The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	RNF126/BAG6複合体による細胞内分子選別機構を介したG0S2の分解メカニズムの解明
Author(s)	神窪, 謙太
Citation	大阪大学, 2020, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/76636
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（神窪　謙太）	
論文題名	RNF126/BAG6複合体による細胞内分子選別機構を介したG0S2の分解メカニズムの解明 (A molecular triage process mediated by RNF126 and BAG6 complex regulates degradation of G0S2)

論文内容の要旨

心不全は高齢化社会に伴い増加の一途をたどり、その発症には心臓への酸素供給不足によるATP産生能の低下が大きく寄与する。しかし、ATP産生能を直接増加させる因子の報告や治療法は存在せず、心臓の負担を軽減する薬物療法が主であるが、その効果は十分ではない。一方で、心臓の収縮力を増強する薬物療法は細胞内カルシウム濃度を増加させるため、副作用として過度な心拍数の上昇をもたらし、患者の予後を悪化させる。すなわち、ATP産生を直接増強することは、従来の治療では困難であった患者に対して治療効果が見込まれ、副作用の少ない新規治療法として期待される。本研究室において、酸化的リン酸化によるATP 産生を担うFoF1-ATP合成酵素を介してATP産生能を活性化する因子としてG0/G1 Switch Gene 2 (G0S2)を同定した。G0S2を強制発現させた心筋細胞及びゼブラフィッシュの心臓はATP産生能の向上により低酸素耐性を獲得することを明らかにした。一方で、G0S2タンパク質の寿命は非常に短く、Ubiquitin Proteasome System (UPS)を介して分解制御を受けることから、G0S2の特異的な分解抑制は、ATP産生の低下を改善し、心不全の新たな治療戦略への可能性を示唆する。そこで、本研究ではG0S2タンパク質の詳細な分解メカニズムを明らかにし、分解抑制によるATP産生能の向上が治療戦略となり得ることを示すProof of conceptの確立を目的とした。

まず始めに、UPSにおいて基質の特異性を担うE3 ligaseの同定を目的として、EGFP-G0S2の蛍光強度変化を指標としたsiRNA library screeningを行い、Ring Finger Protein 126 (RNF126)をG0S2に作用する候補遺伝子として同定した。CRISPR-Cas9 systemを用いてRNF126を欠損させたC2C12細胞においてG0S2タンパク質は半減期の延長とユビキチン化量の著しい減少を認め、RNF126の強制発現によってその作用がレスキューされたことから、RNF126はG0S2タンパク質の分解に寄与するE3 ligaseであることが示唆された。これまでに、RNF126は基質に応じて様々な分解様式を取ることが示されているためG0S2についても検討したところ、足場タンパク質としてBCL2-associated athanogene 6 (BAG6)の必要性を見出した。そこで培養心筋細胞においてBAG6に対するsiRNAを導入したところG0S2タンパク質の半減期の延長とユビキチン化量の著しい減少を認めた。更に、精製タンパク質を用いたin vitroでのユビキチン化反応において、RNF126単独ではG0S2のポリユビキチン鎖は形成せず、BAG6との共存在化でのみラダー状のポリユビキチン鎖を検出した。RNF126/BAG6複合体は、細胞質における合成直後の膜タンパク質の局在化・分解の選別機構に関わることが報告されており、これらの結果は、G0S2が細胞質においてRNF126/BAG6複合体を介した膜タンパク質の選別機構により厳密な量的制御を受けていることが示唆される。

基質の分解メカニズムの解明には、分解を制御するE3の同定と基質に作用する部位(degron)の同定が必要不可欠である。そこで、G0S2のアラニン置換変異体及び欠損変異体を作成しプロテアソーム阻害剤に対する反応から各部位の分解寄与度を評価した。その結果、疎水性領域に存在するグルタミン酸をアラニンに置換したE44A変異体でのみ分解が抑制され、半減期の延長とユビキチン化量の減少を認めた。更に、このE44A変異体はRNF126/BAG6複合体との結合が阻害されることも明らかとなった。これらの結果から、G0S2のE44周囲の特異的な構造をRNF126/BAG6複合体が認識しユビキチン化することで、G0S2が分解されることが示された。最後に心筋細胞でのG0S2の分解抑制効果を評価するため、低酸素環境下でのミトコンドリアATP産生量とそれに伴う細胞生存率を評価した。ミトコンドリアATP産生量の評価には、ATP感受性FRETプローブ”Mit-ATeam”を用い継時的なATPの濃度変化を測定した。野生型G0S2の強制発現は低酸素下でのATP産生の低下を抑制したが、G0S2 E44A変異体の発現はその効果を増強させた。この結果と相関して、低酸素処理に伴う細胞死はG0S2の分解抑制により著しく抑制された。

以上の結果から、G0S2は細胞質においてRNF126/BAG6複合体による分子選別機構により分解される一方で、特異的な構造変化によりE3複合体の認識を免れることで膜への局在化を向上させ、ATP産生能をより活性化することが示唆された。本研究において、E3複合体およびそれに認識されるdegronの2つを同定したことにより、これらの構造基盤に特異的なG0S2分解阻害剤の開発が、心不全や虚血性心疾患に対する新規治療法として期待される。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　神窪　謙太　）			
論文審査担当者		（職）	氏　名
	主 査	教授	高島　成二
	副 査	教授	深川　竜郎
	副 査	教授	甲斐　歳恵
	副 査	教授	山本　亘彦

論文審査の結果の要旨

G0S2はATP合成酵素に直接結合しATP産生を増強させる小分子のミトコンドリア膜タンパク質である。G0S2は低酸素により発現誘導されATP産生低下を抑制することにより強い細胞保護効果を発揮する。そのためG0s2の産生を上げる薬剤が開発されれば虚血性疾患やミトコンドリア病の治療に応用できると期待されている。本論文ではG0S2の極めて短いタンパク質寿命に着目しその分解機構を解析することによるG0S2タンパク質増加薬剤の開発を目的とした。まずG0S2の分解がユビキチン-プロテアゾーム系を介することを証明し、次にそこに関わるE3をsiRNAライブラリースクリーニングにより同定、さらにそれに付随するアダプターまで同定した。これらの分解機構をin vitroで再構成し、G0S2分解機構に必要十分であることを証明した。されにG0S2とE3の結合部位の同定も行いG0S2の分解抑制によりATP産生の増加と細胞死の抑制も提示して論文化し、JBCにアクセプトされている。学位授与にふさわしいと考える。