HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Functional analysis of a novel cardiac-specific protein RING finger protein 207 [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	水島, 航
Description	配架番号：2192
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第11962号
Issue Date	2015-09-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/60061
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Wataru_Mizushima_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称　博士（医　学）　氏 名　水島　航

学 位 論 文 題 名

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 protein 207 の機能解析)

【背景と目的】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。

【方法と結果】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・タンパク質レベルいずれにおいても、RNF207 は著しく心臓優位に発現していた。このことより、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 の結合タンパク質の探索を行ったところ、ミトコンドリア外膜に存在する voltage-dependent anion channel 1 (VDAC1)が同定された。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ている可能性があるため、大腸菌を用いて精製した RNF207 および VDAC1 の組換えタンパク質間の相互作用について解析した。その結果、RNF207 と VDAC1 は直接的に相互作用していることが確認された。VDAC1 との結合に重要な領域を同定するため、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 アミノ酸配列内に存在する親水性アミノ酸をアラニンに置換した点突然変異体を作製し、VDAC1 との相互作用能について解析したところ、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ることが確認された。同様に、VDAC1 の RNF207 との結合領域を探索したところ、VDAC1 の N 末端領域が重要であることがわかった。続いて RNF207 が E3 ユビキチンリガーゼ活性を有し、VDAC1 のユビキチン化に関与しているかどうかを検討した。*in vivo* および semi *in vitro* ユビキチン化アッセイによって、RNF207 が E3 ユビキチンリガーゼ活性を有し、VDAC1 のユビキチン化を促進することを確認した。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、RNF207 遺伝子の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。RNF207 と心疾患との関わりについては、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）を用いて解析し、それぞれの疾患において、心臓での RNF207 の発現が有意に低下していることを見出した。

【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ある。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考えられるが、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。