

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16373

研究課題名(和文) ユビキチンリガーゼRNF183の生理的機能の解明および新規炎症性腸疾患治療薬開発

研究課題名(英文) Elucidation of physiological function of ubiquitin ligase RNF183 and development of new therapeutic agent for inflammatory bowel disease

研究代表者

岡元 拓海 (OKAMOTO, Takumi)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(薬学系)・特任研究員

研究者番号：40826351

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)：近年、炎症性腸疾患(IBD)患者の大腸において、ユビキチンリガーゼRNF183の発現が亢進していることが報告された。RNF183は基質タンパク質の同定もされておらず、生理的機能は不明であった。本研究成果により、RNF183の基質タンパク質の同定に成功し、RNF183がイオントランスポーターNa,K-ATPaseやNKCC1のライソゾーム分解を促進することを明らかにした。Na,K-ATPaseやNKCC1はIBD患者の大腸において発現減少の報告もあり、RNF183の発現亢進がIBDの病態へ関与する可能性が示された。また、近位ビオチン標識法がユビキチンリガーゼの基質同定に有用であることも示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ユビキチンリガーゼと基質タンパク質は結合が弱く、一過性であることが多いため、基質タンパク質の同定が困難であった。しかし、本研究によりビオチンリガーゼを用いた近位ビオチン標識法がユビキチンリガーゼの基質タンパク質同定に有用であることを示し、ユビキチンリガーゼの研究において、その学術的意義は大きい。また、RNF183が高浸透圧ストレスにより発現誘導されるため、IBDの発症に高浸透圧ストレスが関与するという新たな知見を提示しており、社会に与えるインパクトは大きなものであると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In recently, it has reported that the expression of ubiquitin ligase RNF183, which is originally expressed specifically in the collecting duct of the kidney, is increased in the large intestine of patients with inflammatory bowel disease. Although RNF183 is specifically expressed in the kidney, the substrate protein has not been identified and its physiological function is unknown. In this study, we succeeded in identifying the substrate proteins of RNF183 and clarified that RNF183 promotes lysosomal degradation of ion transporters Na, K-ATPase and NKCC1. The expression of Na, K-ATPase and NKCC1 has been reported to be decreased in the large intestine of IBD patients, suggesting that the increased expression of RNF183 is involved in the pathophysiology of IBD. We also indicated that the proximal biotin labeling method using biotin ligase is useful for identifying the substrate proteins of ubiquitin ligases.

研究分野：生化学・分子細胞生物学

キーワード：ユビキチンリガーゼ RNF183 炎症性腸疾患 潰瘍性大腸炎 クローン病

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

研究代表者はこれまでに、膜貫通型ユビキチンリガーゼに注目し、バイオインフォマティクス的手法により新規遺伝子を含む 37 種の同定に成功してきた (*Sci Rep* 2016, 6: 30955)。これらのうち特に、腎臓特異的に発現する RNF183 に注目し、それらの生理機能を明らかにすることを目的に研究を行ってきた (*PLoS One* 2018, 13: e0190407)。最近、いずれも炎症性腸疾患 (IBD; inflammatory bowel disease) である潰瘍性大腸炎とクローン病患者の大腸において RNF183 の発現が亢進していることが報告された (*J Crohns Colitis* 2016, 10: 713-25)。

潰瘍性大腸炎やクローン病は、遺伝的な背景に環境因子が作用することで腸管炎症が引き起こされると考えられているが、未だ発症機序が解明されていないため根治療法が確立されておらず、薬物治療により症状が寛解しても多くの場合再発し、寛解を維持するためには継続的な薬物治療が必要であることから、指定難病に指定されている。患者数は、現在それぞれ 20 万人と 7 万人で指定難病では最も患者数が多く、増加の一途をたどっており、原因の解明とそれに基づく治療薬の開発が求められている。

2. 研究の目的

腎臓特異的な発現を示すユビキチンリガーゼ RNF183 が IBD 患者の大腸において発現亢進していることが報告され、IBD と RNF183 の関連性が示唆された。そこで、本研究では、RNF183 の生理的機能を解明することで IBD の発症機構を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) RNF183 の基質タンパク質候補の同定

HEK293 細胞にビオチンリガーゼである BirA を付加した RNF183 を発現させ、RNF183 の近傍タンパク質をビオチン化する近位ビオチン標識法を用いた。ビオチン化された RNF183 の近傍タンパク質をビオチンと強い結合力を持つストレプトアビジンビーズによって回収し、ショットガンプロテオーム解析を行った。

(2) RNF183 と基質タンパク質候補の結合解析

RNF183 は通常組織において、腎臓の集合管に特異的な発現を示す。培養細胞においてもマウスの腎臓集合管由来の mIMCD 細胞における高浸透圧ストレス条件下でのみ発現が確認できているが、その発現量も多くはない。そこで、HEK293 細胞に RNF183 を過剰発現させ、共免疫沈降法により基質タンパク質候補と RNF183 の結合を解析した。

(3) RNF183 による基質タンパク質候補のユビキチン化解析

基質タンパク質候補の RNF183 によるユビキチン化は、RNF183 過剰発現細胞に HA タグを融合したユビキチン (HA-Ub) を発現させ、基質タンパク質候補への HA-Ub の結合の有無を検証した。また、細胞内ではユビキチン化されるとユビキチン鎖を認識し速やかに分解される、もしくは脱ユビキチン化酵素 (DUB) により脱ユビキチン化されることもあり、ユビキチン化の解析が困難であることも多い。そのため、ポリユビキチン鎖に結合し、分解や脱ユビキチン化を阻害する Tandem Ubiquitin-Binding Entity (TUBE) を用いた解析も行った。すなわち、TUBE を融合したアガロースビーズを用いてプルダウンを行い、基質タンパク質候補の抗体を用いたイムノプロット法により解析した。

(4) RNF183 による基質タンパク質候補のユビキチン化の役割の解析

3×FLAG タグを融合した RNF183 (3×FLAG-RNF183) を安定発現する 3×FLAG-RNF183 安定発現細胞もしくはドキシサイクリンにより 3×FLAG-RNF183 を発現する 3×FLAG-RNF183 発現誘導細胞を作製し、RNF183 による基質タンパク質候補の発現量の変化を解析した。また、RNF183 存在下での基質タンパク質候補の細胞内局在の変化を免疫染色法により解析した。

4. 研究成果

(1) RNF183 の基質タンパク質候補の同定

N 末端に BirA、C 末端に V5 タグを融合した RNF183 を HEK293 に発現させ、BirA によりビオチン化された RNF183 の近傍タンパク質をストレプトアビジンビーズによりプルダウンを行った。ストレプトアビジン-HRP を用いてイムノプロット法により解析を行ったところ、ビオチン化タンパク質を効率よく回収できていることが確認できた (図 1)。

回収したビオチン化タンパク質を用いてショットガンプロテオーム解析を行ったところ、BirA-RNF183 に

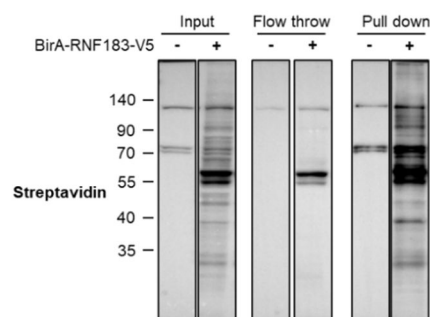


図 1 BirA によるビオチン化タンパク質の回収

よるビオチン化タンパク質を多数同定した。RNF183 は腎臓の集合管に特異的発現を示し、長期の高浸透圧ストレスによって発現誘導される。細胞は高浸透圧ストレスへ適応するためにさまざまなトランスポーターの発現量を制御することから、RNF183 はトランスポーターを基質と認識しているのではないかと考えた。そこで、同定した BirA-RNF183 によるビオチン化タンパク質のうち、トランスポーターに着目したところ、高浸透圧ストレスによる細胞体積変化に関与することが知られている Na,K-ATPase および NKCC1 が含まれていた。そこで、この 2 つのイオントランスポーターに着目し、解析を進めることとした。

(2) RNF183 と基質タンパク質候補の結合解析

Na,K-ATPase は $\alpha 1$ サブユニット (Na,K- $\alpha 1$) と $\beta 1$ サブユニット (Na,K- $\beta 1$) の複合体を形成して機能している。そこで、3×FLAG-RNF183 過剰発現細胞抽出液において Na,K- $\alpha 1$ もしくは Na,K- $\beta 1$ の抗体を用いて共免疫沈降を行った。その結果、抗 Na,K- $\alpha 1$ 抗体および抗 Na,K- $\beta 1$ 抗体の両方において 3×FLAG-RNF183 の共沈降が見られた (図 2)。この時、抗 Na,K- $\alpha 1$ 抗体を用いた場合は Na,K- $\alpha 1$ だけでなく Na,K- $\beta 1$ も共沈降しており、一方で抗 Na,K- $\beta 1$ 抗体を用いた場合は Na,K- $\alpha 1$ の共沈降は見られなかったことから RNF183 は Na,K- $\beta 1$ と結合することが示唆された。

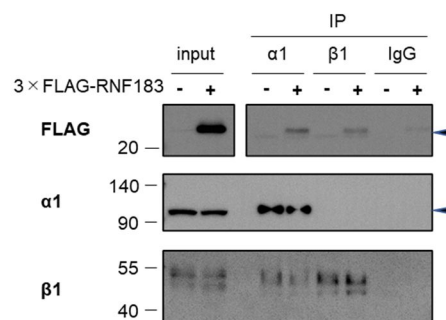


図 2 RNF183 と Na,K-ATPase の結合

また、NKCC1 についても同様に NKCC1 抗体を用いた共免疫沈降法により解析を行い、RNF183 と NKCC1 の共沈降を確認した。

(3) RNF183 による基質タンパク質候補のユビキチン化解析

(2)より RNF183 と Na,K-ATPase の Na,K- $\beta 1$ が結合することが示唆されたが、Na,K-ATPase は通常 $\alpha 1\beta 1$ 複合体を形成しているため、RNF183 が Na,K- $\alpha 1$ 、Na,K- $\beta 1$ のどちらをユビキチン化しているか検証を行った。まず、N 末端に V5 タグを融合した RNF183 (V5-RNF183) を安定過剰発現させた HEK293 細胞に HA-Ub および 3×FLAG- Na,K- $\alpha 1$ を一過性に発現させ、抗 FLAG 抗体で免疫沈降し、抗 HA 抗体でイムノプロットを行った。すると、RNF183 依存的な Na,K- $\alpha 1$ のユビキチン化は見られなかった。次に、V5-RNF183 発現細胞に HA-Ub を一過性に発現させ、抗 Na,K- $\beta 1$ 抗体で免疫沈降し、抗 HA 抗体でイムノプロットを行った。すると、RNF183 依存的な Na,K- $\beta 1$ のユビキチン化が見られた。この結果から、RNF183 は Na,K- $\beta 1$ を基質タンパク質と認識し、ユビキチン化することが示唆された。

RNF183 による NKCC1 のユビキチン化の検証は TUBE を用いて行った。その結果、RNF183 依存的な NKCC1 のユビキチン化が検出された。これより NKCC1 も RNF183 の基質タンパク質であることが示唆された。

(4) RNF183 による基質タンパク質候補のユビキチン化の役割の解析

これまでの研究で RNF183 はライソゾームやエンドソームに局在することが明らかにされている。そこで、Na,K-ATPase や NKCC1 は RNF183 によりユビキチン化されライソゾームで分解されているのではないかと考えた。まず、RNF183 による Na,K-ATPase および NKCC1 の細胞内局在への影響を免疫染色法により解析した。その結果、通常細胞膜に局在している Na,K-ATPase および NKCC1 が RNF183 と共発現させることでライソゾームへ移行していることが分かった。次に、3×FLAG-RNF183 発現細胞における Na,K- $\alpha 1$ および Na,K- $\beta 1$ の発現量を野生型と比較したところ、3×FLAG-RNF183 発現細胞において Na,K- $\alpha 1$ および Na,K- $\beta 1$ の発現量の減少が見られた。また、siRNA により 3×FLAG-RNF183 をノックダウンしたところ、Na,K- $\alpha 1$ および Na,K- $\beta 1$ の発現量は野生型と同程度まで増加した。さらに、ライソゾーム分解阻害剤であるクロロキンで処理したところ、Na,K- $\alpha 1$ および Na,K- $\beta 1$ の発現量の増加が見られた。NKCC1 については 3×FLAG-RNF183 発現誘導細胞を用いて 3×FLAG-RNF183 発現誘導時間依存的な発現量の影響を検証した。その結果、RNF183 発現誘導時間依存的に NKCC1 の発現量の減少が見られ、クロロキン処理することで RNF183 による NKCC1 の発現量の減少が阻害された。

以上の結果から、RNF183 は Na,K- $\beta 1$ および NKCC1 を基質タンパク質として認識し、ユビキチン化することで細胞膜からライソゾームへ移行させ、ライソゾーム分解を促進することを明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Okamoto Takumi, Imaizumi Kazunori, Kaneko Masayuki	4. 巻 21
2. 論文標題 The Role of Tissue-Specific Ubiquitin Ligases, RNF183, RNF186, RNF182 and RNF152, in Disease and Biological Function	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3921 ~ 3921
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21113921	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 Okamoto Takumi, Wu Yan, Matsuhisa Koji, Saito Atsushi, Sakaue Fumika, Imaizumi Kazunori, Kaneko Masayuki	4. 巻 521
2. 論文標題 Hypertonicity-responsive ubiquitin ligase RNF183 promotes Na, K-ATPase lysosomal degradation through ubiquitination of its 1 subunit	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 1030 ~ 1035
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.11.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Matsuhisa Koji, Saito Atsushi, Cai Longjie, Kaneko Masayuki, Okamoto Takumi, Sakaue Fumika, Asada Rie, Urano Fumihiko, Yanagida Kanta, Okochi Masayasu, Kudo Yukitsuka, Matsumoto Masaki, Nakayama Keiichi I., Imaizumi Kazunori	4. 巻 34
2. 論文標題 Production of BBF2H7 derived small peptide fragments via endoplasmic reticulum stress dependent regulated intramembrane proteolysis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 865 ~ 880
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.201901748R	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Wu Yan, Kimura Yuka, Okamoto Takumi, Matsuhisa Koji, Asada Rie, Saito Atsushi, Sakaue Fumika, Imaizumi Kazunori, Kaneko Masayuki	4. 巻 9
2. 論文標題 Inflammatory bowel disease-associated ubiquitin ligase RNF183 promotes lysosomal degradation of DR5 and TRAIL-induced caspase activation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 20301
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-56748-6	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 Maeoka Yujiro, Okamoto Takumi, Wu Yan, Saito Atsushi, Asada Rie, Matsuhisa Koji, Terao Miho, Takada Shuji, Masaki Takao, Imaizumi Kazunori, Kaneko Masayuki	4. 巻 514
2. 論文標題 Renal medullary tonicity regulates RNF183 expression in the collecting ducts via NFAT5	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 436 ~ 442
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.04.168	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 岡元拓海、今泉和則、金子雅幸
2. 発表標題 高浸透圧条件下での腎特異的ユビキチンリガーゼRNF183とオートファジーの関連性の解析
3. 学会等名 日本薬学会 第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 金子雅幸、岡元拓海、今泉和則
2. 発表標題 ユビキチンリガーゼRNF183は高浸透圧環境下でNKCC1のライソゾームにおける分解を促進する
3. 学会等名 第94回日本薬理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡元拓海、呉艶、今泉和則、金子雅幸
2. 発表標題 腎特異的ユビキチンリガーゼRNF183はNKCC1をユビキチン化することで分解を促進する
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 金子雅幸、岡元拓海、今泉和則
2. 発表標題 高浸透圧により誘導されるユビキチンリガーゼRNF183はNKCC1をライソソームで分解する
3. 学会等名 第73回日本薬理学会西南部会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 金子雅幸、岡元拓海、今泉和則
2. 発表標題 浸透圧ストレスによって誘導されるユビキチンリガーゼRNF183はNa ⁺ , K-ATPaseとNKCC1のライソソームでの分解を促進する
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 金子雅幸、岡元拓海、前岡侑二郎、今泉和則
2. 発表標題 近位ヒオチン標識法を用いたRNF183の基質同定と浸透圧調節機構
3. 学会等名 新学術領域研究「ケモユビキチン」第3回領域班会議（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Wu Y, Okamoto T, Imaizumi K, Kaneko M.
2. 発表標題 Inflammatory bowel disease-associated ubiquitin ligase RNF183 promotes lysosomal degradation of DR5 and TRAIL-induced caspase activation
3. 学会等名 ASCB EMBO2019 meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡元拓海、呉艶、今泉和則、金子雅幸
2. 発表標題 高浸透圧によって誘導されるユビキチンリガーゼRNF183の機能解析
3. 学会等名 第2回オルガネラ・ゾーン若手の会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 呉艶、岡元拓海、今泉和則、金子雅幸
2. 発表標題 炎症性腸疾患に関連するユビキチンリガーゼRNF183はリソソームでのDR5の分解およびTRAILが誘導されたカスパーゼの活性化を促進する
3. 学会等名 第136回日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡元拓海、呉艶、今泉和則、金子雅幸
2. 発表標題 高浸透圧ストレスにより誘導されるユビキチンリガーゼRNF183の生理機能解析
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金子雅幸、前岡侑二郎、岡元拓海、今泉和則
2. 発表標題 腎集合管に発現するユビキチンリガーゼRNF183の高浸透圧に対する誘導機構
3. 学会等名 第135回日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡元拓海、呉艶、今泉和則、金子雅幸
2. 発表標題 ユビキチンリガーゼRNF183によりユビキチン化されたNa, K-ATPaseは細胞膜からライソゾームへ移行する
3. 学会等名 第60回日本生化学会 中国・四国支部例会
4. 発表年 2019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
---------	---------