をリン酸化すると考えられ、その時空間的制御には PKC 結合タンパク群が重要と考えられている。本研究では、心筋細胞の肥大化機構における ENH1 と PKC の相互作用の意義を検討した。

心筋細胞内における ENH1-PKD1 複合体の発見 酵母 Two-Hybrid 法により、ENH1 結合タンパク質としてプロテインキナーゼ D1 (PKD1) を見出した。心筋細胞内の PKD1 は PKC 活性化剤や 7 回膜貫通型レセプターに作用する心肥大化試薬 (アンジオテンシン II、ノルエピネフリン、エンドセリン 1 等) の刺激により活性化され、ENH1 と共に Z-disc に移行した。しかし、gp130 レセプターを介する心肥大化試薬 (LIF 等) は PKD1 活性化と Z-disc 移行を誘導しなかった。

心肥大化シグナル伝達経路における ENH1-PKC ε -PKD1 複合体の役割 PKC は 7 回膜貫通型レセプターの下流で活性化され、サブタイプの幾つかは PKD1 を *in vitro* で直接リン酸化することから、心筋細胞における PKD1 の活性化因子も PKC であることが示唆された。PKC 阻害剤及び PKC 不活性型変異体存在下でノルエピネフリン刺激後的心筋細胞の PKD1 リン酸化活性測定により、PKD1 を活性化するのは PKC ε であること、蛍光抗体法と免疫沈降法により活性化 PKC ε と PKD1 が ENH1 と複合体を形成して Z-disc に局在することが判明した。PKD1 不活性型変異体は心筋細胞において LIF 以外の心肥大化シグナルを遮断し、PKC ε と PKD1 の常活性型変異体は心筋細胞を肥大化させた。既に他の研究者により、活性型 PKC ε の Z-disc 局在及び心肥大患者の心臓における PKC ε の著しい活性化が報告されており、ENH1-PKC ε -PKD1 複合体は心肥大シグナル伝達において極めて重要であると考えられた。

一方、LIM ドメインを持たない ENH1 スプライス変異体、ENH2 は Z-disc 上の ENH1-PKC  $\epsilon$ -PKD1 複合体の局在を拮抗阻害することにより、PKC  $\epsilon$ -PKD1 活性化による肥大化シグナルを抑制した。予備実験ながら ENH1 RNAi による肥大化抑制も見られた。

考察 本研究では、①心肥大化試薬により心筋細胞では PKC  $\epsilon$  が活性化され PKD1 を活性化すること、②心肥大化シグナルにより ENH1 が Z-disc に移行して、活性型 PKC  $\epsilon$  と活性型 PKD1 をリクルーティングすること、③ ENH1-PKC  $\epsilon$ -PKD1 複合体は多くの心肥大化シグナルが関与する重要なシグナル分子複合体であること、④ ENH1-PKC  $\epsilon$ -PKD1 複合体の Z-disc 局在が心肥大化シグナル伝達において必須であることを見出した。

今後は、ENH1-PKC  $\epsilon$ -PKD1 複合体の意義を Tg マウス及び KO マウスを用いた解析や、プロテオミクス解析の手法を用いた ENH1-PKC  $\epsilon$ -PKD1 複合体の標的タンパク質の同定が必要である。これらの解析を通して、世界的に死亡要因の上位を占める心不全の素因となるこの心肥大の新しい治療法が開発されれば幸いである。

### 論文審査の結果の要旨

岩田美紀さんは、ラット新生仔由来心筋細胞を用いてプロテインキナーゼ C (PKC) 結合タンパク質 ENH1 の分子細胞生物学的研究を行い、心筋細胞の肥大化過程、特に 7 回膜貫通型レセプターを介するシグナル伝達において、サルコメア Z ディスク上で ENH1 が PKC  $\epsilon$  及び PKD1 と複合体を形成することを見出した。また、PKD1 が PKC  $\epsilon$  によるリン酸化により活性化されることが、心筋細胞の肥大化に必須であることを明らかにした。さらに、PKC  $\epsilon$  と PKD1 は ENH1 の C 末端部分の LIM ドメインと相互作用し、PKC  $\epsilon$  による PKD1 の活性化には ENH1 が必須であることも解明した。以上から、ENH1 は心筋細胞における PKC  $\epsilon$  と PKD1 の活性発現に必須な足場タンパク質であること、ENH1-PKC  $\epsilon$ -PKD1 複合体は、重篤な心疾患の原因となる心肥大の発症機構において非常に重要な役割を担っていることが示唆された。本研究の成果は、細胞内シグナル伝達機構における新規複合体を発見しただけでなく、心臓の肥大化機構解明につながる重要な知見を提供するものである。よって、本論文は博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。