

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570150

研究課題名(和文)心肥大状態を誘導するENH1-PKC/PKD-Caチャンネル複合体の調節機構の解析

研究課題名(英文)Resolving the function of the ENH1-PKC/PKD-Calcium Channel function in the cardiac hypertrophy

研究代表者

MATURANA ANDRES (Maturana, Andres)

名古屋大学・生命農学研究科・准教授

研究者番号：10452004

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、心臓および骨格筋の発達に必須であるENHと呼ばれる足場タンパク質を検討している。ENHは、心肥大の発達に必須であることを示している。逆に、ENHスプライス変異体は、心肥大を防ぐことができる。

本研究では、足場タンパク質ENHのスプライシング機構を研究しました。我々は、in vivoで心肥大を予防する能力試験するスプライス変異ENHトランスジェニックマウスを作製する。最後に、我々はENH1、キナーゼおよびL型カルシウムチャンネルによって構成される複合体シグナル伝達の下流に下流のシグナル伝達事象を分析しました。我々の研究は、ENHは、心臓肥大の開発のキープレイヤーであるという考えを維持する。

研究成果の概要(英文)：Scaffolding proteins are essential for the transmission of intracellular signaling. Scaffolding proteins gather signaling proteins and their targets at precise subcellular locations to maximize the efficiency of the signal transduction. We are studying a scaffolding protein called ENH that is essential for the cardiac and skeletal muscle development. We have previously shown that ENH is essential for the development of cardiac hypertrophy but some ENH splice variants can on the contrary prevent cardiac hypertrophy. In the present study, we studied the splicing mechanisms of ENH. We generate a splice variant ENH transgenic mice to study in-vivo its ability to prevent cardiac hypertrophy. Finally, we analyzed the downstream signaling events downstream to the complex signaling composed by ENH1, the protein kinase D and the L-type calcium channels. Our work sustain the idea that ENH is a key player in the cardiac remodeling leading to heart hypertrophy.

研究分野：細胞情報伝達機構

キーワード：シグナル伝達 心臓肥大

1. 研究開始当初の背景

PDZ-LIM タンパク質は N 末端に PDZ ドメインと C 末端に 1~3 個の LIM ドメイン (Zn フィンガーの一種) を有する細胞内シグナル分子群を細胞骨格に繋ぎ止める足場タンパク質である。特に、心臓分化、免疫応答及び発癌抑制への関与が指摘され、同タンパク質内への変異は心疾患の発症を誘導する。特に、連携研究者の黒田が 1996 年に見いだした PDZ-3LIM タンパク質 ENH1 は、心臓に多く発現し、LIM ドメインを介して PKC β と結合し、PDZ ドメインを介してサルコメアの アクチニンと結合する。次に発現量の多い脳において、連携研究者の黒田が N 型カルシウムチャンネルと相互作用することを示し、精神疾患発症と関連することも判明した。さらに、神経芽腫細胞において ENH1 は転写抑制因子 Id2 を細胞質へ繋ぎ止めることで Id2 依存的神経分化を抑制することも判明している。

2. 研究の目的

PDZ-LIM タンパク質ファミリーは N 末端に PDZ ドメインおよび C 末端に LIM ドメインを 1~3 有する細胞内シグナル分子群の足場タンパク質である。近年、我々は主に心臓で発現する PDZ-3LIM タンパク質 ENH1 が、サルコメア上で PKC α 、PKC β 、PKD1、L 型カルシウムチャンネルおよび アクチニンと結合して心肥大化シグナルとして作動し、心肥大状態マウスと正常マウスを比較して LIM ドメインを欠いた内在性スプライス変異体 ENH4 が誘導されると同シグナルを抑制することを見いだした。本研究では、同スプライス変異体の発現調節機構および ENH1 を含むシグナル分子複合体からの心肥大化シグナルの伝達機構を明らかにしたい。

3. 研究の方法

心筋細胞内における ENH1 及び ENH4 のスプライス変異体の発現調節機構の解析：我々は ENH 遺伝子の exon 組成を分析しました。心臓出生前及び出生後の発達中の ENH スプライス変異体の発現を、RT-qPCR を、RT-PCR により測定しました。同様の実験は、骨格筋の発生および筋芽細胞株 C2C12 で行いました。ENH 遺伝子のスプライシング機構内の識別されたスプライシング因子の役割を試験するために、我々は、これらの要因を過剰発現されるかまたは siRNA によりノックダウン。

ENH4 発現ベクターを組み込んだトランスジェニックマウスの創出：
インビボ心臓肥大を防止する ENH3 の能力を試験しました。

3 ENH1-PKC β -PKD1-L 型 Ca チャンネル複合体の下流に位置する心肥大化誘導機構に含まれる分子群の同定

ENH1-PKC β -PKD1-L 型カルシウムチャンネル複合体の機能は、新生児ラットから単離された心筋細胞の初代培養において試験しました。肥大マーカーはウエスタンブロット、RT-qPCR を、及びイメージングによって測定しました。転写活性は、ルシフェラーゼレポーター遺伝子で測定しました。イオンチャンネル活性は、パッチクランプによって測定しました。

4. 研究成果

心筋細胞内における ENH1 及び ENH4 のスプライス変異体の発現調節機構の解析

心臓の発生中に ENH1 と LIM レス ENH スプライスバリエント (ENH2-3-4) との間のスプライシングスイッチの時間的变化を示しました。LIM レススプライスの変化は、発現がまた発生段階依存性であることが判明した変異体である。ENH スプライス変異体の発現は、骨格筋細胞においても同様に変化します。C2C12 細胞では、心筋細胞への分化は ENH1 の発現を必要としている。ENH4 または ENH1 siRNA の発現は C2C12 細胞の分化を防止している。

我々は、ENH スプライスバリエントの変化に必須の役割を果たして 2 スプライシング因子を同定する。過剰発現または siRNA のノックダウンの両方の要因は、ENH スプライス変異体の発現を変化させる。

ENH3 発現ベクターを組み込んだトランスジェニックマウスの創出

我々はトランスジェニックマウス ENH3 の創設者を生成することができました。交配は、F1 世代を生成しました。F1 世代は F2 世代に産む導入遺伝子と交配の発現を示しました。私たちは、ENH の LIM レス変異体について、最初のトランスジェニックマウスを得ました。我々は、生体内で心肥大を防止する ENH3 の能力を検討します。

3 ENH1-PKC β -PKD1-L 型 Ca チャンネル複合体の下流に位置する心肥大化誘導機構に含まれる分子群の同定

ENH1-PKC β -PKD1-L 型 Ca チャンネル複合体の下流の事象を検討しました。2 つの転写調節因子は、ENH1-PKC β -PKD1-L 型 Ca チャンネル複合体の新たな標的として同定されました。両方の転写調節因子は、心臓肥大の調節において重要な役割を果たす。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3 件)

1 Ito J, Hashimoto T, Nakamura S, Aita Y, Yamazaki T, Schlegel W, Takimoto K,

Maturana AD: "Splicing transitions of the anchoring protein ENH during striated muscle development." Biochem. Biophys. Res. Commun. 421. (2012) 232-238, 査読有

2 Ito J, Takita M, Takimoto K, Maturana AD. Enigma homolog 1 promotes myogenic gene expression and differentiation of C2C12 cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 435, (2013) 483-487, 査読有

3 Ito J, Andrés Daniel Maturana Steroid hormones' genomic and non-genomic actions on cardiac voltage-gated calcium channels Nihon Yakurigaku Zasshi 144 (2014) 9781-979, 査読無

〔学会発表〕(計 11 件)

1 Ito J, Walchli S, Takimoto K, Maturana AD: "Inhibitor of differentiation /DNA binding protein, Id2, prevents the expression and activity of cardiac calcium channels" 13th FAOBMB (Federation of Asian and Oceania Biochemists and Molecular Biologists). December 2012 バンコク、タイ

2 Ito J, Walchli S, Takimoto K, Maturana AD: "Inhibitor of differentiation /DNA binding protein, Id2, prevents the expression and activity of cardiac T-type calcium channels" 第35回日本分子生物学会年会. December 2012. 福岡

3 Ito J, Walchli S, Takimoto K, Maturana AD: "The transcriptional regulator, Id2, regulates the cardiac calcium channel expression" 第 90 回日本生理学会大会. March 2013, 東京

4 伊藤淳平、ヴォルチ・セバスチャン、滝本浩一、マツラナ・アンドレス：“転写制御因子 Id2 は心臓のカルシウムチャンネルの発現を制御する” 生化学若い研究者の会 第 53 回生命科学夏の学校, 静岡 August 20 2013

5 Ito J., Takimoto K., Kuroda S., Maturana AD: "Enigma Homolog 1 promotes myogenic gene expression and differentiation of C2C12 cells" 第 86 回日本生化学会大会, 横浜, September 2013

6 Ito J., Kuroda S., Maturana AD: "ENH1 scaffolds Id2 at Z-disk to promote cardiac hypertrophy." EMBL Conference, Myofibrillar Z-disk Structure and

Dynamics, October 2012, ハンブルグ, ドイツ.

7 伊藤淳平、黒田俊一、マツラナ・アンドレス：“足場タンパク質 ENH1 は転写抑制因子 Id2 を Z-disk に留めることにより心肥大を促進する” 第 36 回日本分子生物学会年会, December 2013, 神戸.

8 Maturana AD: "Inhibitor of differentiation/DNA binding protein 2 regulates the expression of the cardiac T-type calcium channels" 第 87 回日本薬理学会年会, March 2014, 仙台.

9 Ito J, Kuroda S, Maturana AD: "The scaffolding protein ENH1 recruits Id2 to Z-discs enabling cardiomyocytes remodeling" 第 78 回日本生化学会中部支部例会、 May 2014, 名古屋.

10 Ito J, Kuroda S, Takimoto K, Maturana AD: "Splicing transitions of the anchoring protein ENH during striated muscle development" 第 61 回 日本生化学会近畿支部例会 May 2014, Osaka.

11 Ito J, Kuroda S, Maturana AD: "Regulation of CREB phosphorylation by scaffolding protein ENH1 in neonatal rat cardiomyocytes" the 15th IUBMB-24th FAOBMB-TSBMB International Conference , October 2014, Taipei, Taiwan.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等 なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者 Andres Maturana

名古屋大学・大学院生命農学研究科・准教授
研究者番号：10452004

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者

黒田 俊一 (KURODA SHUNICHI) 名古屋大学・大
学院生命農学研究科・教授
研究者番号：60263406