

細胞内局所特異的コシャペロンを介した心臓恒常性維持機構の解明と新規治療戦略の確立

木岡秀隆

大阪大学大学院医学系研究科 循環器内科学

【研究の背景】

タンパク質は常に合成、分解を繰り返すことで、機能的恒常性を維持している。研究代表者らは先行研究によって分子シャペロン HSC70 のコシャペロン BAG5 欠損により発症する遺伝性拡張型心筋症を報告した¹⁾。BAG5 は、筋小胞体特異的コシャペロンであり、BAG5 欠損を起因とし、機能的筋小胞体タンパク質が減少し、不溶分画に凝集することが分子病態であることを明らかにした。シャペロン・コシャペロンは、多くのタンパク質と相互作用することで、シャペロームと呼ばれるネットワークを形成することにより、タンパク質恒常性(プロテオスタシス)を維持していると考えられているが、BAG5 欠損からプロテオスタシスの破綻に至る詳細な分子機序については未解明である。

【目 的】

シャペロン・コシャペロン複合体である HSC70/BAG5 による心筋タンパク質恒常性維持機構の解明を目的とする。

【方 法】

1. BAG5 欠損に起因するシャペロンネットワークの変容をプロテオミクスにより解析する。
BAG5 欠損マウスおよび野生型マウスを用いて、HSC70 を中心としたシャペロンネットワークの変容を、抗 HSC70 抗体による共免疫沈降法を用いたプロテオミクス解析により解析する。
2. シャペロンネットワークが心筋プロテオスタシスに与える分子機序解明。
シャペローム変容の機能的意義を、精製タンパク質を用いた *in vitro* 実験、および細胞実験により行う。

【結 果】

1. BAG5 欠損に起因したシャペロンネットワーク変容
野生型と BAG5 欠損マウス心臓ホモジネートを用い、HSC70 シャペロン複合体構成タンパク質をプロテオミクス解析により比較した。E3 リガーゼ複合体のサブユニットである Cullin を結合蛋白質として同定し、BAG5 欠損マウスでは、HSC70 と Cullin の結合が増強している事が示唆された。この結果を確認するために、精製タンパク質を用いた *In vitro* 結合実験を行ったところ、BAG5 は HSC70 と Cullin1 との直接結合を阻害することが明らかになった。Cullin は Cullin-Ring 型 E3 ユビキチンリガーゼ(CRLs)の足場タンパク質であることから、筋小胞体において、BAG5 が HSC70 と CRLs による超分子複合体形成を阻害し、筋小胞体タンパク質の恒常性維持に寄与していると考えた。HSC70 と CRLs とのタンパク質相互作用は、今まで報告されていなかったことから、HSC70-CRLs 間相互作用がプロテオスタシスに与える影響について検討を進めることにした。
2. 新規タンパク質間相互作用 HSC70-CRLs の機能解析
HSC70 が Cullin1 を含む SCF 複合体(Skp, Cullin, F-box)のユビキチン化活性に与える影響を *in vitro* ubiquitination assay 法により検討した。HSC70 は、SCF 複合体による基質のユビキチン化を活性化させることを明らかにした。SCF 複合体との結合部位に変異を導入した HSC70 変異体では、ユビキチン化活性化を認めなかったことから、HSC70 と SCF 複合体の

結合は、SCF 複合体基質のユビキチン化に重要であることが明らかになった。次に HSC70 ノックダウン 293T 細胞を用いた、シクロヘキシミドチエイズ実験によって、SCF 複合体基質タンパクの半減期が延長することを明らかにした。最後にラット培養心筋細胞を用い、BAG5 ノックダウンにより細胞内不良蛋白質の凝集を認める事を明らかにした。以上より、HSC70/BAG5 によるタンパク質分解制御の重要性が示された。

【考 察】

本研究によって、今まで認識されていなかった分子シャペロン HSC70 と E3 リガーゼ SCF 複合体の新規相互作用を明らかにした。筋小胞体特異的コシャペロン BAG5 は、両者の相互作用を制御することによって、筋肉小胞体タンパク質のプロテオスタシス維持に寄与しているものと考えられる。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

BAG5 欠損による拡張型心筋症は最初の報告¹⁾以降も、症例の報告が相次いでいる^{2,3)}。現在まで同定された BAG5 欠損による拡張型心筋症は、現存する治療に対する反応性に乏しく、重症心不全に至っていることから、病態に基づく特異的な新規治療法の開発が求められる。また、代表的な二次性心筋症の一つである頻拍誘発性心筋症において、ヘテロ接合型 BAG5 変異が同定されていることから、希少遺伝性心筋症のみならず、心房細動等、後天的負荷により発症する心不全の分子病態にも関与している可能性が考えられる。本研究により、コシャペロン BAG5 欠損によるタンパク質フォールディング不全に加え、ユビキチンプロテアソーム系でのタンパク質分解不全が、発症分子機序に関与することが明らかとなった。タンパク質分解系を標的とした治療法は、既に多発性骨髄腫に対するボルテゾミブなど実用化されており、ドラッグブルと考えられる。さらなる病態解明に取り組み、新規治療法開発に向けて研究を進めて行く予定である。

【参考・引用文献】

1. Hakui H, Kioka H[#], et. al, *Sci Transl Med.* 2022 Jan 19;14(628):eabf3274.
2. Hakui H, Kioka H[#], et. al, *Circ J.* 2022 Nov 25;86(12):2043.
3. Inoue S, et. al, *Circ Genom Precis Med.* 2023 Oct 24:e004282.