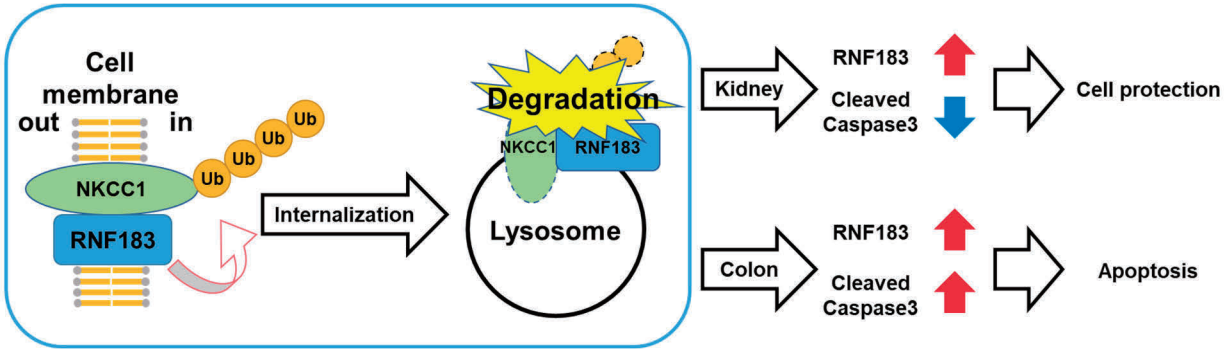
115　高浸透圧ストレスに着目した炎症性腸疾患発症機序解明	岡元　拓海

【目的】炎症性腸疾患（IBD：inflammatory bowel disease）は発症機序が解明されていない難病である。本研究で着目しているユビキチンリガーゼ RNF183 は、腎臓特異的発現を示し、高浸透圧ストレスにより発現誘導されるユニークなユビキチンリガーゼである。IBD 患者の大腸において、本来大腸に発現していない RNF183 の発現が異常に亢進しているということが報告されたため、この大腸での RNF183 の異常発現と IBD の関連性に着目し、高浸透圧ストレスの観点から IBD 発症機序の解明を目指す。また、ゲノム編集技術を駆使した新たなユビキチンリガーゼ研究のモデルの構築にも挑戦する。

【方法】これまでに RNF183 を過剰発現させた HEK293 細胞を用いて RNF183 の基質タンパク質として同定してきた NKCC1 について、内在性 Rnf183 の発現が確認できている mIMCD 細胞や大腸由来細胞である CaCo2 細胞において検証を行った。また、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 にビオチンリガーゼ BioID2 を融合した BioID2 ノックインマウスの作製を行った。

【結果】HEK293 細胞を用いた過剰発現系での結果と同様に、mIMCD 細胞、CaCo2 細胞においても RNF183 が NKCC1 を基質タンパク質として認識し、分解を促進することが分かった。また、これまでの研究で、mIMCD 細胞において、*Rnf183* をノックダウンし、高浸透圧条件下で培養したところ、活性型カスパーゼ 3 の増加がみられていたが、本来 RNF183 を発現していない HEK293 細胞においては逆の結果が得られた。これより、IBD 患者の大腸において、RNF183 が異常発現することで活性型カスパーゼ 3 が増加している可能性が示唆された。

RNF183 は NKCC1 のリソソーム分解を促進する



115. 高浸透圧ストレスに着目した炎症性腸疾患発症機序解明

岡元　拓海

長崎大学 薬学部 創薬薬理学研究室

Key words : RNF183，ビオチンリガーゼ，イオントランスポーター，高浸透圧ストレス，炎症性腸疾患

緒　言

タンパク質の翻訳後修飾の一つであるユビキチン化反応は、ユビキチン活性化酵素（E1）、ユビキチン結合酵素（E2）、ユビキチンリガーゼ（E3）を介する一連の酵素反応カスケードによって行われる。ユビキチン化は、タンパク質のプロテアソーム分解に関与しているだけでなく、シグナル伝達、DNA 修復、エンドサイトーシス、リソソーム分解などの細胞内の様々な機能制御に関与している。哺乳類においては、ユビキチンは一種類のみで、E1 は 10 種以下、E2 は数十種類、E3 は数百種類も存在すると言われており、これらにより、数千の基質タンパク質をユビキチン化することでタンパク質を制御している。当研究室では、これまでに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 種のユビキチンリガーゼの同定に成功した［1］。それらの組織分布を解析したところ高い組織特異性を示す 4 遺伝子を見出し、そのうち腎臓特異的に発現しているユビキチンリガーゼ RNF183 について解析を行ってきた。腎臓が通常組織において唯一、常時高浸透圧環境である特徴的な臓器であることに着目し、高浸透圧と RNF183 の関連性を解析することで、RNF183 は腎臓の中でも特に厳しい高浸透圧環境である集合管に特異的に発現しており、さらに、RNF183 の発現は高浸透圧ストレスによって誘導されることを見出してきた［2，3］。RNF183 の生理的機能は解明されていないが、近年、驚くべきことに潰瘍性大腸炎やクローン病を含む炎症性腸疾患（IBD：inflammatory bowel disease）患者の大腸において RNF183 の発現が上昇していることが多数報告された［4～7］。IBD 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。

当研究室では、*RNF183* ノックアウトマウスを作製し、IBD モデルマウスの作製に用いられる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したところ、*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た。また、*RNF183* ノックアウトマウスにおいて DSS 投与による炎症性サイトカインやケモカインの発現が顕著に抑制されることも見出したため、RNF183 の大腸での異常発現が IBD 発症に関わることが強く示唆された。そこで、本研究では、高浸透圧ストレスと IBD の関連性に着目し、IBD 発症機序解明を目指した研究を行った。

方法および結果

1. mIMCD 細胞および CaCo2 細胞における RNF183 による NKCC1 の分解の検証

これまでの HEK293 細胞を用いた研究において、RNF183 が 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 NKCC1 のリソソーム分解を促進することを明らかにしてきた。しかし、HEK293 細胞は本来 RNF183 を発現しておらず（高浸透圧ストレスを付加しても RNF183 の発現は誘導されない）、NKCC1 が RNF183 の本来の基質タンパク質であるか検証する必要があった。RNF183 の発現は組織だけでなく、培養細胞においても高い特異性を示し、ウェスタンブロットによるタンパク質レベルでの検出が可能なのは現在のところマウス腎髄質集合管細胞由来の mIMCD 細胞に高浸透圧ストレスを付加した条件下のみである。そこで、mIMCD 細胞において *Rnf183* ノックアウト細胞を作製し、高浸透圧ストレスを付加した条件で、Nkcc1 の発現量の変化

を検証した。すると、野生型細胞と *Rnf183* ノックアウト細胞での差がみられなかった。そこで、試しに *Rnf183* ノックアウト細胞に Rnf183 を発現させたところ、Nkcc1 の発現量は減少した。

また、IBD と RNF183 の関連性を検証するため、大腸由来の CaCo2 細胞を用いた検証を行った。まず、CaCo2 細胞においても mIMCD 細胞と同様に高浸透圧ストレスにより RNF183 の発現が誘導されるか検証するため、塩化ナトリウムおよびスクロースを用いて高浸透圧ストレスを加え、RNF183 の mRNA 量を測定したが、RNF183 は発現誘導されていなかった。そこで、ドキシサイクリンによる RNF183 の発現誘導細胞を構築し、CaCo2 細胞における RNF183 による NKCC1 の分解について検証した。すると、ドキシサイクリンによって RNF183 を発現させると、NKCC1 の発現量が減少し（図 1）、さらに、免疫染色を行うと、通常細胞膜に局在している NKCC1 が、RNF183 の発現誘導によってドット状に局在するようになり、リソソーム分解阻害剤であるクロロキンで処理するとそのドットが増加した。また、この時、RNF183 と NKCC1 は共局在していた（図 2）。

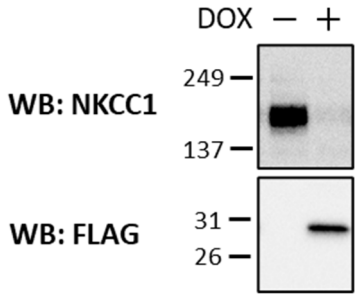


図 1.　CaCo2 細胞における RNF183 による NKCC1 の発現量の変化
ドキシサイクリン（DOX）により 3×FLAG-RNF183 を発現誘導する CaCo2 細胞において、3×FLAG-RNF183 非存在下、存在下での NKCC1 の発現量の変化を検証した。その結果、3×FLAG-RNF183 存在下において NKCC1 が著しく減少することが分かった。

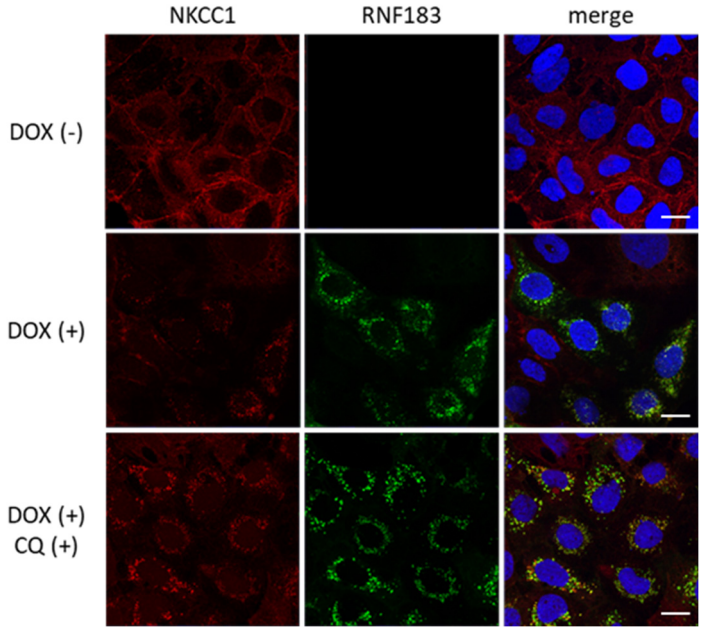


図 2.　CaCo2 細胞における RNF183 による NKCC1 の細胞内局在の変化
3×FLAG-RNF183 非存在下の CaCo2 細胞において、NKCC1 は細胞膜上に局在しているが、DOX により 3×FLAG-RNF183 の発現を誘導すると、NKCC1 はドット状に分布し、その発現量は減少した。さらに、リソソーム分解阻害剤で処理したところ、ドット状に局在する量は増加し、それらは RNF183 と共局在していた。Bar size：20 μ m。

2. RNF183 とカスパーゼ 3 の関連性の検証

これまでの研究で mIMCD 細胞において高浸透圧ストレスを付加したとき、野生型に比べ *Rnf183* をノックダウンした条件では活性型カスパーゼ 3 が増加するという結果を得ていた。そこで、*Rnf183* ノックアウト細胞において、同様に野生型と比較したところ、*Rnf183* ノックアウト細胞において活性型カスパーゼ 3 の増加がみられた。さらに、Rnf183 を安定過剰発現させた HEK293 細胞を用いて、高浸透圧ストレスを付加したときの活性型カスパーゼ 3 の発現量を野生型 HEK293 細胞と比較したところ、Rnf183 安定過剰発現細胞において活性型カスパーゼ 3 が増加するという、mIMCD 細胞とは逆の結果が得られた。CaCo2 細胞においては、検証中ではあるが、HEK293 細胞と同様の傾向がみられている。

3. RNF183 の生理的基質タンパク質の同定

ユビキチンリガーゼの基質タンパク質の同定に限らず、過剰発現系での解析は生理的現象を反映しているか検証する必要がある。特に、組織特異的発現を示すタンパク質の解析は注意が必要である。最初から生理的条件により近い環境下での解析が出来れば、よりスピーディに解析が進む。本研究で着目している RNF183 が発現している腎臓は非常に複雑な構造をしているため、培養細胞においてその環境を模倣するのは困難である。そこで、マウスの組織レベルでの基質タンパク質の同定を可能とするため、ビオチンリガーゼ BioID2 を RNF183 に融合した BioID2 ノックインマウスの作製を行った。ノックインマウス作製の委託先の都合もあり、現段階では BioID2 ノックインマウスの作製にとどまっているが、今後、この BioID2 ノックインマウスを用いて、RNF183 の腎臓における基質タンパク質の同定、さらには、DSS を投与した IBD モデルマウスの大腸における RNF183 の基質タンパク質の同定を行うことで、RNF183 の腎臓での生理的機能や IBD と RNF183 との関連性の解明が期待できる。

BioID2 ノックインマウスの作製に時間を要したため、培養細胞において内在性 Rnf183 の発現がみられる mIMCD 細胞において BioID2 ノックイン細胞の樹立を試みたが、樹立には失敗してしまった。そこで、mIMCD 細胞の野生型細胞と *Rnf183* ノックアウト細胞において、TUBE（Tandem Ubiquitin-Binding Entities）をドキシサイクリンにより発現誘導する細胞の樹立を試みた。TUBE は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り、ユビキチン化されたタンパク質のユビキチン鎖に結合し、保護することで、プロテアソーム分解やリソソーム分解、脱ユビキチン化から保護することが出来る。ユビキチン化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ためにユビキチンリガーゼの基質タンパク質の同定が困難な場合が多いが、TUBE を用いることで克服できると考えている。こちらも mIMCD 細胞のトランスフェクション効率の低さなどにより、細胞の樹立にとどまってしまったが、今後、解析を行い、この TUBE を用いた解析法の有用性を示す。

考　察

mIMCD 細胞、CaCo2 細胞において、過剰発現系ではあるが HEK293 細胞と同様に RNF183 が NKCC1 を基質タンパク質として認識し、リソソーム分解を促進することが示唆された。mIMCD 細胞を用いた内在性 Rnf183 による Nkcc1 の分解は確認できなかったが、これは内在性 Rnf183 の発現量が少なく、ウェスタンブロットによる解析で差が確認できるほどの変化がなかったためではないかと考えている。内在性 Rnf183 による Nkcc1 への影響を解析するため、細胞膜上の Nkcc1 をビオチン化し、高浸透圧ストレスにより Rnf183 の発現を誘導した際、ビオチン化された Nkcc1 の量が変化するか、などの検証を試みる予定である。また、細胞に高浸透圧ストレスが加わった際、細胞体積回復のため細胞内にイオンを取り込むのと同時に水分を吸収する。NKCC1 はこの段階で重要な役割を持つことが知られている。しかし、細胞内にイオンが多く存在する状態は DNA やタンパク質の変性が生じる可能性があり、長期に及ぶ高浸透圧ストレスへはイオントランスポーターの発現量を減らし、有機浸透圧物質トランスポーターの発現量を増加させることで適応する。腎臓は常時高浸透圧環境であるため、イオントランスポーターの発現量を調節する必要があり、その役割を RNF183 が担っていると考えている。一方、大腸

における RNF183 の発現機構は本研究では解明できなかった。今回は塩化ナトリウムおよびスクロースによる高浸透圧ストレスで検証したが、高浸透圧の強さ、時間、浸透圧物質の種類など検討が必要だと考えている。もしくは、高浸透圧ストレスではなくその他の要因によって発現誘導される可能性もあるため、広い視野を持って検証する必要がある。内在性 Rnf183 の発現がみられる mIMCD 細胞と本来 RNF183 が発現していない細胞（HEK293 細胞、CaCo2 細胞）において、活性型カスパーゼ 3 の発現量が逆の挙動を示すことから、本来 RNF183 が発現していない細胞に RNF183 が発現すると、NKCC1 を分解し、細胞内のイオン恒常性が破綻してしまい、細胞死へ繋がるのではないかと考えており、今後は細胞内のイオンの恒常性についても検証していく予定である。

また、今回は BioID2 ノックインマウスの作製にとどまってしまったが、今後、作製した BioID2 ノックインマウスを用いて、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試みる。これに成功すれば、これまでのユビキチンリガーゼの基質タンパク質の同定よりはるかに効率的な生理的基質タンパク質の同定法を提示できる。これにより、より重要な機能を持つと予想できる組織特異的ユビキチンリガーゼの機能解析を加速させることが出来るだろう。

謝　辞

本研究を遂行するにあたり、研究助成による多大なご支援を賜りました公益財団法人上原記念生命科学財団に深謝申し上げます。

文　献

1） Kaneko M, Iwase I, Yamasaki Y, Takai T, Wu Y, Kanemoto S, Matsuhisa K, Asada R, Okuma Y, Watanabe T, Imaizumi K, Nomura Y. Genome-wide identification and gene expression profiling of ubiquitin ligases for endoplasmic reticulum protein degradation. *Sci Rep*. 2016 Aug 3;6:30955. PMID: 27485036 DOI: 10.1038/srep30955

2） Maeoka Y, Wu Y, Okamoto T, Kanemoto S, Guo XP, Saito A, Asada R, Matsuhisa K, Masaki T, Imaizumi K, Kaneko M. NFAT5 up-regulates expression of the kidney-specific ubiquitin ligase gene Rnf183 under hypertonic conditions in inner-medullary collecting duct cells. *J Biol Chem,* 2019 Jan 4;294(1):101-115. Epub 2018 Nov 9. PMID: 30413537 DOI: 10.1074/jbc.RA118.002896

3） Maeoka Y, Okamoto T, Wu Y, Saito A, Asada R, Matsuhisa K, Terao M, Takada S, Masaki T, Imaizumi K, Kaneko M. Renal medullary tonicity regulates RNF183 expression in the collecting ducts via NFAT5. *Biochem Biophys Res Commun*. 2019 Jun 25;514(2):436-442. Epub 2019 May 1. PMID: 31053298 DOI: 10.1016/j.bbrc.2019.04.168

4） Yu Q, Zhang S, Chao K, Feng R, Wang H, Li M, Chen B, He Y, Zeng Z, Chen M. E3 Ubiquitin ligase RNF183 Is a Novel Regulator in Inflammatory Bowel Disease. *J Crohns Colitis*. 2016 Jun;10(6):713-25. Epub 2016 Jan 27. PMID: 26818663 DOI: 10.1093/ecco-jcc/jjw023

5） Geng R, Tan X, Zuo Z, Wu J, Pan Z, Shi W, Liu R, Yao C, Wang G, Lin J, Qiu L, Huang W, Chen S. Synthetic lethal short hairpin RNA screening reveals that ring finger protein 183 confers resistance to trametinib in colorectal cancer cells. *Chin J Cancer*. 2017 Jul 31;36(1):63. PMID: 28756770 DOI: 10.1186/s40880-017-0228-1

6） Geng R, Tan X, Wu J, Pan Z, Yi M, Shi W, Liu R, Yao C, Wang G, Lin J, Qiu L, Huang W, Chen S. RNF183 promotes proliferation and metastasis of colorectal cancer cells via activation of NF-jB-IL-8 axis. *Cell Death Dis*. 2017 Aug 10;8(8):e2994. PMID: 28796265 DOI: 10.1038/cddis.2017.400

7） Gallegos ZR, Taus P, Gibbs ZA, McGlynn K, Gomez NC, Davis I, Whitehurst AW. EWSR1-FLI1 Activation of the Cancer/Testis Antigen FATE1Promotes Ewing Sarcoma Survival. *Mol Cell Biol*. 2019 Jun 27;39(14):e00138-19. Print 2019 Jul 15. PMID: 31036566 DOI: 10.1128/MCB.00138-19