

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15271

研究課題名（和文）高浸透圧誘導性ユビキチンリガーゼRNF183が関連するオートファジー経路の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the autophagy pathway associated with hyperosmotic-induced ubiquitin ligase RNF183

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）・特別研究員

研究者番号：40826351

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：高浸透圧誘導性ユビキチンリガーゼRNF183はNa,K-ATPaseやNKCC1のようなイオントランスポーターを基質として認識することでそれらのリソソーム分解を促進することを明らかにしており、その分解がオートファジーに関連している可能性があった。しかし、オートファジーに関連する分子ATG5、Beclin1をノックアウトした時、これらの分解の抑制は認められなかった。これより、RNF183によるイオントランスポーターの分解はオートファジーとは違う機構、もしくはATG5やBeclin1非依存的な新たな分解機構であることが示唆された。また、組織レベルでのRNF183の基質タンパク質同定も進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

RNF183が発現する細胞によってその細胞への影響が異なる可能性を示せた。これは、本来腎臓特異的に発現しているRNF183が、炎症性腸疾患患者の大腸において異常発現している報告があることから、腎臓ではRNF183の発現が細胞保護の働きを、その他の細胞においては細胞死への誘導作用がある可能性を示した。これより、RNF183が炎症性腸疾患の新たな治療ターゲットとなる可能性がある。また、マウスの組織レベルでのユビキチンリガーゼの基質タンパク質の同定を行っており、成功すれば、様々なタンパク質の生理条件下での機能解析への貢献が期待できる。

研究成果の概要（英文）：The hyperosmotic-induced ubiquitin ligase RNF183 promotes the lysosomal degradation of ion transporters such as Na,K-ATPase and NKCC1 which were recognized as substrates by RNF183. There was a possibility that their degradation may be related to autophagy. However, when autophagy-related molecules ATG5 or Beclin1 were knocked out, no inhibition of their degradation was observed. This suggests that the degradation of ion transporters by RNF183 is a mechanism different from autophagy or a new degradation mechanism that is ATG5- and Beclin1-independent. We are also in the process of identifying the substrate proteins of RNF183 at the tissue level.

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 高浸透圧ストレス NKCC1 ユビキチンリガーゼ

1. 研究開始当初の背景

研究代表者はこれまでに、ユビキチンリガーゼ RNF183 が組織において唯一常時高浸透圧環境である腎臓に特異的発現を示し、かつ、高浸透圧ストレスによって発現誘導されることを見出してきた (*J Biol Chem* 2019, 294: 101-115、*Biochem Biophys Res Commun* 2019, 514: 436-442)。そのため、RNF183 が腎臓において重要な役割を担っていることが推測されている。RNF183 の腎臓における機能は依然不明であるが、意外なことに、大腸がんや炎症性腸疾患 (IBD: inflammatory bowel disease) の患者の大腸において通常発現していない RNF183 の発現が上昇していることが多数報告されている (*J Crohns Colitis* 2016, 10: 713-25、*Chin J Cancer* 2017, 36: 63、*Cell Death Dis* 2017, 8: e2994、*Mol Cell Biol* 2019, 39: e00138-19)。RNF183 の基質タンパク質としては TNF スーパーファミリーの一つである TRAIL 受容体の DR5 や Na,K-ATPase β 1 サブユニットを同定してきた (*Sci Rep* 2019, 9: 20301、*Biochem Biophys Res Commun* 2020, 521: 1030-1035)。さらに、RNF183 ノックアウトマウスを用いてデキストラン硫酸ナトリウム (DSS) による大腸炎への影響を解析すると、RNF183 ノックアウトマウスにおいて大腸炎が劇的に緩和されることを発見し、RNF183 の大腸での異常発現が IBD 発症に関わることが示唆された。しかし、RNF183 の生理機能がいまだ解明されていないため、RNF183 が大腸がんや IBD の発症にどのように関与しているかも解明できておらず、RNF183 が関与した IBD の発症機序を解明するためにも、RNF183 の生理機能の解明が必須である。

2. 研究の目的

RNF183 の基質タンパク質として新たにイオントランスポーター NKCC1 を同定し、NKCC1 は RNF183 により K63 型ポリユビキチン化されることを見出した。RNF183 過剰発現細胞において NKCC1 への影響を検証したところ、本来細胞膜に局在する NKCC1 が RNF183 と共発現させることで細胞内へ移行し、分解されることを見出した。また、内在化した NKCC1 がオートファジーのマーカーである p62 と一致し、さらに、高浸透圧ストレスを付加すると RNF183 による NKCC1 の細胞内への内在化が促進される結果も得た。近年、高浸透圧ストレスが ULK1 非依存性オートファジー経路を誘導することが報告された (*Mol Cell Biol* 2019, 39: e00024-19) ことから、RNF183 とオートファジーおよび高浸透圧ストレスとの関連性が示唆されるが、その詳細な経路については未解明である。本研究では、高浸透圧ストレスによる新たなオートファジー経路の可能性および RNF183 の関与について検証を行った。また、高浸透圧ストレスによる新たなオートファジー経路の可能性および RNF183 の関与の検証には RNF183 の生理機能の解明も必須であるため、これまでの過剰発現系による解析ではなく、より生理条件に近い条件での RNF183 の基質タンパク質を同定する。

3. 研究の方法

RNF183 とオートファジーの関連性を検証するため、オートファジー関連分子である ATG5 もしくは Beclin1 のノックアウト細胞を構築し、RNF183 による NKCC1 の分解が抑制されるか検証した。また、内在性 RNF183 の発現が確認できている mIMCD 細胞と内在性 RNF183 が発現していない HEK293 細胞に RNF183 を発現させた場合で、細胞に及ぼす影響を検証した。

RNF183 の生理的基質タンパク質の同定については、内在性 RNF183 の発現が確認できている mIMCD 細胞において RNF183 にビオチンリガーゼ BioID2 を融合した BioID2 ノックイン細胞の作製を PITCh 法によって行った。mIMCD 細胞において RNF183 は高浸透圧環境下で転写因子 NFAT5 によって発現誘導されるため、mIMCD 細胞に高浸透圧を付加して RNF183 の発現を誘導させたときの RNF183 近傍タンパク質の同定を試みる予定だったが、培養細胞におけるノックインは成功率が依然低い、かつ、mIMCD 細胞のトランスフェクション効率が低いため、BioID2 ノックイン細胞が取得できなかった。そこで、他のアプローチとしてポリユビキチン鎖に高い親和性を持つ人工タンパク質である TUBE (Tandem Ubiquitin Binding Entity)を用いた解析を行った。ユビキチン化されたタンパク質は速やかに分解、もしくは脱ユビキチン化されるが、TUBE が存在するとポリユビキチン鎖に TUBE が結合することで、分解や脱ユビキチン化を阻害し、ユビキチン化タンパク質を安定に保持することが出来る。まず、mIMCD 細胞において RNF183 ノックアウト細胞を作製し、次に、野生型および RNF183 ノックアウト mIMCD 細胞においてドキシサイクリンによる 3xFLAG-TUBE の発現誘導細胞の作製を行った。RNF183 存在下、非存在下で 3xFLAG-TUBE を発現させ、RNF183 存在下において増加したユビキチン化タンパク質を同定することで RNF183 の生理的基質の同定を試みた。さらに、組織レベルでのユビキチンリガーゼの基質タンパク質の同定法を確立するため、RNF183 に BioID2 を融合した BioID2 ノックインマウスの作製も行った。

4. 研究成果

ドキシサイクリンにより 3xFLAG-RNF183 を発現誘導する HEK293 細胞において、CRISPR/Cas9 により ATG5 および Beclin1 のノックアウト細胞を構築した。構築した ATG5 およ

び Beclin1 ノックアウト細胞を用いて、ドキシサイクリンを加えてからの 3xFLAG-RNF183 発現誘導時間依存的な NKCC1 の発現量の変化を検証した。すると、ATG5 および Beclin1 ノックアウト細胞における NKCC1 の発現量は野生型と同様に 3xFLAG-RNF183 発現誘導時間依存的に減少した。このことから、RNF183 による NKCC1 の分解経路は ATG5 および Beclin1 に依存しない経路であることが示唆された。また、mIMCD 細胞において RNF183 をノックダウンすると、高浸透圧ストレス負荷時、アポトーシスが誘導されるが、内在性 RNF183 が発現していない HEK293 細胞においては RNF183 を発現させた細胞において、高浸透圧ストレス負荷時、アポトーシスが誘導された。このことから、RNF183 は本来、高浸透圧ストレスに対する細胞保護の役割があるが、本来発現していない細胞においては逆の影響を示すことが示唆された。

RNF183 の生理的基質タンパク質の同定においては、当初予定していた mIMCD 細胞における RNF183 にビオチンリガーゼ BioID2 を融合した BioID2 ノックイン細胞を用いた解析は BioID2 ノックイン細胞の作製がうまくいかなかった。そこで、TUBE を用いた解析を行うことにした。この解析に必要な RNF183 ノックアウト mIMCD 細胞、野生型および RNF183 ノックアウト mIMCD 細胞における 3xFLAG-TUBE 発現誘導細胞を作製し、作製した細胞を用いて、高浸透圧ストレスおよびドキシサイクリンを加えてから 12 時間後（ドキシサイクリンによる 3xFLAG-TUBE の発現が十分量となり、野生型では内在性 RNF183 の発現がみられる時間）に細胞を回収し、抗 FLAG 抗体によりユビキチン化タンパク質が回収できるか検証したところ、効率よくユビキチン化タンパク質の回収ができることが確認できた。また、組織特異性の高いタンパク質はその組織において重要な役割を担っていることが容易に予想できるが、培養細胞等においても高い発現特異性を示すことが多く、その本来の機能解析が困難なことが多い。本研究で、RNF183 に BioID2 を融合した BioID2 ノックインマウスの作製に成功しており、今後の解析により組織レベルにおけるユビキチンリガーゼの基質タンパク質同定法確立におおいに期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

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 第15回小胞体ストレス研究会
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 皆川直樹、岡元拓海、金子雅幸
2. 発表標題 mRNAワクチンへの応用へ向けた分泌効率の良いシグナルペプチドの同定
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 末長弘基、岡元拓海、金子雅幸
2. 発表標題 SARS-CoV-2受容体ACE2のコピキチン化によるエンドサイトーシスと分解機構の解析
3. 学会等名 第39回日本薬学会九州山口支部大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 皆川直樹、平田悠朗、金子雅幸、岡元拓海
2. 発表標題 mRNAワクチンへの応用へ向けた分泌効率の良いシグナルペプチドの同定
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岡元拓海、金子雅幸
2. 発表標題 腎臓特異の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 末長弘基、岡元拓海、金子雅幸
2. 発表標題 SARS-CoV-2スパイクタンパク質が誘導するACE2のコピキチン化によるエンドサイトーシスと分解機構の解析
3. 学会等名 日本薬学会 第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岡元拓海、今泉和則、金子雅幸
2. 発表標題 腎臓特異的ユビキチンリガーゼRNF183の発現誘導機構および生理機能の解析
3. 学会等名 2021年度 新学術領域「オルガネラゾーン」zoom班会議 若手発表
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡元拓海、今泉和則、金子雅幸
2. 発表標題 浸透圧誘導性ユビキチンリガーゼ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
---------------------------	-----------------------	----

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