

主論文の要約

Role and expression of scaffold protein ENH in cardiac
hypertrophy

(心肥大化における足場タンパク質 ENH の発現と機能)

名古屋大学大学院生命農学研究科

生命技術科学専攻

生物機能技術科学講座

産業生命工学研究分野

伊藤 淳平

2016 年 3 月

第一章 緒言

先進諸国において心疾患による死因の割合は、これまでに原因分子の解明や治療法の開発が進んでいるものの多く、更なる改善が必要とされている。心肥大は、心負荷によって低下した血液輸送能を補うために心筋細胞の肥大を伴う心臓リモデリングである。過負荷による心臓リモデリングの破綻は重篤な心不全を引き起こすため、心筋細胞肥大を制御する分子機構の解明は、心肥大の予防・軽減に重要である。近年、心筋細胞内にあるサルコメア構造の一部、Z-disc にシグナル伝達分子が集まり転写因子を活性化させることで心筋細胞肥大が起こり、心臓リモデリングが誘導されることが報告された。この際、足場タンパク質の一種である PDZ-LIM タンパク質が Z-disc へのシグナル分子集積に関与していることが示唆された。本研究対象である PDZ-LIM タンパク質 *enigma* homolog 1 (ENH1) は、心臓や骨格筋で著量発現する protein kinase C (PKC) 相互作用分子であり、ENH1 欠損マウスが拡張型心筋症を呈することや、心筋細胞内において ENH1 の LIM ドメインに結合した PKC-PKD1 複合体が心臓の拍動に関与する L 型電位依存性カルシウムチャネルの活性を制御することから、ENH1 は筋組織の発生分化や生理機能に重要であると考えられている。近年、この ENH1 をコードする *enh* 遺伝子は、選択的スプライシングにより LIM ドメインを欠失した複数のアイソフォーム、ENH2, ENH3, ENH4 をコードするスプライス変異体を生成することが示された。ENH1 と LIM 欠損 ENH アイソフォームは心筋細胞肥大に対して相反する作用を有しており、新生児ラット初代培養細胞において、ENH1 の過剰発現により肥大を誘発する一方、ENH3 の過剰発現がホルモン刺激による肥大誘発を抑制した。さらに横行大動脈縮窄術による圧負荷で肥大化した成体マウス心臓では、通常有意に発現している *enh3* mRNA の発現量が減少し、発生初期で有意に発現していた *enh1* mRNA が再度発現するというスプライシングの変化が観察された。これらの知見は、LIM 欠損 ENH アイソフォームが心筋細胞肥大を抑制していることを強く示唆しているが、心肥大誘導や同抑制における ENH タンパク質群を含む詳細な分子機構、ならびに心肥大誘導時に起こる *enh* 遺伝子の選択的スプライシングの制御機構は不明な点が多い。

そこで本研究では、LIM 欠損 ENH アイソフォームを有用な新規心肥大抑制因子と証明するために、心筋細胞における LIM 欠損 ENH アイソフォームの肥大化抑制機構を分子レベルで解明した。また、心筋細胞肥大化に関与するシグナル伝達分子群と ENH タンパク質群との相互作用、さらに心筋細胞内における *enh* 遺伝子の選択的スプライシングを制御するスプライス因子とシス因子の同定を行った。

第二章 Scaffold protein enigma homolog activates CREB whereas a short splice variant prevents CREB activation in cardiomyocytes

本章では、ENH1-PKC β -PKD1 複合体および ENH3 の心臓リモデリングに関わる転写因子 CREB (cAMP response elements binding protein) のリン酸化および転写活性への関与を明らかにした。ENH1 は PDZ ドメインを介して α -アクチニンと結合して Z-disc に局在化し、LIM ドメインにより PKCs (サブタイプ α , β , γ , ζ) や protein kinase D1 (PKD1) と結合する。 α 1-アドレナリン受容体のような G α q サブユニットを有する G タンパク質共役受容体の活性化状態時では、Z-disc 中に ENH1-PKC β -PKD1 複合体を形成して心肥大化シグナルを伝達すると考えられているが、その標的転写因子は不明であった。そこで、近年 PKC β や PKD1 によりリン酸化が促進され心肥大を誘導することが報告されている転写因子 CREB の関与を検討した。まず、新生児ラット初代心筋培養細胞において、ENH1 を発現誘導すると α 1 アドレナリン受容体作動薬フェニレフリンによる刺激の有無に関わらず CREB がリン酸化された。一方で、ENH3 を発現誘導したり、RNAi により ENH1 発現を抑制したりすると、フェニレフリン刺激の有無に関わらず CREB はリン酸化されなかった。また、CREB の標的遺伝子である早期応答性転写因子 *c-fos* や心肥大マーカーである ANP (atrial natriuretic peptide) の発現をリアルタイム PCR 法やレポーターアッセイで評価したところ、ENH1 を発現誘導すると両遺伝子発現が亢進することを発見した。しかし、 α 1 アドレナリン受容体の活性化状態時においても、ENH3 発現を誘導すると、両遺伝子の発現亢進は見られなかった。つまり、ENH1 発現誘導時では Z-disc に活性化 PKC β や PKD1 をリクルートすることにより CREB をリン酸化して標的遺伝子の転写を促進し心筋細胞肥大を誘導する。一方、ENH3 発現誘導時では活性化 PKC β や PKD1 を Z-disc にリクルートできず、CREB のリン酸化が抑制されて心筋細胞の恒常性が維持されていると示唆された。以上から、ENH1-PKC β -PKD1 複合体の下流の心肥大化に関わる転写因子として CREB が存在し、ENH3 が同心肥大化誘導機構を抑制することが明らかとなった。

第三章 RBM20 and RBM24 cooperatively promote the expression of short ENH splice variants

本章では、心肥大化過程における *enh* 遺伝子スプライシングの制御機構の解明を行った。既に RNA binding motif ファミリーに属する RBM20 と RBM24 が *enh* 遺伝子スプライシング機構へ関与することが示唆されていたので、スプライス変異体の発現に対する影響を評価した。新生児ラット初代心筋細胞において RBM20 と RBM24 をそれぞれ過剰発現したところ、いずれの場合も *enh1* mRNA のわずかな発現減少と LIM 欠損 ENH アイソフォームをコードする *enh3* および *enh4* mRNA の発現増加が観察された。また、siRNA により RBM20 または RBM24 をそれぞれ発現抑制したところ、いずれの場合も *enh1* mRNA のわずかな発現増加と *enh3* および *enh4* mRNA の発現減少が観察された。一般的にスプライシング機構は複数因子が共制御することから、RBM20 と RBM24 を同時に発現した場合では *enh1* mRNA の発現が有意に減少し、*enh3* および *enh4* mRNA の発現が有意に増加した。一方、両因子の発現を siRNA で同時に抑制した場合では *enh1* mRNA の発現は有意に増加し、*enh3* および *enh4* mRNA の発現は有意に減少した。さらに、*enh* 遺伝子の pre-mRNA 上に RBM20 と RBM24 のコンセンサス結合モチーフが存在したことから、RNA 免疫沈降法により結合遺伝子の単離を行ったところ、RBM20 と RBM24 は共に LIM 欠損 ENH アイソフォームの終止コドンにコードする exon11 に結合していた。以上から、RBM20 と RBM24 は LIM 欠損 ENH アイソフォームの終止コドンにコードする exon11 に結合し、exon11 の mRNA への取り込みを制御していることを強く示唆している。既に RBM20 と RBM24 は心臓の発生にも関与することが報告されていることから、両因子が *enh* 遺伝子スプライシング機構の主な制御因子であると考えられる。

第四章 Inhibitor of differentiation/DNA binding protein 2 represses the corticosteroid-stimulated expression of cardiac T-type calcium channels

本章では、ENH1 と相互作用する転写制御因子 Id2 の心筋細胞内における役割を明らかにした。既に、ENH1-Id2 間相互作用は神経系細胞の分化に関与することが報告されていたが、分化終末細胞である心筋細胞において観察される Id2 と ENH1-Id2 間相互作用の役割は不明であった。まず、Id2 は心臓の刺激伝導系の発現に重要と報告されていたので、心臓の拍動に関わる T 型電位依存性カルシウムチャネルのサブユニット $\alpha 1G$ と $\alpha 1H$ の発現に対する Id2 発現の影響を検討した。その結果、Id2 を心筋細胞内で過剰発現すると $\alpha 1G$ と $\alpha 1H$ の mRNA 発現量が減少し、Id2 を siRNA により発現抑制すると $\alpha 1G$ mRNA 発現のみが増加した。同様な Id2 の $\alpha 1G$ mRNA に対する発現抑制は、単離 $\alpha 1G$ プロモーターを用いたレポーターアッセイでも観察された。また、Id2 の発現誘導及び発現抑制した心筋細胞をパッチ・クランプ法により解析したところ、カルシウムチャネルの活性がそれぞれ減少及び増加した。さらに、コルチコステロイドによる T 型電位依存性カルシウムチャネルの発現誘導、活動電位数増大および心筋細胞肥大化は、Id2 発現により抑制された。以上から、Id2 は T 型電位依存性カルシウムチャネルの発現を抑制的に制御し、コルチコステロイドにより増加する活動電位変化の亢進を抑制し、心肥大化を抑制することが明らかとなった。

第五章 考察

本研究では、① ENH1-PKC β -PKD1-CREB 複合体が心肥大誘導機構に関与し ENH3 が抑制的に作用すること、② RBM20 と RBM24 は *enh* 遺伝子スプライシング機構を制御することで、ENH1 と LIM 欠損 ENH アイソフォームの発現調節を行い、心肥大化シグナルの恒常性を維持していること、③転写抑制因子 Id2 はコルチコステロイドによる T 型電位依存性カルシウムチャネルの発現誘導、活動電位変化亢進および心肥大化を抑制することを明らかにした。心筋細胞中には ENH1 以外にも Cypher/ZASP や他の PDZ-LIM タンパク質が存在しており、ENH3 が競合阻害することで心肥大に抑制的に作用していると考えられる。本研究により新規心保護因子として見出された LIM 欠損 ENH アイソフォームと Id2 は、心肥大を素因とする心不全や不整脈の抑制薬や治療薬の創薬ポイントとして今後活用されることが期待される。