

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06595

研究課題名(和文) ゲノム編集を用いた浸透圧関連ユビキチンリガーゼの生理的基質同定と大腸炎への関与

研究課題名(英文) Identification of physiological substrates of osmotic stress-responsive ubiquitin ligase using genome editing, and its involvement in colitis

研究代表者

金子 雅幸 (KANEKO, Masayuki)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(薬学系)・教授

研究者番号：10322827

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：腎臓特異的に発現するユビキチンリガーゼRNF183が、なぜ集合管に発現するか、生理的な機能についてはまだ解明できていない。そこで本研究では、ビオチンリガーゼをRNF183遺伝子にノックインすることで、ビオチン化されたRNF183のユビキチン化基質タンパク質を生理的条件下で同定する方法を確立した。また、RNF183の基質としてイオントランスポーターNKCC1を同定し、RNF183はK63型ポリユビキチン化によりNKCC1をリソソームで分解することを明らかにした。さらに、RNF183の過剰発現およびノックアウトにより、高浸透圧ストレスに対する細胞の恒常性が破綻することを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

RNF183はNKCC1などのイオントランスポーターを分解誘導することで、集合管では高浸透圧環境に長期的に適応するために働いていると考えられる。一方で、RNF183は炎症性腸疾患の大腸で高発現していることから、大腸などRNF183の発現が増加した組織ではイオントランスポーターの分解が進み、イオン恒常性に異常を来す可能性が示された。これらのことから、本研究の成果は炎症性腸疾患病態メカニズム解明に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The physiological function of the kidney-specific ubiquitin ligase RNF183 and why it is expressed in the collecting duct remains to be elucidated. In this study, we established a method to identify the ubiquitinated substrate protein biotinylated by RNF183 under physiological conditions by knocking-in the biotin ligase to the RNF183 gene. We also identified the ion transporter NKCC1 as a substrate of RNF183 and showed that RNF183 degraded NKCC1 lysosomally through K63-linked polyubiquitination. Furthermore, overexpression and knockout of RNF183 disrupted cellular homeostasis in response to hyperosmotic stress.

研究分野：薬理学

キーワード：ユビキチンリガーゼ RNF183 浸透圧 炎症性腸疾患 ゲノム編集 ビオチン イオントランスポーター
リソソーム

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。

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ユビキチン化反応は、三つの酵素を介するカスケード反応によって行われる。そのうちユビキチンリガーゼは、タンパク質の認識とユビキチン化を触媒する律速酵素であり、その数は 600 種を超えとも言われている。一方、ユビキチン化はプロテアソームによるタンパク質の分解だけに限らず、形成するポリユビキチン鎖のパターンによりシグナル伝達やタンパク質の輸送など、基質タンパク質を巧みに調節していると考えられるが、その機構や生理的意義はまだ不明なものが多い。そこで研究代表者らは、オルガネラ膜に局在する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 種の同定に成功した。

研究代表者らは、その 37 種のうち腎臓特異的に発現する RNF183 に焦点を当てた。RNF183 の組織分布を明らかにするため、研究代表者らは CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集により RNF183 遺伝子に緑色蛍光タンパク質 GFP を挿入したノックインマウスを作製し (図 1A)、RNF183 の腎臓における局在を明らかにした。その結果、RNF183 は腎集合管に局在することが判明した (図 1B)。

腎集合管は生体の中で唯一、高浸透圧環境下にある組織である。そこで、研究代表者らは RNF183 の高浸透圧ストレスによる発現誘導機構を解析したところ、高浸透圧ストレス応答転写因子 NFAT5 を介して転写誘導されることが明らかとなった (図 1C)。

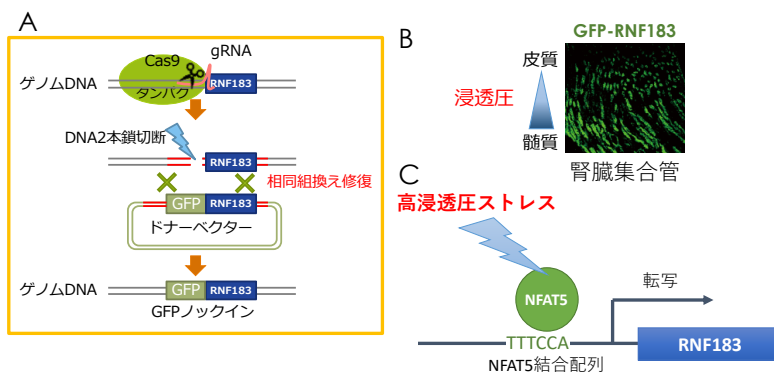


図 1. RNF183 の腎集合管における発現と高浸透圧による誘導機構

高浸透圧環境になると、細胞は水分の流出を防ぐためにイオントランスポーターを活性化させ、細胞体積を維持する。しかし、イオン強度が高い状態では細胞の機能が障害されるため、アルドース還元酵素やタウリントランスポーターなどを NFAT5 によって誘導し、有機物質を細胞内に蓄積させることで長期的に細胞体積を維持することで、高浸透圧環境に適応する。そこで、RNF183 はなぜ高浸透圧環境下で発現するのかという疑問が生じた。

2. 研究の目的

さらに、RNF183 の機能を明らかにするため、RNF183 によるユビキチン化基質の同定を行った。しかし、一般的にユビキチンリガーゼは基質との結合が弱く、一過性であるため、基質同定が困難である。そこで研究代表者らは、近位ビオチン標識法を用いてユビキチンリガーゼの基質を同定することにした。ビオチンリガーゼである

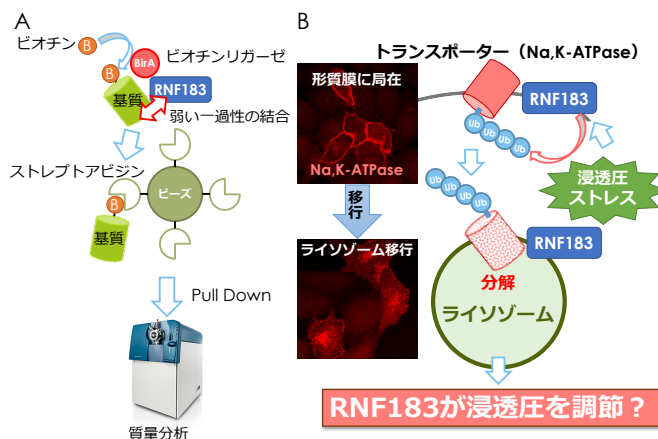


図 2. 近位ビオチン標識法による基質同定とユビキチン化

BirA を融合した RNF183 を細胞内に発現させることで、RNF183 の近傍タンパク質をビオチン化し、ビオチンと結合するストレプトアビジンを用いて、ビオチン化されたタンパク質を質量分析で同定した (図 2A)。その結果、浸透圧調節に関与すると考えられるトランスポーターがいくつか同定された。その中で、Na,K-ATPase のサブユニットに注目し、RNF183 はタンパク輸送に関わる K63 型ユビキチン化により Na,K-ATPase をリソソームに輸送し、分解を促進することを見いだした (図 2B)。

一方、RNF183 のノックアウトマウスを作製したところ、特に腎機能には大きな影響は認められず、Na,K-ATPase のタンパク量に変化はなかった。その理由として、RNF183 の近縁遺伝子には RNF186 や RNF152 など同じく腎臓に発現するユビキチンリガーゼが存在するため、それらの重複性により代償機構が働いている可能性が考えられる。また、RNF183 の基質の同定は HEK293 細胞を用いたため、集合管とは発現するタンパク質が異なっていた可能性が考えられる。そこで、RNF183 の高浸透圧に関連した基質を集合管において同定することで、RNF183 の生理機能を明らかにすることが必要だという結論に至った。

そこで本研究では、ゲノム編集の技術を駆使し、RNF183 の基質を生理的な条件下で同定する。また、RNF183 の近縁遺伝子についても同様に同定することで、これら遺伝子の腎臓における機能を明らかにするとともに関連した炎症性腸疾患への関与を明らかにする。

- ① ビオチンリガーゼノックインによる RNF183 の生理的基質同定
- ② 同定した基質タンパク質のユビキチン化の役割 (浸透圧調節への関与)
- ③ 近縁遺伝子 RNF186・RNF152 との重複性と代償性の検証
- ④ 大腸炎における RNF183 の基質同定と浸透圧ストレスの関与

3. 研究の方法

(1) 集合管細胞 mIMCD-3 を用いた高浸透圧下における RNF183 の基質同定 (①)

RNF183 の生理的基質を同定するため、集合管細胞 mIMCD-3 の RNF183 遺伝子にビオチンリガーゼ BioID2 (BirA より高活性) をゲノム編集 (PITCh 法) によりノックインすることで、生理的な発現レベルで RNF183 の基質同定を試みる。ノックインした細胞を単離するため、ピューロマイシン耐性遺伝子と BioID2-3×FLAG-RNF183 との間を T2A 配列でつなぐことで、高浸透圧下でピューロマイシン耐性遺伝子と BioID2-3×FLAG-RNF183 を別々に発現させる。そして、ストレプトアビジンビーズを用いて、ビオチン化された RNF183 近傍タンパク質を回収し、LC-MS/MS により同定する (図 3A)。

(2) ノックインマウスを用いた高浸透圧下における RNF183 の基質同定 (①)

IMCD 細胞で行ったノックインをマウス個体レベルで行う。マウスでは、ピューロマイシン耐性遺伝

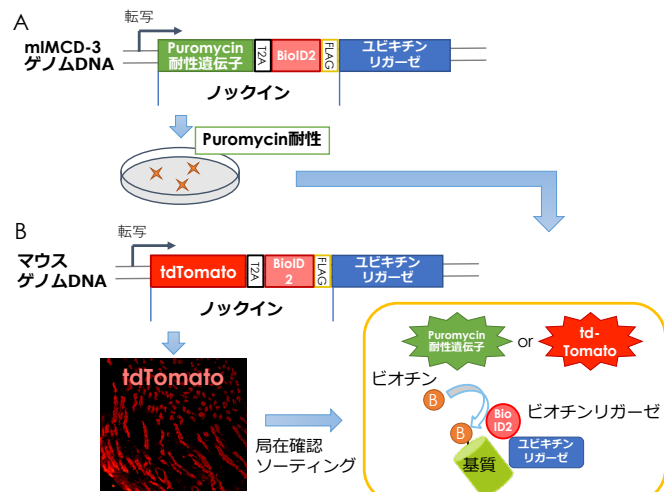


図 3. ビオチンリガーゼのノックイン

子の代わりに蛍光タンパク質 tdTomato をノックインすることで、BioID2-3×FLAG-RNF183 を発現する細胞を tdTomato により検出できるようにする。この方法により、tdTomato の蛍光を用いて BioID2-3×FLAG-RNF183 を発現した細胞をセルソーターで分離することもできる (図 3B)。

(3) 同定した基質タンパク質のユビキチン化関連の解析と浸透圧調節への影響 (②)

同定した近傍タンパク質が RNF183 の基質となるか、細胞レベルで結合やユビキチン化の様式を確認し、分解速度や細胞内局在の変化についても解析する。また、RNF183 のノックアウトマウスを用いて、腎臓における発現量に変化がないか検証する。さらに、基質タンパク質のユビキチン化が浸透圧調節に関係するか、細胞体積への影響について検討する。

(4) RNF183・RNF186・RNF152 のトリプルノックアウトマウスの解析 (③)

RNF183 単独では顕著な変化が認められないことから、RNF183 の近縁遺伝子で腎臓に発現する RNF186、RNF152 を加えたトリプルノックアウトマウスを用いて解析する。RNF183 の基質として同定されたタンパク質の発現量や、尿の生化学的数値の変化について調べる。

(5) 大腸炎における RNF183 の基質同定と浸透圧ストレスの関与 (④)

RNF183 は炎症性腸疾患 (IBD) 患者の大腸で発現が増加しており、大腸炎を引き起こすデキストラン硫酸ナトリウム DSS によって大腸上皮細胞における RNF183 の発現が増加することが明らかとなった。さらに、RNF183 ノックアウトマウスにおいて DSS による大腸炎の諸症状が緩和され、炎症マーカーの発現も顕著に抑制されていることが判明した。そこで、大腸における RNF183 の基質をビオチンリガーゼノックインマウスを用いて同定する。腎集合管における基質と比較し、浸透圧調節と関連したものに注目することで、浸透圧ストレスと炎症性腸疾患との関係について明らかにする。

4. 研究成果

(1) 集合管細胞 mIMCD-3 を用いた高浸透圧下における RNF183 の基質同定 (①) :

RNF183 遺伝子にビオチンリガーゼ BioID2 と FLAG タグをゲノム編集によりノックインするためのドナーベクターを作製した。ノックインした細胞を単離するため、蛍光タンパク質 tdTomato と BioID2-3×FLAG-RNF183 との間を T2A 配列でつなぐことで、tdTomato と BioID2-3×FLAG-RNF183 を別々に発現させることにした。HEK293 細胞においてこれらの遺伝子を発現させたところ、tdTomato と BioID2-3×FLAG-RNF183 がそれぞれ独立して発現することを確認できた。そこで、ピューロマイシン耐性遺伝子と BioID2-3×FLAG-RNF183 との間を T2A 配列でつないだ遺伝子を mIMCD-3 細胞に PITCh 法によりノックインした。結果的に、ノックインした細胞は得られなかった。

(2) ノックインマウスを用いた高浸透圧下における RNF183 の基質同定 (②) :

tdTomato と BioID2-3×FLAG-RNF183 との間を T2A 配列でつなぐことで、tdTomato と BioID2-3×FLAG-RNF183 を別々に発現させるノックインマウスを作出し、ゲノムシーケンズにより tdTomato と BioID2-3×FLAG-RNF183 の遺伝子の挿入を検出した。腎臓の抽出物において、tdTomato と BioID2-3×FLAG-RNF183 の発現をそれぞれ確認できた。つぎに、ビオチン化タンパク質をストレプトアビジンビーズを用いてプルダウンしたところ、ビオチン化したタンパク質が認められたことから、マウス組織において近位ビオチン標識法を確

立できた。

(3) **同定した基質タンパク質のユビキチン化関連の解析と浸透圧調節への影響 (②) :**

同定した RNF183 の基質 Na-K-2Cl 共輸送体 NKCC1 について解析を行った。NKCC1 は RNF183 と結合し、RNF183 によってエンドサイトーシスを誘導する K63 型のポリユビキチン化を受けることが明らかとなった。K63 型ユビキチン鎖は一般的に基質タンパク質のエンドサイトーシスとリソソームへの輸送を促進する。さらに、細胞膜に局在する NKCC1 が RNF183 存在下では細胞内へ移行し、この局在変化は高浸透圧ストレスにより促進されることが分かった。また、RNF183 による NKCC1 のタンパク質量の減少がリソソームの障害で抑制されたことから、RNF183 は NKCC1 をリソソームに輸送することで分解を促進していることが示唆された。このことから、RNF183 は NKCC1 に対して K63 型ユビキチン鎖を形成することで、リソソームへの輸送を促進し、NKCC1 の分解によるダウンレギュレーションに働くことが本研究で証明された。

また、RNF183 による NKCC1 のユビキチン化部位を同定するため、NKCC1 の N 末端欠失変異体および C 末端欠失変異体を作製し、ユビキチン化部位の同定を行った。その結果、NKCC1 の C 末端欠失変異体において RNF183 による分解が阻害されたことから、RNF183 が NKCC1 の N 末端をユビキチン化することが示唆された。

(4) **RNF183・RNF186・RNF152 のトリプルノックアウトマウスの解析 (③) :**

RNF183・RNF186・RNF152 のトリプルノックアウトマウスを作出したが、明らかな変化は認められなかった。今後は、大腸炎を誘導するなど、ストレス下での影響を検証していく予定である。

(5) **大腸炎における RNF183 の基質同定と浸透圧ストレスの関与 (④) :**

RNF183 による NKCC1 分解の生理的意義について検証するため、高浸透圧環境下で RNF183 が発現する集合管由来 IMCD-3 細胞の RNF183 ノックアウト細胞を樹立した。また、RNF183 が発現していない大腸上皮由来 CaCo-2 細胞を用いて RNF183 を過剰発現した細胞を作製し、それぞれ高浸透圧ストレスによるアポトーシス誘導への影響を解析した。その結果、いずれの細胞においてもアポトーシスが増加することが判明した。さらに、この時の細胞内 Na イオン濃度を定量したところ、いずれの細胞も野生型の細胞と比較して細胞内 Na イオン濃度が変化し、Na イオンの恒常性が破綻していることが明らかとなった。以上のことから、RNF183 は NKCC1 などイオントランスポーターの分解を制御することで、集合管や大腸における浸透圧恒常性の維持に働いていることが示唆された。

RNF183 は NKCC1 などのイオントランスポーターを分解誘導することで、集合管などでは高浸透圧環境に長期的に適応することが可能になると考えられる。一方で、大腸など RNF183 の発現が増加した組織では、イオントランスポーターの分解が進み、イオン恒常性に異常を来す。これらのことから、本研究成果は炎症性腸疾患病態メカニズムの解明に寄与したと言える。

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 1件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Saito Atsushi, Kamikawa Yasunao, Ito Taichi, Matsuhisa Koji, Kaneko Masayuki, Okamoto Takumi, Yoshimaru Tetsuro, Matsushita Yosuke, Katagiri Toyomasa, Imaizumi Kazunori	4. 巻 42
2. 論文標題 p53-independent tumor suppression by cell-cycle arrest via CREB/ATF transcription factor OASIS	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 112479 ~ 112479
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2023.112479	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 Kamikawa Yasunao, Saito Atsushi, Matsuhisa Koji, Kaneko Masayuki, Asada Rie, Horikoshi Yasunori, Tashiro Satoshi, Imaizumi Kazunori	4. 巻 7
2. 論文標題 OASIS/CREB3L1 is a factor that responds to nuclear envelope stress	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Death Discovery	6. 最初と最後の頁 152
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41420-021-00540-x	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 該当する

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 金子雅幸
2. 発表標題 近位ヒオチン標識法を用いたユビキチンリガーゼと基質の相互作用解析
3. 学会等名 令和5年度 日本生化学会九州支部例会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 東優稀、岡元拓海、金子雅幸
2. 発表標題 高浸透圧誘導性ユビキチンリガーゼRNF183によるNKCC1の分解が細胞に与える影響の解析
3. 学会等名 日本生化学会九州支部例会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 東優稀、岡元拓海、金子雅幸
2. 発表標題 イオントランスポーターの分解に関与する腎臓特異的ユビキチンリガーゼRNF183が高浸透圧環境下において細胞に与える影響の解析
3. 学会等名 第97回日本薬理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岡元拓海、金子雅幸
2. 発表標題 高浸透圧ストレス誘導性ユビキチンリガーゼRNF183によるイオントランスポーター制御の解析
3. 学会等名 小胞体ストレス研究会若手の会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 東優稀、岡元拓海、金子雅幸
2. 発表標題 高浸透圧適応における腎臓特異的ユビキチンリガーゼRNF183の機能解析
3. 学会等名 次世代を担う若手のための創薬・医療薬理シンポジウム2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 東優稀、岡元拓海、金子雅幸
2. 発表標題 腎臓特異的ユビキチンリガーゼRNF183によるイオントランスポーターNKCC1の分解機構
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岡元拓海、金子雅幸
2. 発表標題 腎臓特異的コピキチンリガーゼRNF183の機能および疾患との関連性の解析
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岡元拓海、今泉和則、金子雅幸
2. 発表標題 浸透圧誘導性コピキチンリガーゼRNF183はNKCC1のリソソーム分解を促進する
3. 学会等名 生体機能と創薬シンポジウム2021
4. 発表年 2021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
研究分担者	高田 修治 (TAKADA Shuji) (20382856)	国立研究開発法人国立成育医療研究センター・システム発生・再生医学研究部・部長 (82612)	

	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
研究協力者	岡元 拓海 (OKAMOTO Takumi)		
研究協力者	寺尾 美穂 (TERAO Miho)		

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
---------	---------