

## ユビキチンリガーゼ RNF183 を標的とした炎症性腸疾患治療薬の開発

広島大学大学院医系科学研究科 分子細胞情報学研究室

岡元 拓海

### 1. 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、プロテアソーム分解への関与に限らず、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ている。ユビキチンリガーゼはユビキチン化の基質となる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る。我々は、膜貫通領域を持つ RING-finger 型 E3 ユビキチンリガーゼに着目して行った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<sup>1)</sup>。このうちの RNF183 について、腎集合管特異的に発現しており、高浸透圧ストレスにより発現誘導されることを明らかにしてきた<sup>2,3)</sup>。しかし、現在、RNF183 の基質タンパク質や RNF183 によるユビキチン化の機構および生理的意義は明らかにされていない。

最近、炎症性腸疾患 (IBD; inflammatory bowel disease) である潰瘍性大腸炎およびクローン病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<sup>4)</sup>。我々は、RNF183 が腎臓特異的に発現することを見出していたため、RNF183 と IBD の関連性を示す報告は予想外のものであった。潰瘍性大腸炎やクローン病は、原因不明のため根治療法が確立されておらず、指定難病に指定されている。これらは指定難病の中では最も患者数が多い疾患であり、さらに、患者数が増加の一途をたどっていることから、原因の解明とそれに基づく治療薬の開発が急務である。

そこで、我々は RNF183 ノックアウトマウスを作製し、IBD モデルマウス作製に用いられるデキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 投与による大腸炎への影響を解析した結果、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 (図 1)。このことから、RNF183 の大腸での発現増加が IBD の

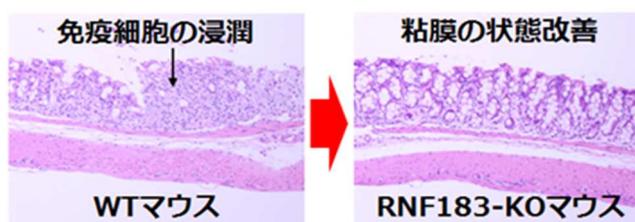


図 1. RNF183 ノックアウトマウスにおける大腸炎改善効果

発症原因の一つであるという仮説に至り、RNF183 を阻害する低分子化合物の探索が IBD 治療薬の開発に繋がると考えた。

本研究では、RNF183 と IBD の関連性を検証するために、まず、RNF183 の基質たんぱく質の同定およびユビキチン化の役割について検証を行った。

## 2.方法

RNF183 の基質タンパク質候補の同定のため、ビオチンリガーゼ BirA を融合した RNF183 を HEK293 細胞に発現させ、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。得られた基質タンパク質候補において、共免疫沈降法により RNF183 との結合、および、ユビキチン化の検証を行った。次に、免疫染色法により RNF183 存在下、非存在下での基質タンパク質候補の細胞内局在を解析した。さらに、mock 細胞と RNF183 安定発現細胞を用いて基質タンパク質候補の発現量を比較した。

## 3.結果

### 3-1. RNF183 の基質タンパク質の同定

RNF183 の基質タンパク質の同定を行うにあたり、従来の共免疫沈降法ではユビキチンリガーゼのように結合が弱い、または一過性である分子の相互作用分子は回収できず、相互作用分子の同定が非常に困難であるため、今回はビオチンリガーゼである BirA を融合した RNF183 を発現させ、近傍タンパク質をビオチン化によって標識することができる近位ビオチン標識法を用いた。ビオチン化タンパク質はストレプトアビジンビーズを用いて回収し、ショットガンプロテオーム解析を行った。すると、RNF183 の基質タンパク質候補として浸透圧ストレスにより発現量が増減することが知られているイオントランスポーターである Na,K-ATPase  $\alpha 1$  を同定した。

### 3-2. RNF183 と Na,K-ATPase $\alpha 1$ の相互作用

Na,K-ATPase  $\alpha 1$  は Na,K-ATPase  $\beta 1$  と複合体を形成し、細胞膜を介した Na イオンや K イオンの輸送を行うトランスポーターとして機能している。そこで、まず RNF183 と Na,K-ATPase  $\alpha 1$  が結合するか、共免疫沈降法により解析した。FLAG タグを融合した RNF183 を発現させ、抗 Na,K-ATPase  $\alpha 1$  抗体により免疫沈降を行ったところ、RNF183 も共沈降した。これより、RNF183 と Na,K-ATPase  $\alpha 1$  が結合することが示唆された (図 2)。

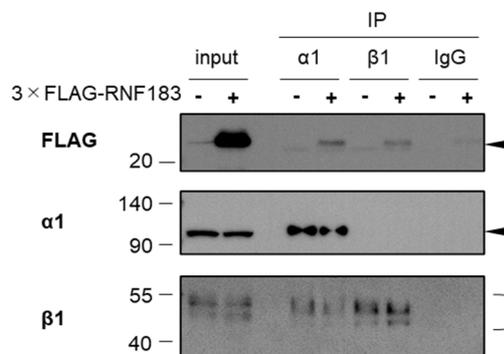


図 2. RNF183 と Na,K-ATPase  $\alpha 1$  の結

### 3-3. RNF183 による Na,K-ATPase $\alpha 1$ のユビキチン化の検証

Na,K-ATPase  $\alpha 1$  が RNF183 によってユビキチン化されるか、検証を行った。まず、FLAG タグを融合した RNF183 非存在下、存在下において HA タグを融合したユビキチン (Ub) を発現させ、抗 Na,K-ATPase  $\alpha 1$  抗体により Na,K-ATPase  $\alpha 1$  を免疫沈降した後、抗 HA 抗体によってウェスタンブロットを行った。すると、予想に反して Na,K-ATPase  $\alpha 1$  の RNF183 依存的なユビキチン化は見られなかった (図 3A)。

そこで Na,K-ATPase  $\alpha 1$  と複合体を形成している Na,K-ATPase  $\beta 1$  が RNF183 によってユビキチン化されているのではないかと考え、Na,K-ATPase  $\beta 1$  について同様の検証を行った。すると、Na,K-ATPase  $\beta 1$  において RNF183 依存的なユビキチン化が検出された (図 3B)。以上の結果から、RNF183

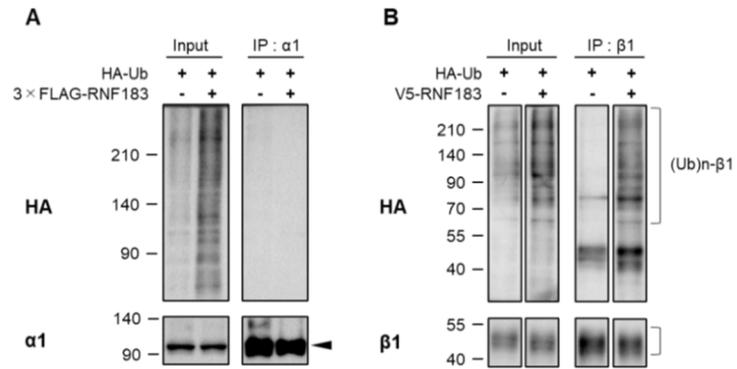


図 3. RNF183 によるユビキチン化の検証

は Na,K-ATPase  $\alpha 1$  と複合体を形成している Na,K-ATPase  $\beta 1$  をユビキチン化することが示唆された。

### 3-4. RNF183 によるユビキチン化の役割の検証

RNF183 による Na,K-ATPase  $\beta 1$  のユビキチン化がどのような役割を持つか検証を行った。まず、Na,K-ATPase  $\alpha 1$ 、Na,K-ATPase  $\beta 1$  の細胞内局在を検証するため、ライソゾームマーカーの LAMP1 と多重染色を行った。すると Na,K-ATPase  $\alpha 1$  は RNF183 非存在下では細胞膜に局在しているが RNF183 と共発現させることでライソゾームへ移行した (図 4A)。また、Na,K-ATPase  $\beta 1$  も、Na,K-ATPase  $\alpha 1$  ほど顕著ではないが RNF183 を共発現させることでライソゾームへ局在するものが増加した (図 4B)。この結果から、Na,K-ATPase  $\alpha 1$  と Na,K-ATPase  $\beta 1$  か

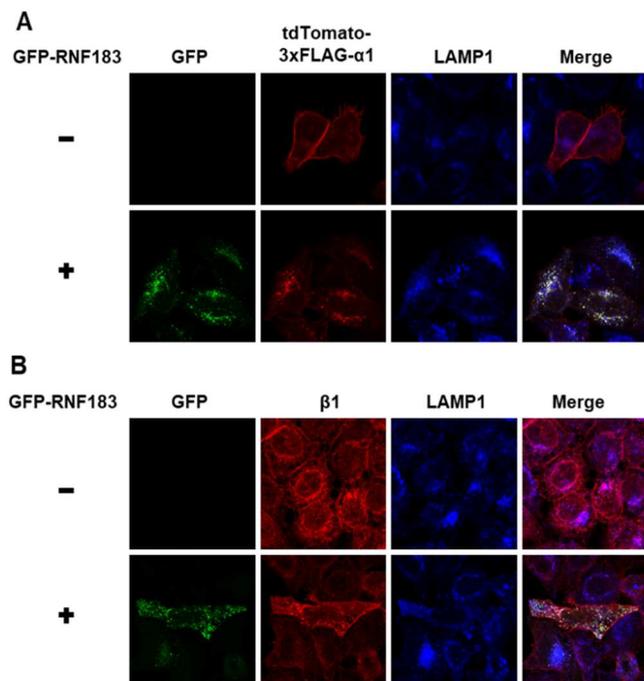


図 4. RNF183 による Na,K-ATPase の局在変化の

ら成る複合体は RNF183 によってライソゾームへ移行することが示唆された。

そこで、Na,K-ATPase が RNF183 によりユビキチン化されることでライソゾームへ移行し、ライソゾーム分解が促進されているのではないかと考え、検証を行った。HEK293 細胞の mock もしくは RNF183 安定発現株から得た cell lysate を用いてウェスタンブロットを行ったところ、RNF183 安定発現株で Na,K-ATPase  $\alpha$ 1、Na,K-ATPase  $\beta$ 1 の両方が減少していた。さらに、RNF183 安定発現株において siRNA により RNF183 をノックダウンしたところ、Na,K-ATPase  $\alpha$ 1、Na,K-ATPase  $\beta$ 1 の発現量はどちらも増加した (図 5A-E)。また、RNF183 安定発現株をライソゾーム阻害剤であるクロロキンで処理したところ、クロロキン処理していないものとは比べ、Na,K-ATPase  $\alpha$ 1、Na,K-ATPase  $\beta$ 1 の両方が増加した (図 5F)。以上の結果から、Na,K-ATPase は RNF183 と共発現することでライソゾームへ移行し、ライソゾームで分解されることが示唆された。

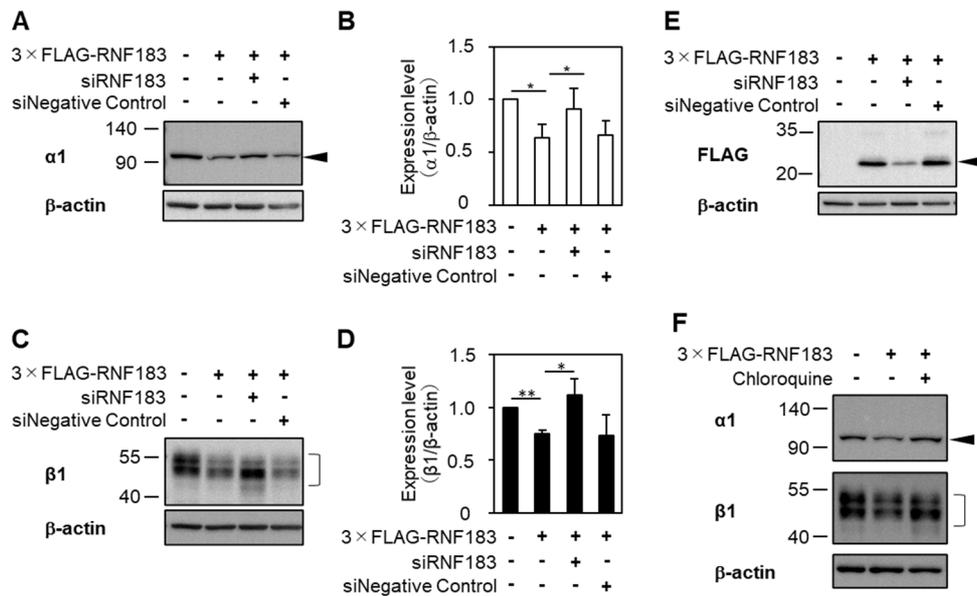


図 5. RNF183 による Na,K-ATPase 発現量への影響

#### 4.考察

本研究により、RNF183 は Na,K-ATPase  $\beta$ 1 を基質として認識し、ユビキチン化することで  $\alpha$ 1  $\beta$ 1 複合体を細胞膜からライソゾームへ移行し、ライソゾーム分解を促進することが示唆された。Na,K-ATPase は細胞の恒常性維持に大きく関わっており、また、IBD 患者の大腸において発現が低下しているという報告もあるため<sup>5)</sup>、大腸での RNF183 の異常発現が Na,K-ATPase を減少させ、恒常性が崩壊することで IBD 発症に関わる可能性が考えられる。

謝辞

本研究は、大阪難病研究財団の 2019 年度医学研究助成の援助を受けて行われたものであり、ここに厚く御礼申し上げます。

## 6.文献

- 1) Kaneko, M. et al. Genome-wide identification and gene expression profiling of ubiquitin ligases for endoplasmic reticulum protein degradation. *Sci Rep* **6**, 30955 (2016).
- 2) Maeoka, Y. et al. Renal medullary tonicity regulates RNF183 expression in the collecting ducts via NFAT5. *Biochem Biophys Res Commun* **514**, 436-442 (2019).
- 3) Maeoka, Y. et al. NFAT5 up-regulates expression of the kidney-specific ubiquitin ligase gene Rnf183 under hypertonic conditions in inner-medullary collecting duct cells. *J Biol Chem* **294**, 101-115 (2019).
- 4) Yu, Q. et al. E3 Ubiquitin ligase RNF183 Is a Novel Regulator in Inflammatory Bowel Disease. *J Crohns Colitis* **10**, 713-25 (2016).
- 5) Greig, E.R., Boot-Handford, R.P., Mani, V. & Sandle, G.I. Decreased expression of apical Na<sup>+</sup> channels and basolateral Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase in ulcerative colitis. *J Pathol* **204**, 84-92 (2004).