



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

博士論文

RNF126/BAG6 複合体による細胞内分子選択機構を
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

大阪大学大学院 生命機能研究科 細胞ネットワーク講座

医化学研究室

32A16016 神窪謙太

(令和 2 年 3 月 25 日 終了見込)

指導教員 高島成二 教授

1 目次

1	目次	1
2	略語	3
3	緒言(General Introduction)	5
3-1	心臓を特徴づける収縮弛緩と薬剤開発の現状	5
3-2	ミトコンドリアにおけるエネルギー産生機構と虚血における適応応答	6
3-3	臨床から見た心疾患とミトコンドリアを標的とした治療薬の開発の可能性	8
4	英文要旨	10
5	要旨	12
6	研究の背景	9
6-1	G0S2 の発見と量的制御、生体内での意義	14
6-2	心筋細胞を用いた ATP さん声量の測定系の確立と G0S2 の機能解析	15
6-3	基質特異性の高いユビキチン・プロテアソーム系と G0S2 タンパク質分解を標的とした創薬展開の可能性	16
6-3-1	ユビキチン・プロテアソーム系	17
6-3-2	膜タンパク質の生合成と量的制御機構について	18
6-3-3	E3 探索における従来の手法	20
6-3-4	degren を標的とした装薬展開と G0S2 への応用	21
7	研究目的	23
8	研究方法	24
8-1	Reagent and antibody	24
8-2	Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)	24
8-3	Western blotting	24
8-4	新生仔ラット心筋細胞初代培養、その他細胞培養	25
8-5	Plasmid and viral vector constructions	25
8-6	レンチウイルス及びアデノウイルスの作製、安定発現株の樹立	27
8-7	C2C12 細胞を用いた G0S2 の分解を制御する因子の探索	27
8-8	siRNA library を用いたスクリーニング	28
8-9	96well plate からの RNA 抽出と droplet digital PCR	29
8-10	CRISPR/Cas9 system を用いた C2C12 RNF126 KO 細胞の作製	30
8-11	in vitro transcription/translation	31
8-12	Recombinant protein の発現・精製	31

8-12-1	substrate (G0S2 WT, mutant), Chaperone の精製	31
8-12-2	E3(GST-RNF126 WT, C231/234A mutant)の精製	32
8-13	in vivo/in vitro ubiquitination assay	32
8-14	detergent-soluble and -insoluble fraction	33
8-15	FRET probe を用いたミトコンドリア ATP 濃度の測定(Mit-ATeam)	33
8-16	心筋細胞を用いた免疫染色	35
8-17	cell viability assay	35
8-18	部位特異的光クロスリンク法による G0S2 結合タンパク質の探索	35
8-19	統計解析	36
9	結果	37
9-1	心筋細胞における G0S2 タンパク質の量的制御	37
9-2	G0S2 の分解を制御する因子の探索	38
9-3	siRNA library を用いたスクリーニング系の構築	40
9-4	E3 リガーゼのスクリーニングと候補遺伝子の同定	43
9-5	G0S2 タンパク質分解における RNF126 の機能解析	45
9-6	心筋細胞において RNF126 ノックダウンは低酸素によるミトコンドリア ATP 産生低下を軽減する	48
9-7	BAG6 は G0S2 のユビキチン化に伴う分解を制御する	51
9-8	低酸素環境下における G0S2 の分解制御機構	54
9-9	G0S2 の分解制御に関わる UBQLN の可能性	55
9-10	G0S2 の分解を規定する degron の探索・同定	56
9-11	G0S2 のユビキチン化サイトの検討	61
9-12	in vitro における RNF126/BAG6 複合体を介したユビキチン化反応	62
9-13	BAG6 との結合阻害は低酸素下におけるミトコンドリア ATP 産生能の低下を保持する	65
9-14	部位特異的光クロスリンク手法を用いた G0S2 の結合タンパク質の探索	68
10	考察	69
11	結言	74
12	参考文献	75
13	業績	81
13-1	原著論文(査読あり)	81
13-2	学会・シンポジウム等における発表	82
13-3	その他	84

2 略語

SR	Sarcomeric reticulum
CICR	Ca ²⁺ -induced Ca ²⁺ release
OXPHOS	Oxidative phosphorylation
ATP	Adenosine triphosphate
MG132	Carbobenzoxy-L-Leucyl-L-Leucyl-L-Leucinal
PS-341	Pyz-Phe-boroLeu
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
Tris	Tris(hydroxymethyl) aminomethane
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
PCR	Polymerase chain reaction
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
Chloroquine	N4-(7-Chloro-4-quinoliny)-N1, N1-dimethyl-1,4-pentanediamine diphosphate salt
NH ₄ Cl	Ammonium chloride
CHX	Cycloheximide
siRNA	Small interfering RNA
CRISPR	clustered regularly interspaced short palindromic repeat
sgRNA	single guide RNA
Log FC	Log ₂ fold change
TUBE2	Tandem ubiquitin binding entity
qPCR	Quantitative PCR
ddPCR	Droplet digital PCR
E1	Ubiquitin-activating enzyme
E2	Ubiquitin-conjugating enzyme
E3	Ubiquitin ligase
G0S2	G0/G1 switch gene 2
RNF126	Ring finger protein 126
BAG6	BCL2-associated athanogene 6

TRC35	Transmembrane domain recognition complex 35
TRC40	Transmembrane domain recognition complex 40
SGTA	Small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein alpha
UBL4A	Ubiquitin-like protein 4A
SEC61B	SEC61 Translocon Beta Subunit
VAMP2	Vesicle Associated Membrane Protein 2
GST	Glutathione S-transferase
UPS	Ubiquitin-proteasome system
CFP	Cyan fluorescent protein
EGFP	Enhanced green fluorescent protein
RNF126	Ring finger protein 126
BAG6	BCL2-associated athanogene 6
TA	Tail-anchored

3 緒言 (General Introduction)

3-1. 心臓を特徴づける収縮弛緩と薬剤開発の現状

心臓は持続的な収縮弛緩の繰り返しによって全身に血液を送り出すポンプの役割を有している。この収縮弛緩には、心筋細胞が受ける電氣的なシグナルを介し興奮・収縮連関 (EC coupling: excitation-contraction coupling) が引き起こされ、絶え間ない収縮弛緩運動へと変換される。この一連の EC coupling は細胞内外へのイオンの移動、特にカルシウムイオンの移動が重要であるとされる。はじめに心筋細胞に活動電位が発生すると Ca^{2+} チャネルが開き、細胞内へと Ca^{2+} が流入する。流入した Ca^{2+} は筋小胞体 (SR: Sarcomeric Reticulum) のリアノジン受容体チャネルを開口させ、そこを通過して大量の Ca^{2+} が SR 内から細胞質へと放出される。この Ca^{2+} によるリアノジン受容体からの Ca^{2+} の放出促進は CICR (Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release) と呼ばれ、収縮開始における重要なトリガーとして決定づけられている。細胞内の Ca^{2+} はアクチンフィラメントに沿って配向するトロポニンと結合することで立体構造を変化させアクチン・ミオシンによる収縮運動が引き起こされる。その後 Ca^{2+} は再び SR に取り込まれるか細胞膜上の Na^+ - Ca^{2+} 交換系によって細胞外へと放出される。この収縮時の細胞質内 Ca^{2+} 濃度の上昇と低下の動きは Ca^{2+} トランジェントと表現され、 Ca^{2+} トランジェントと規則的な収縮は共役することが明らかとなっている^{1,2}。

心筋をはじめとした筋原繊維にはアクチンからなる細いフィラメントとミオシンからなる太いフィラメント (サルコメア構造) が整然と並んでいる。また、心臓組織の電子顕微鏡による解析からこのサルコメア構造の近傍にミトコンドリアが配置され、ミトコンドリアにより産生される ATP を即座に利用し収縮を開始することが伺える³。この収縮に関してはアクチン・ミオシンの滑り運動により生み出されるが、ミオシン頭部の ATP 加水分解酵素のダイナミックな動きによって担われている。ミオシンには ATP 結合部位とアクチン結合部位が存在しており、ATP がミオシンと結合することにより構造変化が生まれアクチンと解離する (weakly bound state)。ミオシンと結合した ATP は加水分解酵素の働きにより ADP とリン酸に分解され、ADP の放出とともにアクチンとの再結合が可能となる。更に、リン酸を放出することでアクチンを手繰り寄せることで全体的な収縮が開始される (strongly bound state) (図 1)⁴。

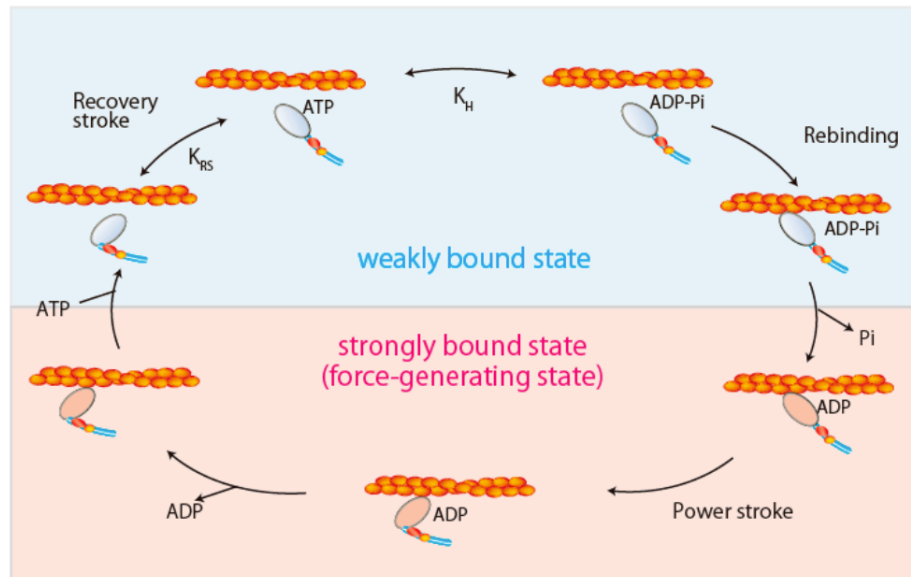


図 1. 収縮時におけるアクチン・ミオシンの結合解離モデル⁴。

このアクチン・ミオシンの結合解離により心臓は収縮を繰り返すが、この strongly bound state / weakly bound state の割合を調節することで、収縮増強剤ならびに収縮抑制剤の開発が近年進められている。従来の収縮不全をきたす心疾患に対する治療は主として β 遮断薬や ACE 阻害薬、Na チャネル遮断薬といった薬剤が用いられてきたが、神経液性因子や細胞内シグナルを介するため過収縮をはじめとした副作用が問題視されている。しかし、近年開発された omecantiv mecarbil はアクチン・ミオシンの結合解離のステップにおけるリン酸の放出を促進し、一方新たなミオシンへの ATP の結合を阻害することで全体的な strongly bound state の状態を持続させ強心作用をもたらすことが示されている⁵。

以上の背景から従来の治療法とは異なる direct sarcomere modulator をはじめとした新たなアプローチによる心疾患への治療薬の開発が現在でも求められている。

3-2. ミトコンドリアにおけるエネルギー産生機構と虚血における適応応答

心臓は持続的な活動に莫大なエネルギー消費する臓器であり、そのエネルギー源である ATP の大部分(~95%程度)はミトコンドリアにおける酸化的リン酸化(OXPHOS : Oxidative Phosphorylation)により産生される。OXPHOS の反応は ATP 産生のみならずミトコンドリアの膜電位の生成、活性酸素の産生、細胞の恒常性に寄与することが明らかとなっている。OXPHOS の過程は電子伝達系の複合体 I~複合体 IV を介した電子の受け渡しを介してマトリックスから膜間部に水素イオンを輸送し最終的に複合体 V(FoF1-ATP 合成酵素)によって ATP が産生される(図 2)。これら複合体のサブユニットは核ゲ

ノムまたはミトコンドリアゲノムの何かにコードされており、核ゲノム由来のサブユニットをコードする mRNA は細胞質のリボソームによって翻訳され、その後ミトコンドリアへと取り込まれる。一方、ミトコンドリアゲノムにコードされるサブユニットの mRNA はマトリクス内のミトコンドリアリボソームによって翻訳される。このように異なる領域で合成されたサブユニットが最終的なアセンブリープロセスの際に同量供給される必要があるが、環境変化に応じた厳密な遺伝子発現調整が行うことにより急激なエネルギー需要に対応していることが明らかとなっている⁶。

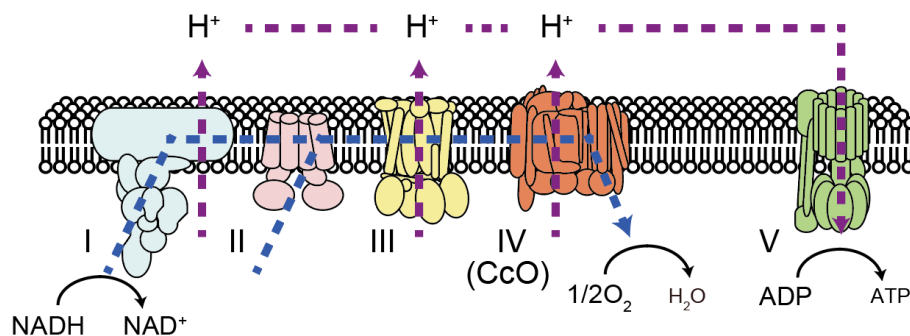


図 2. ミトコンドリアにおける酸化的リン酸化の流れ。青矢印は電子の流れ、紫矢印はプロトンの流れを表す。ミトコンドリアにおけるマトリクス側から電子の受け渡しによる水素イオンの汲み上げが起こり、最終的にプロトンの濃度勾配を利用して ATP が産生される。

狭心症などにより心臓への血液供給が制限されると、低酸素状態もしくは虚血状態に陥り、ATP の需要と供給のバランスが崩れ、最終的には心不全の発症へとつながる。この虚血状態ではほとんどの細胞は OXPHOS から解糖系に代謝をシフトさせることで ATP 枯渇を防ぎ、その環境変化に対応している⁷⁻¹⁰。しかしながら、絶え間ない自律拍動を行う心筋細胞が ATP 産生効率の悪い解糖系でその機能を維持することは困難とされる。低酸素は上述したように細胞内 ATP 濃度の枯渇をもたらし活性酸素などの産生による細胞障害がもたらされるが、細胞は代謝の適応応答によりエネルギー枯渇の有害な影響を最小限に抑えるよう働く⁷⁻¹⁰。しかしながら、近年の報告においては低酸素処理が、解糖系への代謝シフトのトリガーとして働きかける一方で、OXPHOS 効率を高めるように作用することも示されている¹¹⁻¹³。実際には、低酸素刺激に応答し OXPHOS 活性を上昇させる詳細なメカニズムは明らかでないが、細胞内 ATP レベルを維持するための様々な適応応答機構を有していると考えられる。このように OXPHOS の調節メカニズムを明らかにするためには、OXPHOS 活性の正確で非侵襲的な測定系が必要となる。これまでに OXPHOS 活性を測定する手法は開発されているものの、生細胞においては十分ではない。細胞内 ATP 濃度の測定は、OXPHOS 活性を評価するための最も一般的に使用される手法の一つであるが、細胞内 ATP 濃度は OXPHOS 活性を正確に反映できるわけ

ではない。これは解糖系 ATP 産生や細胞質 ATPase、クレアチンキナーゼやアデニル酸キナーゼなどの ATP 干渉による影響も受ける可能性があるためである¹⁴。また、クロマトグラフィーによる ATP 濃度の測定¹⁵、MS¹⁶、NMR¹⁷、ルシフェラーゼアッセイ¹⁸は細胞抽出分析に基づいていることから、生細胞の ATP 濃度変化をリアルタイムで継続的に評価することはできない。そのため、OXPHOS 活性を正確に反映する ATP 測定系、すなわちミトコンドリアで産生される ATP を特異的に測定する鋭敏かつリアルタイムでモニタリングできる系の確立とそれによる心疾患治療の可能性を探索する必要がある。

3-3. 臨床から見た心疾患とミトコンドリアを標的とした治療薬の開発の可能性

心不全は心筋の収縮能の低下を特徴とする複雑な病態であり、虚血による抹消組織のエネルギー需要を満たす血液を心臓が供給できないことで発症する。さらに心臓に流入してくる血液量に応じて生じる圧力である容量負荷(前負荷)と、血液を大動脈へと拍出する際にかかる抵抗である圧負荷(後負荷)の増加、神経ホルモン調節不全・虚血などによって心不全の発症ならびに症状の進行を認める。これらの症状や持続的な負荷により心室からの BNP(brain natriuretic peptide)の分泌が促進されることから、臨床の現場において BNP の発現レベルが心不全マーカーとして広く利用されている¹⁹。

また、ヒトのミトコンドリア機能および代謝における非侵襲的な評価のため放射性同位元素で標識した放射性医薬品(SPECT 製剤 : Single photon emission computed tomography)の投与による画像診断から血流量をはじめとして虚血状態や梗塞領域の探索が行われている。この手法の応用と半減期の短くミトコンドリアに集積する製剤の組み合わせにより心不全の重症度(BNP の発現レベル)を評価したところ、重症度依存的に機能不全となったミトコンドリアが蓄積することが示された^{20,21}。更に、ミトコンドリアミオパチーやミトコンドリア病由来の心筋症に関してもこの相関が見られたことから、ミトコンドリア機能不全は心疾患の発症の初期のイベントであることが示唆されている。これらの知見からミトコンドリアの機能回復による心疾患治療の可能性が考えられ、特にミトコンドリアの生合成を活性化させる治療薬が開発されてきた。実際に PDE(phosphodiesterase)阻害剤により cAMP の分解阻害から細胞内 Ca^{2+} の増加を介して CaMKK β -AMPK 経路の活性化、Sirt1 の活性化により mtDNA 含有量の増加がもたらされ全体的なミトコンドリア機能を向上につながることが報告されている²²。PDE 阻害剤は、心拍出量をはじめとした心機能改善効果をもたらしたが、その一方で細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加による過収縮が副作用として問題となっている。

以上の背景からミトコンドリアの機能を直接的に向上させることが最終的な心疾患への治療薬となりうると考えられ、特にミトコンドリア ATP 産生機構の活性化によるミトコンドリア全体の機能向上が可能となれば、従来とは根本的に作用機序が異なり、副作用のない治療薬の開発に期待が持てる。

4 英文要旨

A molecular triage process mediated by RNF126 and BAG6 complex regulates degradation of G0S2

32A16016 Kenta Kamikubo

Heart failure is a major public health problem due to the progressive aging of the population, and decreasing the ATP production by the oxygen understock mainly contributes its clinical onset. Especially, the oxidative phosphorylation (OXPHOS) system generates most of ATP in cardiomyocytes, ATP is essential energy source especially for cardiomyocytes which continue the contraction and relaxation. Therefore, when the balance collapses, it easily becomes to an ischemic state, which leads to the onset of heart failure. However, there are no reports not only increasing factor for mitochondrial ATP production, but also therapeutic drug for targeting energy metabolism. Recently, we identified G0/G1 Switch Gene 2 (G0S2) as a positive regulator of mitochondrial ATP production through its interaction with F₀F₁-ATP synthesis. Overexpression of G0S2 prevented cardiomyocytes and zebrafish hearts from ATP depletion and provided strong tolerance to these cells and organs in hypoxia. Moreover, we found that the G0S2 protein is rapidly degraded in ubiquitin-proteasome pathway. These results imply that inhibiting the degradation of G0S2 may lead to therapeutic strategy to heart disease such as myocardial infarction and heart failure. Therefore, we aim to elucidate of mechanism of G0S2 degradation, and aim to establish of the proof of concept that inhibiting the degradation of G0S2 leads to therapeutic target.

Firstly, we tried to identify the specific ubiquitin ligase of G0s2. ~600 siRNA libraries against E1, E2, and E3 were transfected to C2C12 cell lines stably expressing EGFP-G0s2 and the changes in EGFP intensity of these cells were analyzed using high-content analysis instruments. After a few assay, we identified the Ring Finger Protein 126 (RNF126) as a candidate ubiquitin ligase. Established RNF126-deficient cells by using CRISPR-Cas9 technology showed prolonged turnover of G0s2 protein and reduced G0s2 ubiquitination. Moreover, we investigated about the mechanism of RNF126 regulation because it was recently reported to be an E3 ligase for the degradation together with Bag6 as a scaffold protein. In fact, BAG6 knockdown increased G0S2 protein expression in cardiomyocytes and also inhibited G0S2 ubiquitination. Cycloheximide chase analysis showed that the half-life of G0S2 was significantly longer than that of control cells in BAG6 knocked-down cells.

Additionally, recombinant G0s2 was ubiquitinated by RNF126 only in the presence of E1, E2 and Bag6 in an in vitro ubiquitination assay.

In the parallel study, we generated the various alanine-replaced mutants to identify the domain related to degradation and tested the effect of proteasome inhibitor. Among them, only the degradation of the mutant replaced Glu44 with alanine (E44A) was strikingly inhibited in cardiomyocytes. In a cycloheximide chase analysis, G0s2 E44A mutant had a longer half-life, and ubiquitination rate was remarkably decreased in comparison with WT. We further revealed that G0s2 E44A mutant reduced the interaction with Bag6 complex. Finally, we measured mitochondrial ATP concentration by FRET-based ATP biosensor in hypoxia-exposed cardiomyocytes to evaluate the effect of inhibiting the degradation. Interestingly, overexpression of G0s2 E44A effectively attenuated ATP depletion under hypoxic condition in comparison with G0s2 WT.

In summary, G0S2 protein was regulated by molecular triage process mediated by RNF126 and BAG6 complexes just before membrane targeting. Escaped G0S2 from degradation pathway was correctly imported to membrane and increases the mitochondrial ATP concentration. These data suggested that the intervention to prevent G0S2 degradation can be a novel therapeutic strategy for heart failure.

5 要旨

RNF126/BAG6 複合体による細胞内分子選択機構を介した

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)

32A16016 神窪 謙太

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す、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 スクリーニングを行い、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”を用い継続的な 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。

6 研究の背景

6-1 G0S2 の発見と量的制御、生体内での意義

G0S2 は初め G0 から G1 期への薬物誘発性細胞周期の移行のフェーズにおいて、発現が誘導される因子として同定された²³。その後、G0S2 が様々な培養細胞において細胞質²⁴や小胞体²⁵、脂肪滴、ミトコンドリア²⁶の様々なオルガネラに局在するという報告がなされ、細胞増殖や分化、アポトーシス、炎症や脂質代謝に関与していることが示されてきた。

G0S2 は心臓だけではなく、骨格筋・肝臓・脂肪組織において高い発現様式を示すことが明らかとなっている²⁷。しかし、私たちのグループにおける過去の報告からラット培養心筋細胞に対して低酸素処理をすることで内因性に発現する G0S2 の発現が転写レベルで増強することを見出した。この低酸素応答は、転写因子である HIF-1 α (Hypoxia inducible factor) の活性化により担われることが示唆された。HIF-1 α に対する siRNA を用いたノックダウン実験において、G0S2 の発現誘導が起こらないことから HIF-1 α を介した制御であることが明らかとなっている。またマウス横紋筋由来培養細胞 C2C12 細胞や癌細胞をはじめとした細胞株においても G0S2 の発現は認めるものの低酸素応答は認めず、心筋細胞特異的な機構であることも同時に明らかとなっている。更に、自拍能を持つ培養心筋細胞においても心拍数の程度すなわち ATP の需要に応じて G0S2 の発現が変動することを見出した。交感神経興奮薬 β -アドレナリン作動静受容体のアゴニストである Isoproterenol の作用により頻脈を誘発し ATP の需要が高まると、G0S2 の転写レベルでの発現が増大し、一方でアクチン・ミオシンのクロスブリッジを阻害する BDM(2,3-butanedione monoxime)の作用を介した自拍抑制下、すなわち ATP の需要が下がると G0S2 の発現が著しく低下する。他の組織においては、C2C12 細胞の筋芽細胞から骨格筋細胞への分化誘導により内因性に発現する G0S2 の転写レベルが増大することも明らかにしている。これは筋芽細胞から骨格筋への分化によって、ATP の需要が高まったためと考えられる。以上の結果から、G0S2 がエネルギー需要の高い組織・細胞においては発現量が高く、エネルギー需要の変動に応答して発現を変動させることで、そのエネルギーバランスに対応する重要な因子であることが示唆される。

一方で、他グループの報告により HeLa 細胞において G0S2 タンパク質は寿命が非常に短く、Ubiquitin Proteasome System(UPS)を介して分解制御を受けることが示された²⁸。G0S2 特異的な E3 を含めた詳細な分解メカニズムは明らかとなっていないものの、G0S2 にユビキチン修飾がなされ速やかにプロテアソームでの分解へ誘導されることが示されている。

これらの結果から、G0S2 はエネルギー需要と供給のバランスに合わせて発現量を増大させ、更にタンパク質レベルでの制御により必要量だけ生体内に蓄積させることでエネルギー枯渇を防ぐ機能を有することが示唆される。

6-2 心筋細胞を用いた ATP 産生量の測定系の確立と G0S2 の機能解析

心筋細胞は酸素濃度に応じて細胞内 ATP レベルを維持するための様々な適応応答機構を有している。特に主な代謝系である OXPHOS 活性のダイナミックな変化により ATP 産生を担うが、その正確で非侵襲的な測定系はこれまで存在しなかった。私たちの研究室では京都大学 生命科学研究科 今村博臣准教授との共同研究により、OXPHOS の最終段階において ATP は細胞質ではなくミトコンドリアのマトリックス内で産生されることに着目し、心筋細胞においてマトリックス内の ATP 濃度($[ATP]_{mito}$)を選択的に測定するアッセイ系は OXPHOS 活性を正確に評価できると考え、そのアッセイ系を構築した(Mit-ATeam assay)²⁹。Mit-ATeam assay は蛍光タンパク質である CFP 及び YFP を、ATP に親和性を持つ枯草菌由来 FoF1-ATP 合成酵素の ϵ サブユニットを介して結合させ、更にミトコンドリア移行シグナルを付加することでミトコンドリアのマトリックスにおける ATP の結合解離に応じた蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)を利用するものである。ATP が遊離した状態では ϵ サブユニットの flexible な構造により 2 つの蛍光タンパク質の距離が遠くなり、FRET 効率が低下する。一方で、ATP が結合すると ϵ サブユニットの構造変化により FRET 効率が上昇する。

実際にこのプローブを心筋細胞に導入し、ATP 合成酵素の阻害剤 Oligomycin A を作用させ FRET の変化からミトコンドリア ATP 産生能をモニタリングすると、濃度依存的に FRET ratio(YFP/CFP 蛍光強度比)の低下が見られ、最終的に 0.7 近傍でプラトーに達した(図 3: Mit-ATeam)。一方で、細胞質における ATP 産生量においては Oligomycin A の作用で FRET ratio の変化が見られなかったことから(図 3: Cyto-ATeam)、Mit-ATeam が特異的にミトコンドリア ATP 産生量を捉えていることが示唆される。また、Mit-ATeam によるミトコンドリア ATP 産生量を評価するダイナミックレンジは 30%程度であり、このレンジにおける微細な変化からミトコンドリア ATP 産生能を鋭敏に測定することが可能となる。

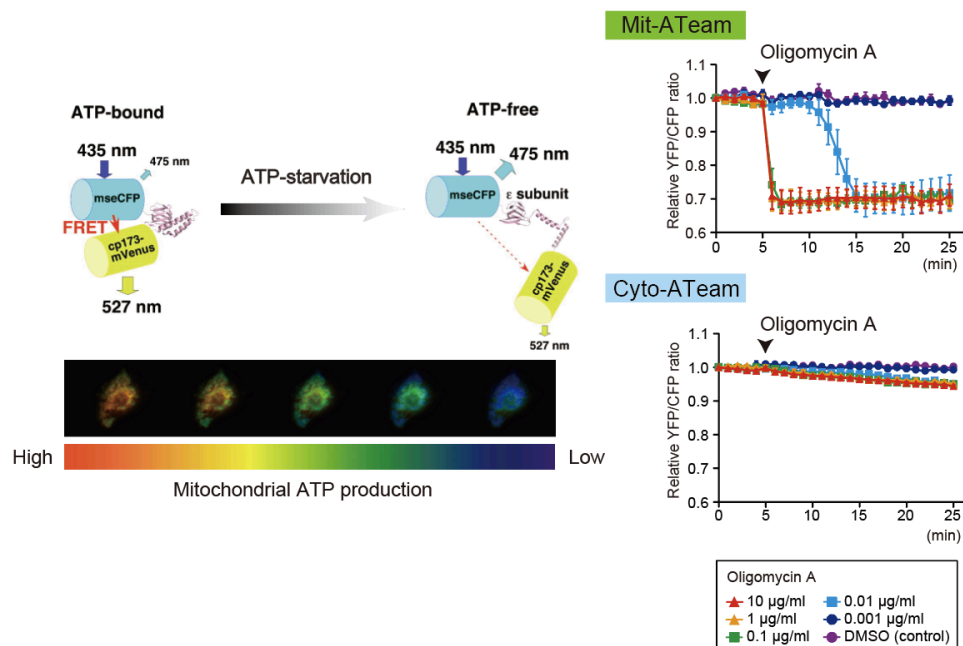


図3. ATeamの原理とFoF1-ATP合成酵素阻害剤Oligomycin A(0.1 $\mu\text{g/mL}$ ~ 10 $\mu\text{g/mL}$)の濃度依存的な作用によるFRET比の変化をMit-ATeamおよびCyto-ATeamを用いてリアルタイムにモニタリングした結果。Mit-ATeamにおけるFRET比は1.0~0.7のレンジで推移し、微量な変化からATP産生量を測定することが可能となる(Kioka et al., PNAS. 2014より引用。一部改変)

この精密かつリアルタイムでのモニタリングが可能な手法を用いることで、私たちの研究室ではOXPHOSの活性化によるミトコンドリアATP産生能の評価を行ってきた^{30,31}。実際に心筋細胞にG0S2を強制発現させることで通常酸素状態においては余剰なATP産生能の活性化には至らなかったが、低酸素下におけるATP産生能の低下を減弱する効果を得た。また、培養細胞を用いたセミインタクトアッセイ系であるMASC assay³²や酸素消費量からミトコンドリア呼吸鎖活性を測定するFlux analyzerにおいてもG0S2はOXPHOSを活性化させATP産生量を向上させることを見出している。

in vivoでの機能解析として私たちの研究室ではゼブラフィッシュ、マウスを用いた機能解析を行ってきた。まず、TALENを用いて樹立したG0S2 KOゼブラフィッシュにおいては低酸素により誘発される心停止が有意に増加することを明らかとした。また、ゼブラフィッシュの心臓にG0S2を強制発現させたトランスジェニックゼブラフィッシュ(Transgenic zebrafish; Tgフィッシュ)を作製するとともに、Mit-ATeamを発現するTgフィッシュとの交配により低酸素下におけるミトコンドリアATP産生能を評価した。G0S2発現領域においてATP産生能の保持を認め、低酸素刺激により誘発される心停止を有意に抑制する効果を認めた³³。以上の背景から、G0S2は細胞内だけに留まらず生体内においてもエネルギー不全下においてATPの供給を担い心機能を維持するのに重要な因子であることが示唆される。

6-3 基質特異性の高いユビキチン・プロテアソーム系と G0S2 タンパク質分解を標的とした創薬展開の可能性

6-3-1 ユビキチン・プロテアソーム系

ユビキチン・プロテアソーム系はリン酸化と並ぶ生体内における主要な翻訳後修飾であるユビキチン化をトリガーとして、細胞周期や DNA 修復、転写、ストレス応答など様々な細胞内の homeostasis を維持する役割を担っている。この反応系は 76 個のアミノ酸からなり高度に保存されたユビキチンタンパク質が基質に対してラダー状に結合した状態(ポリユビキチン鎖)を目印としてその後の反応がもたらされる。この修飾の起点となるのはユビキチンタンパク質に存在する 7 つのリジン(K6, K11, K27, K29, K33, K48, K63)または N 末端のメチオニン(M1)であり、どのアミノ酸を介してポリユビキチン鎖が形成されるのかによりその意義が大きく異なる。これまでに、K48 を介したポリユビキチン化は分解シグナルによるプロテアソームでの分解、K63 は DNA 修復やシグナル伝達に寄与することが明らかとされてきた。近年では質量分析による解析から新たに直鎖状ユビキチン鎖や分岐ユビキチン鎖の存在が示され、炎症やシグナル伝達、タンパク質分解といった種々の機構に関与することが示されている。この基質に結合するユビキチンは ATP 依存性の反応によって複数の酵素を介して付加される。まず、ユビキチン活性化酵素(E1)がユビキチンとチオエステル結合を形成し、ユビキチン結合酵素(E2)へ受け渡しを行う。その後、ユビキチンをユビキチンリガーゼ(E3)への受け渡しもしくは E2-E3 複合体を形成することで基質認識・ユビキチン化を行う。

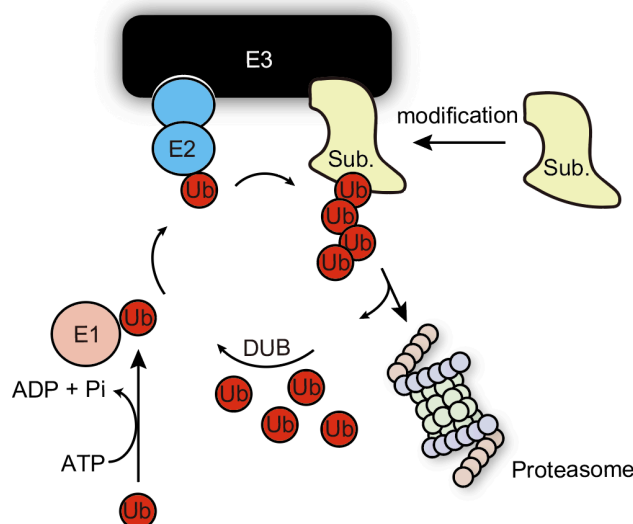


図 4. ユビキチン・プロテアソーム系によるタンパク質分解機構。ATP 加水分解におけるエネルギーを用いて E1~E3 の酵素反応によって基質(Sub.)へのユビキチン化修飾を行い、プロテアソームにて分解する。ポリユビキチン鎖は脱ユビキチン化酵素(DUB)によって分解直前に切断され再利用される。

基質特異性を有する E3 は 1)HECT 型、2)RING-Finger 型、3)U-Box 型に大別され、基質に応じた制御を担っている。まず、1)HECT(Homologous to the E6-AP Carboxyl Terminus)型の E3 は、哺乳類では約 30 種類ほど報告されており、タンパク質の輸送や免疫応答、細胞の増殖など細胞内のシグナル伝達系に関与することが示されている。この E3 の構造学的な知見として、N 末端領域に基質結合領域、E2 との結合領域を有し、C 末端領域に存在する HECT ドメインにおいて E2 から受け渡されるユビキチン分子とチオエステル結合を一度形成することが特徴である。その後、E2 から基質へ再びユビキチンを受け渡し、基質にユビキチンを付加することでポリユビキチン鎖を形成する。2)RING-Finger 型の E3 は~600 種類程度存在することが報告され、E3 における最大のクラスである。構造学的解析から、酵素活性を担う RING-Finger ドメインに存在するシステインおよびヒスチジン残基の領域(Zn フィンガードメイン)を介して亜鉛イオンを取り込み、E2 依存的なユビキチン化を促進することが明らかとなっている³⁴。3)U-Box 型の E3 は RING Finger 型の E3 と構造および機能が非常に類似しているが Zn フィンガーとは異なり金属キレートが必要としないことが特徴である³⁵。また、U-Box 型の E3 は特異的な基質に対してユビキチン化修飾を行うだけではなく、細胞内における folding 異常となった基質のユビキチン化にも関与することが示されている。Folding 異常となった基質は Hsp70 や Hsp90 のような分子シャペロンを介して ATP 依存的に Refolding される、もしくは U-Box 型の E3 における N 末端領域に存在する TPR(Tetratricopeptide repeat)にシャペロンが結合することでユビキチン化することが明らかとなっている。また、近年の報告から E2 および E3 の両活性を併せ持つハイブリッド型 E2/E3 の同定³⁶やユビキチン化シグナルに関しても多様性が認められ²⁷、細胞内の恒常性維持を担う機構の複雑さが伺える。

6-3-2 膜タンパク質の生合成と量的制御機構について

膜タンパク質はゲノムにコードされるタンパク質の約 20~30%を占めており、細胞内において生合成されたタンパク質の正しい局在化はその機能を獲得するだけではなく、シグナル伝達受容体・細胞内輸送因子・細胞小器官の生合成の促進などといった細胞全体における恒常性維持のため非常に重要である。

小胞体を通過する膜タンパク質の約 30%程度は N 末端に移行シグナルを持ち、小胞体内にてジスルフィド結合の形成や糖鎖修飾などといった翻訳後修飾が行われる。ほとんどの真核生物の膜タンパク質は合成と同時に小胞体へと挿入される共役反応(co-translational translocation)が採られている。細胞質においてリボソームでの翻訳と同時にシグナル認識粒子(SRP : Signal Recognition Particle)によってシグナル配列が認識され SRP 受容体を介

して小胞体を標的とし膜透過装置トランスロコン(Sec61 チャンネル)を通過し、翻訳と局在化を完了する(図 5)³⁷。一方、細胞内では約 30%程度のタンパク質が恒常的に不良タンパク質として形成され、遺伝子変異や転写・翻訳のエラー・飢餓などによって folding 異常となったタンパク質が蓄積し神経変性疾患をはじめとした病態発症につながる。細胞質においてはシャペロンを介し不良タンパク質の re-folding や品質管理機構によってプロテアソームでの分解へと誘導されるが、小胞体内においてもユビキチン化を介し不良タンパク質を排除する機構 ERAD(ER-associated degradation)が備わっている³⁸。この ERAD は ER 内腔に蓄積した folding 異常となったタンパク質を小胞体シャペロンによって識別し、膜内のレトロトランスロケーション複合体へとリクルートする。その後、小胞体膜上に存在する E3 がユビキチン修飾を介し、AAA ATPase である p97-Ufd1-Npl4 複合体によって膜から引き抜かれた後、プロテアソームにて分解される。この機構により小胞体における恒常性が保たれている³⁹。

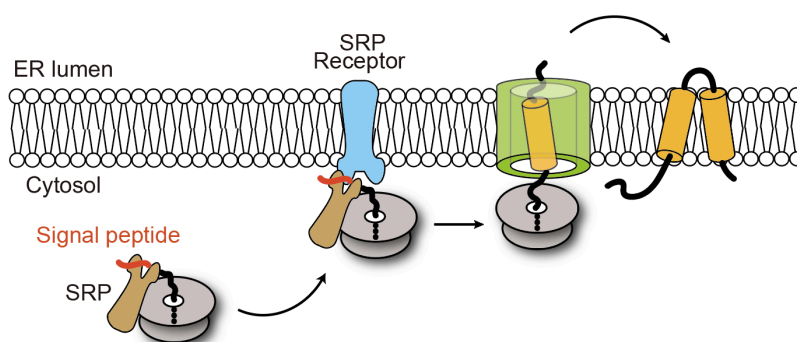


図 5. co-translational translocation による膜タンパク質の生合成経路。新生ポリペプチド鎖は SRP により認識され SRP 受容体、sec61 複合体へとリクルートされ翻訳・局在化が完了する。

また、核ゲノムにコードされたミトコンドリアタンパク質は約 1500 程度存在し、ミトコンドリアタンパク質の約 99%以上を占めると推測されている。ミトコンドリアは OXPHOS による ATP 産生のみとしてではなく、アミノ酸やヘム合成、アポトーシスをはじめとしたシグナル伝達にも寄与する重要なオルガネラであり、その機能を維持するための生合成・分解システムは堅牢である必要がある。構成するタンパク質の大部分は N 末端にミトコンドリア移行シグナルを持ち、細胞質での生合成後ミトコンドリアへと挿入される。この挿入には外膜の膜透過装置 TOM 複合体(translocase of the outer membrane)および内膜の膜透過装置 TIM23(translocase of the inner membrane)を通過し、外膜・膜間部・内膜・マトリクスへと正しく輸送される⁴⁰。一方、タンパク質分解系に関しては、各部位特異的なシャペロンタンパク質、ATP 依存的プロテアーゼそして E3 リガーゼによってミトコンド

リア内外の品質管理を担っている。最も重要なシャペロンタンパク質として Heat shock protein family に属する Hsp60 または Hsp70 がミトコンドリアには存在しており、folding 異常となったポリペプチドを認識し、refolding または安定化する方向に寄与する。また、古くから研究が進められている Lon protease は原核生物から真核生物にまで高度に保存された ATP 依存性セリン/スレオニンプロテアーゼであり、ミトコンドリアマトリクス内で生じる酸化および folding 異常となったタンパク質の分解に寄与することが報告されている。また Lon protease は酸化ストレスや飢餓状態などのストレスによって誘発される因子であり、ストレス負荷時にミトコンドリア機能を保持する機能を有していることが明らかとなっている⁴¹。

6-3-3 E3 探索における従来の手法

様々な基質における分解マシナリーに関与する因子の探索には基質特異性の高い E3 の同定が必要不可欠であり、その探索法は多岐に渡る。一般的には免疫沈降法と質量分析を組み合わせた手法が用いられるが、基質と E3 の結合は非常に弱く、またその相互作用も一過性であることから low affinity な基質に対する E3 の同定は困難とされる。そのため、様々な基質に応用可能かつ簡便な siRNA library または CRISPR/Cas9 system などを用いたスクリーニングのプラットフォームが開発されてきた^{42,43}。両スクリーニングは標的タンパク質の発現レベルをモニターするためレポーターとして蛍光タンパク質を付加し、E1~E3 ならびに複合体因子のノックダウン・ノックアウトによる蛍光強度の変化から標的因子を探索する手法である。siRNA library でのスクリーニングはタンパク質の量を ELISA や western blotting により測定する手法がとられ、throughput の低さが問題視されてきた。一方、CRISPR/Cas9 system による Genome wide スクリーニング系は FACS による特定のマーカー分子陽性細胞の回収およびその後の次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析から同定する手法が取られている。これらのスクリーニングは偽陽性が多数ヒットすることが一番の問題点となるが、網羅的な解析から E3 のみならず、分解シグナルとして修飾に関する因子や E3 を取り巻く複合体の同定が可能となり、多くの基質のメカニズム解明に用いられている。

また近年、細胞内で生じるタンパク質相互作用を捉える手法として「部位特異的光クロスリンク法」が開発されてきた。この手法は光反応性を有する非天然アミノ酸と遺伝暗号の改変を用い、相互作用するタンパク質同士を共有結合で結合させ、タンパク質相互作用を検出する手法である。これはケミカルクロスリンカーや PFA 固定などによる従来のクロスリンク法とは異なり、特異的な 1 アミノ酸を標的にするため、非特異的なクロスリンクによる

結合や凝集体の形成を引き起こしにくく、部位特異的かつ直接的に結合するタンパク質複合体のみを解析することが可能となる。しかし、部位特異的光クロスリンク法は標的分子との相互作用部位の検討が非常に重要となるが、分解シグナルとなるコンセンサス配列の予測から特異的な部位にクロスリンカーを導入することで標的分子の探索が可能となりうる。

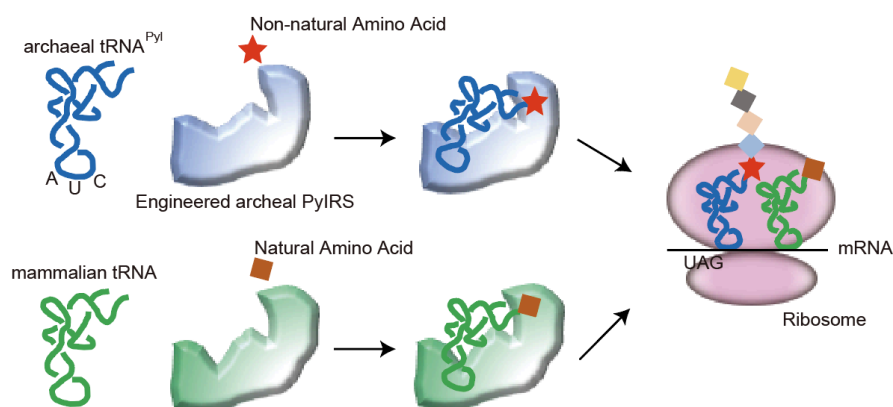


図6. 部位特異的光クロスリンカーを用いた標的タンパク質探索における原理。

6-3-4 degron を標的とした創薬展開と G0S2 への応用

一般的に、半減期が数十分程度のタンパク質においてはタンパク質内に分解シグナルを持ち、その領域ないしはアミノ酸配列は“degron”として定義される^{44,45}。その配列の種類は多岐に及び E3 による基質認識からプロテアソームでの分解までの一連の各ステップにおいて degron が寄与するとされる。実際には、1st degron として E3 による基質認識部位、2nd degron としてユビキチン修飾を受けるアミノ酸、3rd degron として 2nd degron の近傍に存在する flexible な領域でプロテアソーム内に取り込まれる最初のアミノ酸などが挙げられる⁴⁶。これまでに基質の安定化を図る化合物が多数開発され、UPS を標的とした創薬の可能性が改めて注目されている。現在までに抗癌剤として臨床試験にまで達している 1st degron を標的とした基質と E3 の結合阻害剤や⁴⁷、一般的なユビキチンサイトである Lys をマスクするような低分子化合物の探索から創薬を目指す取り組みも進められており⁴⁸、特異性の高い化合物の開発に期待が持たれている。

これまでの研究結果から細胞内において G0S2 タンパク質量の増加はミトコンドリア ATP 産生能を更に向上させ心機能を改善しうる。また、G0S2 タンパク質がユビキチン・プロテアソーム系により分解制御されていることから特異的な分解抑制が更なるミトコンド

リア ATP 産生能を獲得することが期待され、従来の治療法とは根本的に異なるエネルギー代謝を標的とした治療戦略となりうることが示唆される。しかし、G0S2 特異的な E3 を含めた分解メカニズムは全く明らかとなっていない。また、一般的なタンパク質分解のステップとして、不良タンパク質として認識され分解へと運命づけられた基質が各オルガネラまたは細胞質に放出されユビキチン化修飾の後、プロテアソーム分解へと誘導される。それゆえ分解抑制の機序によっては細胞内に不良タンパク質の蓄積と凝集体の形成を来すことも考えられ、分解メカニズムの解明のみならずその生理的意義を検討する必要がある。特に G0S2 をはじめとした一回膜貫通型タンパク質の生合成経路および分解機構については不明な点が多い。

したがって、本研究では G0S2 特異的な E3 の同定および細胞内における分解メカニズムの解明を行うことで創薬の可能性を検討することを目的とする。更に、G0S2 における degron の探索は、E3 との相互作用阻害剤の開発やその後の創薬展開に向けた大きな知見となることから、この領域の同定とその生理的意義の解明を目指す。

7 研究目的

私たちの研究室にて同定した G0S2 は FoF1-ATP 合成酵素を正に制御し、心筋細胞及びゼブラフィッシュの心臓においてミトコンドリア ATP 産生能を増強することを明らかにした。一方で、低酸素条件下において転写レベルで発現量が増大し、ユビキチン・プロテアソーム系を介してタンパク質分解が制御されることを見出した。以上の背景から、低酸素条件下における G0S2 タンパク質の特異的な分解抑制が心不全をはじめとしたエネルギー不全を来す疾患への治療応用へと繋がることが示唆される。

そこで、本研究では G0S2 の分解メカニズムの解明を目的に研究を行う。更に、G0S2 の特異的な分解抑制が更なるミトコンドリア ATP 産生能を獲得しうるか検証する。

8 研究方法

8-1 Reagent and antibody

必要な試薬は以下の通り購入した：MG132(Sigma-Aldrich), Lactacystin(Peptide Institute Inc.), PS-341(Selleck Chemicals), Chloroquine(Sigma-Aldrich), ammonium chloride(Wako), cycloheximide(Sigma-Aldrich), Lipofectamine 2000(Invitrogen), Lipofectamine 3000(Invitrogen), Lipofectamine RNAiMAX(Invitrogen), anti-HA Agarose (HA-7, Sigma-Aldrich), Anti-FLAG M2 Agarose(Sigma-Aldrich), TUBE2-Agarose (LifeSensors)。また、必要な抗体は以下の通り購入もしくは分与していただいた：anti-RNF126 (Abcam: RNF126 #B), anti-GAPDH (Merck), anti-His₆ (Clontech), anti-FLAG M2-peroxidase antibody (Sigma-Aldrich), anti-HA (Sigma-Aldrich), anti-GST (Merck), anti-Vimentin (Abcam)。anti-RNF126 (RNF126 #A)は東北大学の中山啓子教授に分与していただいた⁴⁹。また、anti-BAG6 (polyclonal antibody against BAG6)は首都大学東京の川原裕之教授に分与していただいたものを使用した⁵⁰。

その他、in vitro ubiquitination assay で使用する精製タンパク質は R&D Systems から購入した：recombinant human ubiquitin, recombinant human ubiquitin-activating enzyme/UBE1, recombinant human UBCH5B/UBE2D2。

8-2 Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

目的に合わせた濃度のポリアクリルアミドゲルを作成した。泳動槽にゲル板をセットし、1x Running Buffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0.1% SDS)を加えた。ゲル板の well にマーカーとサンプルをアプライし、Power Pac HC™を定電圧で 200 V にして約 40 分間電気泳動した。

8-3 Western blotting

PVDF メンブレンをメタノールに浸し、活性化させた。トランスファー装置にセミドライ用 Buffer に浸したろ紙を敷き、その上にメンブレン、泳動したアクリルアミドゲルの順に乗せた。Power Pac HC™を定電圧にして、15 mV で 30 分間転写した。転写後は、1x TTBS でメンブレンを洗浄し、3% non-fat milk を用いてブロッキングした。再度、1x TTBS で振盪させながらメンブレンを洗浄し、希釈した一次抗体を入れ、4°Cで一晩抗体反応を行った。同様に 1x TTBS で振盪させながら洗浄した後、二次抗体を入れ、室温で一時間反応させた。検出液である ECL(A 液 : B 液 = 1 : 1)をメンブレンと反応させた後、シート状にメンブレンに置き、LAS-4000 にて画像撮影を行った画像は Image Quant TL Analysis Toolbox にて画像解析および目的のバンドにおける intensity を定量化した。

8-4 新生仔ラット心筋細胞初代培養、その他細胞培養

新生仔ラット(Wister, 0 日齢)から心臓組織のみを摘出し、HBSS(Hanks' Balanced Salt Solution)メディウム内でほぐし、血液やその他の組織を取り除いた。心臓組織をコニカルに移し 0.25% Trypsin/EDTA 溶液と 4°Cにて 12 時間反応させた。メディウムを加え、37°Cで 5 分インキュベートすることで反応を停止させ、遠心により心臓組織のみ抽出した。その後、collagenase を加えることで心筋細胞を単離した。その後、遠心分離により心筋細胞および線維芽細胞・血球系細胞を分離し必要量を適切な dish に播種し実験に用いた。

その他培養細胞、HEK293T 細胞、C2C12 細胞(標的遺伝子安定発現株)は、DMEM(high glucose) + 10% FBS + 1% penicillin-streptomycin 含有培地を用い、37°C 5% CO₂ の環境下で培養した。

8-5 Plasmid and viral vector constructions

Mouse G0S2 をコードする配列 (NM_008059.3)を Puromycin もしくは G418 耐性遺伝子を 2A で介した pCDH-EF1 cloning Vector にサブクローニングした。更に、PCR を用いて N 末端に HA-tag もしくは EGFP を融合させ HA-G0S2, EGFP-G0S2 が発現する plasmid を得た。G0S2 に対して目的の変異を導入するため、当該コドンをも目的のアミノ酸に置換した Primer もしくは欠損を目的とした Primer をそれぞれ設計した (Primer set は以下の通り)。pCDH-EF1/HA-G0S2 のプラスミドをテンプレートに Inverse PCR 法により増幅させ変異体を作製した。アガロースゲルを用いて電気泳動を行い、目的のバンドのみを切り出し、QIAGEN QIAEX II GEL EXTRACTION による精製の後、フェノール・クロロホルム、エタノール沈殿により目的産物のみ精製した。Kination 反応により PCR 産物のリン酸化を行い、Self-ligation の後、大腸菌 DH5 α に形質転換させ、目的のプラスミドを得た。適切な変異が導入されているか検討するためサンガーシーケンスを行い評価した。

今回の実験で用いた primer set は以下の通り。

変異体	Forward Primer (5'→3')	Reverse Primer (5'→3')
Δ 1-9	ctggccaaggagatgatggcgcaagaagc	agcaccagcaccagcaccagcgtagtct
Δ 10-17	aagccccgaggaagctagtgaagctat	agggatcagctcctgcacatttcagca
Δ 18-25	ctatacgtgctgggcagtgtgctggcgctc	ctgcgccatcatctccttgccagaggg
L26A	ggtgctgggcagtgtgctggcgctcttc	tcatagcttcactagcttcctcggggc
Y27A	gctgggcagtgtgctggcgctcttcggt	gcgtatagcttcactagcttcctcggg
V28A	gggcagtgtgctggcgctcttcggtgtg	gccacgtatagcttcactagcttcctc
L29A	gagtgtgctggcgctcttcggtgtggtg	gccagcacgtatagcttcactagcttcc
G30A	gagtgtgctggcgctcttcggtgtggtg	accagcacgtatagcttcactagcttcc

S31A	ggtgctggcgctcttcggtgtggtgctc	gcgcccagcacgtatagcttcactagct
V32A	gctggcgctcttcggtgtggtgctcggc	gcactgcccagcacgtatagcttcacta
L33A	ggcgctcttcggtgtggtgctcggccta	gccacactgcccagcacgtatagcttca
A34G	gctcttcggtgtggtgctcggcctagtt	gccagcacactgcccagcacgtatagct
L35A	gttcggtgtggtgctcggcctagttgag	gccgcccagcacactgcccagcacgtata
F36A	gggtgtggtgctcggcctagttgagacg	gcagcgccagcacactgcccagcacgt
G37A	ggtggtgctcggcctagttgagacgggtg	gcgaagagcgccagcacactgcccagca
V38A	ggtgctcggcctagttgagacgggtgtgc	gcaccgaagagcgccagcacactgcca
V39A	gctcggcctagttgagacgggtgtgcagc	gccacaccgaagagcgccagcacactgc
L40A	gggcctagttgagacgggtgtgcagccct	gccaccacaccgaagagcgccagcacac
G41A	gctagttgagacgggtgtgcagccctttc	gcgagcaccacaccgaagagcgccagca
L42A	ggttgagacgggtgtgcagccctttcaca	gcgccgagcaccacaccgaagagcgcca
V43A	ggagacgggtgtgcagccctttcacagcc	gctaggccgagcaccacaccgaagagcg
E44A	gacgggtgtgcagccctttcacagccgcc	gcaactaggccgagcaccacaccgaaga
T45A	ggtgtgcagccctttcacagccgccagc	gcctcaactaggccgagcaccacaccga
V46A	gtgcagccctttcacagccgccagccgt	gccgtctcaactaggccgagcaccacac
C47A	gagccctttcacagccgccagccgtctg	gccaccgtctcaactaggccgagcacca
S48A	gcctttcacagccgccagccgtctgcgc	gcgcacaccgtctcaactaggccgagca
Δ 49-57	gaccaagaggctgcagtggtggagctg	gctgcacaccgtctcaactaggccgagc
Δ 58-66	cgggaagcgtgtgaacagcagtccttc	gcgcagacggctggcggtgtgaaagg
Δ 67-75	cacaagcaggccctgctggcaggaggc	cagctccaccactgcagcctcttggtc
Δ 76-84	aaggcacaggaggcgaccctgtgcagc	gagggactgctgttcacacgcttcccg
Δ 85-93	gcctcctgccagcagggcctgcttggtg	gcctcctgccagcagggcctgcttggtg
Δ 94-103	gcggccgctgagggcagaggaagtcttc	gcctcctgccagcagggcctgcttggtg

Mouse RNF126 (NM_144528.3)もしくは Human RNF126 (NM_194460.3)はそれぞれ心臓の cDNA ライブラリーから PCR により増幅させ、pENTR 1A-Dual selection vector にサブクローニングした。Human BAG6 を発現させるプラスミド (pRK-FLAG-BAG6) は Addgene (no.61836)から購入したものを使用した。

8-6 レンチウイルス及びアデノウイルスの作製、安定発現株の樹立

レンチウイルスを用いた安定発現株は以下の通り作製した。目的遺伝子(EGFP-G0S2, EGFP-CL1(CL1 degon : ACKNWFSSLSHFVIHL), G0S2 WT, G0S2 変異体)を組み込んだ pCDH-EF1 Vector 及び pRSV-Rev, pMDL 2.G, pMDL-q/p-RRE plasmid を HEK293T 細胞に Lipofectamine 2000 を使ってトランスフェクションし産生した。12 時間後、細胞培養液を交換し 48 時間後に細胞上清を 15 mL コニカルに回収した。0.45 μ m filter に通すことで細胞の残渣を取り除き、5x PEG-it solution (System Biosciences)を加え濃縮した。ウイルス濃縮後、遠心(3,000 rpm, 10 分間, 4°C)によりウイルスを沈殿させ、PBS(-)にて懸濁した後 -80°Cで保存した。12 well plate に C2C12 細胞を 1×10^5 cells/well で播種し、4 時間後 Polybrene (最終濃度 800 μ g/mL)と併せてレンチウイルスを感染させた。48 時間後に 10 cm dish に継代し、Puromycin (最終濃度 5 μ g/ml)を加え、セレクションを開始した。3 日毎に Puromycin 含有メディウムに交換し、細胞増殖・形態が安定化する段階まで培養を行った。Single clone は細胞を限外希釈することで獲得し、その後ゲノム DNA の回収および direct sequence を行うことで適切に single clone を獲得しているか検討した。

アデノウイルスは以下の通り作製した。目的遺伝子(PA-RNF126, Mit-ATeam)を組み込んだ pENTR 1A-Dual-selection Vector から LR 反応により pAd-CMV-V5-DEST Vector に移し、コンストラクトを作製した。次に、ヒト胎児腎細胞をアデノウイルスの E1 遺伝子によりトランスフォーメーションして樹立された細胞株 293A 細胞に作製したコンストラクトをトランスフェクションし、アデノウイルスを産生させた。

8-7 C2C12 細胞を用いた G0S2 の分解を制御する因子の探索

C2C12 細胞に FLAG タグおよび HA タグを付加したコンストラクトを作成し、レンチウイルスを用いて FLAG-HA-G0S2 の安定発現株を樹立した。細胞回収直前に DMSO(0.1%)または MG132(10 μ M)を 4h 作用させ、その後 Lysis Buffer(50 mM Tris-HCl (pH7.5), 150 mM NaCl, 0.5 mM EDTA) + 0.5% NP40 + PIC + PhosStop を用いて細胞を回収した。細胞抽出液を 15,000rpm, 4°C, 15min 遠心し核をはじめとした不溶性因子を取り除いた。その後、可溶性分画に対して FLAG Agarose を加え、4°C, 60min 反応させた。反応後、Lysis Buffer を用いて wash し、0.45 μ m フィルターカラムで buffer を除去し、FLAG peptide(0.5 mg/ml)により溶出した。再度 Lysis Buffer によりメスアップを行い、HA-Beads を入れ、4°C, 60min 反応させた。その後、Lysis Buffer による洗浄および 0.45 μ m フィルターカラムで buffer の除去後、HA peptide (最終濃度 0.5 mg/ml)で溶出した。溶出サンプルに sample buffer を加え銀染色またはウェスタンブロットにて結合タンパク質を検出した。

銀染色は以下のプロトコルにて行った。染色前に各反応液を調製した。

固定液 1	メタノール 50 ml + 水 45 ml+酢酸 5 ml
固定液 2	メタノール 50 ml + 水 50 ml
増感液	水 90 ml + 増感原液 10 ml
染色液	水 90 ml + 染色原液 10 ml
現像液	水 95 ml + 現像粉末 1g + 現像原液 5 ml

銀染色用にサンプルを泳動したアクリルアミドゲルを固定液 1 に 20 分浸した。その後、固定液 2 に 10 分浸した。その後水に 10 分浸し、増感液に 1 分浸した後、水で 2 回 wash し、染色液に 20 分浸した。その後、水で 2 回 wash し、現像液に浸した。目的のバンドが検出されたら、直ちに停止原液を現像液の 1/10 量加え、反応を停止させた。質量分析は大阪大学最先端イノベーションセンターに委託し、LC-MS/MS により解析を行い、Q-Exactive (Thermo Fisher Scientific)、LC システムには UltiMate 3000 Nano LC systems (Thermo Fisher Scientific)、カラムは ESI-column (0.075 x 120mm)、流速 300 nL/min で行った。

8-8 siRNA library を用いたスクリーニング

Dharmacon siGENOME SMARTpool siRNA Library-Mouse Ubiquitin Conjugation Subset1~3 (0.1 nmol ; GE Healthcare) (siRNA library)を siRNA Buffer (60 mM KCl, 6 mM HEPES, 0.9 mM MgCl₂ - 6H₂O)で溶解し最終濃度 1 μ M とした。スクリーニングにはレンチウイルスによって安定発現を示す C2C12/EGFP-G0s2 細胞、C2C12/EGFP-CL1 細胞を使用し、陽性コントロールとして UBA1 に対する siRNA(3 pmol/well)を選択した。陰性コントロールには non-targeting siRNA を用いた。96 well plate に siRNA library を 3 μ l/well (最終濃度 30 nM)で分注し、dropper を用いて OptiMEM (Gibco)を 7 μ l/well で加え 10 分間静置した : siRNA mixture。同時にエッペン内で Lipofectamine 3000 (invitrogen)を最終濃度 0.3%の濃度で OptiMEM に混合し 10 分間静置した : Lipofectamine mixture。96well plate 上の siRNA mixture に対して Lipofectamine mixture を 10 μ l/well ずつ添加し 20 分間静置した後、C2C12/EGFP-G0s2 細胞を 2500 cells/well で播種した。24 時間後、トランスフェクション試薬による細胞障害を防ぐためにフェノールレッド free 培地に培地交換し、細胞播種 72 時間後から解析を開始した。解析 30 分前に Hoechst 染色を行い(最終濃度 1 μ g/mL)、IN Cell Analyzer (GE Healthcare)を用いて蛍光画像撮影を行なった。画像解析には Developer ToolBox を用いて EGFP の蛍光強度及び細胞生存率を定量化した。各値は siCTL との Log₂FC(Log₂ Fold change)を算出し、候補遺伝子の絞り込みとして、以下 4 つの閾値を設けて選択した。1)EGFP-G0S2 の蛍光強度: >0.6, 2)EGFP-CL1 の蛍光強度: -0.6 ~ 0.6, 3)EGFP-G0S2 の蛍光強度: -0.6<, 4)siRNA の濃度依存性に対する EGFP-G0S2 の蛍

光強度の変化。

今回の実験で用いた siRNA の配列は以下の通り。

Gene Name	Target Sequence (5' → 3')
Non-targeting (スクリーニング陰性コントロール)	配列情報なし コントロール #1 siRNA (Thermo)
Mouse Uba1 (スクリーニング 陽性コントロール)	CACUUACUUUUGAUGUAA
Mouse RNF126	#1, UCACGCAGCUCCUCAAUCA #2, GCAACCACCUGUUCCACGA #3, CAUCUUCGACGAUAGCUUU #4, UCACGCUGCCACAGGGAUA
Mouse BAG6	#1, GGGUACCUAUUAUCCAGCA #2, CCUUCAAUCUCCUAGUGA #3, GCACAUGAUUAGGGAUUAUA
Rat siUBQLN1	#1, GACAUUGGAACUUGCCAGA #2, GUCAUAGCAGCAUUUCUGU #3, GACUUACGGUUCACCUUGU
Rat siUBQLN2	#1, CGAUUUCUAAACGCUUCAA #2, GUUCUUAACCGCGAAGCA #3, CUUUCGAAUCCUGAUCUGA
Rat siUBQLN4	#1, GCUGUUUGCAGGGAAUCCA #2, CACUGAACCAGCAUGGGAU #3, GCAUCAAUUCUUCUGGCU

8-9 96well plate からの RNA 抽出と droplet digital PCR

スクリーニングで用いた siRNA transfection 後の細胞を PBS で 2 回洗浄し、SingleShot™ cell Lysis Kit の Lysis Buffer を 50 ul/well 加え、10 分間静置した。ピペッティングによって回収した cell lysate を PCR 用 8 連エッペンに入れ、サーマルサイクラー (Applied Biosystems)を用いて熱処理(37°C 5 min → 75°C 5 min)を行い RNA の抽出を行った。その後、iScript™ Advanced cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR #172-5038 (BIO-RAD)を用い、以下の組成で逆転写反応を行った。

5 x iScript Reaction Mix	4 μ l
iScript Reverse Transcriptase	1 μ l
Nuclease-free water	6 μ l
RNA template (PCR product)	9 μ l
Total	20 μ l

サーマルサイクラーを用いて逆転写反応(25°C 5 min \rightarrow 46°C 20 min \rightarrow 95°C 1 min \rightarrow 4°C ∞)を行い cDNA を得た。

droplet digital PCR を行うために、8 連チューブ内に以下の組成で mix を作成した。

ddPCR Supermix (BIO-RAD)	10 μ l
20 x target probe	1 μ l
20 x reference probe	1 μ l
cDNA	1 μ l
up to	20 μ l

QX200™ Droplet Digital™ PCR システム(以下 ddPCR™) (BIO-RAD)を用い、cDNA を微小区画(droplet)に分け、サーマルサイクラーで PCR 反応を行った。その後、ddPCR™を用いて、各 droplet 内で増幅し閾値を超えた蛍光強度を示す droplet 数をカウントすることで目的の遺伝子の発現量を定量化した。

8-10 CRISPR/Cas9 system を用いた C2C12/RNF126 KO 細胞の作製

RNF126 KO 細胞を以下の通り 2 種類樹立した。初めに pKLV2-EF1a-BsdCas9-W Vector (Addgene)を pRSV-Rev, pMDL 2.G, pMDL-q/p-RRE plasmid と共に HEK293T 細胞に Lipofectamine 2000 を使ってトランスフェクションすることでレンチウイルスを作製した。C2C12 細胞に作製したレンチウイルスを感染させ、Blasticidin (最終濃度 20 μ g/mL)によるセレクションの後、Cas9 安定発現株を樹立した(C2C12/Cas9)。

C2C12/Cas9/RNF126 KO 細胞 : RNF126 に対する gRNA のオリゴ DNA (GTGCGAGTCTGGCTTCATTG)を設計し、pKLV2-U6gRNA5 (BbsI)-PGKpuro2ABFP-WVector (Addgene)に ligation した。同様に gRNA を発現させるレンチウイルスを作成し、C2C12/Cas9 細胞に感染させた後、Puromycin によるセレクションを行うことで RNF126 KO 細胞を樹立した。

C2C12/Cas9/EGFP-G0S2/RNF126 KO 細胞 : EGFP-G0S2-T2A-Neomycin が発現するレンチウイルスを C2C12/Cas9 細胞に感染させ G-418 (最終濃度 800 μ g/mL)によるセレクションの後、C2C12/Cas9/EGFP-G0S2 細胞を樹立した。その後、RNF126 を標的とした

gRNA を発現させ Puromycin のセレクションを行うことで KO 細胞を樹立した。

各 RNF126 KO 細胞に対する CTL 細胞は gRNA Vector をレンチウイルスで感染させ Puromycin によりセレクションを行うことで樹立した。それぞれの細胞は限外希釈を用いてシングルクローン化し、回収したゲノム DNA からサンガーシーケンス法により適切にゲノム編集が起きているか検討した。

また、RNF126 KO 細胞の表現系解析として樹立した細胞株の増殖能を評価した。96well plate に 4well ずつ CTL 細胞および RNF126 KO 細胞を播種し、4, 24, 48, 72 時間経過毎に Hoechst を最終濃度 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 30 分間静置し細胞数をカウントした。細胞は IN Cell Analyzer 6000 を用いた画像撮影の後 Developer Tool Box にて画像解析を行い細胞数を算出した。

8-11 in vitro transcription/translation

in vitro における G0S2 タンパク質の転写・翻訳には Promega(Rabbit Reticulocyte Lysate) を用いて行った。BluntII Vector にクローニングした HA-G0S2 WT, E44A, Δ TM を用いて下記の通りサンプルを調製した。

TNT SP6 Quick master mix	40 μl
1mM Mrthionine	1 μl
BluntII Vector DNA (1 μg)	4 μl
DW	5 μl
up to	50 μl

反応液の調製後、30°C に設定したブロックインキュベータ内で 90min 反応させた。その後、sample buffer を加えることで反応を停止し、G0S2 の発現量を評価した。また、免疫沈降法においては KHM Buffer (110 mM KOAc, 20 mM HEPES(pH 7.4), 2mM MgAc_2) を加え、HA Agarose を加え 4°C で 1 時間結合反応させた。KHM Buffer による洗浄の後、sample buffer を加えることで結合タンパク質を評価した。

8-12 Recombinant protein の発現・精製

8-12-1 Substrate (G0s2 WT, mutant), Chaperone の精製

HEK293T 細胞を 10cm dish に 5.5×10^6 cells/dish で播種した。細胞が接着した後、Lipofectamine 2000 を用いて pCDH-EF1-Flag-HA-G0s2 plasmid(WT, 6KR, E44A 変異体)をトランスフェクションした。48 時間後、Lysis Buffer(50 mM Tris-HCl (pH7.5), 150 mM NaCl, 0.5 mM EDTA) + 1% NP40 + PIC + PhosStop を用いて細胞を回収し、Flag-

Agarose (SIGMA)を 10 ul 加え、4°Cで 1 時間結合反応させた。Lysis Buffer による洗浄の後、Flag peptide (最終濃度 0.5 mg/ml)で溶出し精製産物とした。精製産物は SDS-PAGE の後クマシー染色をすることで精製度を確認した。

8-12-2 E3 (GST-RNF126 WT, C231/234A mutant)の精製

pGEX-6P-1-GST-RNF126 WT または GST-RNF126 C231/234A 変異体が形質転換された大腸菌 BL21-star(Rosetta)のグリセロールストックを 2 mL のアンピシリン(最終濃度 0.1 mg/mL)含有 LB 液体培地に加え、37°C, 一晚振とう培養した。翌日、培養液を 200 mL のアンピシリン含有 LB 培地にスケールアップし、37°Cで振とう培養を行った。OD₆₀₀ が 0.4 になったことを確認し、イソプロピル- β -チオガラクトプラノシド(IPTG, 終濃度 0.5 mM)を加え、15°Cで振とう培養し発現誘導を行った。6 時間後に遠心・集菌し、Lysis Buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2% Triton X-100, 1% protein inhibitor cocktail)に懸濁し、sonication で細胞を破碎した。遠心によって沈殿物を取り除き、上清に Glutathione Beads を加えた。Wash Buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2% polyoxyethylene octylephenylther(Triton X-100))で 2 回洗浄を行い、Elution Buffer(50 mM Tris-HCl (pH7.5), 10 mM 還元型 Glutathione)によって、GST-RNF126 WT または C231/234A 変異体を溶出した。

8-13 in vivo / in vitro ubiquitination assay

in vivo ubiquitination assay は以下の通り行なった。10cm dish に目的となる細胞株 (C2C12/HA-G0s2 細胞, C2C12/Cas9/CTL 細胞, C2C12/Cas9/RNF126 KO 細胞)を 1.5 x 10⁶ cells/dish で播種した。48 時間後、Lysis Buffer (50 mM Tris-HCl (pH7.5), 150 mM NaCl, 0.5 mM EDTA) + 0.5% NP40 + PIC + PhosStop)を用いて cell lysate を 1.5 mL エッペンに回収した。15,000 rpm, 4°C, 5 分間遠心し、可溶性分画のみ新たなエッペンに移し使用した。Agarose-TUBE2 (LifeSensors)を 10 ul 加え、4°C, 2 時間反応させた。反応後は Lysis Buffer で 3 回洗浄したのち、SDS sample Buffer を加え、95°C, 5 分間の熱処理により溶出した。

in vitro ubiquitination assay は以下の通り行なった。10 x Reaction Buffer (500 mM Tris-HCl (pH 7.5), 50 mM MgCl₂, 20 mM ATP, 10 mM DTT)を作製し、Recombinant Human Ubiquitin(Ubiquitin), Recombinant Human Ubiquitin-activating Enzyme/UBE1(E1), Recombinant Human UbcH5b/UBE2D2(E2)を下記濃度に希釈した。HA-G0S2 (WT, mutant), GST-RNF126 (WT, mutant), FLAG-BAG6 は上記の手法によりそれぞれ精製したものを使用し、下記濃度に希釈して使用した。以下の組成にて 1.5ml エッペン内で反応液を作成した。

E1 (5 μ M)	0.4 μ l (最終濃度 50 nM)
E2 (25 μ M)	0.4 μ l (最終濃度 250 nM)
Ubiquitin (1 mM)	0.4 μ l (最終濃度 10 μ M)
10 x Reaction Buffer	4 μ l
ZnCl ₂ (1 mM)	4 μ l (最終濃度 100 μ M)
HA-G0S2 WT, mutant (3 μ M)	1 μ l (最終濃度 75 nM)
GST-RNF126 WT, C231/234A (33 nM)	3 μ l (最終濃度 2.5 nM)
FLAG-BAG6 (500 nM)	4 μ l (最終濃度 50nM)
Up to	40 μ l

反応溶液を 37°C, 恒温槽にて 1h 反応させ、最後に sample buffer で反応停止した。

8-14 detergent-soluble and -insoluble fraction

C2C12 細胞を 10cm dish に播種し、siCTL もしくは siBAG6 (最終濃度 30 nM)を Lipofectamine RNAiMAX を用いてノックダウンした。48 時間後、HA-G0S2 WT もしくは E44A 変異体を Lipofectamine 3000 を用いて強制発現した。更に 48 時間後、プロテアソーム阻害剤である MG132 (最終濃度 10 μ M)を 4 時間作用させ、Lysis Buffer (50 mM Tris-HCl (pH7.5), 150 mM NaCl, 0.5 mM EDTA) + 1% Triton X-100 + PIC + PhosStop を用いて可溶化させた。細胞抽出液は 15,000 rpm, 4°C, 20 分間遠心し、可溶性分画と不溶性分画に分けた。その後、3 x sample buffer を加え、95°C 5 分間熱処理により変性させた。サンプルは可溶性・不溶性分画の陽性コントロールとして anti-GAPDH, anti-Vimentin の抗体を用いた Western blotting により適切に分画されていることを確認した。

8-15 FRET probe を用いたミトコンドリア ATP 濃度の測定 (Mit-ATeam)

心筋細胞を 35mm glass-bottom dish に 8×10^4 cells/dish で播種し、24 時間後アデノウイルスを用いてミトコンドリア ATP 感受性 FRET-Based-Probe (Mit-ATeam)を発現させた。同時に、siRNF126, siBAG6 を用いてノックダウンもしくはレンチウイルスを用いて G0s2 WT 及び E44A 変異体を発現させ、48 時間後、メディアウムを FluoroBrite DMEM (Invitrogen) + 10% FBS + 1% penicillin-streptomycin + 1% L-glutamine に交換した。細胞は、ステージトッパヒーター (Tokai Hit) で 37°C に維持し、タイムラプスイメージング中の酸素濃度はステージトッパインキュベータによって調節した (20% ~ 1%)。細胞の観察は PLAPO 60X, 1.35N.A., 油浸対物レンズを搭載した蛍光顕微鏡 Olympus IX-81 で行った。蛍光は dual CCD カメラ (ORCA-D2 Hamamatsu Photonics) を用いて 2 種類の波長を測定した (483/32 nm : CFP, 542/27 nm : YFP)。各タイムポイントにおける画像は 5 分毎に 150

分間、YFP および CFP 画像を取得しタイムラプスイメージングを行った。画像取得 30 分後に酸素濃度を 1% に設定した。

画像解析は MetaMorph (Molecular Devices) を用いて行い、YFP/CFP 比(FRET ratio)を画像上の background signal(細胞の非存在領域)を除いた YFP, CFP 値から算出し、FRET 画像を取得した(図 7A)。Mit-ATeam probe のミトコンドリアへの局在が認められる細胞に対して、FRET ratio 画像のミトコンドリア上に ROI (Region of Interest) を選択後、各タイムポイントにおける FRET ratio を数値化し、平均値から各細胞におけるミトコンドリア ATP 産生量とした(図 7B)。更にこの FRET ratio 値のタイムラプス開始時を 1.0 として各タイムポイントでの相対 FRET ratio 値を算出することで継続的な FRET ratio の変化を ATP 産生量の変化としてグラフ化した。最終的には複数個の細胞を選択し、その平均値および標準誤差から各条件における値を算出した。

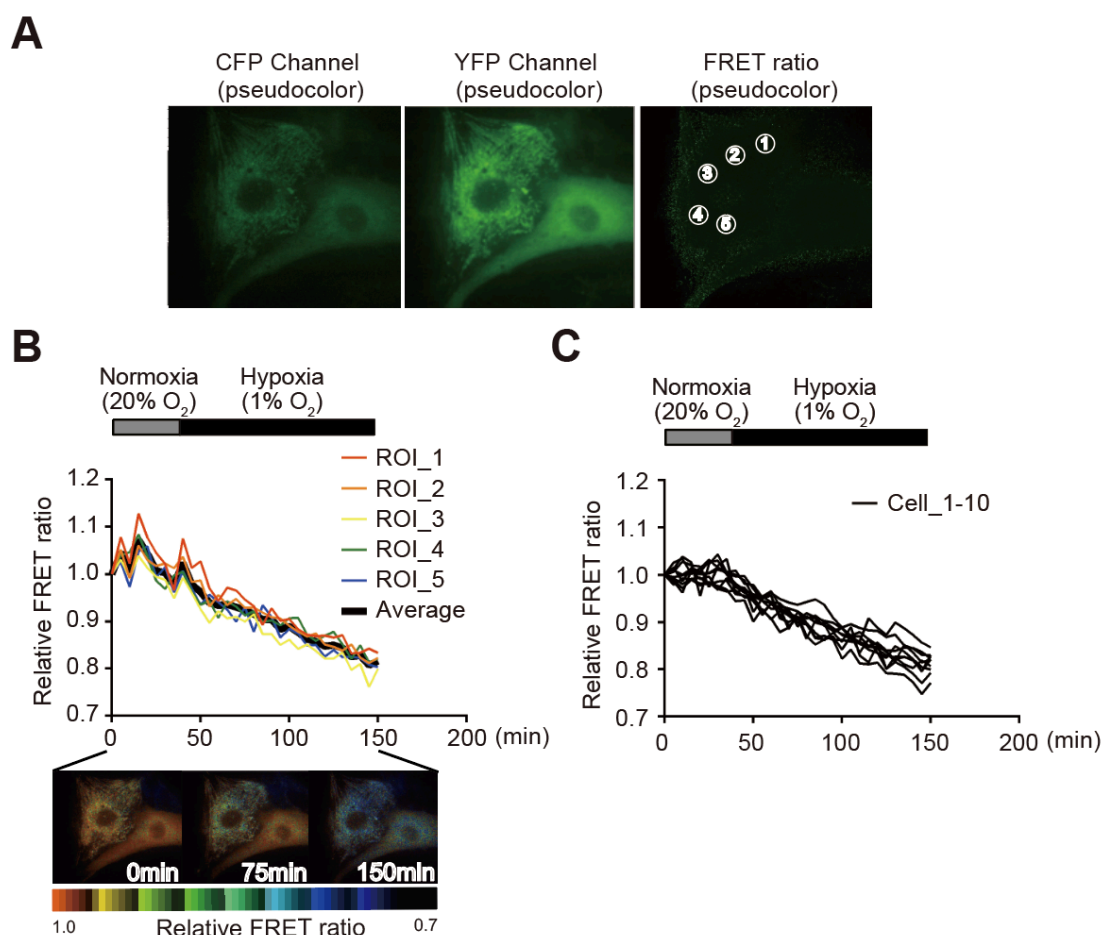


図 7. (A) Mit-ATeam を導入した心筋細胞の CFP, YFP, CFP/YFP ratio のイメージング画像。Mit-ATeam がミトコンドリアへの局在を示す細胞において ROI を選択する。(B) (A) で選択した ROI に対して FRET ratio を継続的にモニタリングし、定量化。(C) 各条件において細胞を複数個選択しその平均値および標準誤差から FRET 値とする。

8-16 心筋細胞を用いた免疫染色

35mm dish に播種した心筋細胞に対し、低酸素処理(1% O₂, 37°C, 4h)、siRNA によるノックダウンまたは Lentivirus を用いた強制発現させた細胞に対して免疫染色を行う。細胞固定直前に MitTracker Red を最終濃度 100 nM で染色した。細胞を PBS(-)により洗浄し、-20°C, 10min, MeOH を用いて固定した。再度、PBS(-)による洗浄を行い、0.5% Triton X-100 を用いて透過処理を行った。その後、Blocking Buffer (3% BSA in PBS)により Blocking 処理を室温にて 20min 行った。一次抗体(G0S2, rabbit polyclonal antibody, マウス G0S2(a.a. 93 - 103) CSRALSLRQHAS ペプチドを抗原として使用)を Blocking Buffer を用いて希釈し、室温、1h 反応させた。PBS(-)を行い、二次抗体(rabbit-Alexa488)を Blocking Buffer を用いて希釈し、共焦点レーザー蛍光顕微鏡(LSM710, ZEISS)により観察した。

8-17 cell viability assay

培養心筋細胞を 96well plate に播種し、RNF126 に対する siRNA を最終濃度 30nM でトランスフェクションする群、レンチウイルスを用いて G0S2 WT もしくは E44A 変異体を強制発現する群に分け細胞生存率を検討した。低酸素処理には AnaeroPack・ケンキを使用し酸素濃度を 1%以下に維持した。24 時間の低酸素処理後、Hoechst を最終濃度 0.5 µg/mL, Propidium iodide(PI)を最終濃度 1 µg/mL で加え、30 分間静置した。細胞は IN Cell Analyzer 6000 を用いて画像撮影を行い、PI 陽性細胞 / Hoechst 陽性細胞の割合から細胞死率を算出した。

8-18 部位特異的光クロスリンク法による G0S2 結合タンパク質の探索

10cm dish に HEK293T 細胞を播種し、G0s2_Amb、pOriP-PylRS(EE306A)、pOriP-9×U6/tRNAPyl を Lipofectamine 2000 により transfection した。6 時間後、非天然アミノ酸である ZLys(最終濃度 500 µM)または mTmdZLys(最終濃度 25 µM)含有メディウムに培地交換した。24 時間後 HEK293T 細胞を HBSS で 5 ml×2 回 wash し、氷上に dish を置き UV を 15 min 照射した。その後、Lysis Buffer (50 mM Tris-HCl (pH7.5), 150 mM NaCl, 0.5 mM EDTA) + 1% Triton X-100 + PIC + PhosStop により回収した。細胞抽出液を 15,000rpm, 4°C, 15min 遠心し核をはじめとした不溶性因子を取り除いた。その後、可溶性分画に対して FLAG Agarose を加え、4°C, 60min 反応させた。反応後、Lysis Buffer を用いて wash し、0.45 µm フィルターカラムで buffer を除去し、FLAG peptide(0.5 mg/ml)により溶出した。

8-19 統計解析

各実験結果は平均±標準偏差として算出した。図 5C に示す通り、統計学的解析として、一元配置分散分析および Dunnett 法を用いた多重比較により検定した。図 10,B および C, 図 12, A および B, 図 18, D および E に示す Mit-ATeam の結果においては二元配置分散分析、Tukey-Kramer 法を用いた多重比較により検定した。図 18F に示す細胞生存率の結果においては一元配置分散分析、Tukey-Kramer 法を用いた多重比較により検定した。その他の結果に関しては 2 群間比較のため Student_t 検定により評価した。

9 結果

9-1 心筋細胞における G0S2 タンパク質の量的制御

初めに、私たちの研究グループおよびこれまでの報告における G0S2 の細胞内挙動について免疫染色と western blotting から再び検討した。内因性に発現する G0S2 は低酸素に応答し発現が上昇することでミトコンドリアでのタンパク質量が増加することを認め(図 8, A および B)、更にレンチウイルスによる HA タグ融合 G0S2 強制発現条件下においても同様にミトコンドリアへの移行を示した。G0S2 に対する抗体は核に非特異的なシグナルを示すが、HA タグの抗体を用いた免疫染色像からは検出されないことから、ミトコンドリア局在を確認した(図 8A、下図)。また、これまでの他グループの研究から G0S2 タンパク質は HeLa 細胞において半減期が短く、プロテアソーム依存的に分解されていることが示されている⁵¹。心筋細胞においても同様な挙動を示すのか新生仔培養心筋細胞の内因性に発現する G0S2 についてタンパク質合成阻害剤 cycloheximide (CHX)を用いて検討した。その結果、G0S2 は半減期が約 15 分程度と非常にターンオーバーが早いタンパク質であることが明らかとなった(図 8C)。次に、G0S2 タンパク質の分解機序を検討するためプロテアソーム阻害剤である Carbobenzoxy-L-Leucyl-L-Leucinal (MG132)や Lactacystin, Bortezomib (PS-341)の作用による変化、ならびにリソソーム系の分解阻害剤である Chloroquine, NH₄Cl の作用による変化を Western blotting により検討した。G0S2 タンパク質はプロテアソーム阻害剤の作用 4 時間でタンパク質量の蓄積を認めたのに対し、リソソーム阻害剤の作用においてはタンパク質量に有意な変化を認めなかった。以上の結果から、G0S2 タンパク質は心筋細胞においても非常にターンオーバーが早く、ユビキチン・プロテアソーム系を介して分解が制御されていることが明らかとなった。

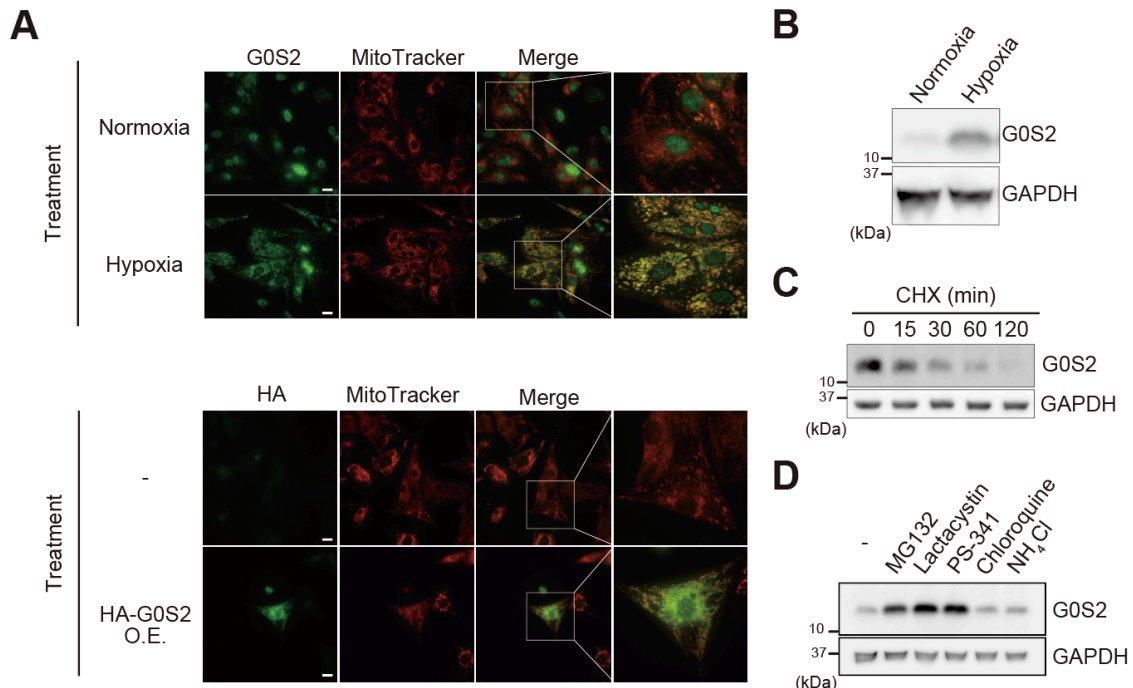


図 8. (A)培養心筋細胞における内因性に発現する G0S2 タンパク質の局在を G0S2 に対する抗体およびミトコンドリアオルガネラマーカーとして MitoTracker Red を用いて共染色を行った。HA タグ融合 G0S2 を培養心筋細胞に強制発現し、HA の抗体および MitTracker を用いて共染色を行った。図中のスケールバーは 20 μm を示す。(B)培養心筋細胞を 1% O_2 条件下で 4 時間処理し、内因性に発現する G0S2 タンパク質量を評価した。(C)培養心筋細胞における内因性に発現する G0S2 タンパク質の半減期を Cycloheximide (CHX) の作用により検討した。CHX を 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で 0, 15, 30, 60, 120 分間処理し細胞回収後 Western blotting により評価した。(D)培養心筋細胞における内因性に発現する G0S2 タンパク質のプロテアソーム阻害剤(MG132: 10 μM , Lactacystin: 10 μM , PS-341: 0.3 μM)、リソソーム阻害剤(Chloroquine: 100 μM , NH_4Cl : 10 mM)に対する反応を Western blotting により評価した。

9-2 G0S2 の分解を制御する因子の探索

G0S2 は培養心筋細胞においてもユビキチン・プロテアソーム系で分解が制御されていることを明らかにしたが、その分解に特異的に作用する E3 リガーゼは明らかではない。そこで、G0S2 に特異的な E3 リガーゼの同定を目的として、免疫沈降法を用いて結合因子の探索を行った。心筋細胞は初代培養系であり、個々の heterogeneity が非常に高く G0S2 の発現量の差異が非常に大きい。そのため、安定的に免疫沈降法を行うことが可能な cell line を用いて G0S2 の分解制御因子の探索を行った。まず、G0S2 タンパク質の分解機構が働く他の細胞株を探索したところ、マウス骨格筋由来の培養細胞である C2C12 細胞において半減期が非常に短く制御機構が存在することが示唆された。そのため、FLAG タグおよび HA タ

グをタンデムに付加した G0S2 が安定発現する株を樹立し、アッセイに使用した。この細胞株に対して MG132 を作用させることで、DMSO 処理と比較して結合量が増加したものを探索することとした。FLAG, HA アガロースを用いたアフィニティー精製を行い、溶出サンプルを用いて銀染色を行ったところ、複数のバンドに関して結合量の増加したタンパク質を複数認めた(図 9A)。大阪大学最先端医療イノベーションセンター共通基盤部門において、アクリルアミドゲルから目的バンドの抽出およびトリプシン消化、質量分析までを委託した。解析の結果、75kDa 付近におけるタンパク質は Hsp70(Heat shock cognate 71kDa protein)および Grp78(78kDa glucose-regulated protein)が検出され、40kDa 付近におけるタンパク質は Actin であることが再現性を持って明らかになった(図 9A)。これまでの報告から Hsp70 は細胞質性のシャペロン、Grp78 は小胞体内におけるシャペロンとして品質管理機構の一端を担うことが明らかとなっている。また、特に E3 との複合体を介して基質のフォールディングまたは分解制御を担うことが示されていることから、G0S2 に対しても同様な機構で制御する可能性が十分考えられる。しかし、Hsp70, Grp78 抗体を用いたウェスタンブロットティングの結果から、実際に G0S2 との結合性は認めなかったことからアフィニティー精製時の非特異的な結合であることが推測される(図 9, B および C)。

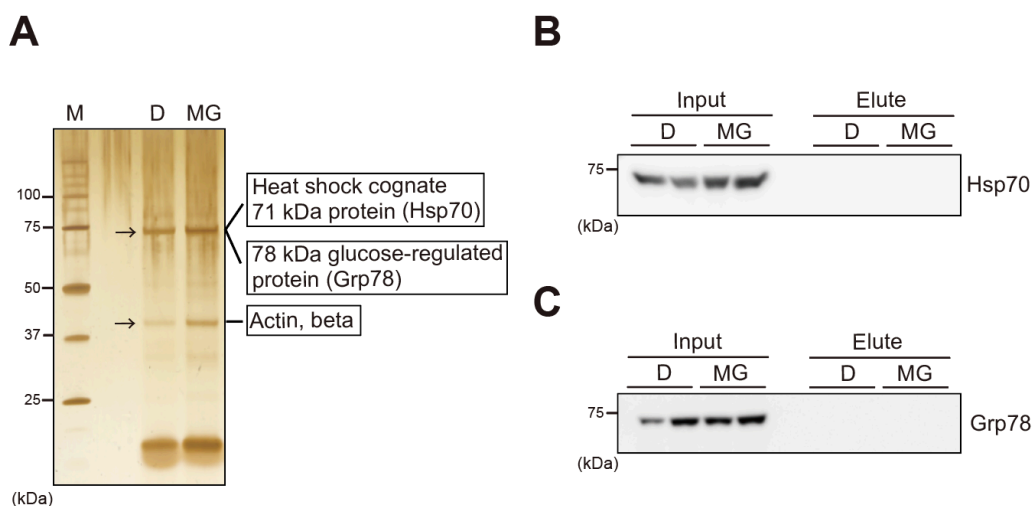


図 9. (A)C2C12/FLAG-HA-G0S2 細胞に対してプロテアソーム阻害剤(MG132: 10 μ M)を 4 時間作用させ FLAG, HA タグを用いたアフィニティー精製の後、銀染色により結合タンパク質を探索した。矢印で示すバンドに関して質量分析を行ったところ、Hsp70, Grp78, Actin の結合が示された。(B-C)(A)の精製溶液を Hsp70, Grp78 による抗体を用いて G0S2 との結合を western blotting により評価した。

9-3 siRNA library を用いたスクリーニング系の構築

分解メカニズムの解明には G0S2 特異的な E3 の同定が必要不可欠となるが、免疫沈降法を用いた手法からは E3 の同定には至らなかった。G0S2 と E3 の affinity は非常に低く、相互作用も一過性であることが推測されることから、他のアプローチにより E3 の探索を行うこととした。分解をモニタリングするアッセイ系を構築する過程で、IN Cell Analyzer 6000 を用いることで蛍光強度の変化をハイスループットかつ正確に定量できることを見出した。

そこで、G0S2 の分解系が働く C2C12 細胞を用いてレンチウイルスを用いて EGFP 融合 G0S2 タンパク質の安定発現株を樹立し、siRNA library を用いた遺伝子ノックダウンによる EGFP-G0S2 の蛍光強度変化を測定するスクリーニングから E3 の探索を行うこととした。初めに siRNA library を用いたスクリーニング系のデザインを行い、96 well plate でのアッセイ系を構築した。1 レーン目に陰性コントロールとして siControl (siCTL)、12 レーン目に陽性コントロールである siUBA1 を遺伝子導入し、72 時間後 EGFP の蛍光強度の変化を IN Cell Analyzer 6000 (GE Healthcare) 及び Developer Tool BOX (GE Healthcare) を用いることで定量化し、遺伝子の分解寄与度を評価した(図 2)。

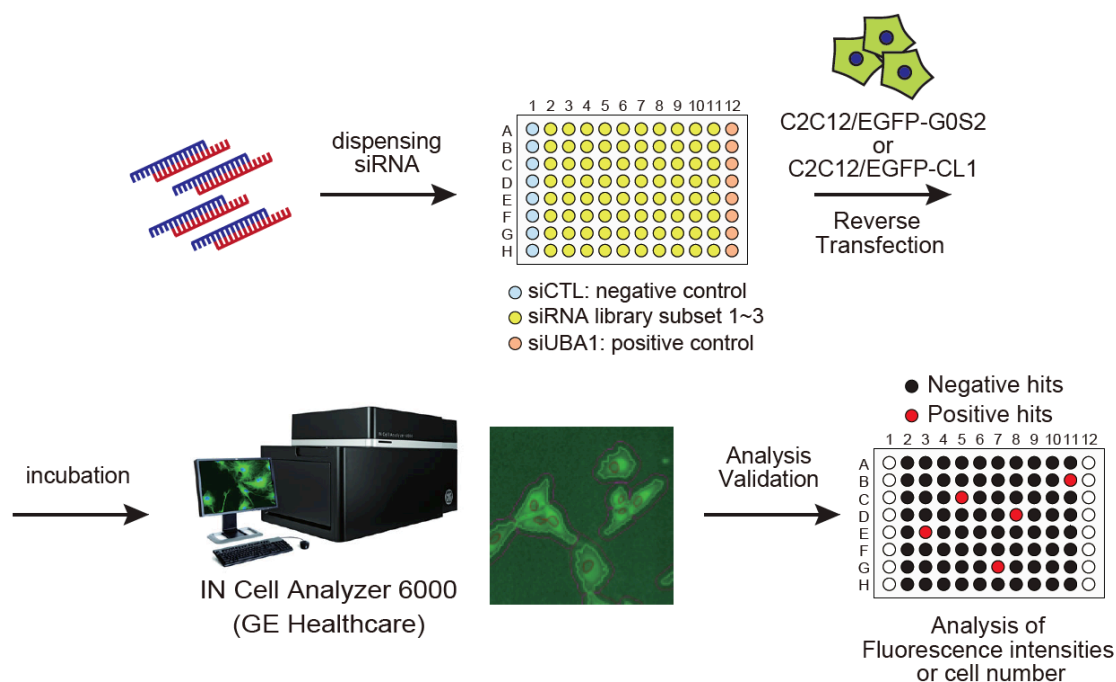


図 10. siRNA library を用いたスクリーニングのワークフロー。96well plate に陰性コントロール (siCTL), 陽性コントロール (siUBA1) 及び siRNA library をそれぞれ 3 pmol/well で分注し、その後 C2C12/EGFP-G0S2 細胞、C2C12/EGFP-CL1 細胞を播種することで Reverse transfection を行った。細胞播種 72 時間後に IN Cell Analyzer 6000 にて蛍光画像撮影、Developer Tool BOX を用いて画像解析・定量化を行った。

実際のスクリーニングに際して、樹立した G0S2 の安定発現株がプロテアソーム依存的に分解されているか検討する為、プロテアソーム阻害剤である MG132 の作用およびユビキチン活性化酵素である UBA1 遺伝子のノックダウンにより EGFP-G0S2 の蛍光強度を評価した。結果としては、どちらの処理においても G0S2 タンパク質の分解が阻害され、EGFP の蛍光強度が増大したことから、本細胞株を用いたスクリーニング系構築の妥当性を明らかにした(図 11, A および B)。また、本スクリーニングにおいては、多数の偽陽性が候補遺伝子としてヒットする可能性が示唆された。その為 C2C12 細胞を用いてプロテアソーム依存的に分解される非特異的 degron 配列 CL1 ペプチド (ACKNWFSSLSHFVIHL)⁵²を EGFP に融合させた、EGFP-CL1 安定発現株を樹立することでカウンターアッセイ系とした。この安定発現株においても正しくプロテアソーム系に従って分解制御を受けるかを検討したところ、G0S2 と同様に分解抑制に伴う EGFP の蛍光強度の増大が観察された(図 11, C および D)。以上の結果を基に、C2C12/EGFP-G0S2 細胞及び C2C12/EGFP-CL1 細胞を用いて siRNA library を用いた E3 リガーゼのスクリーニングを行った。

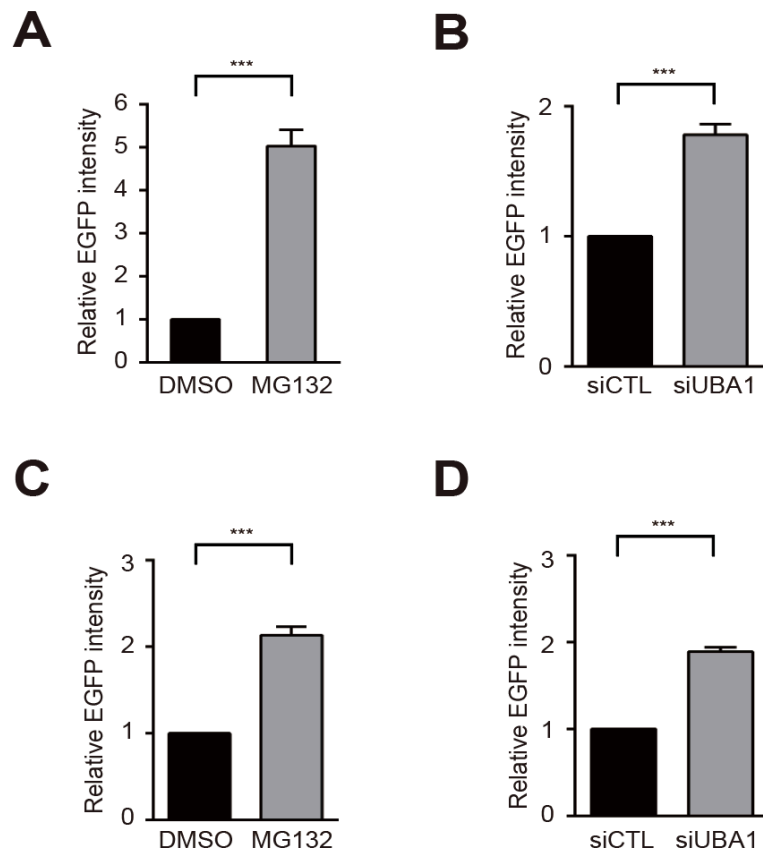


図 11. (A-B)C2C12/EGFP-G0S2 細胞に対して(A)プロテアソーム阻害剤 (MG132 : 10 μ M)を処理もしくは(B)UBA1 に対する siRNA をトランスフェクションし、72 時間後 Hoechst による核染色の後、IN Cell Analyzer 6000 を用いて EGFP の蛍光強度を測定した。データは平均 \pm 標準偏差で示す。統計学的解析として、Student_t 検定により有意差検定を行った (***, $P < 0.001$ vs DMSO (A) or siCTL (B))。 (C-D)C2C12/EGFP-CL1 細胞に対して(C)プロテアソーム阻害剤 (MG132 : 10 μ M)を処理もしくは(D)UBA1 に対する siRNA をトランスフェクションし、72 時間後 Hoechst による核染色の後、IN Cell Analyzer 6000 を用いて EGFP の蛍光強度を測定した。データは平均 \pm 標準偏差で示す。統計学的解析として、Student_t 検定により有意差検定を行った (***, $P < 0.001$ vs DMSO (C) or siCTL (D))。

9-4 E3 リガーゼのスクリーニングと候補遺伝子の同定

次に 9-2 において構築したアッセイ系により siRNA library を用いて G0S2 の E3 リガーゼのスクリーニングを実施した。siRNA library は E1 ~ E3 を含むユビキチン関連遺伝子 523 個を標的とした 4 種類の siRNA を用いた。各 siRNA を導入し、72 時間後 Hoechst による核染色を行ったのち、IN Cell Analyzer 6000 にて蛍光画像撮影を行い、画像解析により各 siRNA 導入細胞の細胞数（細胞生存率を評価）および EGFP-G0S2 の蛍光強度を定量化した。各スクリーニングにおいては、蛍光強度の変化を siCTL と比較した Log_2 fold change (Log FC) から算出した値を用いて各 siRNA における EGFP-G0S2 タンパク質量の増加率をプロットした。1st スクリーニングにおいては $\text{Log FC} > 0.6$ となる siRNA を positive hits とした (図 12A)。次に多数の偽陽性を排除する為、C2C12/EGFP-CL1 細胞を用いて同様なワークフローにてカウンターアッセイを行なった (2nd スクリーニング) (図 12B)。また、細胞周期や増殖に関わる因子についてはノックダウンにより細胞死が誘発され、自家蛍光から偽陽性としてヒットする因子が多数存在したことから Hoechst 染色により細胞数を評価した (図 12C)。最後に siRNA の濃度依存性に対する評価を行い、低濃度での siRNA においても分解抑制効果が保たれていた RNF126 を G0S2 の E3 リガーゼ候補遺伝子として同定した (図 12D)。本スクリーニングで使用した siRNA library は各標的遺伝子に対する siRNA が 4 種類混合した pool 型である。そこで、RNF126 遺伝子を標的とした各 siRNA による G0S2 の分解抑制効果を検討することで off-target の可能性を評価した。結果として、4 種類の siRNA 全てにおいて RNF126 遺伝子のノックダウンが見られ (図 12E)、同様に Western blotting から G0S2 タンパク質の分解抑制によるタンパク質量の蓄積を認めた (図 12F)。以上の結果から、RNF126 が G0S2 の分解に関わる E3 リガーゼであることが示唆された。

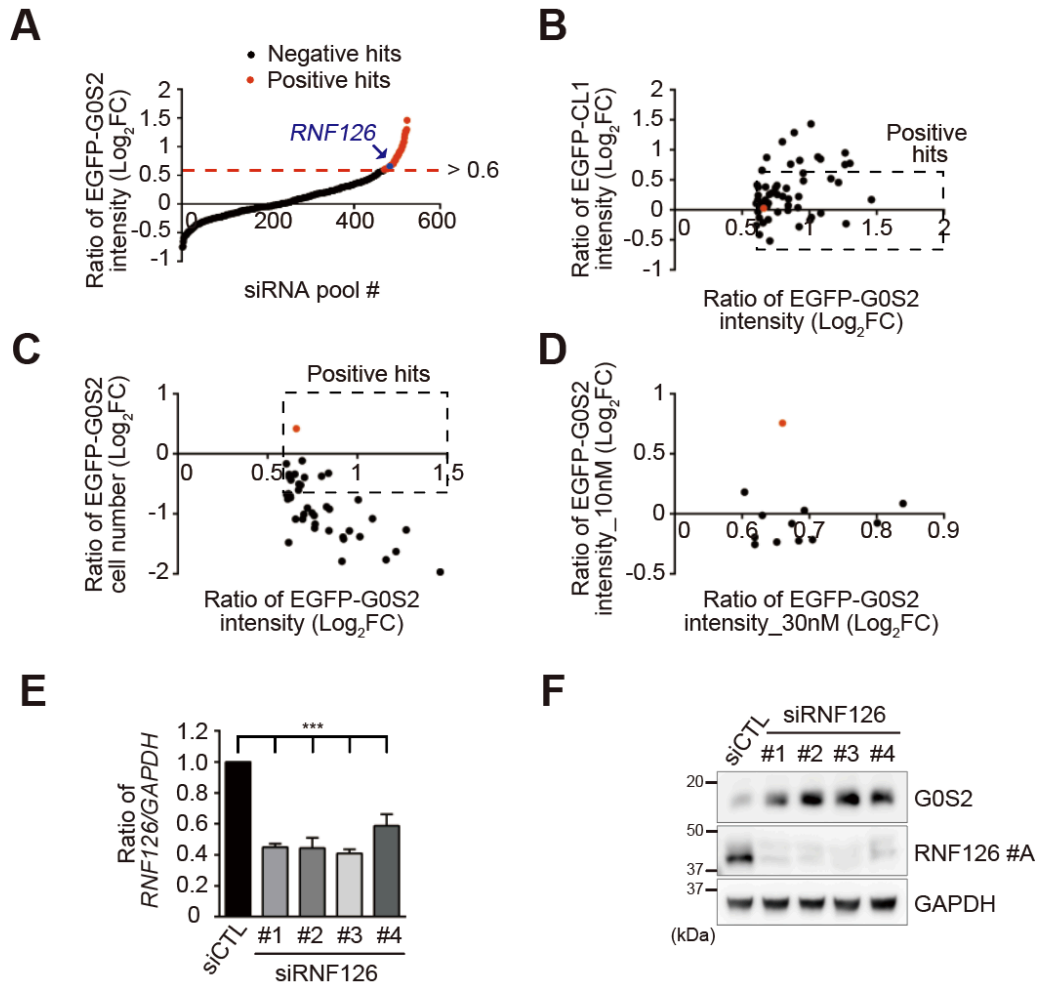


図 12. (A) siCTL を導入した EGFP-G0S2 細胞に対する各 siRNA 導入細胞の蛍光強度比を Log_2 fold change (Log_2FC) により算出し、散布図としてまとめたものを図示。各値は 3 回のスクリーニングの平均値から算出した。黒丸: Negative hit, 赤丸: Positive hit。 $\text{Log}_2\text{FC} > 0.6$ 以上を positive hit 遺伝子としてピックアップした。(B-D) 横軸に siCTL を導入した EGFP-G0S2 細胞に対する各 siRNA 導入細胞の蛍光強度比をとり、縦軸に siCTL を導入した (B) EGFP-CL1 細胞に対する各 siRNA 導入細胞の蛍光強度比をとりプロットした。 $-0.6 < \text{Log}_2\text{FC} < 0.6$ となる遺伝子について positive とした。(C) EGFP-G0S2 細胞に対する各 siRNA 導入細胞の細胞数比をとりプロットした。 $-0.6 < \text{Log}_2\text{FC}$ となる遺伝子について positive とした。(D) EGFP-G0S2 細胞に対する各 siRNA (10nM) 導入細胞の蛍光強度比をとりプロットした。(E, F) C2C12/HA-G0S2 細胞に対して siRNA library で使用した siRNA を導入し、(E) ddPCR を用いて RNF126 の遺伝子ノックダウン効果を検討した。データは平均 \pm 標準偏差で示す。統計学的解析として、一元配置分散分析および Dunnett 法を用いた多重比較検定により有意差検定を行った ($***$, $P < 0.001$ vs siCTL)。(F) 72 時間後細胞を回収し、Western blotting により G0S2 および RNF126 タンパク質を検出した。

9-5 G0S2 タンパク質分解における RNF126 の機能解析

RNF126 による G0S2 の分解制御機構を明らかにする為、CRISPR-Cas9 システムを用いて RNF126 ノックアウト(KO)細胞を樹立した。C2C12細胞にレンチウイルスを用いて Cas9 安定発現株を樹立し、この細胞にレンチウイルスにより RNF126 に対する sgRNA を導入することで KO 細胞を得た(C2C12/Cas9/RNF126 KO)。一方、Cas9 安定発現株に対してレンチウイルスにより EGFP-G0S2 を安定発現させ、sgRNA を遺伝子導入することで同様に KO 細胞を得た(C2C12/Cas9/EGFP-G0S2/RNF126 KO) (図 13)。

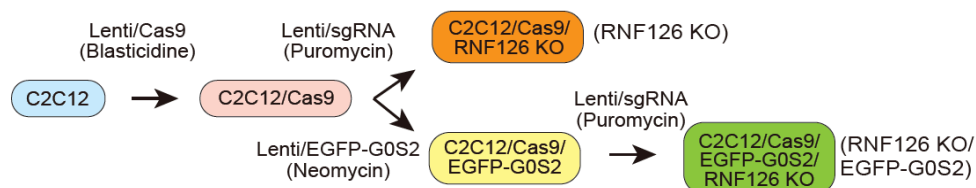


図 13. CRISPR-Cas9 system を用いた 2 種類の RNF126 KO 細胞の樹立。Cas9, EGFP-G0S2 が発現するレンチウイルス及び RNF126 に対する sgRNA が発現するレンチウイルスを用い、段階的なセレクションを行うことで目的の細胞株を樹立した。RNF126 KO : C2C12/Cas9/RNF126 KO, RNF126 KO/EGFP-G0S2 : C2C12/Cas9/EGFP-G0S2/RNF126 KO。

標的とする RNF126 遺伝子配列において適切にゲノム編集がおこっているか検討するために、RNF126 KO 細胞及び RNF126 KO/EGFP-G0S2 細胞の両株からゲノム DNA を抽出しサンガーシーケンスを行ったところアデニン(A)の 1 塩基もしくは 2 塩基挿入によりフレームシフトが起きていることが確認された(図 7B)。siRNA library screening 時において RNF126 のノックダウンにより細胞増殖が促進されたことから KO 細胞においても増殖能を評価したところ、CTL 細胞と比較して有意な変化は見られなかった。また Western blotting により RNF126 KO 細胞における RNF126 タンパク質のバンドの消失を確認するとともに、内因性の G0S2 の著しいタンパク質量増加を認めた (図 7C)。これは siRNA による RNF126 ノックダウンと同様に、E3 リガーゼ RNF126 の消失により G0S2 の分解が抑制されたことによるタンパク質の蓄積を示唆する。

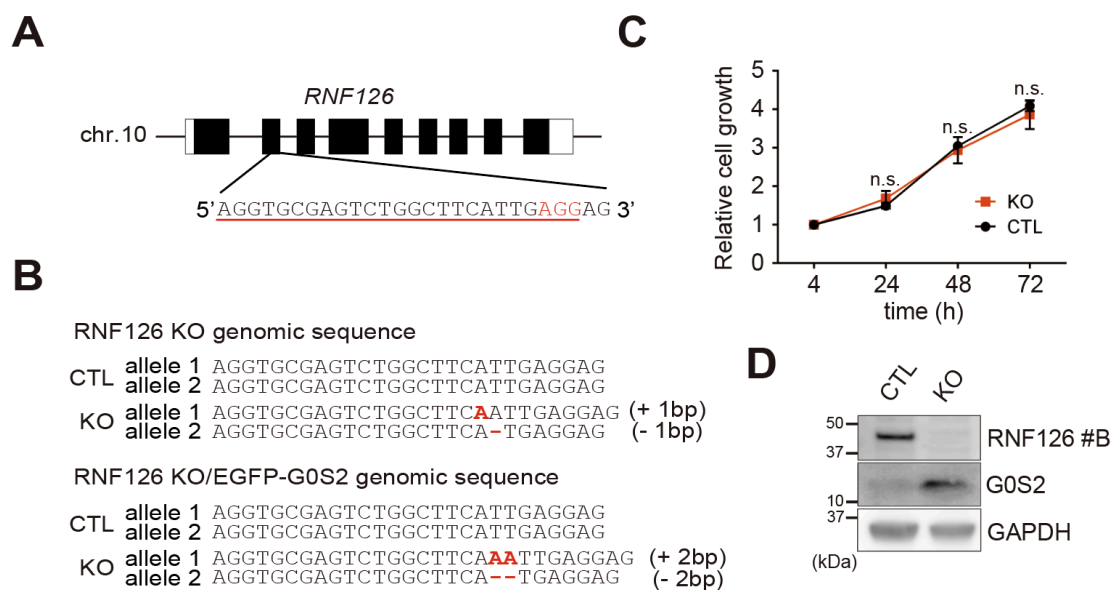
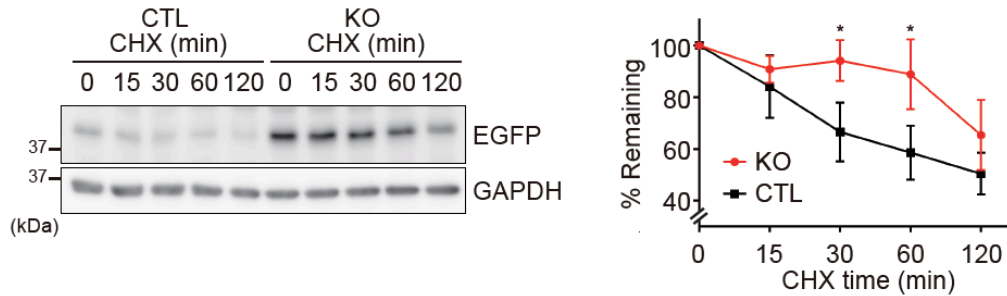


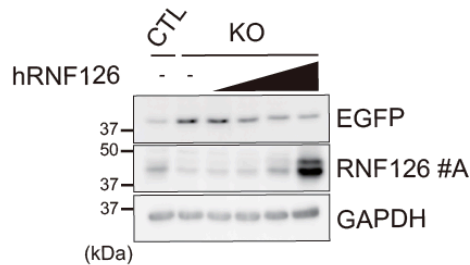
図 14. (A)RNF126 の標的とした sgRNA の配列。RNF126 遺伝子はマウス 10 番染色体上に存在し、赤線の配列が標的となる sgRNA の標的配列。四角：エクソン，黒線：イントロン。(B)樹立した RNF126 KO 細胞、RNF126 KO/EGFP-G0S2 細胞から抽出したゲノム DNA をサンガーシークエンスにより配列情報を確認した。両 KO 細胞においてはアデニン(A)の挿入が観察された。(C)RNF126 KO 細胞における表現系を細胞数から検討した。細胞を 96well plate に播種し、各時間経過毎に Hoechst (最終濃度 1 μ g/m)を用いて染色し IN Cell Analyzer 6000 にて蛍光画像撮影を行った。その後、Developer Tool BOX を用いて画像解析・定量化を行い、細胞数を計測した。画像は各 well あたり 4 視野ずつ撮影し、4well 分の平均値およびその相対評価から算出した。データは平均 \pm 標準誤差で示す。統計学的解析として、統計学的解析として、Student_t 検定により有意差検定を行った。(D)樹立した RNF126 KO 細胞におけるゲノム編集効果を Western blotting により評価。内因性に発現する RNF126 は RNF126 #B の抗体により検出した。

これら樹立した細胞株を使用して G0S2 タンパク質の半減期を検討したところ、RNF126 KO 細胞においてベースラインでの G0S2 タンパク質量の蓄積 (CHX: 0 min)と半減期の延長を認めた (図 15A)。更に RNF126 KO 細胞にアデノウイルスを用いて、マウス RNF126 に対する sgRNA の標的とならないヒト RNF126 を強制発現させたところ G0S2 タンパク質量が RNF126 発現量依存的に減少し、RNF126 KO による効果をレスキューした (図 15B)。最後に、G0S2 のユビキチン化について、検討したところ、RNF126 KO 細胞においては、CTL 細胞において観察されるポリユビキチン化 G0S2 タンパク質量の著しい減少を認め、hRNF126 の強制発現でその作用がレスキューされた (図 15C)。以上の結果から RNF126 が G0S2 のユビキチン化による分解を制御する E3 リガーゼであることを明らかにした。

A



B



C

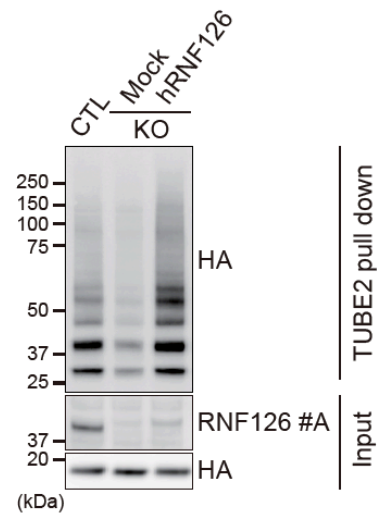


図 15. (A)RNF126 KO/EGFP-G0S2 細胞を CHX (最終濃度 100 μ g/mL)で処理し、図に示す各時間後に細胞回収後 Western blotting により G0S2 タンパク質量を評価した (左)。G0S2 のバンドを定量し、CTL 細胞と RNF126 KO/EGFP-G0S2 細胞における G0S2 タンパク質の半減期を評価した。データは 3 回の実験の平均 \pm 標準偏差で示す。統計学的解析として、Student_t 検定により有意差検定を行った (*, $P < 0.05$ vs CTL)。(B)CTL 細胞または RNF126 KO/EGFP-G0S2 細胞における EGFP-G0S2 タンパク質量の変化を Western blotting により評価した (上段、EGFP)。RNF126 KO/EGFP-G0S2 細胞においてはアデノウイルスを用いて異なる量のヒト RNF126 を強制発現させ、その効果を評価した (上段、レーン 3-6)。内因性のマウス RNF126 および強制発現させたヒト RNF126 を検出するために RNF126 #A 抗体を使用した。(C)CTL 細胞もしくは RNF126 KO 細胞に強制発現させた HA-G0S2 のユビキチン化量を tandem ubiquitin binding entity (TUBE2)アフィニティープルダウンによって評価した。RNF126 KO 細胞にはアデノウイルスを用いてヒト RNF126 を強制発現させ、ユビキチン化に与える影響を評価した (上段、レーン 3)。

9-6 心筋細胞において RNF126 ノックダウンは G0S2 の分解を制御し、低酸素によるミトコンドリア ATP 産生低下を軽減する

培養心筋細胞を用いて RNF126 の生理的機能を検討した。初めに、siRNA を用いて RNF126 のノックダウンを行い、qPCR 及び Western blotting により G0S2 mRNA およびタンパク質に及ぼす影響を評価した。qPCR の結果から、RNF126 のノックダウンが確認されたが、内因性に発現する G0S2 の転写レベルは RNF126 ノックダウンによって変化しなかった(図 16A)。RNF126 は RNF115 と相同性が 52.6%と高く、特に E3 活性に重要とされる領域においては RING-Finger 型の E3 に必須な RING フィンガードメインおよび Zn フィンガードメインが共通していることが 2 次構造から明らかとなっている⁵³。In vitro ユビキチン化反応においても RNF126 と RNF115 は共通の E1/E2 を介して基質の分解を担うことことからこの二つの E3 は互いに redundancy を持って機能することが示唆される⁵⁴。しかし、心筋細胞において RNF126 のノックダウンによって RNF115 の転写レベルでの発現量には変化を与えなかった(図 16B)。Western blotting の結果においては、RNF126 ノックダウンにより G0S2 タンパク質量の蓄積を認め(図 16C)、hRNF126 の過剰発現によってベースでの G0S2 タンパク質量の低下を認めた(図 16D)。定量 PCR の結果と合わせると、RNF126 ノックダウンにより G0S2 タンパク質の分解が抑制されたことが明らかとなり、RNF126 は C2C12 細胞のみならず心筋細胞においても G0S2 の分解を制御する E3 リガーゼであることが示唆された。

次に、RNF126 のノックダウン条件下による G0S2 の挙動を免疫染色により検討した。RNF126 は細胞質内における品質管理機構により基質の分解を担うことが報告されており⁵⁵、RNF126 のノックダウンによる基質の分解抑制は細胞質での凝集体形成を引き起こす可能性が示唆されたが、G0S2 においてはミトコンドリアへの局在を示した(図 16E)。この結果を受け、私たちの研究室において確立した培養心筋細胞における低酸素環境下でのミトコンドリア ATP 産生の変化を鋭敏に測定可能な FRET プローブ(Mit-ATeam)^{29,56}を用いて ATP 産生能への影響を検討した。RNF126 に対する siRNA もしくは siCTL を心筋細胞に導入し、同時にアデノウイルスを用いて Mit-ATeam を強制発現させた。導入 48 時間後に低酸素環境下(1% 酸素濃度)におけるミトコンドリア ATP 産生量を継続的にモニタリングすることで RNF126 の与える影響について検討することとした。急激な低酸素暴露により、ミトコンドリア ATP 産生量が徐々に低下していく様子が観察されたが(図 10B, 下段 siCTL)、siRNF126 による G0S2 の分解抑制により、低酸素処理 150 分時点においてミトコンドリア ATP 産生量を 15%程度保持する結果が得られた(図 16,F および G)。通常酸素条件下においてミトコンドリア ATP 産生能は十分に保たれていることから G0S2 による additive な効果は得られなかったが、急速な酸素枯渇により ATP 産生能が低下する条件下

においては FoF1-ATP 合成酵素の活性を上昇させることでこの低下を抑制したと考えられる。しかし ATP 産生能の向上が、長時間の低酸素処理により誘発される細胞死については有意な変化を与えなかった(図 16H)。この結果は RNF126 が G0S2 のみならず多様な基質の分解を制御することと低酸素下での RNF126 の活性を含めた挙動の変化が背景にあると推測される。

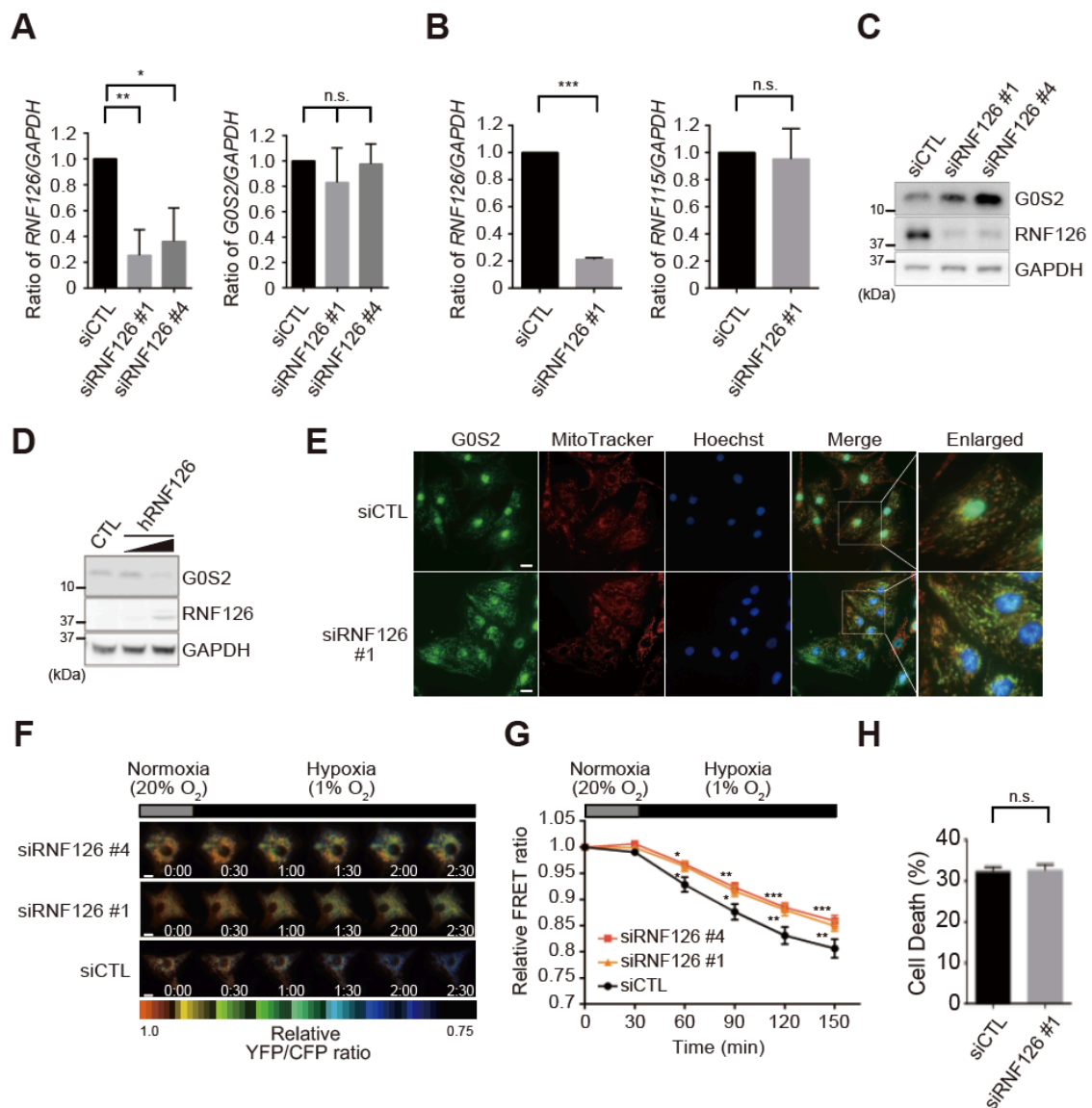


図 16. (A-C, E, F-G)心筋細胞に対して siCTL もしくは siRNF126 (最終濃度 30 nM)を導入し機能解析を行った。(A)48 時間後 RNA を回収し、qPCR によって遺伝子発現を解析した。データは 3 回の実験の平均±標準偏差で示す。統計学的解析として、Student_t 検定により有意差検定を行った (*, $P<0.05$; **, $P<0.01$ vs CTL)。n.s.は有意差なしを表す。(B) 48 時間後 RNA を回収し、qPCR によって RNF126, RNF115 の遺伝子発現を解析した。データは 3 回の実験の平均±標準偏差で示す。統計学的解析として、Student_t 検定により有意差検定を行った。n.s.は有意差なしを表す。(C) 72 時間後タンパク質を回収し Western blotting により RNF126 ノックダウンに伴う G0S2 タンパク質量の変化を検討した。(D)心筋細胞にアデノウイルスを用いて human RNF126 を強制発現させ 72 時間後の G0S2, RNF126 のタンパク量を Western blotting により評価した。RNF126 に対しては RNF126 #B の抗体を使用し検出した。(E)72 時間後 RNF126 ノックダウン下における G0S2 の局在を免疫染色により評価した。ミトコンドリアのオルガネラマーカーとして MitoTracker Red を用い、G0S2 の抗体を併せて共染色を行った。図中のスケールバーは 20 μm を示す。(F)心筋細胞にアデノウイルスを用いて Mit-ATeam を発現させ、同時に siCTL もしくは siRNF126 #1, #4 (最終濃度 30 nM)を心筋細胞に導入した。48 時間後、酸素濃度を変動させ(30 分間 21% O_2 → 120 分間 1% O_2)、Mit-ATeam プロープによる YFP/CFP の蛍光強度比を継続的に測定した。図は代表的な YFP/CFP 比の疑似カラー画像を表す。図中のスケールバーは 10 μm を示す。(G)Mit-ATeam と併せて siCTL (n=20), siRNF126 #1 (n=20), siRNF126 #4 (n=20)を発現させた心筋細胞の Mit-ATeam による YFP/CFP の蛍光強度比をプロットした。各 YFP/CFP 比は 0 分の値で補正し、それぞれの各条件及び各時間において比較した。データは平均±標準誤差で示す。統計学的解析として、二元配置分散分析および Tukey-Kramer 法を用いた多重比較検定により有意差検定を行った ($P<0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$ vs siCTL)。(H)48 時間後から、1% O_2 , 24 時間の低酸素刺激により細胞死を誘発させた。低酸素処理後、Hoechst (最終濃度 1 $\mu\text{g}/\text{m}$)および PI (最終濃度 1 $\mu\text{g}/\text{m}$)を用いて染色し IN Cell Analyzer 6000 にて蛍光画像撮影を行った。その後、Developer Tool BOX を用いて画像解析・定量化を行い、PI 陽性細胞 / Hoechst 陽性細胞の割合から細胞死率を算出した。データは平均±標準誤差で示す。統計学的解析として、Student_t 検定により有意差検定を行った。n.s.は有意差なしを表す。

9-7 BAG6 は G0S2 のユビキチン化に伴う分解を制御する

RNF126 は RING finger 型の E3 ligase であり、これまで多数の基質の分解を制御することが報告されている。ミトコンドリア FeS cluster の形成に必須な Frataxin や CDK インヒビターである p21 に対しては直接的にユビキチン化することで分解制御を担う一方で⁵⁷⁻⁵⁹、テイルアンカー型タンパク質に分類される一回膜貫通型のタンパク質に対しては BAG6-UBL4A-TRC35 複合体からなるシャペロンと結合することで分解制御を担うことが報告されている⁵⁵。そこで BAG6 をノックダウンすることにより、RNF126 による G0S2 の分解に BAG6 複合体が関与するかを検討することとした。初めに、内因性に G0S2 を発現する培養心筋細胞および、HA-G0S2 が安定発現する C2C12 細胞株に BAG6 siRNA を導入し G0S2 タンパク質の変化を検討した。結果として、どちらの細胞に対しても BAG6 ノックダウンによって G0S2 タンパク質量の蓄積を認めた (図 17, A および B)。次に、BAG6 ノックダウンによる G0S2 のユビキチン化について TUBE2 を用いたプルダウンアッセイによって検討したところ、siRNA 導入細胞において著しい G0S2 ユビキチン化量の減少を認めた (図 17C)。また cycloheximide chase assay から、G0S2 タンパク質の半減期の延長を認め、BAG6 が G0S2 の分解制御を担う因子であることが明らかとなった (図 17, D および E)。

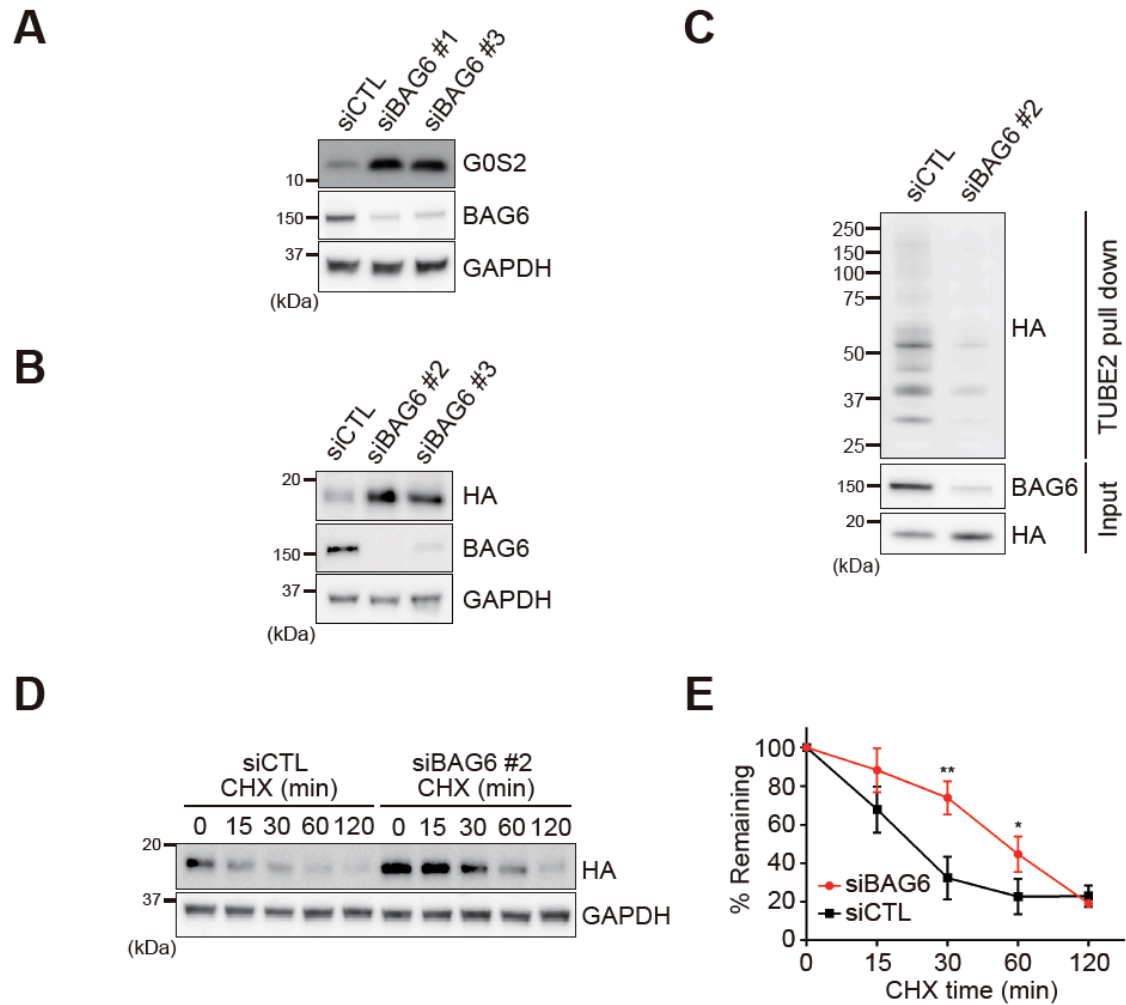


図 17. BAG6 は G0S2 のユビキチン化に伴う分解を制御する。図に示す通り siRNA を (A) 心筋細胞もしくは (B-D) C2C12/HA-G0S2 細胞に導入し (最終濃度 30 nM)、72 時間後に細胞を回収し Western blotting により評価した。(C)細胞回収後 TUBE2 プルダウンアッセイによりユビキチン化された G0S2 タンパク質を濃縮した。(D) CHX (最終濃度 100 μ g/mL)を図に示す時間処理し細胞回収後 Western blotting により評価した。(E) (D)の Western blotting で得られたバンドを定量化し、0 分時のタンパク質量で補正した値をグラフにプロットした。データは 3 回の実験の平均 \pm 標準偏差で示す。統計学的解析として、Student_t 検定により有意差検定を行った (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ vs siCTL)。

G0S2 タンパク質の分解に RNF126 及び BAG6 が関与することから、BAG6 のノックダウンによっても G0S2 の分解抑制によるミトコンドリア ATP 産生能の向上を認める可能性が示唆された。そこで、心筋細胞において Mit-ATeam を用いて低酸素環境下におけるミトコンドリア ATP 産生能を評価した。BAG6 siRNA 導入細胞は siCTL 導入細胞と同様に低酸素下で ATP 産生が低下したことから、BAG6 ノックダウンはミトコンドリア ATP 産生能に影響を与えないことが明らかとなった (図 18, A および B)。これは BAG6 の多面的な scaffold 因子としての機能を理解する上で非常に重要な結果であり、BAG6 が単なる E3 の scaffold タンパク質ではなく、膜タンパク質の合成直後から生じる選別機構において中心的な役割を持つ⁶⁰⁻⁶² という知見をサポートするものである。以上の結果から、G0S2 タンパク質の生合成及び分解は RNF126/BAG6 複合体によって精密に調節されている可能性を見出した(10.考察を参照)。

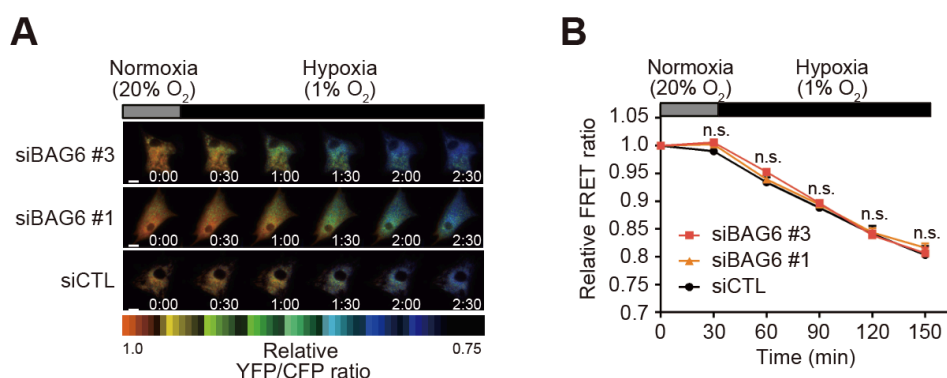


図 18. (A)心筋細胞にアデノウイルスを用いて Mit-ATeam を発現させ、同時に siCTL もしくは siBAG6 #1, #3 (最終濃度 30 nM) を心筋細胞に導入した。48 時間後、酸素濃度を変動させ(30 分間 21% O₂ → 120 分間 1% O₂)、Mit-ATeam プローブによる YFP/CFP の蛍光強度比を継続的に測定した。図は代表的な YFP/CFP 比の疑似カラー画像を表す。図中のスケールバーは 10 μ m を示す。(B)Mit-ATeam と併せて siCTL (n=18), siBAG6 #1 (n=20), siBAG6 #3 (n=20) を発現させた心筋細胞の Mit-ATeam による YFP/CFP の蛍光強度比をプロットした。各 YFP/CFP 比は 0 分の値で補正し、それぞれの各条件及び各時間において比較した。データは平均±標準誤差で示す。統計学的解析として、二元配置分散分析および Tukey-Kramer 法を用いた多重比較検定により有意差検定を行った。

9-8 低酸素環境下における G0S2 の分解制御機構

これまでの私たちの研究から、G0S2 は低酸素環境下において転写レベルでの発現向上が見られ細胞・臓器保護的な役割を持つことが明らかとなっている³⁰。また、低酸素環境下における RNF126 の遺伝子抑制により G0S2 タンパク質の分解を抑制することでミトコンドリア ATP 産生能の向上を認めた。しかし、これまでに低酸素環境下における G0S2 タンパク質の半減期を含めた制御やスクリーニングで同定した RNF126/BAG6 複合体の挙動は明らかになっていない。そのため、低酸素環境下における分子の挙動を正確に評価した。初めに、低酸素環境下における G0S2 タンパク質の半減期について検討したところ、通常酸素状態と同様の半減期であり急速に分解されていることが明らかとなった (図 19A)。更に、同様な環境下でプロテアソーム阻害剤である PS-341 の作用においても通常酸素条件下と同様の反応を示した (図 19B)。更に、低酸素環境下における RNF126/BAG6 複合体のタンパク質レベルでの挙動を検討したが、12 時間の継時的な低酸素処理では特に変化は見られなかった (図 19C)。以上の結果から、G0S2 タンパク質は酸素濃度に依存せず恒常的に分解されていることが明らかとなった。

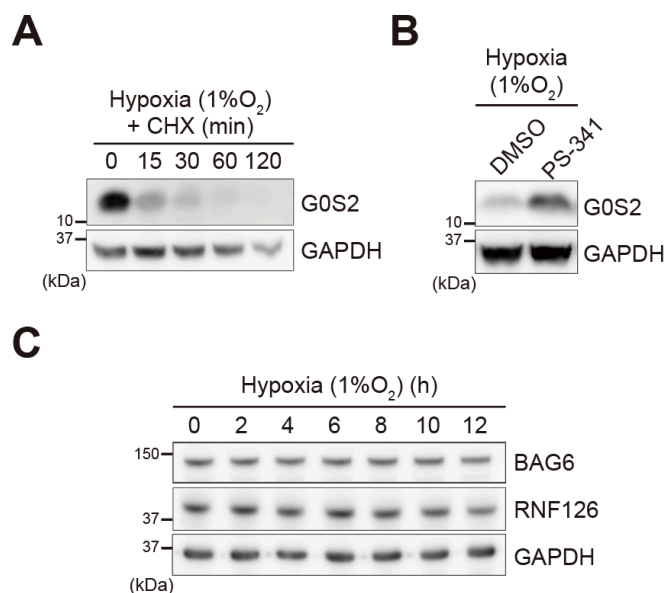


図 19. (A)低酸素条件下における培養心筋細胞の内因性に発現する G0S2 タンパク質の半減期を Cycloheximide (CHX)の作用により検討した。CHX (最終濃度 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を継時的に作用させ細胞回収後 Western blotting により評価した。(B)低酸素条件下における培養心筋細胞の内因性に発現する G0S2 タンパク質のプロテアソーム阻害剤(PS-341、最終濃度 0.3 μM)に対する反応を Western blotting により評価した。(C)低酸素条件下における培養心筋細胞の内因性に発現する RNF126 および BAG6 のタンパク質量の変化を Western blotting により評価した。

9-9 G0S2 の分解制御に関わる UBQLN の可能性

RNF126/BAG6 複合体は細胞質における品質管理機構の一端を担うことが報告されており⁶⁰、G0S2 においてもこの機構を介した分解制御が働くことがこれまでの研究結果から示唆される。しかし、BAG6 に着目した分解機構については以下の点が報告されている。1) 基質の膜貫通領域における疎水度から BAG6 と細胞質性のシャペロン UBQLN の選択的な基質保護⁶¹、2) BAG6/UBQLN の複合体による基質の保護⁶³、3) BAG6 と UBQLN の redundant な作用。また、UBQLN は UBL(Ubiquitin-like)ドメイン、UBA(Ubiquitin associated)ドメインが共通かつ全体構造の相同性が70%以上の UBQLN1,2,4 が存在しており、各 UBQLN タンパク質においても redundant に働くことが示唆されることから、基質の膜貫通領域の保護を担う因子の同定やその詳細な解析を行うことは非常に難しい。しかし、G0S2 においても UBQLN の関与を検討するため、各 UBQLN1,2,4 に対する siRNA 及び全ての UBQLN のノックダウンによる G0S2 の分解抑制効果を検討した。その結果としては、UBQLN1/2/4 の全てのノックダウンにより G0S2 の分解が抑制されることを見出した(図 20A)。しかし、RNF126/BAG6 複合体との関連性については不明な点が多いことから更なる今後の検討が必要である。

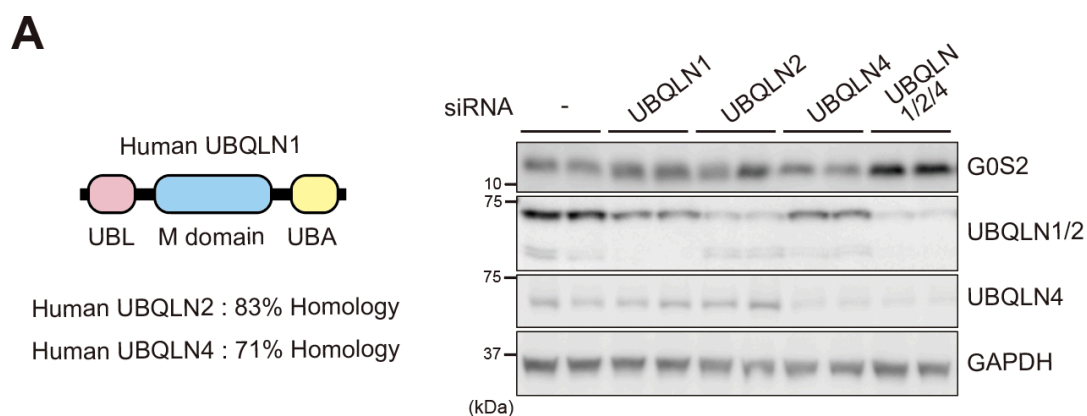


図 20. (A)心筋細胞に UBQLN1,2,4 に対する siRNA を導入し (最終濃度 30 nM)、72 時間後に細胞を回収し Western blotting により評価した。UBQLN1,2 は両タンパク質を認識する UBQLN1/2 の抗体を用いて評価した。

9-10 G0S2 の分解を規定する degron の探索・同定

詳細なタンパク質の分解メカニズムの解明には、E3 リガーゼによる認識部位を含めたタンパク質分解に必須なアミノ酸領域すなわち”degron”を同定することが必要不可欠である^{64,65}。そこで、G0S2 を N 末端、疎水性領域、C 末端の 3 つの領域に分類し、それぞれアラニンに置換した変異体および一部欠損させた変異体を作製し、分解に寄与する部位の探索を行なった (図 21A)。変異体によるスクリーニングには C2C12 細胞を用い、各変異体を強制発現させた後、プロテアソーム阻害剤である MG-132 に対するタンパク質量の変化から分解寄与度を評価した。結果として、N 末端・C 末端における欠損変異体ではすべて MG-132 の作用後タンパク質量が著しく増加したことから、これらの領域は分解には関与しないことが示された。しかしながら、G0S2 の中央部に存在する疎水性領域において 44 番目のグルタミン酸をアラニンに置換した E44A 変異体では、コントロール処理 (DMSO) で他の変異体や野生型に比してそのタンパク質量が著しく増加したことに加え、MG-132 の作用でタンパク質量が変化しなかったことから、E44 が degron である可能性が示唆された (図 21B)。また、この E44 周辺にはデグロンのコンセンサス配列の一つである PEST 配列が存在している。PEST 配列は P(Pro), E(Glu), S(Ser), T(Thr)が近接した領域に並ぶことで E3 による認識を受けることが示されている。そのため、E44 のみならず、他の PEST 配列として推測されるアミノ酸に関してもアラニン置換変異体を作成し、分解抑制効果を検討した。結果としては、E44A 変異体でのみ著しい分解抑制効果を認めたことから (図 21C)、E44 がデグロンである可能性が強く示唆された。

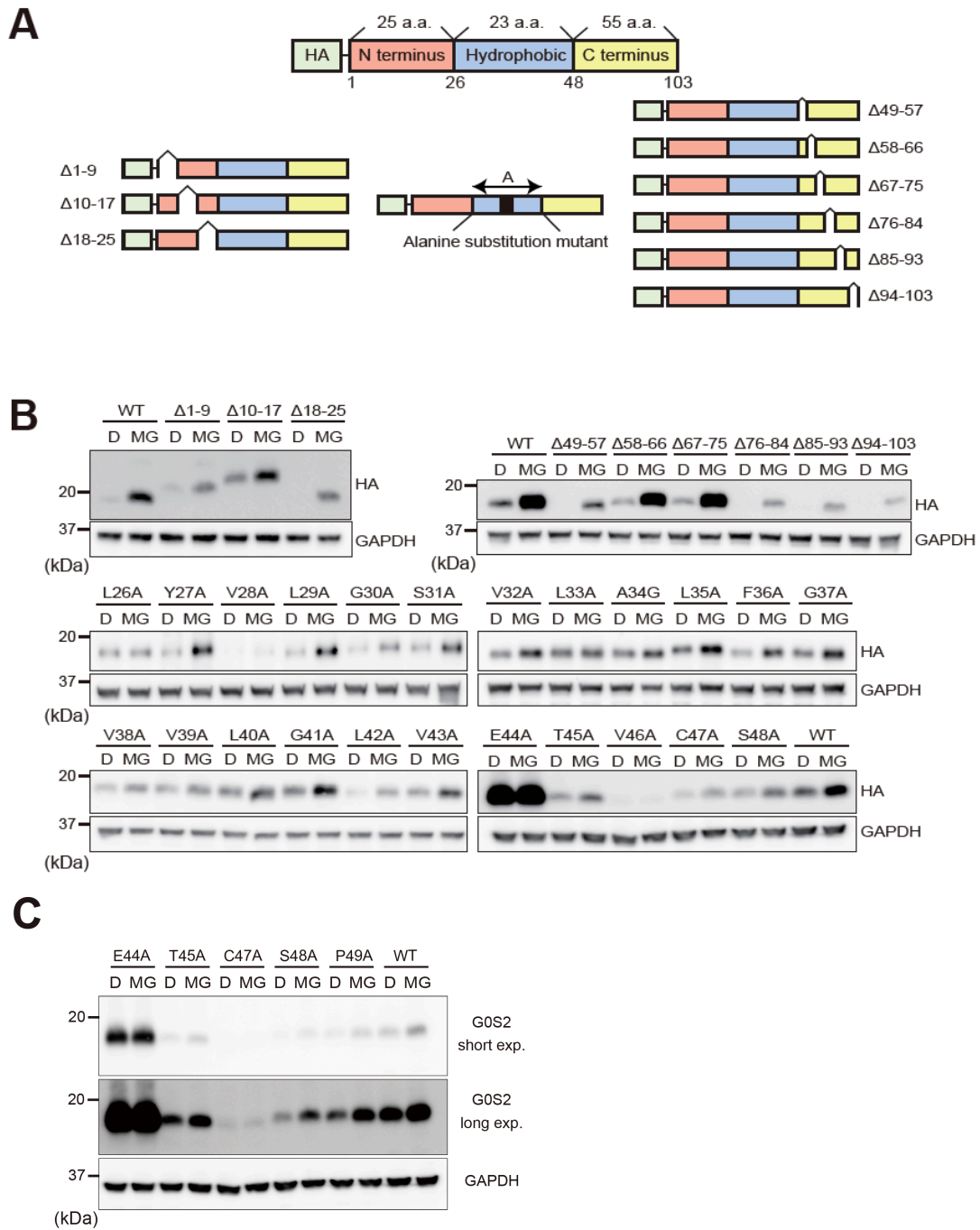


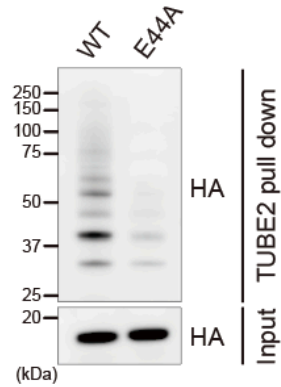
図 21. (A)G0S2 変異体作成における概要図。N 末端領域(1-25), C 末端領域(49-103)はその領域の欠損変異体を、疎水性領域(26-48)においては個々のアミノ酸のアラニン置換変異体を作成した。(B-C)C2C12 細胞に作成した変異体を強制発現させ、4 時間 DMSO (D, 最終濃度 0.1%) もしくは MG132(MG, 最終濃度 10 μ M)作用下におけるタンパク質量の変化を Western blotting により検討した。

Degron として働くことが予想される E44A 変異体について更なる機能解析を行うため、C2C12 細胞において HA-G0S2 E44A の安定発現株を樹立し、ユビキチン化量と半減期について解析を行なった。TUBE2 プルダウンアッセイによって G0S2 のユビキチン化を検討したところ、E44A 変異体においては WT と比較してユビキチン化量の減少を認め (図 22A)、cycloheximide chase assay からは半減期の延長を認めた (図 22, B および C)。次に、これまでのスクリーニング・機能解析から明らかにした G0S2 の分解制御には、G0S2 E44 を介した RNF126/BAG6 複合体との相互作用が重要であるとの仮説を立てた。RNF126/BAG6 複合体は、BAG6 が scaffold タンパク質として基質を捕捉し、その後動員された RNF126 がユビキチン化することで、プロテアソーム依存的な分解へと誘導されることがこれまでの研究から明らかになっている⁶⁰⁻⁶²。特にウサギ網状赤血球ライセートを用いた *in vitro* transcription/translation system の反応系により合成された基質の挙動が解析されてきたことから、G0S2 においても同様のアッセイ系で評価した。HA タグを付加した G0S2 WT, E44A, 膜貫通領域を欠損させた Δ TM の変異体を合成し免疫沈降法の後 BAG6 との相互作用を検討した。結果としては、これまでの報告通り Δ TM により BAG6 との相互作用が減少したが、E44A による変化は認めなかった。しかし、HEK293T 細胞に G0S2 を強制発現させ、内因性に発現する BAG6 との相互作用を検討したところ、E44A 変異体ではその結合量が著しく低下することが認められた (図 22D)。細胞内においては翻訳合成の後に分解または膜への局在化の選別が行われるが、*in vitro* での翻訳系においてはプロテアソームでの分解および膜局在化のステップが行われないことから E44A による BAG6 との結合量に変化を認めなかったと推測される。

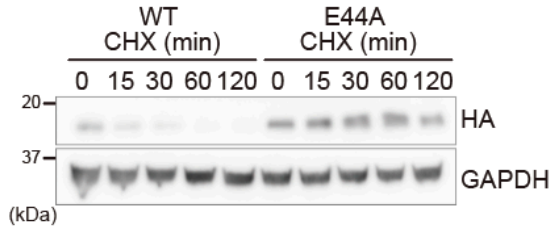
更に、BAG6 の細胞内における役割は、テイルアンカー型タンパク質に分類される一回膜貫通型タンパク質の疎水性領域を捕捉することで、翻訳直後の細胞質における親水性環境から疎水性領域を隔離して膜タンパク質の凝集を防ぐ機能を持つことが示唆されている⁶⁶。したがって、BAG6 の遺伝子発現の抑制もしくはアラニン変異体によって BAG6 との相互作用が低減し、細胞質内に凝集タンパク質が形成された結果、分解が抑制されている可能性が示唆された。その為、C2C12 細胞に BAG6 siRNA を導入し、その後野生型 G0S2 と E44A を強制発現させ細胞抽出液から界面活性剤 Triton X-100 可溶性および不溶性分画を回収することで凝集性を比較した。Triton X-100 可溶性分画の陽性コントロールとして GAPDH、不溶性分画の陽性コントロールとして Vimentin を用いて実験系の確からしさを評価した。野生型の G0S2 は BAG6 の遺伝子発現抑制の有無にかかわらず可溶性分画にタンパク質が存在し、凝集性タンパク質などに見られる不溶性分画での蓄積は認めなかった。更に、BAG6 との相互作用を阻害する E44A 変異体は BAG6 の遺伝子発現の抑制においてもタンパク質量の蓄積を認めず、可溶性分画に存在することが明らかとなった (図 22E)。以上の結果か

ら、G0S2 の疎水性領域に存在する E44 が G0S2 の degron として機能し、BAG6 の認識により捕捉されことを足がかりにプロテアソーム依存的な分解へと誘導されることを見出した。

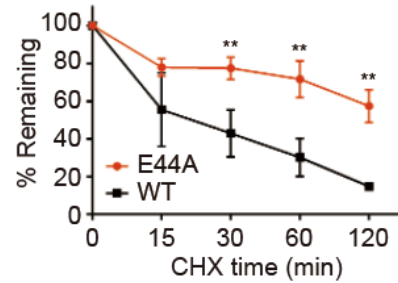
A



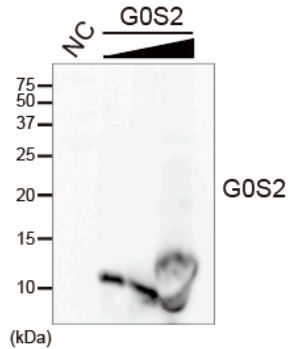
B



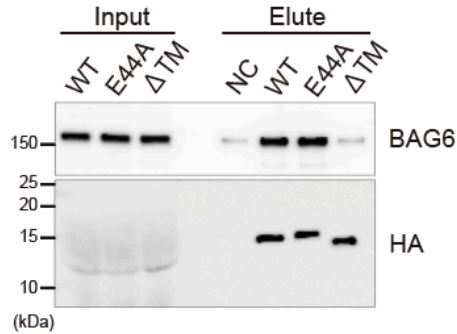
C



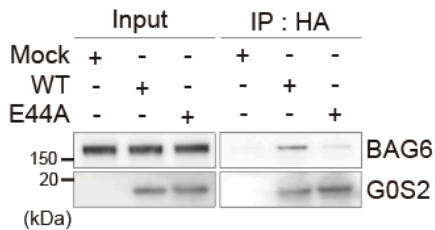
D



E



F



G

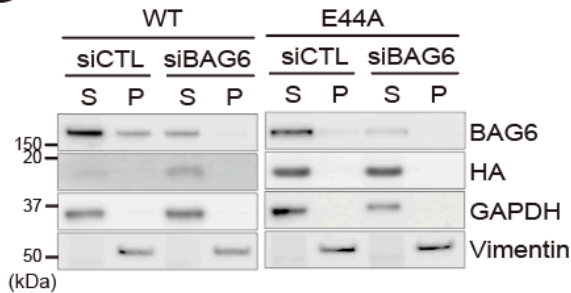


図 22. (A)C2C12/HA-G0S2 WT または E44A 細胞抽出液を用いて TUBE pull down assay によりユビキチン化された G0S2 タンパク質を濃縮し、Western blotting により検出した。(B)C2C12/HA-G0S2 WT または E44A 細胞に対して CHX を 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で継続的に作用させ、細胞回収後 Western blotting により検出した。(C)(B)Western blotting で得られたバンドを定量化し、0 分時のタンパク質量で補正した値をグラフにプロットした。データは 3 回の実験の平均 \pm 標準偏差で示す。統計学的解析として、Student_t 検定により有意差検定を行った (**, $P < 0.01$ vs siCTL)。(D)in vitro transcription/translation により合成した G0S2 の発現量および検出条件の検討。合成サンプルの量を dose-dependent に泳動し、western blotting により評価した。(E)in vitro transcription/translation により合成した HA-G0S2 WT, E44A, ΔTM (膜貫通領域の欠損変異体)の合成後、HA タグによる免疫沈降法により結合タンパク質との相互作用を検討した。(F)HEK293T 細胞に HA-G0S2 WT または E44A を強制発現させ、HA 抗体を用いて免疫沈降を行なった。(G)C2C12 細胞に siCTL もしくは siBAG6 を導入し、48 時間後 HA-G0S2 WT または E44A 変異体を強制発現させた。更に、48 時間後 1% Triton X-100 含有 Lysis Buffer にて可溶化し、遠心後、上清(S)およびペレット(P)分画に分けそれぞれ Western blotting により解析した。P には凝集性タンパク質を含めた Triton X-100 不溶性タンパク質が検出される。GAPDH, Vimentin はそれぞれ可溶性タンパク質、不溶性タンパク質としてのマーカーとして使用した。

9-11 G0S2 のユビキチン化サイトの検討

また他グループにおける G0S2 の量的制御に関する報告として、HeLa細胞を用いた G0S2 のプロテアソームでの分解制御機構の解析およびユビキチン化サイトの検討がなされている。そのユビキチン化サイトは G0S2 の K25 として同定されているものの、その変異体による分解抑制効果は限定的であった。また、G0S2 のリジンの部位としては N 末端領域に 4 箇所、C 末端領域に 2 箇所存在しており、single mutation による解析においては、変異部位から異なる部位においてユビキチン化することが示唆される。実際に K25 をアルギニンに置換した変異体を C2C12 細胞に発現させ、その分解抑制効果を検討すると、その効果は限定的であった。そのため、G0S2 のリジンを全てアルギニンに置換した 6KR 変異体が C2C12 細胞に安定発現する株を樹立し、プロテアソーム阻害剤による効果を検討したところ 6KR 変異体ではタンパク質量の増加を認めなかった(図 23A)。更に、TUBE2 pull down assay によるユビキチン化量についても著しいユビキチン化量の減少を認めた(図 23B)。詳細なユビキチン化サイトの決定には至っていないものの、G0S2 においても Lys を介したユビキチン化修飾が行われていることを明らかにした。

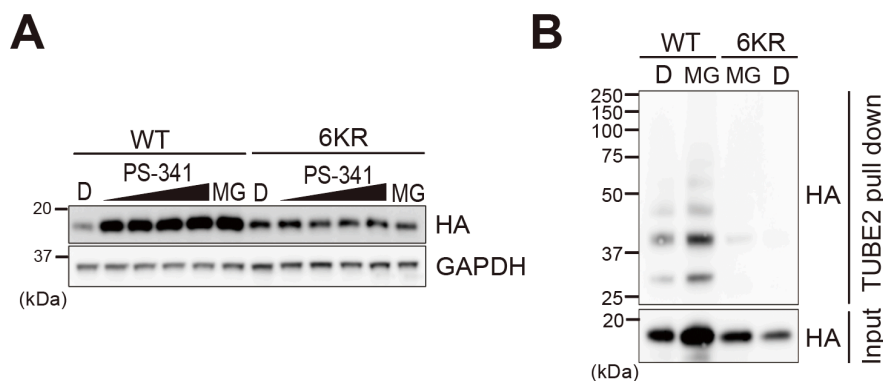


図 23. (A)C2C12/HA-G0S2 WT または 6KR 細胞に対してプロテアソーム阻害剤(PS-341: 0.1 μ M ~ 1 μ M, MG132: 10 μ M)を 4 時間作用させタンパク質量の変化を Western blotting により検出した。(B)C2C12/HA-G0S2 WT または E44A 細胞抽出液を用いて TUBE pull down assay によりユビキチン化された G0S2 タンパク質を濃縮し、Western blotting により検出した。

9-12 in vitro における RNF126/BAG6 複合体を介したユビキチン化反応

次に、RNF126/BAG6 複合体が G0S2 のユビキチン化反応において必要十分か否か明らかにするために、精製タンパク質を用いた in vitro ユビキチン化アッセイを行なうこととした。まず、反応に使用するリコンビナントタンパク質をそれぞれ精製した。野生型の RNF126 および酵素活性を欠損させた変異体 C231/234A を発現させた大腸菌からグルタチオンによるアフィニティー精製を行った (図 24A)。また、基質である G0S2 の野生型および変異体、BAG6 を発現させた HEK293T 細胞から FLAG アフィニティー精製を行いアッセイに用いた (図 24, B または C)。

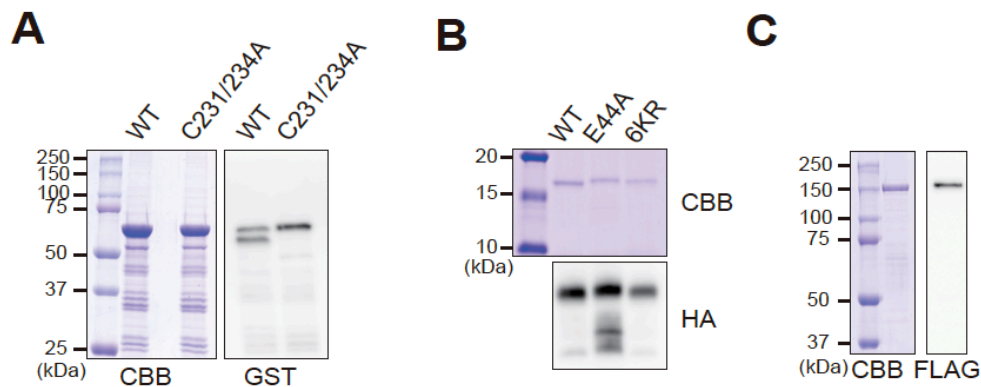


図 24. in vitro ユビキチン化アッセイで使用するリコンビナントタンパク質の精製。精製タンパク質は CBB 染色および Western blotting により精製度および収量を評価した。(A)精製した GST 融合 RNF126WT もしくは C231/234A 変異体。Western blotting は GST 抗体を用いて検出した。(B)精製した FLAG-HA-tag 融合 G0S2 の WT もしくは E44A, 6KR 変異体。Western blotting は HA 抗体を用いて検出した。(C)精製した FLAG-tag 融合 BAG6。Western blotting は FLAG 抗体を用いて検出した。

精製したタンパク質及び E1 には UBA1 を、E2 には UBCH5B を用いて *in vitro* ユビキチン化アッセイを行った。UBCH5B はこれまでの研究において RNF126 と協調して働くことと^{55,67,68}、siRNA library におけるスクリーニングにおいて特異性は乏しいものの G0S2 の分解抑制効果が見られたため選択した。実際のユビキチン化アッセイにおいて G0S2 タンパク質は E1, E2, ATP, ubiquitin そして RNF126 の存在下において僅かながらポリユビキチン鎖の形成を認めたが(図 25A, レーン 4)、BAG6 の共存在下においてはその効果を増強した(図 25A, レーン 5)。更に、G0S2 は RNF126 非存在下で BAG6 単独ではユビキチン鎖を形成できず(図 25B, レーン 1)、RNF126 の濃度依存的に G0S2 のポリユビキチン鎖が形成された(図 25B, レーン 2-4)。また、E2 から E3 へのユビキチン鎖の受け渡しに必須な RING ドメインに存在する二つのシステインをアラニンに置換した C231/234A 変異体ではユビキチン鎖は全く形成できないことから(図 25C, レーン 3)、RNF126/BAG6 複合体が G0S2 を直接的にユビキチン化することを *in vitro* においても明らかにした。また、細胞内において BAG6 との相互作用を低減させた G0S2 E44A 変異体は野生型と比較してポリユビキチン鎖の形成が減少し、G0S2 のユビキチン付加部位であるリジンを全てアルギニンに置換した KR 変異体ではユビキチン化が起こらないことも明らかとなった(図 25, C および D)。最後に、ユビキチン化はそのユビキチン鎖の形状によって細胞内で様々な機能を担っていることが知られている。そこで、RNF126 が形成するユビキチン鎖の形状について検討した。*in vitro* ユビキチン化アッセイ後のサンプルを HA 抗体により免疫沈降することでユビキチン化された G0S2 を濃縮した。その後、Lys-48 もしくは Lys-63 鎖特異的な抗体を用いて Western blotting を行なったところ、過去の報告と同様に Lys-48 特異的な抗体においてバンドが検出された(図 25E)^{49,58}。以上の結果から、E3 リガーゼ RNF126 は BAG6 依存的に G0S2 のユビキチン化を担うことが明らかとなった。

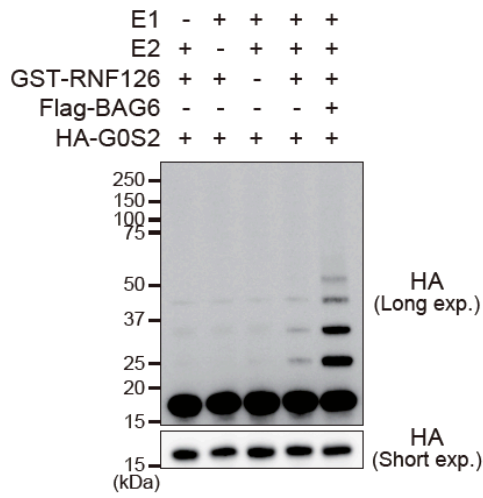
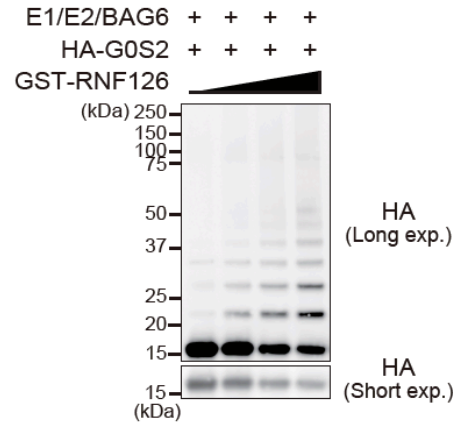
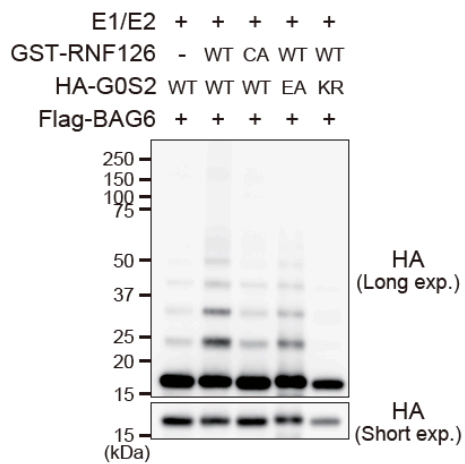
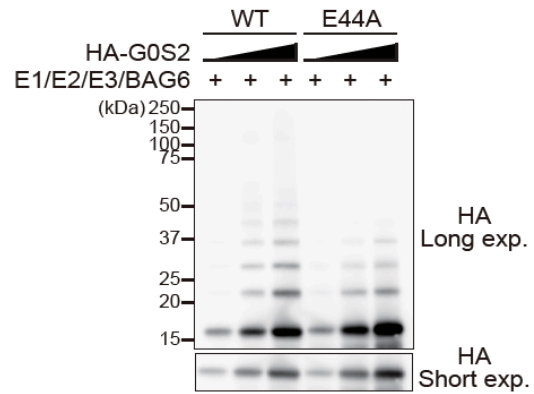
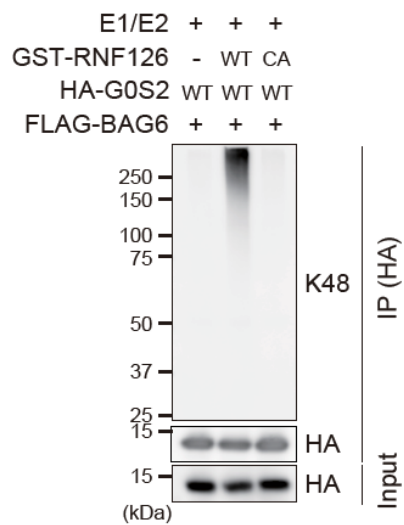
A**B****C****D****E**

図 25. (A-E)リコンビナント UBE1 (E1), UBCH5B (E2), GST-RNF126 (E3), BAG6, His-ubiquitin, ATP, HA-G0S2 の存在下または非存在下における in vitro ユビキチン化アッセイ。反応液は 37°C の恒温槽にて 60 分間反応させた。(B)GST-RNF126 タンパク質濃度依存的な G0S2 のポリユビキチン鎖の形成度を評価した。GST-RNF126 は 0, 0.625, 1.25, 2.5 nM で反応させた。(C)基質として G0S2 WT, E44A 変異体 (EA), Lysin-less 変異体 (KR)を用い、E3 の酵素活性変異体である C231/234A 変異体を反応させ、G0S2 のポリユビキチン鎖の形成度を評価した。(D)G0S2 WT, E44A 変異体濃度依存的な G0S2 のポリユビキチン鎖の形成度を評価した。HA-G0S2 WT, E44A 変異体は 18.75, 37.5, 75 nM で反応させた。(E)in vitro ユビキチン化反応を 37°C にて 60 分間反応させた。反応後 anti-HA 抗体を用いて 4°C にて 60 分間反応させ、G0S2 タンパク質のみを濃縮した。Western blotting にてユビキチン K48 鎖特異的な抗体もしくは HA 抗体により検出した。

9-13 BAG6 との結合阻害は低酸素下におけるミトコンドリア ATP 産生能の低下をより保持する

最後に BAG6-G0S2 の相互作用の重要性を検討するため、培養心筋細胞にレンチウイルスを用いて G0S2 WT もしくは E44A 変異体を強制発現させ機能解析を行なった。G0S2 WT は内因性の G0S2 と同様にミトコンドリアへの局在を示し、E44A 変異体も同様にミトコンドリアへ移行することを明らかにした。(図 26A)。また、プロテアソーム阻害剤である MG132, Lactacystin, PS-341 の作用において G0S2 WT は分解抑制によりタンパク質量の蓄積を認めたが、E44A は変化を認めなかった(図 26B)。更に Cycloheximide chase assay においては半減期の著しい延長と共に、ベースでのタンパク質量の増加を認めた(図 26, C および D)。以上の結果から、G0S2 E44A 変異体はミトコンドリアにおける機能を獲得し ATP 産生能を向上させる可能性を示唆した。そのため、Mit-ATeam assay により低酸素条件下におけるミトコンドリア ATP 産生能について評価した。以前の私たちの報告のとおり、心筋細胞において G0S2 WT の強制発現は、低酸素条件下でのミトコンドリア ATP 産生能を LacZ と比較して 13%程度保持させた。更に、E44A 変異体の強制発現は G0S2 WT の強制発現と比較してその効果を 10%程度増強させることが明らかとなった(図 26, E および F)。最後に、ミトコンドリア ATP 産生能の増強が低酸素刺激による細胞死に及ぼす影響について検討した。心筋細胞にレンチウイルスを用いて G0S2 WT もしくは E44A 変異体を強制発現させ 48 時間の低酸素刺激により細胞死を誘導した。その結果、CTL の心筋細胞は 25% 程度の細胞死が誘導されたが、G0S2 WT の強制発現によりその細胞死が抑制され、E44A 変異体では細胞死の抑制効果が増強した(図 26G)。これらの結果は、BAG6 との相互作用の阻害による G0S2 の分解抑制は、低酸素環境下におけるミトコンドリア ATP 産生能を向上させるのみならず細胞生存率も改善することが明らかとなった。

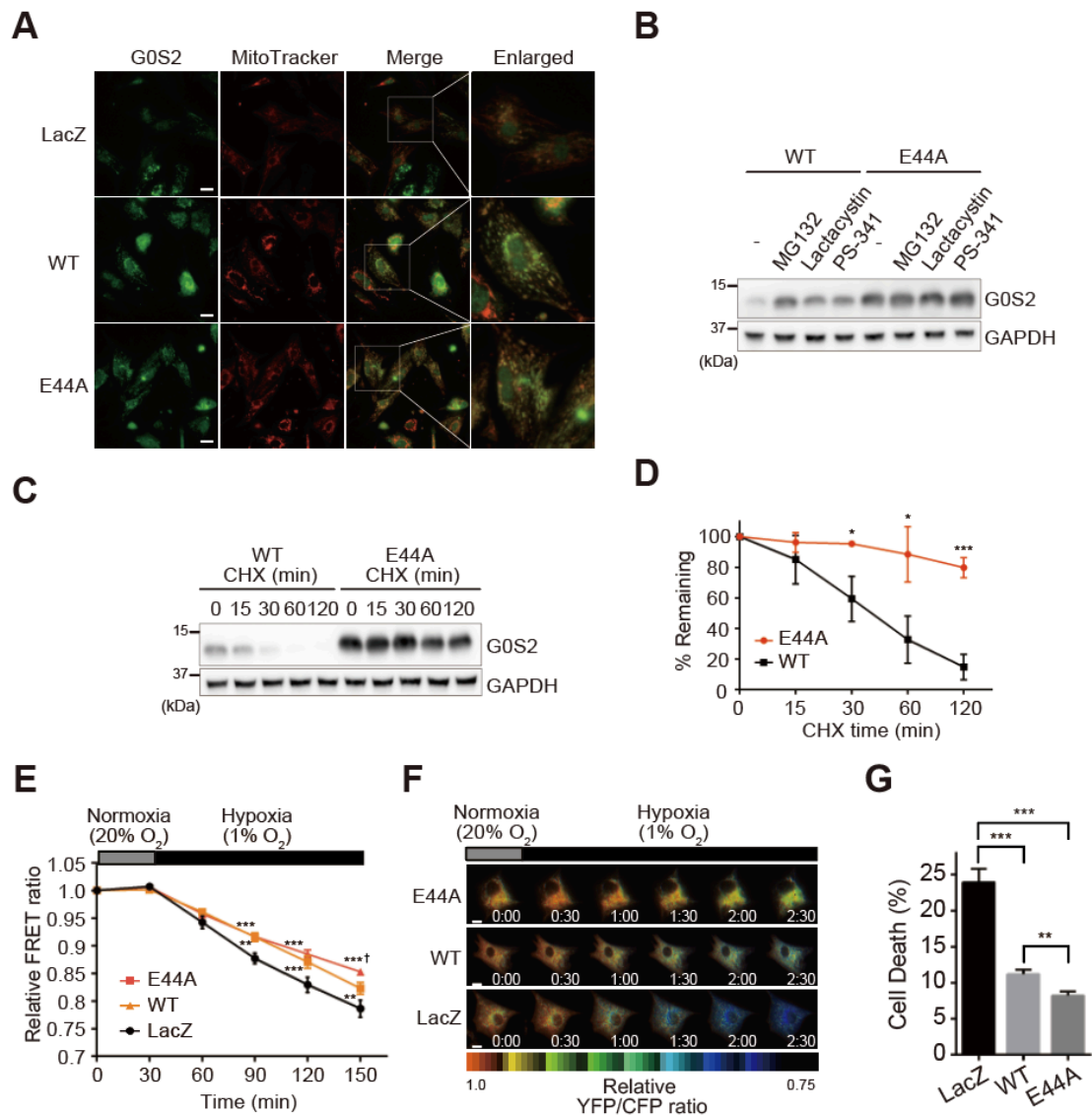


図 26. (A-G)培養心筋細胞にレンチウイルスを用いて G0S2 WT もしくは E44A 変異体を強制発現させ、機能解析を行った。(A) G0S2 タンパク質の局在を G0S2 に対する抗体およびミトコンドリアオルガネラマーカーとして MitoTracker Red を用いて共染色を行った。図中のスケールバーは 20 μm を示す。(B)培養心筋細胞にレンチウイルスを用いて G0S2 WT もしくは E44A 変異体を強制発現させ、プロテアソーム阻害剤(MG132: 10 μM , Lactacystin: 10 μM , PS-341: 0.3 μM)の作用によりタンパク質量の変化を Western blotting により検討した。(C)G0S2 WT もしくは E44A 変異体を強制発現させた心筋細胞を CHX(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)で処理し、図に示す各時間後に細胞回収後 Western blotting により G0S2 タンパク質量を評価した。(D)(C)で得られた G0S2 のバンドを定量し、G0S2 タンパク質の半減期を評価した。データは 3 回の実験の平均 \pm 標準偏差で示す。統計学的解析として、Student_t 検定により有意差検定を行った(*, $P < 0.05$; ***, $P < 0.001$ vs G0S2 WT)。(E)心筋細胞にアデノウイルスを用いて Mit-ATeam を発現させ、同時に G0S2 WT もしくは G0S2 E44A を心筋細胞に導入した。48 時間後、酸素濃度を変動させ(30 分間 21% $\text{O}_2 \rightarrow$ 120 分間 1% O_2)、Mit-ATeam プローブによる YFP/CFP の蛍光強度比を継続的に測定した。図は代表的な YFP/CFP 比の疑似カラー画像を表す。図中のスケールバーは 10 μm を示す。(F)Mit-ATeam と併せて LacZ(n=19), G0S2 WT(n=16), G0S2 E44A(n=20)を発現させた心筋細胞の Mit-ATeam による YFP/CFP の蛍光強度比をプロットした。各 YFP/CFP 比は 0 分の値で補正し、それぞれの各条件及び各時間において比較した。データは平均 \pm 標準誤差で示す。統計学的解析として、二元配置分散分析および Tukey-Kramer 法を用いた多重比較検定により有意差検定を行った(**, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$ vs LacZ, †, $P < 0.05$ vs G0S2 WT)。(G)培養心筋細胞にレンチウイルスを用いて G0S2 WT もしくは E44A 変異体を強制発現させ、1% O_2 , 24 時間の低酸素刺激により細胞死を誘発させた。低酸素処理後、Hoechst (最終濃度 1 $\mu\text{g}/\text{m}$)および PI (最終濃度 1 $\mu\text{g}/\text{m}$)を用いて染色し IN Cell Analyzer 6000 にて蛍光画像撮影を行った。その後、Developer Tool BOX を用いて画像解析・定量化を行い、PI 陽性細胞 / Hoechst 陽性細胞の割合から細胞死率を算出した。データは平均 \pm 標準誤差で示す。統計学的解析として、一元配置分散分析および Tukey-Kramer 法を用いた多重比較検定により有意差検定を行った(**, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$)。

9-13 部位特異的光クロスリンク手法を用いた G0S2 の結合タンパク質の探索

これまでの結果から G0S2 E44A 変異体は RNF126/BAG6 複合体との相互作用を低減させ、膜輸送因子への受け渡しをスムーズに行うことでミトコンドリア ATP 産生能を向上させることを見出した。しかし、G0S2 をはじめとした一回膜貫通型タンパク質をミトコンドリアへと輸送する特異的な因子は現在のところ同定されていない。そのため、E44 に部位特異的なクロスリンカーを導入することで現在未同定であるミトコンドリア膜輸送因子の同定を試みる。今回行う部位特異的光クロスリンク法は光反応を有する非天然アミノ酸と遺伝暗号(Amber コドン : UAG)の改変を用い、UV 照射直後に相互作用するタンパク質同士を結合させる手法である(図 27A)。HEK293T 細胞に E44 および周辺アミノ酸を Amber コドンに改変した FLAG タグ融合 G0S2 をコードするプラスミド(E44, V46, C47, S48_Amb)、Amber コドンを認識する改良型 tRNA 合成酵素(RS : PyIRS EE306A)、そして改良型 tRNA(tRNA-Pyl)のプラスミドを強制発現させ、UV 照射の有無と各アミノ酸における結合タンパク質の変化からスクリーニングを行った。実際には UV 照射による光クロスリンクを行った後、FLAG Agarose を用いた免疫沈降法および western blotting により G0S2 に共有結合された結合タンパク質を探索した。結果として、E44 においては特異的なバンドを検出した(図 27B)。このバンドにおける解析は不十分ではあるものの今後質量分析から結合タンパク質の同定を目指す。

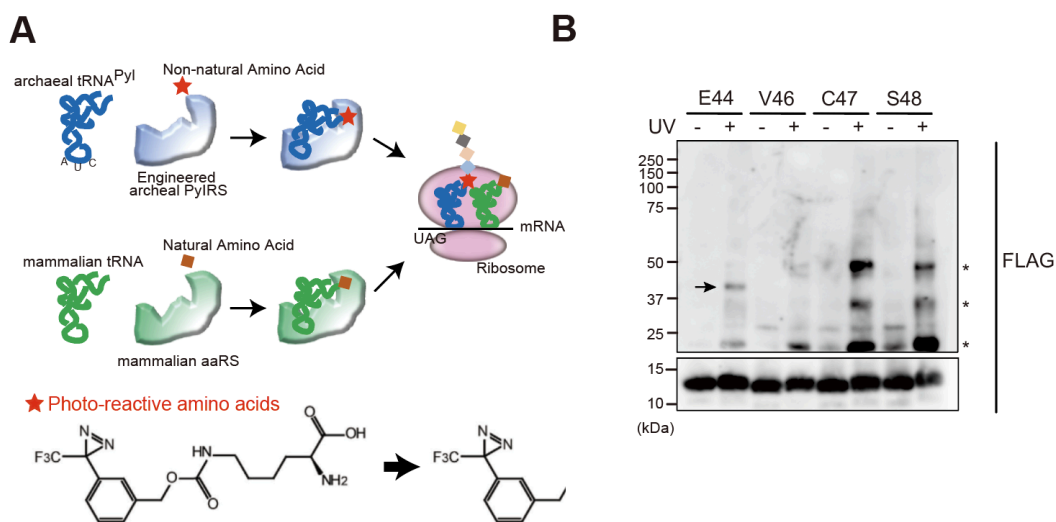


図 27. (A)部位特異的光クロスリンク法の原理。(B)(A)を用いた G0S2 の結合探索。HEK293T 細胞へのトランスフェクション 24 時間後 UV 照射および免疫沈降法を行い western blotting から評価した。矢印は G0S2 に対する結合タンパク質として推測されるバンド。*は G0S2 の多量体を表す。

10 考察

私たちの研究室におけるこれまでの研究結果から G0S2 は培養心筋細胞において低酸素環境刺激や薬剤刺激によるエネルギー需要に応答しダイナミックな発現変化を示すことが明らかとなっている³⁰。また、G0S2 を強制発現させた心筋細胞もしくはゼブラフィッシュは低酸素環境下におけるミトコンドリア ATP 産生能の低下を抑制するだけではなく、細胞死を抑制する細胞・臓器保護的な働きを持つことを見出した。これらの結果は生体内において G0S2 のタンパク質量を増加させることが虚血性心疾患をはじめとした心疾患において治療標的となりうることを示唆する。したがって、本研究では G0S2 のタンパク質寿命に着目し機能解析を進めるとともに G0S2 分解抑制によるミトコンドリア ATP 産生能への影響を Mit-ATeam Assay により評価することとした。

まず、本研究で重要な Mit-ATeam assay は、ミトコンドリアに移行させた probe の ATP 結合率から FRET による ATP 産生量を相対的に算出するものである。心筋細胞に導入した Mit-ATeam の FRET 比は FoF1-ATP 合成酵素の阻害剤である oligomycin A 作用により 0.7 程度まで低下し、その後プラトーに達する。つまり心筋細胞における相対的な ATP 産生量はこの 1.0 から 0.7 までのレンジで変化を捉えることが可能となる。

G0S2 タンパク質が心筋細胞において急速に分解されることを見出し、siRNA library を用いたスクリーニングから G0S2 の分解を制御する E3 ligase として RNF126 を同定した。CRISPR/Cas9 system を用いて RNF126 KO 細胞を樹立し、G0S2 の分解抑制効果を検討したところ、CTL 細胞と比較して G0S2 タンパク質の半減期の延長とユビキチン化量の減少を認めた。しかし、RNF126 KO においても長時間の Cycloheximide chase 実験では G0S2 の分解が進み、TUBE pulldown assay によるユビキチン化量の評価についても完全にはユビキチン化の抑制には至らなかった。これは、特定の基質に対して複数の E3 が分解を制御するという従来からの知見からも予想され、siRNA library でのスクリーニングにおける他の候補 E3 が RNF126 と協調的に G0S2 の分解を一部制御している可能性が示唆される。RNF126 はこれまでにミトコンドリアにおける代謝フラックスの制御⁶⁹や DNA 二重鎖切断時の修復機構⁴⁹、膜受容体の trafficking⁵⁸といった様々な細胞内機能に関与することが示されてきた。更に、CDK インヒビターである p21⁶⁸やミトコンドリア内の鉄-硫黄クラスターの生合成に必須な Frataxin タンパク質⁵⁹を直接ユビキチン化することでプロテアソーム依存的分解系に導くことが示されているが、基質認識機構に関しては不明瞭な点が多い。今回は培養心筋細胞に RNF126 に対する siRNA を導入し、G0S2 に対する分解抑制効果と心機能評価を行った。結果としては G0S2 の分解が一部阻害されたことによりミトコンドリアにおいて G0S2 タンパク質量の蓄積を認め、急性低酸素状態に対するミトコンドリア ATP 産生能

が 30%程度保持されたが、長期間の低酸素処理により誘発される細胞死に対しては変化を認めなかった。RNF126 は低酸素下において発現レベルには変化を認めなかったものの、上述した E3 が制御する基質の多様性を鑑みると複数の基質分解抑制効果による side-effect から細胞死がもたらされた可能性を示唆する。また、ミトコンドリア ATP 産生能に関しても 120 分という低酸素環境下での変化を捉えたのみで更なる時間経過における ATP 産生能の変化を検討する必要がある。また、実際の心臓における虚血状態は血流の途絶すなわち低酸素およびグルコースの枯渇によりもたらされることから、酸素濃度およびグルコース濃度を検討し G0S2 の虚血状態での挙動と分解抑制によるミトコンドリア ATP 産生能への影響を正確に捉えることが可能となる。

一方で、近年無細胞翻訳系による生化学的なアプローチによって RNF126/BAG6 複合体が細胞質内で正常に局在化しなかったタンパク質を特異的に認識しユビキチン鎖形成の後、分解誘導することが報告されている^{54,62,66}。BAG6 や RNF126 の欠損は細胞質内に正常に局在化しなかったタンパク質が異常に集積し、これらが不良タンパク質として蓄積・凝集することで神経変性疾患をはじめとした疾患発症が惹起されることが示されている^{54,62,66}。それゆえに、RNF126/BAG6 複合体は細胞質におけるプレエンブティブ(pre-emptive: 予防的)な品質管理機構の一端として新しい細胞質性ユビキチン依存的分解経路の役割を担っていると考えられる^{70,71}。本研究では BAG6 が RNF126 と共役し G0S2 のユビキチン依存的分解系へと誘導する因子であることを明らかにした。実際に細胞レベルの解析において siRNA を用いた BAG6 のノックダウンより G0S2 タンパク質量を顕著に増加させ、半減期の延長をもたらした。しかしながら、従来報告されてきた BAG6 の基質とは大きく異なり G0S2 は BAG6 の遺伝子発現抑制下において凝集性タンパク質の形成を認めなかった。これらの結果から、リボソームで合成された新生 G0S2 ポリペプチド鎖は“正常に局在化できなかったタンパク質”として排除されるのではなく、恒常的に RNF126 と BAG6 によって分解制御を受けていると考えられる。したがって、特定の条件下において G0S2 は機能タンパク質になると考えられ、構造変化や翻訳後修飾を受けることでその選択性が生じている可能性が強く示唆される。近年の研究において、BAG6 は基質の分解のみならず、合成直後の膜タンパク質の運命決定(プロテアソーム依存的に分解されるか、機能タンパク質としてオルガネラへ運ばれ膜へ挿入されるか)を行う“スイッチハブ”としての重要な役割を持つことが示された⁶⁰。特に C 末端領域に膜貫通領域を持つ一回膜貫通型タンパク質(テイルアンカー型タンパク質: TA タンパク質)は翻訳終了時に疎水性部分がリボソームトンネルから完全に抜け切れないため、一度細胞質へと放出される。凝集性タンパク質の形成を防ぐために、シャペロンである SGTA が疎水性領域を保護し、即座に BAG6 複合体(BAG6-UBL4A-TRC35)に受け渡され、その後の運命決定がなされる。プロテアソーム依存的分解経路に関

しては上述したように基質のユビキチン化を行うために RNF126 を動員することが示されている^{60,72}。一方、膜挿入においては疎水性領域の長さや疎水度などによって各オルガネラ特異的な輸送因子が担うことが示唆されている。ミトコンドリア膜への輸送因子は未だ同定されていないが、小胞体へは TRC40 が輸送と膜挿入を担うことが明らかにされた。

しかし、RNF126/BAG6 複合体および膜輸送因子による精密なタンパク質の生合成～分解経路はウサギ網状赤血球の抽出液を用いた無細胞翻訳系から証明され、確立された機構であるものの、近年他の因子によっても媒介される可能性が示唆されている。E3 として機能する RNF126 はパラログとして RNF115 や RNF185 といった保存性が非常に高く、特に E3 活性に重要とされる RING フィンガードメインや Zn フィンガードメインといった領域が高度に保存されていることから、RNF126 の機能不全時にはこれらの E3 により細胞内における品質管理がなされる可能性が十分に考えられる。また、BAG6 に関しても同様にシャペロンとして働く UBQLN ファミリーによって基質の膜貫通領域の保護およびプロテアソームへの誘導がもたらされることが示されている⁷³。実際に G0S2 に関しても UBQLN ファミリー(UBQLN1/2/4)のトリプルノックダウンによって G0S2 の分解が抑制され細胞内においてタンパク質量の蓄積を認めた。細胞内において BAG6 と UBQLN がどのようなメカニズムで基質認識を行っているのか、単独ないしは協調して分解制御を行っているのかを含めて今後検討する必要がある。または心臓特異的である持続的な収縮弛緩のレベルやエネルギー需要の程度によって BAG6 および UBQLN の発現プロファイルがダイナミックに変化し、基質の占有率が変化する可能性も十分に考えられることから、更なる解析を進めていくことで、細胞内における基質の分解と膜挿入の運命決定がどのように規定されているのか明らかとなる。

一般的に、半減期が数十分程度のタンパク質において分解のシグナルは degron として定義される。具体的には E3 による認識部位やユビキチン化サイト、プロテアソーム内へとリクルートされる領域が degron とされ、degron を標的とした創薬化合物の開発が進められてきた^{47,48}。特に VHL(von Hippel-Lindau)や CRBN(celebrin)などの E3 と基質の結合を阻害する高い親和性を持つ化合物が同定されたことに端を発し、標的分子に結合する低分子化合物をリンカーで繋いだ PROTAC(Proteolysis targeting chimera)による E3 ハイジャックを用いた新規標的分子のプロテアソーム依存的な分解誘導剤の開発も進められており、臨床試験にまで達している^{74,75}。そのため、基質の E3 のみならず degron を同定することは創薬候補化合物の探索だけに留まらずその後の創薬展開に向けて非常に大きな意味を持つ。

実際に G0S2 欠損変異体もしくはアラニン/グリシン置換変異体の作製による degron 領

域のスクリーニングから Glu-44(E44)が特異的な degron であることを見出した。G0S2 は 2 次構造から中央部に疎水性領域を持つことが推測されているが、その領域中において E44 のみ負電荷アミノ酸として存在している。保存性の高いこのアミノ酸をアラニン置換によって E44 の負電荷を欠失させることで G0S2 タンパク質の安定化のみならずミトコンドリア ATP 産生量を向上させる結果を得た。更に G0S2 E44A 変異体が BAG6 複合体との相互作用阻害を認め、G0S2 WT と同様に凝集性タンパク質を形成することなく可溶性を維持することを明らかとした。また、培養心筋細胞における E44A 変異体の局在は免疫染色の結果ミトコンドリアに集積していることと、Mit-ATeam の結果から E44A 変異体は野生型 G0S2 と比較して 10%程度 ATP 産生能の向上をもたらした。更に、低酸素処理によって誘導される細胞死についても E44A 変異体の発現によって細胞死の低下をもたらした。以上の結果は E44A 変異体が BAG6 複合体から膜輸送因子へ効率よく受け渡されていることを示唆する。これまで SEC61B や VAMP2 が細胞質品質管理機構のモデル基質として用いられてきたが^{66,76}、G0S2 とは異なり膜貫通領域中に特異的な電荷を持つアミノ酸は存在していない。それゆえに、一般的な TA タンパク質とは異なり、G0S2 は未同定なタンパク質の結合によって負電荷をマスクするもしくは、周辺の PEST 配列を含めた領域での翻訳後修飾によって G0S2 の E44 を介した特異的な分解制御機構が存在していることが推測される。この結果、E44A 変異体は特異的な分解機構から逃れ、正確に膜に輸送された後、機能を獲得することが示唆される(図 28)。

総合すると、本研究では G0S2 タンパク質の分解が細胞質において RNF126 と BAG6 複合体を含めた分子選択機構によって制御されていることを明らかにした。更に、BAG6 複合体との結合を阻害するアミノ酸 E44 を同定することに成功し、アラニンに置換した変異体は凝集性タンパク質を形成することなく分解が抑制され、ミトコンドリア ATP 産生能を増強させた。これらの知見は、同様の機構で制御される基質においても適応されることが示唆され、現在までに不明であった細胞内分子選択機構の選択性の解明につながることを期待される。また、RNF126 のノックダウンまたは E44A 変異体の過剰発現により、通常状態に発現する G0S2 タンパク質量の 10 倍程度増加させることで、低酸素環境下でのミトコンドリア ATP 産生能の向上をもたらすだけでなく最終的な細胞死を抑制させた。これはエネルギー不全を来す疾患に対して治療効果をもたらす可能性が示唆される。現在のところ、低酸素処理中における内因性 G0S2 の発現変動と過剰発現による G0S2 タンパク質量の量的関係だけではなくミトコンドリア ATP 産生能との相関関係を計時的に捉えることには至っていない。エネルギー不全を来す疾患の程度に対して G0S2 タンパク質量の増加により治療効果がもたらされるのか今後検討する必要がある。

“Molecular Triage” in the cytosol

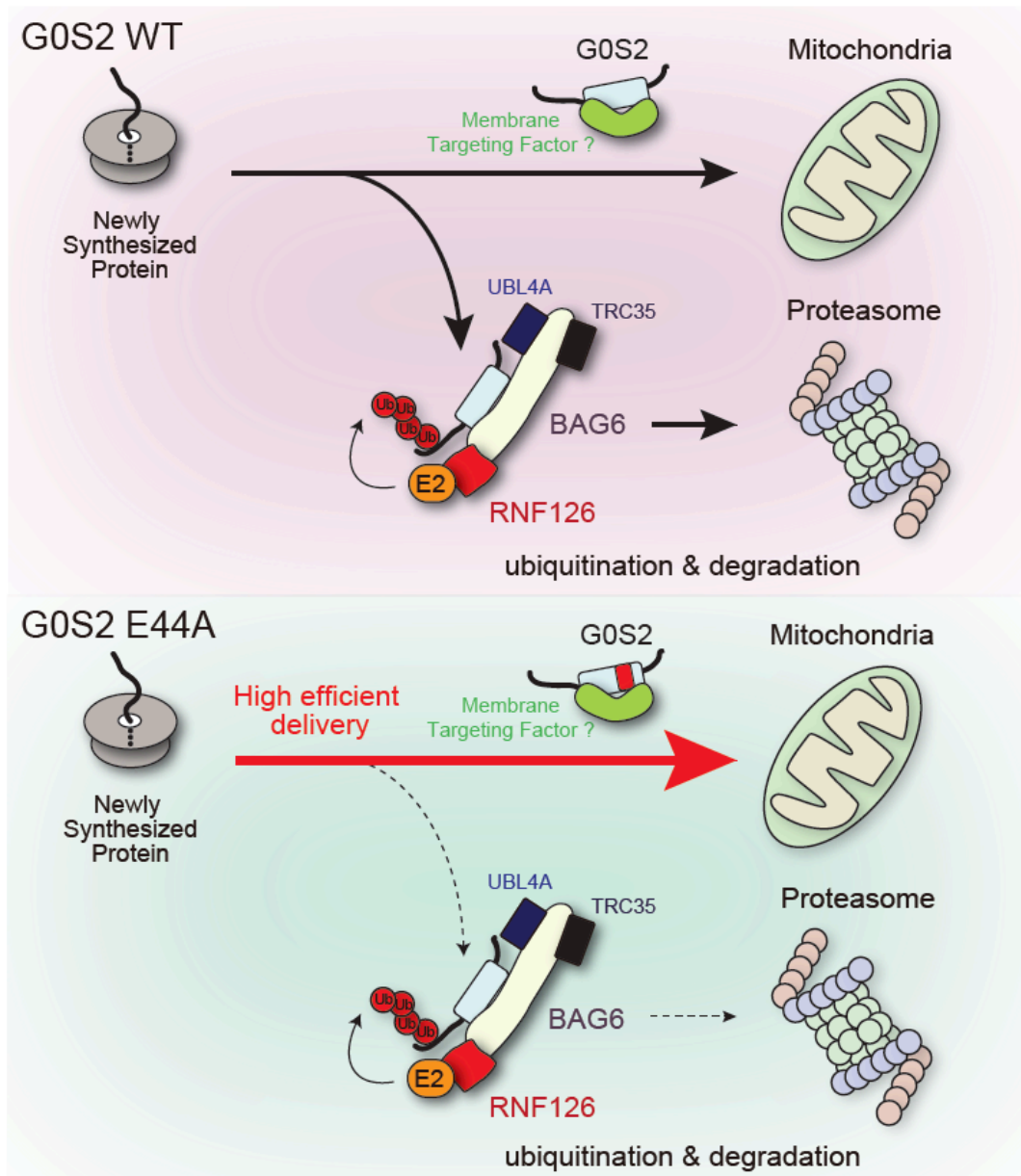


図 28. G0S2 タンパク質の分解制御機構に関する提案モデル。G0S2 タンパク質は RNF126/BAG6 複合体を介した細胞内分子選択機構によりプロテアソームでの分解もしくは膜挿入への運命決定がなされる。分解時には RNF126 によりユビキチン化され、膜挿入においてはミトコンドリア膜への局在化因子により輸送される。G0S2 E44A 変異体はダイナミックな構造変化により分子選択機構における膜挿入の効率を上昇させることで膜挿入の効率を上昇させ ATP 産生能を活性化させる。

11 結言

G0S2 は心筋細胞においてもユビキチン・プロテアソーム系によりタンパク質量が調節され、特に RNF126/BAG6 複合体による細胞質内での分子選択機構を介して制御されることを明らかにした。更に、RNF126/BAG6 複合体との相互作用部位である degron を同定し、変異体を作成することで分解抑制による更なるミトコンドリア ATP 産生能の活性化をもたらした。

今後、本研究で明らかにした G0S2 の分解制御メカニズムの構造基盤を詳細に解明することで、degron を標的とした創薬候補化合物の探索及び心不全や虚血性心疾患に対する新規治療法の開発が期待される。

12 参考文献

1. Soeller, C. & Baddeley, D. Super-resolution imaging of EC coupling protein distribution in the heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **58**, 32–40 (2013).
2. Birkeland, J. A., Sejersted, O. M., Taraldsen, T. & Sjaastad, I. EC-coupling in normal and failing hearts. *Scandinavian Cardiovascular Journal* **39**, 13–23 (2005).
3. Bennett, P. M., Ehler, E. & Wilson, A. J. Sarcoplasmic reticulum is an intermediary of mitochondrial and myofibrillar growth at the intercalated disc. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **37**, 55–69 (2016).
4. Tsukamoto, O. Direct sarcomere modulators are promising new treatments for cardiomyopathies. *International Journal of Molecular Sciences* **21**, (2020).
5. Malik, F. I. *et al.* Cardiac myosin activation: A potential therapeutic approach for systolic heart failure. *Science (80-.).* **331**, 1439–1443 (2011).
6. Ott, M. Cell biology: Choreography of protein synthesis. *Nature* **533**, 472–473 (2016).
7. Semenza, G. L. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell* **148**, 399–408 (2012).
8. Papandreou, I., Cairns, R. A., Fontana, L., Lim, A. L. & Denko, N. C. HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metab* **3**, 187–197 (2006).
9. Kim, J. W., Tchernyshyov, I., Semenza, G. L. & Dang, C. V. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab* **3**, 177–185 (2006).
10. Semenza, G. L. *et al.* Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase a gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1. *J. Biol. Chem.* **271**, 32529–32537 (1996).
11. Chen, Y. C. *et al.* Identification of a protein mediating respiratory supercomplex stability. *Cell Metab.* **15**, 348–360 (2012).
12. Fukuda, R. *et al.* HIF-1 Regulates Cytochrome Oxidase Subunits to Optimize Efficiency of Respiration in Hypoxic Cells. *Cell* **129**, 111–122 (2007).

13. Strogolova, V., Furness, A., Robb-McGrath, M., Garlich, J. & Stuart, R. A. Rcf1 and Rcf2, Members of the Hypoxia-Induced Gene 1 Protein Family, Are Critical Components of the Mitochondrial Cytochrome bc1-Cytochrome c Oxidase Supercomplex. *Mol. Cell. Biol.* **32**, 1363–1373 (2012).
14. Saks, V. *et al.* Cardiac system bioenergetics: Metabolic basis of the frank-starling law. *Journal of Physiology* **571**, 253–273 (2006).
15. Camilleri, P., Dyke, C. A., Paknoham, S. J. & Senior, L. A. Direct resolution of the optical isomers of fenoldopam and one of its derivatives. *J. Chromatogr. A* **498**, 414–416 (1990).
16. Shimura, D. *et al.* Metabolomic profiling analysis reveals chamber-dependent metabolite patterns in the mouse heart. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* **305**, (2013).
17. Kemp, G. J., Meyerspeer, M. & Moser, E. Absolute quantification of phosphorus metabolite concentrations in human muscle in vivo by ³¹P MRS: A quantitative review. *NMR in Biomedicine* **20**, 555–565 (2007).
18. Ford, S. R. *et al.* Use of firefly luciferase for ATP measurement: Other nucleotides enhance turnover. *J. Biolumin. Chemilumin.* **11**, 149–167 (1996).
19. Kuwahara, K., Nakagawa, Y. & Nishikimi, T. Cutting Edge of Brain Natriuretic Peptide (BNP) Research — The Diversity of BNP Immunoreactivity and Its Clinical Relevance —. *Circ. J.* **82**, 2455–2461 (2018).
20. Kawamoto, A. *et al.* Measurement of technetium-99m sestamibi signals in rats administered a mitochondrial uncoupler and in a rat model of heart failure. *PLoS One* **10**, (2015).
21. Kato, T. *et al.* A potential linkage between mitochondrial function of the heart and leg muscles in patients with heart failure. *Int. J. Cardiol.* **188**, 67–69 (2015).
22. Park, S. J. *et al.* Resveratrol ameliorates aging-related metabolic phenotypes by inhibiting cAMP phosphodiesterases. *Cell* **148**, 421–433 (2012).
23. Russell, L. & Forsdyke, D. R. A Human Putative Lymphocyte G0/G1 Switch Gene Containing a CpG-Rich Island Encodes a Small Basic Protein with the Potential to Be Phosphorylated. *DNA Cell Biol.* **10**, 581–591 (1991).
24. Yamada, T., Park, C. S., Burns, A., Nakada, D. & Lacorazza, H. D. The cytosolic protein G0S2 maintains quiescence in hematopoietic stem cells. *PLoS One* **7**, e38280–e38280 (2012).

25. Zandbergen, F. *et al.* The G0/G1 switch gene 2 is a novel PPAR target gene. *Biochem. J.* **392**, 313–324 (2005).
26. Welch, C. *et al.* Identification of a protein, G0S2, that lacks Bcl-2 homology domains and interacts with and antagonizes Bcl-2. *Cancer Res.* **69**, 6782–6789 (2009).
27. Tsuchiya, H., Tanaka, K. & Saeki, Y. The parallel reaction monitoring method contributes to a highly sensitive polyubiquitin chain quantification. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **436**, 223–229 (2013).
28. Heckmann, B. L., Zhang, X., Saarinen, A. M. & Liu, J. Regulation of G0/G1 Switch Gene 2 (G0S2) Protein Ubiquitination and Stability by Triglyceride Accumulation and ATGL Interaction. *PLoS One* **11**, e0156742 (2016).
29. Imamura, H. *et al.* Visualization of ATP levels inside single living cells with fluorescence resonance energy transfer-based genetically encoded indicators. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 15651–15656 (2009).
30. Kioka, H. *et al.* Evaluation of intramitochondrial ATP levels identifies G0/G1 switch gene 2 as a positive regulator of oxidative phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 273–278 (2014).
31. Hayashi, T. *et al.* Higd1a is a positive regulator of cytochrome c oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, 1553–1558 (2015).
32. Fujikawa, M. & Yoshida, M. A sensitive, simple assay of mitochondrial ATP synthesis of cultured mammalian cells suitable for high-throughput analysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **401**, 538–543 (2010).
33. Kioka, H. *et al.* In vivo real - time ATP imaging in zebrafish hearts reveals G0s2 induces ischemic tolerance. *FASEB J.* (2020). doi:10.1096/fj.201901686r
34. Chasapis, C. & Spyroulias, G. RING Finger E3 Ubiquitin Ligases: Structure and Drug Discovery. *Curr. Pharm. Des.* **15**, 3716–3731 (2009).
35. Hatakeyama, S. & Nakayama, K. I. I. U-box proteins as a new family of ubiquitin ligases. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **302**, 635–645 (2003).
36. Yanagitani, K., Juszkievicz, S. & Hegde, R. S. UBE2O is a quality control factor for orphans of multiprotein complexes. *Science (80-.).* **357**, 472–475 (2017).
37. Hessa, T. *et al.* elimination of mislocalized proteins. *Nature* (2011). doi:10.1038/nature10181

38. Vembar, S. S. & Brodsky, J. L. One step at a time: Endoplasmic reticulum-associated degradation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **9**, 944–957 (2008).
39. Liu, Y. & Ye, Y. Roles of p97-Associated Deubiquitinases in Protein Quality Control at the Endoplasmic Reticulum. *Curr. Protein Pept. Sci.* **13**, 436–446 (2012).
40. Shiota, T. *et al.* Molecular architecture of the active mitochondrial protein gate. *Science* (80-.). **349**, 1544–1548 (2015).
41. Kataoka, K., Nakamura, C., Asahi, T. & Sawamura, N. Mitochondrial cereblon functions as a Lon-type protease. *Sci. Rep.* **6**, (2016).
42. Warner, N., Burberry, A., Pliakas, M., McDonald, C. & Núñez, G. A genome-wide small interfering RNA (siRNA) screen reveals nuclear factor- κ B (NF- κ B)-independent regulators of NOD2-induced interleukin-8 (IL-8) secretion. *J. Biol. Chem.* **289**, 28213–28224 (2014).
43. Wu, Y. *et al.* A genome-scale CRISPR-Cas9 screening method for protein stability reveals novel regulators of Cdc25A. *Cell Discov.* **2**, (2016).
44. Varshavsky, A. Naming a targeting signal. *Cell* **64**, 13 (1991).
45. Ravid, T. & Hochstrasser, M. Diversity of degradation signals in the ubiquitin-proteasome system. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **9**, 679–689 (2008).
46. Guharoy, M., Bhowmick, P., Sallam, M. & Tompa, P. Tripartite degrons confer diversity and specificity on regulated protein degradation in the ubiquitin-proteasome system. *Nat. Commun.* **7**, (2016).
47. Azer, S. MDM2-p53 Interactions in Human Hepatocellular Carcinoma: What Is the Role of Nutlins and New Therapeutic Options? *J. Clin. Med.* **7**, 64 (2018).
48. Rufini, A. *et al.* Preventing the ubiquitin-proteasome-dependent degradation of frataxin, the protein defective in Friedreich’s ataxia. *Hum. Mol. Genet.* **20**, 1253–1261 (2011).
49. Ishida, N. *et al.* Ubiquitylation of Ku80 by RNF126 Promotes Completion of Nonhomologous End Joining-Mediated DNA Repair. *Mol Cell Biol* **37**, (2017).
50. Yamamoto, K. *et al.* Elimination of a signal sequence-uncleaved form of defective HLA protein through BAG6. *Sci Rep* **7**, 14545 (2017).
51. Heckmann, B. L., Zhang, X., Saarinen, A. M. & Liu, J. Regulation of G0/G1 switch gene 2 (G0S2) protein ubiquitination and stability by triglyceride accumulation and ATGL interaction. *PLoS One* **11**, (2016).

52. Bence, N. F., Sampat, R. M. & Kopito, R. R. Impairment of the ubiquitin-proteasome system by protein aggregation. *Science (80-.).* **292**, 1552–1555 (2001).
53. Kryzstofinska, E. M. *et al.* Structural and functional insights into the E3 ligase, RNF126. *Sci. Rep.* **6**, (2016).
54. Rodrigo-Brenni, M. C., Gutierrez, E. & Hegde, R. S. Cytosolic Quality Control of Mislocalized Proteins Requires RNF126 Recruitment to Bag6. *Mol. Cell* **55**, 227–237 (2014).
55. Rodrigo-Brenni, M. C., Gutierrez, E. & Hegde, R. S. Cytosolic quality control of mislocalized proteins requires RNF126 recruitment to Bag6. *Mol Cell* **55**, 227–237 (2014).
56. Kioka, H. *et al.* Evaluation of intramitochondrial ATP levels identifies G0/G1 switch gene 2 as a positive regulator of oxidative phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, (2014).
57. Zhi, X. *et al.* E3 ubiquitin ligase RNF126 promotes cancer cell proliferation by targeting the tumor suppressor p21 for ubiquitin-mediated degradation. *Cancer Res* **73**, 385–394 (2013).
58. Smith, C. J., Berry, D. M. & McGlade, C. J. The E3 ubiquitin ligases RNF126 and Rabring7 regulate endosomal sorting of the epidermal growth factor receptor. *J. Cell Sci.* **126**, 1366–1380 (2013).
59. Benini, M. *et al.* E3 Ligase RNF126 Directly Ubiquitinates Frataxin, Promoting Its Degradation: Identification of a Potential Therapeutic Target for Friedreich Ataxia. *Cell Rep* **18**, 2007–2017 (2017).
60. Shao, S., Rodrigo-Brenni, M. C., Kivlen, M. H. & Hegde, R. S. Mechanistic basis for a molecular triage reaction. *Science (80-.).* **355**, 298–302 (2017).
61. Guna, A. & Hegde, R. S. Transmembrane Domain Recognition during Membrane Protein Biogenesis and Quality Control. *Current Biology* **28**, R498–R511 (2018).
62. Juszkievicz, S. & Hegde, R. S. Quality Control of Orphaned Proteins. *Molecular Cell* **71**, 443–457 (2018).
63. Suzuki, R. & Kawahara, H. UBQLN 4 recognizes mislocalized transmembrane domain proteins and targets these to proteasomal degradation . *EMBO Rep.* **17**, 842–857 (2016).
64. Ravid, T. & Hochstrasser, M. Diversity of degradation signals in the ubiquitin-proteasome system. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 679–689 (2008).

65. Guharoy, M., Bhowmick, P., Sallam, M. & Tompa, P. Tripartite degrons confer diversity and specificity on regulated protein degradation in the ubiquitin-proteasome system. *Nat Commun* **7**, 10239 (2016).
66. Hessa, T. *et al.* Protein targeting and degradation are coupled for elimination of mislocalized proteins. *Nature* **475**, 394–399 (2011).
67. Siderovski, D. P., Blum, S., Forsdyke, R. E. & Forsdyke, D. R. A Set of Human Putative Lymphocyte G0/G1 Switch Genes Includes Genes Homologous to Rodent Cytokine and Zinc Finger Protein-Encoding Genes. *DNA Cell Biol.* **9**, 579–587 (1990).
68. Zhi, X. *et al.* E3 ubiquitin ligase RNF126 promotes cancer cell proliferation by targeting the tumor suppressor p21 for ubiquitin-mediated degradation. *Cancer Res.* **73**, 385–394 (2013).
69. Yoshino, S. *et al.* The ERK signaling target RNF126 regulates anoikis resistance in cancer cells by changing the mitochondrial metabolic flux. *Cell Discov* **2**, 16019 (2016).
70. Minami, R. *et al.* BAG-6 is essential for selective elimination of defective proteasomal substrates. *J. Cell Biol.* **190**, 637–650 (2010).
71. Kuwabara, N. *et al.* Structure of a BAG6 (Bcl-2-associated athanogene 6)-Ubl4a (ubiquitin-like protein 4a) complex reveals a novel binding interface that functions in tail-anchored protein biogenesis. *J. Biol. Chem.* jbc. M114. 631804 (2015).
72. Guna, A. & Hegde, R. S. Transmembrane Domain Recognition during Membrane Protein Biogenesis and Quality Control. *Curr Biol* **28**, R498–R511 (2018).
73. Itakura, E. *et al.* Ubiquilins Chaperone and Triage Mitochondrial Membrane Proteins for Degradation. *Mol. Cell* **63**, 21–33 (2016).
74. Rathod, D., Fu, Y. & Patel, K. BRD4 PROTAC as a novel therapeutic approach for the treatment of vemurafenib resistant melanoma: Preformulation studies, formulation development and in vitro evaluation. *Eur. J. Pharm. Sci.* **138**, (2019).
75. Raina, K. *et al.* PROTAC-induced BET protein degradation as a therapy for castration-resistant prostate cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, 7124–7129 (2016).
76. Shao, S. & Rodrigo-brenni, M. C. Mechanistic basis for a molecular triage reaction. **302**, 298–302 (2017).

13 業績

13-1 原著論文（査読あり）

Kenta Kamikubo¹, Hisakazu Kato¹, Hidetaka Kioka², Satoru Yamazaki³, Osamu Tsukamoto¹, Yuya Nishida^{1,4}, Yoshihiro Asano², Hiromi Imamura⁵, Hiroyuki Kawahara⁶, Yasunori Shintani¹, and Seiji Takashima^{1,4}

A molecular triage process mediated by RING finger protein 126 and BCL2-associated athanogene 6 regulates degradation of G₀/G₁ switch gene 2

Journal of Biological Chemistry. (2019) 294(40): 14562-14573

From the ¹Department of Medical Biochemistry, Osaka University Graduate School of Frontier Biosciences, Suita, Osaka 565-0871, Japan; ²Department of Cardiovascular Medicine, Osaka University Graduate School of Medicine, Suita, Osaka 565-0871, Japan; ³Department of Cell Biology, National Cerebral and Cardiovascular Center, Suita, Osaka 565-8565, Japan; ⁴Japan Science and Technology Agency-Core Research for Evolutional Science and Technology (CREST), Kawaguchi, Japan; ⁵Laboratory of Functional Biology, Graduate School of Biostudies, Kyoto University, Kyoto 606-8501, Japan; ⁶Laboratory of Cell Biology and Biochemistry, Department of Biological Sciences, Tokyo Metropolitan University, Tokyo, 192-0397, Japan

Kenta Kamikubo¹, Osamu Tsukamoto¹, Yuki Uyama¹, Ryohei Oya¹, Tomoya Tsubota¹, Noboru Fujino³, Yoshihiro Asano², Hisakazu Kato¹, Ken Matsuoka¹, and Seiji Takashima¹

Protocols for non- radioactive, in vitro, cardiac myosin light chain kinase assay

Journal of Visualized Experiments (JOVE) Under revise

From the ¹Department of Medical Biochemistry, Osaka University Graduate School of Frontier Biosciences, Suita, Osaka 565-0871, Japan; ²Department of Cardiovascular Medicine, Osaka University Graduate School of Medicine, Suita, Osaka 565-0871, Japan; ³Department of Cardiovascular and internal medicine, Kanazawa, Ishikawa 920 – 8641, Japan

13-2 学会・シンポジウムにおける発表

(1) 国際会議における発表

1. 著者 : ○Kenta Kamikubo, Hisakazu Kato, Hidetaka Kioka, and Seiji Takashima
題名 : G0S2 is degraded by Rnf126 through the interaction with Bag6-mediated molecular triage process
学会名 : Cold Spring Harbor Laboratory meeting (CSHL),
Ubiquitins, Autophagy & Disease
場所 : Cold Spring harbor Laboratory, NY, USA
年月 : 2019 年 4 月 23~27 日 (lightning talk、ポスター発表、査読あり)

(2) 国内会議における発表

1. 著者 : ○神窪謙太、加藤久和、高島成二
題目 : ミトコンドリア ATP 産生制御因子 G0S2 の量的制御機構に関する機能解析
学会名 : 第 64 回 日本生化学会大会 近畿支部例会
場所 : 大阪大学 豊中キャンパス
年月 : 2017 年 5 月 27 日 (口頭発表、ポスター発表、査読あり)
2. 著者 : ○神窪謙太、加藤久和、高島成二
題目 : ミトコンドリア ATP 産生制御因子 G0S2 タンパク質を特異的に分解する新規ユビキチンリガーゼの探索
学会名 : 2017 年度 生命科学系合同年次大会 (conBio 2017)
場所 : 神戸国際展示場
年月 : 2017 年 12 月 6~9 日 (ポスター発表、査読あり)
3. 著者 : ○神窪謙太、加藤久和、高島成二
題目 : ミトコンドリア ATP 産生制御因子 G0S2 タンパク質を特異的に分解する新規 E3 ligase の同定と機能解析
学会名 : 第 91 回 日本生化学会大会
場所 : 国立京都国際会館
年月 : 2018 年 9 月 24~26 日 (口頭発表、ポスター発表、査読あり)

4. 著者：○神窪謙太、加藤久和、高島成二
題目：ミトコンドリア ATP 産生制御因子 G0S2 を特異的に分解する
E3 複合体の同定と機能解析
学会名：第 41 回 日本分子生物学会年会
場所：パシフィコ横浜
年月：2018 年 11 月 28~30 日（口頭発表、ポスター発表、査読あり）
5. 著者：○宇山侑希、塚本蔵、矢白木翔平、北浦真生、神窪謙太、高島成二
題目：心臓特異的ミオシン軽鎖キナーゼの機能解明
学会名：第 41 回 日本分子生物学会年会
場所：パシフィコ横浜
年月：2018 年 11 月 28~30 日（ポスター発表、査読あり）
6. 著者：○北浦真生、塚本蔵、宇山侑希、神窪謙太、高島成二
題目：サルコメア収縮性を直接的に抑制する新しい薬剤の開発
学会名：第 41 回 日本分子生物学会年会
場所：パシフィコ横浜
年月：2018 年 11 月 28~30 日（ポスター発表、査読あり）
7. 著者：○神窪謙太、加藤久和、高島成二
題目：Functional analysis about the quantitative regulation of G0S2 protein
that controls mitochondrial ATP production
学会名：大阪大学 第 10 回 若手研究フォーラム
場所：大阪大学 銀杏会館
年月：2018 年 3 月 14 日（ポスター発表、査読なし）
8. 著者：○Kenta Kamikubo、Hisakazu Kato、Seiji Takashima
題目：Mitochondrial ATP regulator protein G0S2 is rapidly degraded by
specific E3 mediated pathway
学会名：The 1st OIST-OU Joint Symposium 'Cell Biology and Immunology'
場所：大阪大学 銀杏会館
年月：2019 年 1 月 29 日（ポスター発表、査読なし）

9. 著者 : ○Kenta Kamikubo、Hisakazu Kato、Seiji Takashima
題目 : Rnf126/Bag6-mediated molecular triage process regulates
G0S2 degradation
学会名 : MSW2019 ミトコンドリアサイエンスワークショップ
年月 : 2019 年 5 月 14~15 日 (口頭発表、査読なし)

13-3 その他

受賞歴

1. 受賞名 : 若手優秀発表賞
学会名 : 第 91 回 日本生化学会大会
年月 : 2018 年 9 月 24~26 日