

令和 6 年 6 月 8 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K08410

研究課題名（和文）MuleによるCHK1を介した心筋ストレス応答の制御機序の解明

研究課題名（英文）Analysis of the regulation mechanism of CHK1 by Mule during myocardial stress response

研究代表者

竹田 健史（TAKEDA, Kenji）

金沢医科大学・総合医学研究所・助教

研究者番号：90340009

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、心筋細胞の酸化ストレス応答と関連するCHK1蛋白質の分解メカニズムを解明することを目的とした。心筋細胞が出生後に分裂を停止し、酸化ストレスに曝される過程で重要な役割を果たすCHK1は、Muleと呼ばれるE3リガーゼによって制御されている。本研究では、MuleがCHK1を特異的に認識し、ユビキチン化して分解するメカニズムを解析した。その結果、CHK1の分解に関連する新規の経路を同定し、糖化ストレス応答におけるCHK1とMuleの役割を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的意義は、心筋細胞の酸化ストレス応答におけるCHK1とMuleの相互作用メカニズムを明らかにした点にある。特に、糖化ストレスがCHK1の分解に与える影響を解析し、新たな経路を同定することで、心疾患治療の新しいターゲットを提案することができた。社会的意義としては、心筋細胞のストレス応答を理解することで、糖尿病性心疾患などの予防や治療に役立つ知見を提供する点である。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to elucidate the degradation mechanism of CHK1 protein, which is crucial for the oxidative stress response in cardiomyocytes. After birth, cardiomyocytes stop dividing and are exposed to oxidative stress, with CHK1 playing a pivotal role in this process. CHK1 is regulated by an E3 ligase called Mule. Our research analyzed how Mule specifically recognizes and ubiquitinates CHK1 for degradation. As a result, we identified new pathways related to CHK1 degradation and clarified the roles of CHK1 and Mule in the glycation stress response. This work contributes to understanding the molecular mechanisms underlying cardiomyocyte stress responses and suggests potential targets for treating heart disease.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：ユビキチン Mule CHK1

1. 研究開始当初の背景

哺乳類では出生後に心筋細胞の分裂が停止するとともに、それまで主として嫌氣的な解糖系から ATP を産生していた心筋細胞は、ミトコンドリア電子伝達系による好氣的な ATP 産生システムにスイッチする。このことは同時に活性酸素種 (ROS) の発生を促し、心筋細胞はそれ以降、絶えず酸化ストレスに曝されることになる。細胞内における酸化ストレスの増加は、DNA の切断を誘発し、これに対応するために DNA 損傷応答 (DDR) と呼ばれる一連の細胞内防御機構が作動し、損傷部位の検出や修復等に関わるシグナル伝達経路が活性化される。例えば、一本鎖 DNA の切断によって、DNA 障害チェックポイント機構の一つである ATR-CHK1 経路が活性化し、細胞周期を一時停止させて細胞分裂を遅らせることによって DNA 修復までの時間を稼ぐ。興味深いことに、マウス新生仔の心筋では、このような ROS 産生-DDR 活性化-細胞周期停止というシグナル伝達経路は、心筋細胞が増殖から肥大へ向かう成長の転換においても重要であることが報告され (Puente et al., Cell. 2014, 157(5):1243)、心臓の正常な発生過程においても DDR 関連因子は重要な役割を果たしていると考えられている。

DDR に重要な役割を果たす CHK1 の細胞内基底レベルは、Mule/HUWE1 と呼ばれる HECT 型 E3 リガーゼによって厳密に制御されているが (Xu et al., Cell Discov. 2016, 2:16040)、近年、Mule と心疾患との関連性が複数報告されている。例えば、突発性拡張型心筋症の患者や、虚血性心疾患の患者から得られた左室サンプルにおいて、Mule の発現レベルが有意に低下しており、さらに、Mule 欠損マウスは心肥大と左室機能障害を引き起こしたが、これにはミトコンドリアにおけるエネルギー産生や ROS 応答に関与する複数の因子 (Pgc-1 α や Pink1) の発現量低下が関与していることが明らかとなった (Dadson et al., Sci Rep. 2017, 7:41490)。

これらの報告は、Mule が病的な心肥大経路に重要な役割を果たしていることを示唆しているが、CHK1 発現レベルとの関連性や、ROS 産生によって引き起こされる DNA 障害チェックポイント機構への関与、さらには、肥大した心筋に見られる不良蛋白凝集・蓄積にともなうユビキチン-プロテアソーム経路の異常に関する Mule の関与については不明な点が多く残されている。

以上のような背景を踏まえ、本研究では Mule による基底レベルの CHK1 蛋白質制御の詳細な機序の解明と、DNA 損傷刺激時における Mule による CHK1 レベルの調節への影響を解析することを目的とした。これにより、心筋細胞の酸化ストレス応答や病的肥大における分子メカニズムの解明を目指した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、細胞周期制御や DNA 損傷応答において重要な役割を果たす CHK1 蛋白質の分解機構を明らかにすることである。特に、Mule が野生型 CHK1 やその変異体に対して、どのような細胞内機構によって迅速な分解を促進するのか、その分子メカニズムを解明することを目指した。

CHK1 は、DDR において中心的な役割を果たすセリン/スレオニンキナーゼであり、その安定性と活性は、心筋細胞を含めた多くの細胞の生存に不可欠である。特に、CHK1 の異常な活性化や発現はがんなど様々な疾患の進展に関与することが知られており、DDR 経路を介した CHK1 活性調節メカニズムの解明が重要である。しかしながら、CHK1 やその変異体が Mule によってどのように特異的に認識され、ユビキチン化された後、分解されるかに関しては不明な点が多く残されており、これを解明することで新たな心疾患やがん治療戦略の開発に貢献することが期待される。本研究では、まず *in vitro* および *in vivo* の両方のアプローチを用いて、Mule と CHK1 との相互作用を詳細に解析した。具体的には、以下の 3 つの主要な課題に取り組んだ。

- (1) Mule の CHK1 結合領域の特定: Mule の全長 4374 アミノ酸から、CHK1 との相互作用に必要な最小限の領域を特定することを目指した。これにより、Mule が CHK1 に対して特異的に結合するメカニズムを明らかにすることができる。
- (2) CHK1 変異体の分解に関与する新規因子の同定: CHK1 不活性化変異体 (d270KD) の分解に関与する未知の因子を同定するため、d270KD 安定発現細胞を樹立し、免疫沈降および質量分析を用いて分解経路に関与する候補因子を探索した。
- (3) 糖化ストレス応答における Mule および CHK1 の役割の解明: 糖化ストレスが Mule および CHK1 の機能や分解にどのような影響を与えるかを解析した。特に、糖尿病性心疾患に関連する終末糖化産物 (AGEs) が Mule と CHK1 の相互作用および分解機構に与える影響を調査した。

これらの研究を通じて、Mule が CHK1 野生型やその変異体の分解においてどのように機能するのか、その詳細なメカニズムを明らかにすることを目指した。最終的には、CHK1 の構造変化に応じた、その分解調節メカニズムに関する新たな知見を得ることで、心疾患やがん治療におけるターゲットとしての CHK1 および Mule の可能性を探ることが本研究の目的である。

3. 研究の方法

本研究では、Mule が CHK1 をどのように特異的に認識して分解するのかについて、その分子メカニズムを解明するために、以下の方法を用いて詳細な解析を行った。

(1) Mule の組換え蛋白質の精製:

ヒト細胞由来の HEK293 細胞を用いて、V5 タグ融合 Mule の組換え蛋白質を一過性発現させた。その後、細胞溶解液を調製し、V5 タグ抗体を利用したアフィニティー精製カラムを用いて組換え Mule 蛋白質を精製した。また、バクテリア発現系を用いて His タグ融合 Mule の部分的な組換え蛋白質を発現させ、ニッケルアフィニティークロマトグラフィーを用いて精製を行った。

(2) Mule deletion mutant の作製:

Mule の全長 4374 アミノ酸から C 末端側を欠損させた様々な長さの Mule deletion mutant を作製した。これらの変異体を構築するために、標準的な分子生物学的手法を用いて PCR によるサブクローニングを行い、各変異体の哺乳類細胞用の発現ベクターを作製した。その後、各 Mule deletion mutant を HEK293 細胞に一過性に発現させ、V5 抗体を用いた免疫沈降法により、それらと CHK1 との結合能を解析した。

(3) d270KD 安定発現細胞の樹立:

CHK1 の構成的不活性化変異体である d270KD の発現ベクターを作製し、HEK293 細胞に導入した。薬剤 (G418) 耐性能を指標として d270KD 安定発現細胞を樹立した。d270KD 安定発現細胞を用いて、d270KD 蛋白質に付加した FLAG および V5 タグを利用してダブルタグ法による免疫沈降を行った。溶出サンプルを収集し、質量分析 (LC-MS/MS) により、d270KD に結合する候補因子を同定した。その分析により 7 個の d270KD 結合候補因子を同定し、その中から特異性の高い 3 種の抗体 (HSP70、RPS3、BiP) を使用して結合を検証した。

(4) 糖化ストレス応答の解析:

細胞にグリセルアルデヒド (GA) を投与し、糖化ストレスが Mule および CHK1 の機能に与える影響を調査した。特に、GA で糖化した CHK1 の高分子架橋体の形成や不溶性画分への蓄積を Western blot 解析で確認した。また、Mule のノックダウン効果を RNA 干渉法によって調査し、CHK1 変異体の分解における糖化修飾の影響を評価した。

(5) Mule の糖化応答解析:

Mule 自身が GA による糖化刺激の影響を受けるかを解析した。GA 投与後、細胞溶解液を調製し、抗 Mule 抗体を用いて Western blot 解析を行い、Mule の糖化修飾がその機能にどのように影響するかを解析した。さらに、GA 投与により、選択的オートファジーに関与する p62/SQSTM1 の発現レベルと高分子架橋体の形成を Western blot 解析で評価した。

以上の方法を用いて、Mule と CHK1 変異体の相互作用および分解機構に関する詳細な解析を行った。これらの実験手法により、Mule が CHK1 変異体を認識し、ユビキチン化して分解するプロセスを明らかにすることを目指した。

4. 研究成果

本研究では、Mule が CHK1 野生型・変異体をどのように認識し、ユビキチン化して分解するかについて、心筋ストレス応答に関連する以下の成果を得た。

(1) CHK1 binding region (CBR) の特定:

当初、Mule が CHK1 変異体をユビキチン化し迅速に分解する機構を *in vitro* で再現するため、HEK293 細胞系やバクテリア発現系を使って Mule 組換え蛋白質の大量精製を試みたが、全長 460kDa という巨大な酵素であるがゆえに精製産物の量的・質的な問題により成功しなかった。そこで、*in vivo* での相互作用解析に焦点を当て、Mule の全長 4374 アミノ酸から C 末端側を欠損させた様々な長さの Mule deletion mutant を作製し、CHK1 との結合能を免疫沈降実験によって詳細に調べた。その結果、Mule が CHK1 との結合に必要な領域を 200 アミノ酸残基まで絞り込み、これを CBR と名付けた。この CBR を細胞内で一過性に過剰発現させると、シクロヘキシミド投与による CHK1 変異体蛋白質の迅速な細胞内ターンオーバーを遅らせ、さらに CBR の共発現により内在性 CHK1 の蛋白分解を遅らせ、結果として基底レベルが上昇することが示された。この成果は、Mule が心筋細胞において CHK1 の安定性を調節するメカニズムを解明する一助となり、心筋ストレス応答における重要な知見を提供した。

(2) d270KD 結合候補因子の同定:

CHK1 不活性化変異体 d270KD は野生型よりも迅速に細胞内で分解され、この分解経路には Mule

の特異的な結合が関与することを明らかにした。この現象は、ラット心筋由来細胞 H9c2 のみならず、ヒト由来の HEK293 細胞やアフリカミドリザル由来の COS-7 細胞などの異種細胞株でも同様に観察された。不活性変異体に特異的な分解に関わる未知因子を同定するために、d270KD 発現ベクターを HEK293 細胞へ導入し、ベクターに由来する薬剤耐性を指標にして、d270KD 安定発現細胞を樹立した。この細胞を用いて、d270KD 蛋白質に予め付加した FLAG と V5 タグに対する抗体をそれぞれ利用してダブルタグ法による 2 連続の免疫沈降を行った。精製された d270KD 結合蛋白質を質量分析 (LC-MS/MS) し、その結果、7 個の結合候補因子を同定した。そのうち、特異性の高い 3 種の抗体 (HSP70、RPS3、BiP) を利用して、Western blot 解析により、それらと d270KD との結合が確認できたが、これらの因子は野生型 CHK1 にも特異的に結合した。これらの成果は、心筋細胞における CHK1 野生型・変異型の分解メカニズムの解明に向けた重要な最初のステップであり、今後心筋ストレス応答に、これらの因子と CHK1 との結合がどのような調節を受けているのかを明らかにすることで、新たな分解経路の発見に繋がることが期待される。

(3) 糖化ストレス応答における Mule と CHK1 の解析:

慢性的な高血糖によって体内の過剰な糖が蛋白質と反応して AGEs が蓄積し、心筋の蛋白質恒常性低下の一因となる。様々な AGEs の中でも、GA 由来の AGEs (GA-AGEs) は強い細胞毒性を示すことが知られている。2 mM の GA を培地に投与すると、細胞内部で CHK1 が高分子架橋して不溶性画分へ蓄積しやすくなることが分かった。また、GA 刺激による CHK1 変異体の分解には Mule のノックダウンによる効果は認められなかった。一方、GA 投与による Mule の減少が観察され、糖化修飾による影響が示唆された。Mule の糖化修飾がその機能に与える影響については、さらなる詳細な解析が必要である。この結果は、糖尿病性心疾患における Mule と CHK1 の相互作用の役割を理解する上で重要であり、心筋ストレス応答における新たな調節機構を提案するものである。

(4) 選択的オートファジーとユビキチン-プロテアソーム経路における GA-AGEs の影響:

GA は、蛋白質のアルギニンやリジン残基を修飾して GA-AGEs を形成する。GA-AGEs は糖尿病性の病的な心臓リモデリングと密接に関連していることが知られている。GA 投与により細胞内 GA 濃度を上昇させると、選択的オートファジーに重要な役割を果たす p62/SQSTM1 が高分子架橋体を形成し、時間と共に不溶性画分への移行が観察された。GA 投与による Mule の蛋白レベルへの影響を調べたところ、投与後数時間で消失することが確認された。これらの結果は、細胞内蛋白質の GA 修飾によって選択的オートファジーの抑制や、Mule のような特定の E3 リガーゼが変性、あるいは消失し、異常蛋白質の蓄積が亢進する可能性を示している。また、細胞内 GA レベルの上昇が DNA ストレス応答を惹起することが知られていることから、細胞周期の監視役である CHK1 や、その構成的活性化型の N 末端断片 (CHK1-CPs) に着目し、それらの GA 修飾による影響を解析した結果、CHK1-CPs や d270KD が、GA の影響を受けて迅速に分解されることを発見した。これらの分解は Mule ノックダウンの影響を受けず、GA 修飾を認識して迅速に分解する独特な E3 リガーゼが関与することが示唆された。これらの知見は、糖尿病性心疾患における心筋ストレス応答に関わる新たな分子メカニズムを提案するものである。

以上の研究成果により、Mule および CHK1 変異体の分解機構に関する重要な知見が得られた。Mule の CHK1 結合領域の特定、d270KD 結合候補因子の同定、糖化ストレス応答における Mule および CHK1 の役割の解明など、いずれも心筋ストレス応答の理解を深める上で重要な発見である。また、これらの知見は、糖化修飾が、DDR 経路に影響することを示唆しており、新たな心疾患治療のターゲットとなる可能性を秘めている。今後の研究において、糖化応答における Mule、および CHK1 の分解機構に関するさらなる詳細な解析が求められる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Takeda Kenji, Sakai-Sakasai Akiko, Kajinami Kouji, Takeuchi Masayoshi	4. 巻 12
2. 論文標題 A Novel Approach: Investigating the Intracellular Clearance Mechanism of Glyceraldehyde-Derived Advanced Glycation End-Products Using the Artificial Checkpoint Kinase 1 d270KD Mutant as a Substrate Model	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 2838 ~ 2838
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells12242838	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sakai-Sakasai Akiko, Takeda Kenji, Suzuki Hirokazu, Takeuchi Masayoshi	4. 巻 14
2. 論文標題 Structures of Toxic Advanced Glycation End-Products Derived from Glyceraldehyde, A Sugar Metabolite	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Biomolecules	6. 最初と最後の頁 202 ~ 202
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biom14020202	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 竹田健史、河合 康幸、梶波康二
2. 発表標題 HECT型ユビキチンリガーゼMule1はC末端欠損型Chk1の不活性化型変異特異的な迅速分解機構に關与する
3. 学会等名 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 竹田健史 坂井亜紀子 梶波康二 竹内正義
2. 発表標題 新規アプローチ: 人工CHK1変異体d270KDを基質モデルとした毒性AGEs (TAGE)の細胞内クリアランス機構の解明.
3. 学会等名 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------