

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：34517

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07044

研究課題名(和文)モヤモヤ病感受性因子RNF213が制御する脂質代謝とオートファジー制御の関連解析

研究課題名(英文)Analysis of relationship between RNF213 moyamoya factor and autophagy

研究代表者

土生 敏行(Habu, Toshiyuki)

武庫川女子大学・生活環境学部・准教授

研究者番号：70346071

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：脳内頸動脈閉塞を引き起すモヤモヤ病感受性因子RNF213機能の脂質代謝及びオートファジー制御における機能を、栄養代謝との関連基盤から解析した。脂質利用と血管形成との関連性に迫り、モヤモヤ病感受性因子RNF213の脂質代謝特に脂質の取込み及び脂質滴の形成における機能でのモヤモヤ病多型との関連性、脂質ととのオートファジー隔壁膜とRNF213機能の関連性を明らかにした。これらを基に血管形成維持におけるRNF213のモヤモヤ病多型での機能変化の解析を行ったが、タンパク質のドメイン機能との関連性は明確にすることはできなかったが、ドメイン間の相互作用の重要性を導き出せたと考えている。

研究成果の概要(英文)：P.R4810K of RNF213 (mysterin: rs112735431), which is an AAA(+) ATPase, is the susceptibility polymorphism for moyamoya disease (MMD) in East Asians. However, the role of RNF213 R4810K in the etiology of MMD is unknown. To clarify the role of RNF213, RNF213 overexpressed in human culture cells was subjected to microscopic analysis. Using various mutated RNF213 overexpressing cells, morphological changes of autophagosomes were found and mobility of cells movement were largely different between wt of RNF213 and SNPs, mutants. RNF213 protein function in moyamoya disease was still unknown but from this analysis we concluded SNPs of this disease might affect the interaction of intermolecule RNF213 domain.

研究分野：細胞生物学

キーワード：モヤモヤ病 オートファジー 脂質代謝 酸素環境

1. 研究開始当初の背景

RNF213 タンパク質の生理学的意義を明らかにするために、細胞内での局在を詳細に調べた結果、RNF213 は細胞質中の脂肪滴に存在することを明らかにしてきた。この解析結果を基に、脂質との関連性を調査した結果、RNF213 タンパク質は脂肪取込みに影響を与え、特に脂肪滴の大きさに影響を与える。脂肪滴の周辺部を覆う様に存在する。脂肪酸代謝反応 -酸化に影響を与える。RNF213 の形成する脂肪滴には高級脂肪酸代謝に必要なペルオキシソームが存在する以上を明らかにした。

これらのことより、脂肪滴局在因子と類似し RNF213 の脂質調節機能、特に脂肪酸の貯蔵と脂肪滴形成において重要な機能をしていることが示唆された。

ア. RNF213 タンパク質は脂肪取込みに影響を与え、特に脂肪滴の大きさに影響を与える(図1)

イ. 脂肪滴の周辺部を覆う様に存在する(図2)

ウ. 脂肪酸代謝反応 -酸化に影響を与える

2. 研究の目的

脂質はエネルギー生成のみならず、生体の種々の膜を構成する上で重要な栄養素である。この脂質の細胞内利用において、脳内頸動脈閉塞を引き起すモヤモヤ病感受性因子 RNF213 が重要な機能を持つことを見出してきました。本申請研究では、この RNF213 の脂質代謝及びオートファジー制御における機能に焦点をあて、栄養代謝による血管の恒常性維持の基盤を拓くことを目的とした。

3. 研究の方法

モヤモヤ病感受性因子 RNF213 の脂質利用、特に脂質の取込み及び脂質滴の形成における機能をイメージング法により検討し、脂質利用における RNF213 機能単位導き血管形成維持と脂質との接点を検討する。RNF213 の脂質と血管形成維持との関わり合いを検討する。また脂質と酸素環境変化に伴うオートファジーとの関連性に注目し、RNF213 のオートファジー制御を顆粒形成の観点よりイメージングにより解析し、血管形成維持とオートファジー及び脂肪滴制御との関連性を検討していく。

4. 研究成果

RNF213 はエネルギー分子 ATP の加水分解で生じるエネルギーを利用して機能する分子群 (AAA+ファミリー) に属し、さらにユビキチン分子付加酵素の活性を併せ持った現在までに報告のない一次構造を持つタンパク質で、590kDa と超巨大分子である。その構造は6量体を形成し AAA+タンパク様の構造を形成していることが共同研

究者 森戸らによって報告された。モヤモヤ病感受性を示す 4810 多型は上記機能ドメインと一次構造的に離れた位置にあり、このアミノ酸変化に伴う機能変化は非常に興味深い。これらに注目し、ドメイン機能と細胞内で現象特に、脂肪滴形成への関わり合いを調べた結果、AAA ATPase ドメインの変異型や Ringfinger 変異では大きな変化を観察することができないが、R4810K ではその劇的な変化をすることより、それら二つのドメインとの関わり合いはないと結論付けられる。一部、モヤモヤ病の多型のうち数種に関しても同様の観察を行なったが、R4810K の示す、脂肪滴の劇的な形成不全は観察されなかった。このことより、R4810K は Ringfinger の介する酵素反応での特異的基質との相互作用に問題があるのではないかと、もしくは酵素反応の異常活性化による基質の変化を導くのではないかと考えられる。

一方で、R4810K は in-vitro では ATPase 活性を低減させていることを明らかにしている。これは Ringfinger ドメイン近傍に位置する R4810K 多型が遠位に位置する AAA ATPase ドメインに影響を与えていることが想定できる。Morito らの報告から考えると、数量体形成すると予想されるタンパク質であり、構造的に近位に位置し、数量体形成やその安定性を変化させていると想定することができると考えられる。

これを基に、大幅な欠失変異体を形成し、Ringfinger ドメイン以降のアミノ酸配列 (全体の半分程度) を欠失させ、細胞での挙動と脂肪滴形成を観察すると、この変異体では、脂肪滴への局在を示さず、その形成を変化しないことが明らかになった。つまり、AAA ATPase 機能だけでは、脂肪滴への局在能力がなく、一方 Ringfinger ドメインだけでも同様の結果となり、その

R4810K 変異でも変化を示さなかったことより、双方のドメインが必要で、R4810K は上述したように数量体の形成やその安定性に関与していると考えられる。その考えをサポートするように、R4810K は in-vitro では ATPase 活性を低減させていることを明らかにしている。多くの AAA ATPase は多量体を形成し、その機能を示すが、ATPase 活性も同様にその多量体化が重要なステップとなっている。このことより、R4810K は構造変異である可能性が考えられ、AAA ATPase との構造的相互作用が重要であると考えられる。

RNF213 タンパク質の細胞内機能

申請者は、RNF213 が細胞質中の脂肪滴と関連性があることを突き止め、細胞内での局在を詳細に調べた結果、RNF213 は細胞質中の脂肪滴周辺部を覆う様に存在することを明らかにしてきた。脂肪滴形成に関与するペリリピン、脂肪組織トリグリセリドリパーゼ等の分子との関連や滴形成の階層性は不明のままである。

また、血管内皮細胞機能（血管形成、遊走性等）と、脂肪酸の取込や脂肪滴との関連性は現在検討中であるが、脂肪酸の取込後の遊走性の向上を観察できている。脂肪酸の炭素鎖長の違いや飽和度の違いを検討した結果、飽和脂肪酸で炭素鎖長の増加が、RNF213 の脂肪滴形成と関連があり、また不飽和度の違いはその現象とは関連せず、RNF213 の強制発現がそれらの細胞毒性を抑制することも観察されないことより、飽和脂肪酸の利用との関連性が明らかとなった。またこれら脂肪酸とオートファジー隔壁膜形成との関連性を調査した結果、隔壁膜形成自身は、炭素鎖長には関連せず、不飽和度の小さな脂肪酸がその形成を促進していることが明らかになってきた。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

Wakida Takeshi, Ikura Masae, Kuriya Kenji, Ito Shinji, Shiroiwa Yoshiharu, Habu Toshiyuki,

Kawamoto Takuo, Okumura Katsuzumi, Ikura Tsuyoshi, Furuya Kanji

The CDK-PLK1 axis targets the DNA damage checkpoint sensor protein RAD9 to promote cell

proliferation and tolerance to genotoxic stress

eLife 10.7554/eLife.29953

Robert S. Banh, Caterina Iorio, Richard Marcotte, Yang Xu, Dan Cojocari, Anas Abdel Rahman, Judy Pawling, Wei Zhang, Ankit Sinha, Christopher M. Rose, Marta Isasa, Shuang Zhang, Ronald Wu, Carl Virtanen, Toshiaki Hitomi, Toshiyuki Habu, Sachdev S. Sidhu, Akio Koizumi, Sarah E. Wilkins, Thomas Kislinger, Steven P. Gygi, Christopher J. Schofield, James W. Dennis, Bradly G. Wouters and Benjamin G. Neel

PTP1B controls non-mitochondrial oxygen consumption by regulating RNF213 to promote tumour survival during hypoxia

Nature cell biology 2016

RNF213 rare variants in Slovakian and Czech moyamoya disease patients

Hatasu Kobayashi, Miroslav Brozman, Kateina Kyselova, DaaViszlayova, Takaaki Morimoto, Martin Roubec, David koloudik, Andrea Petroviova, Dominik Juskani, Jozef Strauss, Marian Halaj, Peter Kurray, Marian Hranai, Koji Harada, Sumiko Inoue, Toshiyuki Habu, Roman Herzig, Akio Koizumi
PLOS ONE 2016

Kobayashi H, Matsuda Y, Hitomi T, Okuda H, Shioi H, Matsuda T, Imai H, Sone M, Taura D, Harada KH, Habu T, Takagi Y, Miyamoto S, Koizumi A.

Biochemical and Functional Characterization of RNF213 (Mysterin) R4810K, a Susceptibility Mutation of Moyamoya Disease, in Angiogenesis In Vitro and In Vivo.

J Am Heart Assoc. 2015 Jun 30;4(7). online journal e00214

Akio Koizumi, Hatasu Kobayashi, Toshiaki Hitomi, Kouji H. Harada, Toshiyuki Habu, Shohab Youssefian

A new horizon of Moyamoya disease and associated health risks explored by RNF213

Environ Health Prev Med

DOI 10.1007/s12199-015-0498-7 2015

〔雑誌論文〕(計 5 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 1件）

名称：疼痛遺伝子及びその用途
発明者：小泉昭夫、小林果、
原田浩二、人見敏
明、土生敏行 等
権利者：同上
種類：
番号：特許、2013162560
出願年月日：2015
国内外の別： 国内

取得状況（計 1件）

名称：疼痛遺伝子及びその用途
発明者：小泉昭夫、小林果、
原田浩二、人見敏
明、土生敏行 等
権利者：同上
種類：
番号：特許、2013162560
出願年月日：2015
国内外の別： 国内

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

土生 敏行 (HABU, Toshiyuki)
武庫川女子大学・生活環境学部・准教授
研究者番号：70346071

(2) 連携研究者

小泉 昭夫 (KOIZUMI, Akio)
京都大学・医学研究科・教授
研究者番号：50124574

小林果 (KOBAYASHI, Hatasu)
中部大学・生命健康科学部・准教授
研究者番号：70542091