

広範な血管閉塞疾患に関わる RNF213 異常の解明

京都大学・学際融合教育研究推進センター・医学生命系ユニット
手塚徹

【研究の背景と目的】

もやもや病は頭蓋内の内頸動脈終端部の狭窄と、代償的に形成される異常血管網「もやもや血管」を特徴とする、東アジア（日本、韓国、中国）に多い脳血管疾患で、幼児を含む若年性脳卒中の主な原因である。2011年に、もやもや病の感受性遺伝子として初めてRNF213 遺伝子が発見され（参考文献1）、本邦患者の殆どがその遺伝子変異（R4810K多型）を持つ。もやもや病は希少な難治性疾患であるが、本邦において、肺高血圧症、さらには、年間6万人以上の死者を出す非心原性脳梗塞でも、当該RNF213多型に深い関連が示された（文献2,3）。従って、RNF213の遺伝子異常はもやもや病のみでなく、本邦の重大死因疾患である脳梗塞にまで至る、多様な血管閉塞疾患を引き起こす。これらの疾患には予防法はなく、治療もバイパスなどの手術に大きく依り、発症後のQOLも低い。それ故に、未だ殆ど不明である発症機構の解明が当該血管閉塞疾患の理解や制御法（特に予防法）の開発に不可欠である。

現在、もやもや病はRNF213の遺伝子・機能異常だけが原因ではなく、未解明の環境要因が合わさって初めて発症すると理解されている（文献4）。しかし、RNF213の遺伝子・機能異常が発症の下地を作っていることは間違いなく、その解明なくして、疾患の理解は不可能である。そこで、本研究では、RNF213蛋白質の正常機能と、遺伝子変異による機能異常の実体を解明することを目的とした。また、その成果をもって、RNF213異常が要因となる多様な血管閉塞疾患（もやもや病や脳梗塞）の診断・予防・制御法の開発基盤となることを目指した。

研究開始当時、5207アミノ酸残基から成る巨大分子RNF213には2つのAAA+ドメインと、1つのRINGドメイン（RINGフィンガー）が同定されていた（図A）。このRINGドメインはユビキチンリガーゼ（E3）活性を持つと予想されていたが、その活性や機能は詳しく調べられていなかった。そこで、本研究では、まずRNF213のRINGドメインのE3活性を*in vitro*で評価し、その活性に基づき、RNF213の機能を解析することとした。

【実験方法】

1. RNF213のRINGドメインが持つE3活性の解析

ヒトRNF213のRINGドメインを含む部分断片（アミノ酸番号3975から4053まで、C末端にHAタグを付加）をGST融合タンパク質として、大腸菌に発現させ、その精製タンパク質を*in vitro*ユビキチン化アッセイに使用した（図A）。ユビキチン活性化酵素（E1）は Sf9細胞に、ユビキチン結合酵素（E2）とユビキチンは大腸菌に発現させ、精製したタンパク質を使用した。*in vitro*ユビキチン化反応は、E1、E2、E3、ユビキチン、ATPを混合し、30°Cにて行った。反応産物をSDS-PAGEで分離し、抗ユビキチン抗体でのウェスタンブロットにより、ユビキチン化産物を検討した。立体構造モデリングにおいては、報告されているRNF8のRINGドメインの構造（PDBバンク：4ORH）と鋳型として、RNF213のRINGドメインモデルを構築した。また、RNF213のRINGドメインとUbc13の複合体モデルは、RNF8-Ubc13複合体を基に構築した。RNF213の変異体（人為的なRINGドメイン不活性型変異体 C3997A、および、もやもや病患者変異体）の発現プラスミドは、Q5 DNAポリメラーゼを使ったPCRにより作製し、PCRで得られた配列についてはDNAシーケンシングにより確認した。

2. 全長RNF213の細胞機能の解析

3xFLAGタグを付加した全長RNF213、NFκBレポーター・ホタルルシフェラーゼ、および、HSV-tkレポーター・ウミシイタケルシフェラーゼを発現するプラスミドをHEK293T細胞に一過性に導入し、デュアルルシフェラーゼアッセイにより、NFκB活性を検討した。アポトーシスの評価には、IRES配列により、3xFLAG全長RNF213とenhanced green fluorescent protein (EGFP)の両者を発現するプラスミドを作製・使用した。当該プラスミドを一過性に導入したHEK293T細胞をAPC-Annexin V と propidium iodide (PI) で標識し、FACSによりGFP陽性細胞のアポトーシスを検討した。RNF213タンパク質の安定性は、cycloheximide (CHX) 追跡実験により評価した。

【結果】

1. RNF213のRINGドメインが持つE3活性の解析

RNF213のRINGドメインのE3活性を解明するために、まず、共役してE3活性を発現させるユビキチン結合酵素（E2）を探索した。12種類のE2（E2-25K, Ube2G2, UbcH2, UbcH3, UbcH4, UbcH5A, UbcH5B, UbcH6, UbcH7, UbcH8, UbcH10, Ubc13/Uev1A）を用いて、*in vitro*ユビキチン化アッセイを行った結果、Ubc13/Uev1Aのみで、RNF213のRINGドメインによるポリユビキチン化が起こり、このE2がRNF213のRINGドメインと共

役することが明らかになった。Ubc13との共役では、Lys-63型のポリユビキチン鎖を生成することが知られているが、RNF213のRINGドメインとUbc13との共益によるポリユビキチン化もLys-63重合型であることは、抗Lys-63重合型ポリユビキチン抗体や、ユビキチン変異体などを用いて、確認した。本邦におけるもやもや病患者のRNF213変異は殆どR4810K多型であるが、世界的には、9つのRINGドメイン内変異が報告されている (C3997Y, P4007R, D4013N, H4014N, C4017S, R4019C, W4024R, C4032R, P4033L)。そこで、これらRINGドメイン内変異が、RNF213 RINGドメインのE3活性に及ぼす影響を検討した。その結果、D4013N変異を除く、殆どの変異により、Ubc13依存的なE3活性が大きく障害されることが判明した (図B)。

立体構造モデリングにより、これらの変異の立体構造的な影響を検討したところ、これらのCys、His、および、Pro残基はRINGドメインの構造維持に重要であり、他方、R4019C変異は亜鉛イオンとの結合に、W4024R変異はUbc13との結合に影響する可能性が見出された。

2. 全長RNF213の細胞機能の解析

プロテアソームによるタンパク質分解シグナルとなるLys-48重合型ポリユビキチン化とは異なり、Ubc13との共益によるLys-63重合型ポリユビキチン化は、NFκB経路の活性化やDNA修復、エンドソームへの輸送など様々な細胞機能に関わっている。特に、NFκB活性化においては、Traf6とUbc13によるLys-63重合型ポリユビキチン化がNFκB活性化を正に制御することが知られている。本研究中に、RNF213の発現抑制が、パルミチン酸刺激によるNFκB活性化やアポトーシスを抑制することが報告された (文献5)。そこで、我々は、RNF213のRINGドメインによるUbc13依存性のE3活性もNFκB活性化を促進すると予想した。そこで、ルシフェラーゼアッセイにより、RNF213のNFκB活性化能を検討したところ、HEK293T細胞への野生型RNF213 (全長) の強制発現によりNFκB活性化が起こり、RNF213がNFκB活性化の正の制御因子であることが確認された。しかしながら、予想とは異なり、E3活性が減弱したもやもや病患者変異体の多くで、野生型RNF213と比較して、NFκB活性化能が亢進していることが認められた。これら変異体におけるNFκB活性化能の亢進は、RINGドメイン変異により、RNF213タンパク質が安定化して起こる可能性も考えられた。そこで、RNF213タンパク質の安定性をCHX追跡実験で検討したところ、CHX投与後のRNF213タンパク質レベルの低下は、むしろNFκB活性化能が高い変異体で早く、上記の可能性は否定された。

上述の通り、RNF213はパルミチン酸刺激によるアポトーシスへの関与も報告されている。そこで、もやもや病患者に同定されたRINGドメイン内変異がアポトーシスに及ぼす影響も検討した。その結果、HEK293T細胞への野生型RNF213を強制発現させても、アポトーシスは起こらなかったが、NFκB活性化能が亢進していたRINGドメイン変異体の強制発現により、アポトーシスが認められた (図C)。以上のNFκB活性化・アポトーシスについて、RNF213のAAA+ドメインの寄与を検討した結果、AAA+ドメイン変異体では、上記のNFκB活性化、アポトーシスが起こらず、当該ドメインのATPase活性の必要性が示唆された。

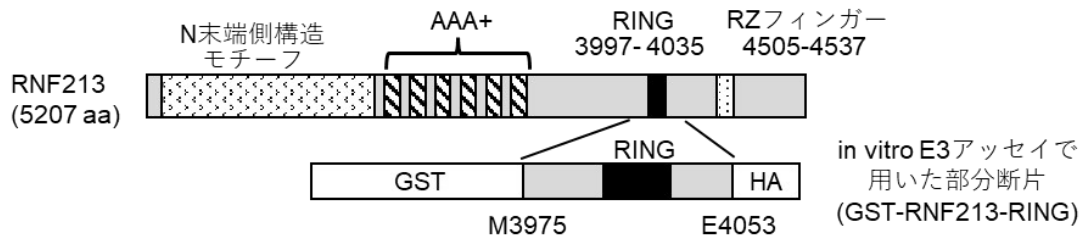
【考察】

本研究により、RNF213のRINGドメインによるE3活性発現機構が明らかになり、RNF213のRINGドメイン依存的Lys-63重合型ポリユビキチン化が、RNF213による細胞機能制御に関わることが示された。もやもや病患者で同定されたRINGドメイン変異の殆どが、当該E3活性を大きく低下させ、これらの変異の多くで、NFκB活性化、アポトーシスの誘導能が亢進した。以上より、RNF213のRINGドメインによるE3活性はRNF213のAAA+ドメイン依存的なNFκB活性化、アポトーシスを抑制する役割を持ち、患者RNF213変異によるこの制御機構の破綻が、もやもや病を引き起こす可能性が示唆された。

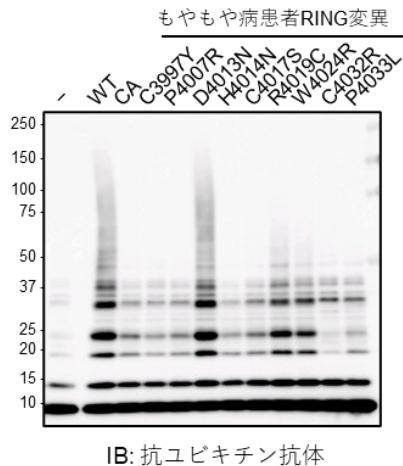
RNF213がNFκB活性化、アポトーシスを誘導する分子機構、また、RINGドメインのE3活性がそれらを抑制する機構はまだ明らかにできておらず、現在検討を進めている。特に、RINGドメインを介して、ユビキチン化される分子の同定が重要である。他方、近年、RNF213はRINGドメインとは別に、E3活性を持つことが示唆されていたが、最近になって、新規のE3ドメイン (RZフィンガー) が同定され、このRZフィンガーにより非タンパク質分子 (細菌のリポ多糖) をユビキチン化できることが報告された (図A、文献6)。RNF213のE3活性については、RINGドメインとRZフィンガーの両者を検討し、活性制御機構や標的基質、ポリユビキチン化様式などを明らかにする必要があると考えている。

RNF213は脂質に対する応答や細胞周期、Wntシグナルなどを制御することが報告されている。また、最近になって、細菌やウイルスに対する細胞応答にRNF213が重要であることが発見され (文献6, 7)、生体におけるRNF213の重要性の理解が深まっている。しかしながら、もやもや病患者に認められる患者変異がどのようにして、もやもや病など多様な血管閉塞を引き起こすかはまだ解明されていない。本研究により、「もやもや病患者変異により、RNF213の正常機能が障害されるのではなく、異常な機能亢進が起こることで、血管閉塞に至る細胞障害が惹起される」という疾患メカニズムの可能性が見出された。世界的には、もやもや病患者に多様なRNF213変異が報告されており、R4810K多型やRINGドメイン変異以外にも、N末端側構造モチーフなどにも変異は存在する。今後、もやもや病患者変異の影響をより網羅的に解析する予定である。また、RNF213の細胞機能や標的とする細胞内シグナル経路も未解明であり、事実、代表者は、RNF213が受容体分子Xの活性化に重要であることを見出している (未発表)。引き続き、「患者変異がRNF213による細胞機能制御に及ぼす影響」を明らかにすることに注力し、それを起点に、RNF213変異に起因する血管閉塞を制御する手法を作り出すことに貢献したい。

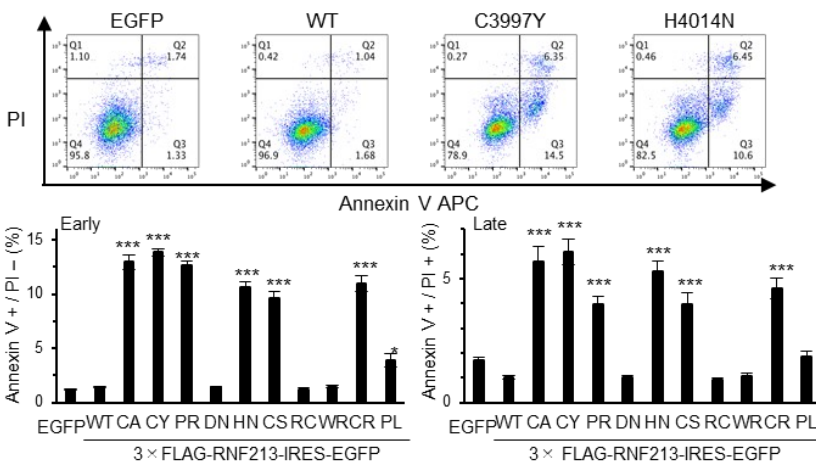
(A) ヒト RNF213の構造 (模式図)



(B) Ubc13依存性のE3活性



(C) 全長RNF213の強制発現によるアポトーシスの誘導



【図の説明】

(A) ヒトRNF213の構造とin vitro ユビキチン化アッセイで使用したRNF213タンパク質の模式図。研究開始当時は、2つのAAAドメイン (図で示す3番目と4番目)、および、RINGドメインのみが同定されていた。その後、クライオ電顕により、マウスRNF213の立体構造が解明され (文献8)、また、新たなE3活性ドメイン (RZフィンガー) も同定されており (文献6)、それらの情報も記載した。(B) RNF213 RINGドメインのUbc13依存性のE3活性に対する、もやもや病患者変異の影響。(A)で示したGST-RNF213-RINGを用いて、in vitro ユビキチン化反応を行い、反応産物を抗ユビキチン抗体でのウェスタンブロットで検討した。CAは人為的なRINGドメイン不活性化型変異体 (C3997A)。(C) RNF213の強制発現によるアポトーシスの誘導。GFP陽性細胞 (トランスフェクションで、プラスミドが導入された細胞) のアポトーシスをFACSで検討した。

【参考文献】

- [1] Liu W, et al., PLoS One 6:e22542 (2011).
- [2] Kobayashi H, et al., Pulm Circ 8:2045894018778155 (2018).
- [3] Okazaki S, et al., Circulation 139:295-298 (2019).
- [4] Koizumi A, et al., Environ Health Prev Med 21:55-70 (2016).
- [5] Piccolis M, et al., Mol Cell 74:32-44 (2019).
- [6] Otten EG, et al., Nature 594:111-116 (2021).
- [7] They F, et al., Nat Commun 12:5772 (2021).
- [8] Ahel J, et al., Elife 9:e56185 (2020).

【謝辞】

本研究は、代表者が研究従事場所とする京都大学・医学研究科・分子バイオサイエンス研究室 (Shohab Youssefian教授) で主に行われ、主要な成果は、研究室に所属していた大学院生を筆頭著者、代表者を責任著者として、下記の論文で発表致しました。共同研究者の皆様にお礼申し上げます。

Midori Takeda, Tohru Tezuka, Minsoo Kim, Jungmi Choi, Yuki Oichi, Hatasu Kobayashi, Kouji H Harada, Tsunehiro Mizushima, Shigeru Taketani, Akio Koizumi, and Shohab Youssefian

“Moyamoya disease patient mutations in the RING domain of RNF213 reduce its ubiquitin ligase activity and enhance NF κ B activation and apoptosis in an AAA+ domain-dependent manner”
Biochem Biophys Res Commun. 2020;525(3):668-674. doi: 10.1016/j.bbrc.2020.02.024.

公益財団法人アステラス病態代謝研究会からいただきました研究助成により、本研究を進めることができました。ご支援に深謝申し上げます。