

## 論文内容の要旨

論文提出者氏名 内藤 大督

### 論文題目

The coiled-coil domain of MURC/cavin-4 is involved in membrane trafficking of caveolin-3 in cardiomyocytes.

### 論文内容の要旨

カベオラは細胞膜がフラスコ状に陥入した構造物であり、シグナル伝達やエンドサイトーシスなど重要な細胞プロセスに関与していることが知られている。カベオラはカベオリンとキャビンファミリーによってその形態や機能が制御されているが、近年MURC (muscle restricted coiled coil protein) /cavin-4 がキャビンファミリーに属していることが明らかになった。カベオリン3 (Cav3) は筋特異的なカベオラ構成蛋白で、心臓において Cav3 の過剰発現は心保護作用を示し、逆に Cav3 の欠損は心筋細胞でカベオラの減少と ERK の活性化を誘導し、進行性の心筋症を来すことが知られている。MURC/cavin-4 も筋特異的に発現しており、Cav3 と結合することや心肥大に関与することが分かっている。キャビンファミリー蛋白はいずれも coiled-coil ドメインを有しており、このドメインをもつ蛋白は重要な役割をもつことが知られているが、MURC/cavin-4 の coiled-coil ドメインの機能的意義は明らかではない。本研究ではMURC/cavin-4 の coiled-coil ドメインの機能とカベオラ局在蛋白としてMURC/cavin-4 の心臓における役割を検討した。

まず初めに coiled-coil ドメインを欠いた MURC/cavin-4 変異体( $\Delta$ CC)を作成し、H9c2 細胞に $\Delta$ CCを発現させ、共焦点顕微鏡検査法にてその局在を調べた。H9c2 細胞では全長 MURC/cavin-4 は細胞膜で Cav3 と共局在するが、 $\Delta$ CC は細胞膜ではなく細胞質に局在することが観察された。次に、細胞分画法による検討を行ったところ、全長 MURC/cavin-4 は主に膜分画に発現しているが $\Delta$ CC は細胞質分画でのみ発現していることが分かった。このように、MURC/cavin-4 の coiled-coil ドメインはMURC/cavin-4 が細胞膜に移行するために必須であることが示された。

Cav3 は本来細胞膜に局在するが、細胞質に $\Delta$ CCを発現した H9c2 細胞では細胞膜で Cav3 局在が観察されなかった。そこで $\Delta$ CC と Cav3 の結合を免疫沈降と GST プルダウンアッセイで検討したところ、Cav3 との結合

能は $\Delta$ CC でも保たれていることが示された。また、 $\Delta$ CC を発現させた心筋細胞ではコントロール細胞に比べ Cav3 の蛋白レベルが減少しており、細胞分画法により細胞質分画と細胞膜分画を分離すると、Cav3 の蛋白レベルがコントロール細胞の細胞膜分画に比べ $\Delta$ CC を発現させた心筋細胞の細胞膜分画で減少していることが明らかになった。しかしながら $\Delta$ CC は心筋細胞の Cav3 の mRNA 発現には影響を与えていなかった。これらのことから $\Delta$ CC は心筋細胞で Cav3 と結合し、膜への局在を障害することで蛋白発現を減少させると考えられた。すなわちMURC の coiled-coil ドメインは Cav3 の膜への輸送と安定化に必要と考えられた。

我々は以前に全長 MURC/cavin-4 が心筋細胞肥大を誘導することを報告しているが、本研究により $\Delta$ CC も心筋細胞を肥大させることが分かった。加えて $\Delta$ CC では全長 MURC/cavin-4 と比較して ANP、BNP、SkA といった肥大関連遺伝子の mRNA 発現が有意に亢進していた。さらに $\Delta$ CC では ERK のリン酸化も全長 MURC/cavin-4 に比べて有意に亢進しており、 $\Delta$ CC は全長 MURC/cavin-4 より強い肥大反応を誘導することが示された。

つぎに生体での $\Delta$ CC の作用を検討するため $\Delta$ CC の心筋特異的トランスジェニックマウス ( $\Delta$ CC-Tg)を作成した。 $\Delta$ CC-Tg はコントロールマウス(NTg)と比較して心重量/骨長比は有意に大きく、心臓切片標本では心腔拡大を認めた。また、 $\Delta$ CC-Tg の心筋細胞は肥大し間質の線維化は亢進していた。心臓超音波検査では $\Delta$ CC-Tg はNTg に比べ左室内腔の拡大と収縮不全を呈し、心臓での ANP や BNP の mRNA 発現は有意に増加していた。そして、 $\Delta$ CC-Tg の心臓において Cav3 の蛋白発現は *in vitro* の結果と同様に NTg と比べ有意に減少し、ERK のリン酸化も亢進していた。このように、生体においても $\Delta$ CC は心臓において Cav3 蛋白の発現を減少させ、ERK を活性化し、重症心不全を来すことが示された。

以上の結果から、MURC/cavin-4 の coiled-coil ドメインは細胞膜への輸送に必須で、Cav3 が細胞膜で安定して存在するために重要な役割を果たしており、MURC/cavin-4 は重要なカベオラ局在蛋白として心機能を制御していることが示された。