

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

科学研究費助成事業

研究成果報告書



令和 5 年 6 月 27 日現在

機関番号：84404

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K16607

研究課題名（和文）もやもや病感受性遺伝子産物RNF213によるシグナル制御機構の解析

研究課題名（英文）Analysis of signal pathway control mechanism of Moyamoya disease susceptibility gene

研究代表者

崔 廷米（Choi, Jungmi）

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・リサーチフェロー

研究者番号：40896180

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000 円

研究成果の概要（和文）：RNF213遺伝子の変異は、もやもや病や脳梗塞・肺高血圧症など多様な血管狭窄病変の要因となる。しかし、その発症分子機構は未解明である。本研究では、RNF213と物理的・機能的な相互作用するタンパク質Xに着目して、RNF213とタンパク質Xとの双方機能制御解析を行うことで、RNF213の遺伝子変異によりタンパク質Xの細胞内シグナルが制御されることや、タンパク質XがRNF213依存性シグナル経路への影響を及ぼすことを明らかにした。さらに、RNF213とタンパク質Xの相互作用は血管内皮細胞機能を調節する因子に関与している可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

RNF213変異は、もやもや病の原因であり、種々の動脈閉塞性疾患にかかわる遺伝子と考えられている。これらの疾患には、重症群が存在し、当該患者のQOLは極めて低いことが臨床的に知られている。しかしながら、その発症メカニズムは明らかでなく、根治療法も確立していない。本研究により、RNF213とタンパク質Xとの間に双方向性の制御機構が存在し、様々な細胞応答のシグナル制御に関わることが明らかとなった。タンパク質XによるRNF213機能解明は、RNF213に関連障害の疾患メカニズム解明、ひいては、これらの疾患の予防・治療薬の開発も促進が期待されるので、高度な社会医学的意義がある。

研究成果の概要（英文）：RNF213 was initially identified as the susceptibility gene for Moyamoya disease (MMD) but is now also associated with vascular stenosis of the pulmonary and coronary arteries. Although recent evidence suggests the involvement of RNF213 in various cellular and signaling pathways, the precise and primary functions of RNF213 remain unclear. In this study, I have focused on Protein X, which I found to physically and functionally interact with RNF213. Through analysis of the regulation of both RNF213 and protein X functions, I found that genetic mutations in RNF213 regulate intracellular signaling by protein X. I also demonstrate that protein X affects RNF213-dependent signaling pathways. Furthermore, I identified that the interaction between RNF213 and protein X may modulate vascular endothelial cell functions and lead to the changes in vascular architecture that result in stenosis and development of MMD.

研究分野：脳神経外科学関連

キーワード：RNF213 もやもや病

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1．研究開始当初の背景

RNF213 は、5207 アミノ酸、591 kDa の巨大蛋白質をコードし、ATP 分解機能を持つ AAA + ATPase ドメイン、及び、蛋白質のユビキチン化活性を持つ E3 ligase ドメインである RING ドメインを有する。

RNF213 遺伝子は、もやもや病の感受性遺伝子として同定され、R4810K 多型を始め、様々な変異体が報告されている。特に、RNF 213 R4810K 多型は、もやもや病のみならず、脳血管以外の血管（冠動脈、肺・頸動脈）でも狭窄病変のリスク因子であることが知られ、若年性脳梗塞のリスクを数十倍のレベルで上昇させることも遺伝疫学的に示されている。RNF213 の細胞内機能としては、脂質応答や細胞周期制御、Wnt シグナルなどへの関与への報告がある他、細胞に侵入した感染性細菌をユビキチン化し、細胞自律的免疫に関与することが報告されている。

しかし、RNF213 の異常が多様な血管狭窄病変に至る分子機構は未解明であり、その理由は、RNF213 が制御するシグナルや RNF213 自身の制御機構が不明であることが挙げられる。その中でも、RNF213 と結合し、RNF213 がユビキチン化・分解する標的基質によるシグナル制御は明らかでない。

2．研究の目的

RNF213 と関連性があると報告されたタンパク質から生化学手法を用いてタンパク質 X が RNF213 のユビキチン化標的基質となり得ることを、これまでの研究から発見した。そこで、本研究では、RNF213 とタンパク質 X の機能的相互作用に着目し、双方向性制御システムを起点に分子レベルでの役割を包括的に解析することで、もやもや病発症の要因となるシグナル異常を同定することを目的とする。

3．研究の方法

（１） RNF213 RING ドメイン変異体によるタンパク質 X のユビキチン化への影響

もやもや病患者に見られる、RNF213 RING ドメイン内の変異体によるタンパク質 X への影響を検討した。HEK293T 細胞において、RNF213 RING ドメインの変異体、タンパク質 X、ユビキチンを一過性に発現させ、プルダウン法を行った。

（２） RNF213 によるタンパク質 X ユビキチン鎖の特定

HEK293T 細胞に RNF213、タンパク質 X、ユビキチンを一過性に発現させ、K63 や K48 ポリユビキチン鎖などの特定リンケージを認識する Tandem Ubiquitin Binding Entity (TUBE) を用いてプルダウン法を行った。

（３） RNF213 とタンパク質 X の相互作用によるシグナル経路制御

血管内皮細胞での RNF213 とタンパク質 X の相互作用による機能変化を検討するために、ヒト肺動脈内皮細胞 (HPAEC) を用いて炎症惹起因子を添加し、プルダウン法により RNF213 とタンパク質 X の結合量への変化および、ウェスタンブロット法により発現量の変化を解析した。

CRISPR/Cas9 技術により、RNF213 欠損培養細胞株を樹立した。脂質の過剰負荷による RNF213 とタンパク質 X の相互作用の変化を検討するために、飽和脂肪酸のパルミチン酸を RNF213 欠損培養細胞に添加し、RNF213 とタンパク質 X の発現をウェスタンブロット法により解析した。

4．研究成果

（１） RNF213 RING ドメイン変異体によるタンパク質 X のユビキチン化への影響

RNF213 がユビキチン化活性を持つ E3 ligase ドメインを有することから、RNF213 によるタンパク質 X のユビキチン化への影響を検討した結果、野生型 RNF213 との共発現により、タンパク質 X のユビキチン化が促進された。従って、タンパク質 X が RNF213 によりユビキチン化される標的基質である可能性が示された。さらに、現在まで報告されているもやもや病患者に見られる RNF213 の変異の中で、RNF213 RING ドメイン内に変異を持つ変異体がタンパク質 X のユビキチン化に及ぼす影響の検討を行った。その結果、RING ドメイン変異体によりタンパク質 X のユビキチン化活性がほぼ消失することが示された（図 1）。よって、RNF213 の患者変異では、ユビキチン化におけるシグナル伝達異常に影響している可能性が見出された。

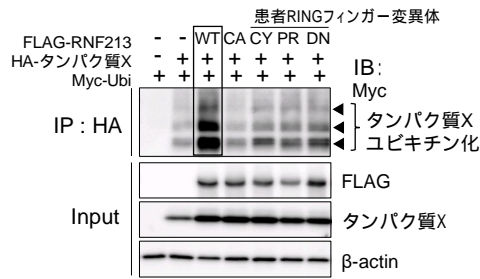


図1. もやもや病変患者のRINGフィンガー内変異の多くは、タンパク質Xユビキチン化活性を減弱させる。

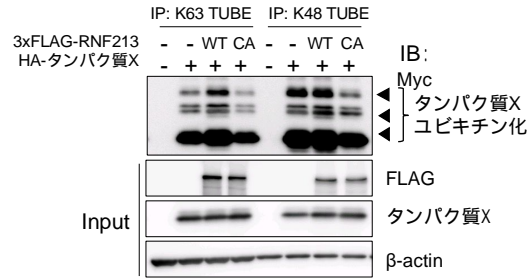


図2. RNF213はK48、K63のポリユビキチン鎖を形成する。

(2) RNF213 によるタンパク質 X ユビキチン鎖の特定

蛋白質に付加されるポリユビキチン鎖はその性状により、基質蛋白質の制御を異にする。Lys-48 (K48) を介したポリユビキチン鎖は基質蛋白質の分解を誘導する一方で、K63 を介したポリユビキチン鎖はシグナル伝達や DNA 修復に機能する。RNF213 によるタンパク質 X のユビキチン化の役割を知るため、RNF213 とタンパク質 X を HEK293 細胞に発現させ、K63 や K48 ポリユビキチン鎖などの特定リンケージを認識する Tandem Ubiquitin Binding Entity (TUBE) を用いたブルダウン法により RNF213 がタンパク質 X に付けるポリユビキチン鎖の性状を特定した。その結果、RNF213 は K48、K63 のポリユビキチン鎖を形成し、タンパク質 X の分解誘導やシグナル伝達などに機能することが示唆された (図 2)。

(3) RNF213 とタンパク質 X の相互作用によるシグナル経路制御

RNF213 結合蛋白質による RNF213 依存性シグナル経路制御の検討を行うため、血管内皮細胞において RNF213 を発現誘導することが報告されている炎症惹起因子を添加し、RNF213 とタンパク質 X の相互作用の検討を行った。その結果、RNF213 発現量の増加は認めなかったが、タンパク質 X との結合量が上昇することが明らかとなった。さらに、RNF213 とタンパク質 X の結合が上昇した同時に eNOS と AKT がリン酸化され、活性化することを見出した (図 3)。このことから、RNF213 とタンパク質 X の相互作用は eNOS-AKT の活性化を介して血管新生に参与する可能性が考えられた。現在、RNF213 とタンパク質 X が血管新生を制御に影響するかの詳細を解明するため研究を継続している。

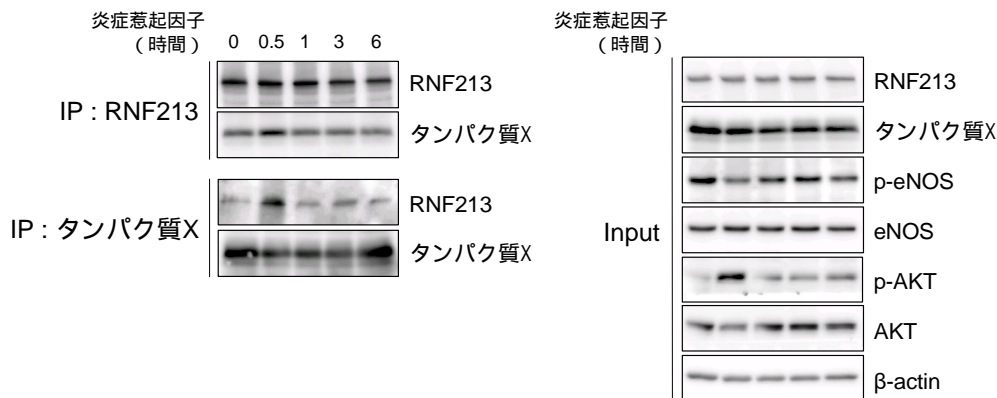


図3. 炎症惹起因子によりRNF213とタンパク質Xの結合が上昇する。

RNF213 が脂質代謝に寄与する因子であることが報告されていることから、脂質代謝における RNF213 とタンパク質 X の相互作用の解析を行った。RNF213 欠損細胞株と親株を用いてパルミチン酸を添加し、タンパク質 X の発現量への影響を検討した。パルミチン酸添加により脂質代謝を活性させると RNF213 欠損細胞ではタンパク質 X の発現量には影響がないことに対し、親株ではパルミチン酸添加に伴いタンパク質 X の発現量が上昇し、RNF213 がパルミチン酸によるタンパク質 X の発現レベルを制御していることが明らかとなった (図 4)。この結果から、脂質代謝における RNF213 とタンパク質 X の相関を見出し



図4. RNF213欠損によりパルミチン酸添加時のタンパク質Xの発現量上昇が抑制された。

た。現在、脂質代謝における RNF213 とタンパク質 X 関連の詳細解明を進めている。

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1．発表者名 崔 廷米、手塚 徹、Youssefian Shohab
2．発表標題 血管疾患におけるRNF213の分子機能と環境応答シグナル経路の解析
3．学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4．発表年 2022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
---------	---------