

Title	A cardiac myosin light chain kinase regulates sarcomere assembly in the vertebrate heart
Author(s)	瀬口, 理
Citation	大阪大学, 2008, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/49015">https://hdl.handle.net/11094/49015</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>〉</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	瀬口 理
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 21822 号
学位授与年月日	平成 20 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科生体制御医学専攻
学位論文名	A cardiac myosin light chain kinase regulates sarcomere assembly in the vertebrate heart (心臓型ミオシン軽鎖キナーゼは脊椎動物における心臓サルコメア形成を調節する)
論文審査委員	(主査) 教授 望月 直樹  (副査) 教授 澤 芳樹 教授 堀 正二

### 論文内容の要旨

#### 〔 目 的 〕

心不全に対する様々な薬物治療、外科的治療の進歩により、近年その予後は改善してきた。しかしながら、依然として心不全の予後は不良であり、本邦における移植医療の普及が不十分であることから、新たな心不全治療の標的を見出すことは循環器領域にとって急務である。

#### 〔 方法ならびに成績 〕

重症心不全に対して Dor あるいは Batista 手術等の心筋切除術を受けた症例を対象として、その切除心筋組織から mRNA を抽出し、マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析を行った。正常心筋組織における遺伝子発現と比較してその発現が上昇もしくは低下している遺伝子を選択し、さらに各症例より得られた臨床データとの相関性を含めた解析を行った結果、不全心筋にてその発現が上昇し各症例の肺動脈圧と有意な相関を認める新規遺伝子を同定した。本遺伝子は心臓特異的に発現し、そのリコンビナントタンパクを新生ラット培養心筋細胞に強制発現させることにより、サルコメア構造形成の促進を含む心筋細胞の形態変化が認められた。また本遺伝子から合成されるタンパクはその C 端にセリン・スレオニンキナーゼドメインを持つことから心筋特異的なリン酸化酵素であると考えられたため、マウス心臓抽出物を基質として In vitro リン酸化反応を行い、基質として心室型ミオシン軽鎖 (MLC2v) を同定した。本遺伝子から合成されるタンパクのキナーゼドメインはこれまでに報告されていた平滑筋型 (遺伝子名: MYLK) および骨格筋型 (遺伝子名: MYLK2) のミオシン軽鎖キナーゼとの高い相同性を認め、その基質として MLC2v が同定されたため、cardiac-MLCK: 心臓型ミオシン軽鎖キナーゼ (遺伝子名: MYLK3) と命名した。新生ラット培養心筋細胞において、cardiac-MLCK を過剰発現することにより、サルコメア構造形成の促進とともにミオシン軽鎖のリン酸化が上昇することが認められ、さらにエピネフリン刺激によりミオシン軽鎖のリン酸化上昇とともにサルコメア構造形成が促進されることがしめされた。siRNA を用いた cardiac-MLCK の発現抑制により、エピネフリン刺激による MLC2v のリン酸化およびサルコメア構造形成促進が抑制されることから、cardiac-MLCK は MLC2v リン酸化を介して心筋細胞におけるサルコメア構造形成を調節していることが示唆された。次に cardiac-MLCK はゼブラフィッシュを含め、脊椎動物において高度に保存されていたため、ゼブラフィッシュにおける cardiac-MLCK 遺伝子をクロ

ーニングし、*in vivo*における解析を行った。*In situ hybridization*により、*cardiac-MLCK* 遺伝子がゼブラフィッシュにおいても心臓特異的に発現していることが確認された。さらにモルフォリノ・アンチセンスオリゴを用いた遺伝子発現抑制実験により、心室筋サルコメア形成異常を伴う心室の拡大が認められ、*in vivo*においても *cardiac-MLCK* がサルコメア形成促進に関与することが示唆された。またラット心筋梗塞・心不全モデルにおいてはヒト不全心筋における遺伝子発現パターンと同様に心不全重症度に一致した *cardiac-MLCK* 遺伝子の発現上昇を認めた。

〔 総 括 〕

今回我々は不全心筋においてその遺伝子発現が上昇する新規遺伝子として心臓型ミオシン軽鎖キナーゼ (*cardiac-MLCK*、遺伝子名：*MYLK3*) を同定した。その後の機能解析により、*cardiac-MLCK* は *in vitro*、*in vivo* において *MLC2v* のリン酸化を介して心筋におけるサルコメア構造形成を促進することが示された。これまで拡張型心筋症症例の不全心筋においてサルコメア構造の破綻とともにミオシン軽鎖リン酸化の低下が報告されており、不全心筋における *cardiac-MLCK* の mRNA 発現上昇はこのような *MLC2v* リン酸化低下に対する代償性の遺伝子発現上昇であると考えられた。今後の展開として、哺乳動物における *cardiac-MLCK* の機能をより明らかにし、さらには *cardiac-MLCK* を介したミオシン軽鎖リン酸化増強が不全心筋の機能改善に寄与する可能性について検討していく予定である。

### 論文審査の結果の要旨

近年の治療の進歩にも関わらず、依然として心不全の予後は不良であり、さらに新たな心不全治療の標的を見出すことが必要である。今回の論文はヒト心不全患者からの心筋サンプルをもとに、ある新規の遺伝子を同定した。本遺伝子は心臓のみに発現し、心筋の構造タンパク質のひとつであるミオシン軽鎖をリン酸化するため、心臓型のミオシン軽鎖キナーゼ (*cardiac-MLCK*；遺伝子名：*MYLK3*) と命名され、培養細胞やモデル動物を用いた実験により、*cardiac-MLCK* が心臓においてサルコメア形成に関わることが証明された。これまで不全心筋においてはミオシン軽鎖リン酸化の低下が報告されており、不全心筋における *cardiac-MLCK* の発現上昇はこのような変化に対して代償的に機能していると考えられる。

本研究により、*cardiac-MLCK* はミオシン軽鎖リン酸化を介してサルコメア構造形成に重要な働きを持つことが示唆され、今後、新たな心不全治療へとつながることが期待される。

本論文の研究内容は学位の授与に値すると考えられる。