HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Functional analysis of a novel cardiac-specific protein RING finger protein 207 [an abstract of entire text]
Author(s)	水島, 航
Citation	北海道大学. 博士(医学) 甲第11962号
Issue Date	2015-09-25
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/60062
Type	theses (doctoral - abstract of entire text)
Note	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。　配架番号：2192
Note(URL)	https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
File Information	Wataru_Mizushima_summary.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文(要約)

Functional analysis of a novel cardiac-specific protein RING finger protein 207
（新規心筋特異的タンパク質 RING finger protein207 の機能解析）

2015 年 9 月

北海道大学

水島　航

【緒言】
近年、タンパク質翻訳後修飾の一つであるユビキチン化が、心臓が正常に機能する上で重要な役割を担っていることが広く知られるようになり、ユビキチン化と心疾患の関連が精力的に研究されている。これまでに、muscle RING finger1-3 (MuRF1-3)、C-terminus of Hsp70-interacting protein (CHIP)、murine double minute 2 (MDM2)などの E3 ユビキチンリガーゼが、心筋肥大、虚血性心疾患、心不全といった一般的な心疾患の病態生理に関わっていることが報告されているが、心臓特異的な E3 ユビキチンリガーゼに関する報告は未だなされていない。我々は、タンパク質の構造から E3 ユビキチンリガーゼ活性を有していると考えられる RING finger protein (RNF)ファミリーの遺伝子発現状況を web 上のデータベースを用いて探索し、RNF207 が心臓に著明に多く発現していることを見出した。これまでに RNF207 の一塩基変異多型 (SNP)が QT 間隔の延長に関わっていることが報告されているが、その詳細な機能については不明であったため、本研究では RNF207 の心臓における機能的役割について明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】
リアルタイム PCR 法とウェスタンブロット法によって、遺伝子およびタンパク質レベルでの RNF207 のマウス臓器における発現状況を解析した。その結果、データベースから得られた情報と一致して、遺伝子レベルおよびタンパク質レベルのいずれにおいても、RNF207 は著しく心臓優位に発現していた。これらの結果より、RNF207 は心臓特異的なタンパク質であることが強く示唆された。次に、多くのタンパク質は他の分子との相互作用を介してその機能を発揮することから、質量分析法を用いて RNF207 と相互作用するタンパク質を探索した。ヒト胎児腎細胞に RNF207 を外因性に発現させて免疫沈降を行い、沈降物を電気泳動することで分離されたタンパク質を質量分析法によって解析した。その結果、RNF207 と相互作用するタンパク質としてミトコンドリア外膜に存在する voltage-dependent anion channel 1 (VDAC1)を同定した。免疫沈降法とウェスタンブロット法によって、それぞれ由来種が異なる 3 種類の培養細胞 (ヒト胎児腎細胞、マウス筋芽細胞、ラット胎仔心筋細胞)内で、外因性に発現させた RNF207 と内在性の VDAC1 が相互作用していることを確認した。細胞内でのタンパク質間の相互作用は、当該タンパク質以外のタンパク質を介した間接的な相互作用である可能性があるため、RNF207 と VDAC1 の細胞外での相互作用を確認する目的で、大腸菌発現系を用いて両タンパク質の組換えタンパク質を精製した。精製した組み換えタンパク質を用いて免疫沈降法とウェスタンブロット法を施行したところ、RNF207 と VDAC1 は直接的に相互作用していることが確認された。次に、タンパク質間の相互作用部位は創薬の際などに重要となってくるため、RNF207 の VDAC1 との相互作用に重要な領域を探索した。RNF207 の様々な欠失変異体をヒト胎児腎細胞に外因性に発現させて、内在性の VDAC1 との相互作用能について解析したところ、RNF207 の B-box C-terminal ドメイン内の 40 アミノ酸が VDAC1 との相互作用に必須であることがわかった。VDAC1 との結合に

必須である 40 アミノ酸配列は、脊椎動物間で高度に保存されていた。更に、その 40 アミノ酸配列内のタンパク質の立体構造上表面に位置していると推測される親水性アミノ酸をアラニンに置換した 3 種類の点突然変異体をヒト胎児腎細胞に外因性に発現させて、内在性の VDAC1 との相互作用能について解析した。その結果、RNF207 の 277 番目のリジン残基および 278 番目のグルタミン酸残基が VDAC1 との相互作用に重要であった。同様に、VDAC1 の欠失変異体を用いて VDAC1 の RNF207 との相互作用部位を探索したところ、VDAC1 の N 末端領域が RNF207 との相互作用に重要であった。続いて、RNF207 が E3 ユビキチンリガーゼ活性を有するかどうかを検討した。組み換えタンパク質を用いた自己ユビキチン化アッセイの結果、RNF207 が E3 ユビキチンリガーゼ活性を有することが確認されたため、VDAC1 を基質として RNF207 がユビキチン化反応を促進するかどうかを検討した。細胞内にユビキチン、RNF207 および VDAC1 を外因性に発現させる *in vivo* ユビキチン化アッセイおよび VDAC1 以外は組み換えタンパク質を用いた semi *in vitro* ユビキチン化アッセイによって、RNF207 が VDAC1 のユビキチン化を促進することが確認された。Pulse chase アッセイによって RNF207 による VDAC1 のユビキチン化が VDAC1 の安定性に与える影響について解析したが、RNF207 存在下でも VDAC1 の安定性に変化は認められなかった。VDAC1 はミトコンドリアおよび細胞内代謝を制御していると考えられているため、ラット胎仔心筋細胞を用いて、siRNA による RNF207 ノックダウンが細胞内代謝やエネルギーホメオスタシスに与える影響について解析した。メタボローム解析では、RNF207 をノックダウンした細胞群で ATP 濃度やアミノ酸濃度が有意に低下しており、RNF207 が心筋細胞のエネルギー代謝に関与していることが示唆された。それと関連して、RNF207 をノックダウンした細胞群では、ピルビン酸をアセチル CoA に変換することで解糖系と TCA 回路を結び付けているピルビン酸脱水素酵素活性やミトコンドリア最大酸素消費量が有意に低下していた。ブドウ糖飢餓ストレスによって RNF207 の VDAC1 との相互作用能が低下することが確認されたので、RNF207 は心臓のストレス応答において何らかの役割を担っていると考え、ラット胎仔心筋細胞に様々なストレス負荷(酸化ストレス、肥大ストレス、小胞体ストレス、カルシウム過負荷)を加え、RNF207 の発現が変化するかどうかを解析した。その結果、全てのストレス負荷によって RNF207 の発現は有意に低下していた。心疾患においては、心筋に様々なタイプのストレス負荷が加わっていると報告されているため、心疾患モデルマウス(圧負荷モデル、虚血/再灌流モデル、慢性心不全モデル)を用いて RNF207 の発現が変化するかどうかを解析した。その結果、それぞれの心疾患において心臓での RNF207 の発現は有意に低下していた。

【考察】

これまでに、遺伝子レベルで RNF207 が心臓特異的に発現していることは報告されていたが、本研究では初めて RNF207 がタンパク質レベルでも心臓特異的に発現していることを明らかにした。心臓特異的という特性により、心疾患マーカーとしての応用が期待され、実際

に心筋梗塞の診断に有用との報告がなされている。本研究では、RNF207 が心筋細胞のエネルギー代謝制御に関わっていることを明らかにした。RNF207 の SNP が QT 間隔の延長に関連していることや RNF207 ノックダウンによってゼブラフィッシュ胚芽での活動電位持続時間が延長することが報告されており、更には、VDAC1 がミトコンドリア外膜で同定されている唯一の Ca^{2+} 輸送に関わるタンパク質であること、細胞内の Ca^{2+} 動態は活動電位持続時間に深く関わるだけでなく、細胞のエネルギー代謝にも重要な役割を果たしていることなどから、RNF207 が細胞内のカルシウム動態、特にミトコンドリア内の Ca^{2+} 濃度を調節しているのではないかと推察された。しかし、今回の研究で用いた何れの方法においても、ミトコンドリア内 Ca^{2+}濃度に関して有意な結果を得ることができず、RNF207 がエネルギー代謝に影響を及ぼす詳細な機序は解明することができなかった。心筋細胞のエネルギー代謝の変化は本研究で用いた心疾患モデルマウスに共通する特徴であり、それらのマウスでは心臓での RNF207 の発現が有意に低下していることから、RNF207 の低下が心筋細胞のエネルギー代謝の変化を引き起こす主因となっている可能性が考えられた。慢性心不全では、心筋エネルギー代謝に介入する治療によって心不全の更なる進展が予防可能であったとする報告があり、RNF207 が慢性心不全の新たな治療標的となる可能性もあるが、そのためには詳細な分子メカニズムを含めた RNF207 機能の更なる解明が必要である。

【結論】

新規心筋特異的 E3 ユビキチンリガーゼである RNF207 は VDAC1 と直接的に相互作用しており、心筋細胞のエネルギー代謝を制御する。