別記様式第6号（第16条第3項，第25条第3項関係）

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

<table>
<tr><td>博士の専攻分野の名称</td><td>博士（　医学　）</td><td rowspan="2">氏名</td><td rowspan="2">前岡　侑二郎</td></tr>
<tr><td>学 位 授 与 の 条 件</td><td>学位規則第4条第1・2項該当</td></tr>
<tr><td colspan="4">論　文　題　目
NFAT5 up-regulates expression of the kidney-specific ubiquitin ligase gene Rnf183 under hypertonic conditions in inner-medullary collecting duct cells
（腎特異的ユビキチンリガーゼ RNF183 の発現は高浸透圧により NFAT5 を介して誘導される）</td></tr>
<tr><td colspan="4">論文審査担当者
主　　査　　教授　　吉栖　正生　　　　　　印
審査委員　　教授　　松原　昭郎
審査委員　　准教授　仲　一仁</td></tr>
</table>

〔論文審査の結果の要旨〕

RING finger protein (RNF) ファミリーは RING-finger ドメインを有し、ユビキチンリガーゼとして機能する。申請者らはバイオインフォマティクス的手法を用いて膜貫通型の RNF ファミリーを 37 種同定し、その一つである RNF183 のみが腎臓特異的に発現していることを以前に報告していた。一方で、RNF183 の発現が炎症性腸疾患患者の腸管上皮細胞や大腸癌患者の癌組織において亢進し、それに伴って腸管の炎症や癌細胞の増殖・転移が促進することが他のグループより報告されたが、これまで腎臓における RNF183 の解析はなされていなかった。そこで申請者は、RNF183 が腎臓に発現する機序とその意義を明らかにすることを目的とし本研究を行った。リコンビナントの RNF183 タンパク質をエピトープとしたウサギポリクローナル抗体を作製した。4 週齢のマウス組織を用いた RT-PCR とウエスタンブロットでは、RNF183 は腎髄質に高発現していた。そこで、申請者は腎髄質の解剖学的な特徴より、高浸透圧ストレスによって RNF183 が誘導されるかを検討し、マウス髄質内層集合管（mIMCD-3）細胞を用いて、塩化ナトリウムまたはスクロースを添加した培地で高浸透圧刺激を行った。その結果、qRT-PCR とウエスタンブロットでは、両培地にて RNF183 の発現は浸透圧依存的に誘導され、*Rnf183* mRNA の誘導は他の RNF ファミリー36 種類と比較しても最も顕著であった。高浸透圧による *Rnf183* mRNA の発現は、高浸透圧応答の主要制御転写因子である nuclear factor of activated T-cells 5 (NFAT5) の核内移行や標的遺伝子である *Akr1b1*, *Hspa1b* mRNA の発現と一致していた。また、NFAT5 をノックダウンすると、高浸透圧による RNF183 の誘導が減弱していた。ECR browser と JASPAR software を用いたデータベース解析では、*Rnf183* の転写開始地点の上流に哺乳類で保存されている領域が存在し、この領域内に NFAT5 結合モチーフを 1 箇所同定した(3342–3332 塩基対上流）。ルシフェラーゼレポーターアッセイでは、同モチーフを含むプロモーターでのみ高浸透圧により転写活性の上昇を認め、モチーフに変異を加えると転写活性が低下していた。ChIP アッセイでは高浸透圧下で同モチーフに対する NFAT5 の結合が増強していた。GFP-RNF183 を過剰発現した HeLa 細胞を用いた免疫染色法では RNF183 のシグナルは Lamp1 や EEA1 (リソソームや初期エンドソームのオルガネラマーカー）と共局在していた。NFAT5 やその標的遺伝子は高浸透圧に対する適応に重要であることが知られていることより、RNF183 をノックダウン後に高濃度の塩化ナトリウム（200 mM）を添加し培養する実験を行った結果、ウエスタンブロットと免疫染色法では活性型カスパーゼ 3 の発現量と陽性細胞が約 2 倍増加し、クリスタルバイオレット法では細胞生存率が約 30%低下していた。また、申請者は論文には掲載していないが追加で行った下記の実験結果を示した。RNF183 の N 末端に GFP を挿入したノックインマウスを作製した。このノックインマウスを用いた免疫染色法では、RNF183 が集合管のマーカーである AQP2 と共局在しており、in vitro の結果と一致していた。腎髄質の浸

透圧が低下させるモデルとして、マウスにフロセミドを投与したところ、ウエスタンブロットでは NFAT5 と RNF183 の発現量が低下し、qRT-PCR では NFAT5 標的遺伝子の mRNA と共に *Rnf183* mRNA の発現が低下していた。

以上の結果から、本論文は RNF183 が高浸透圧により NFAT5 を介して誘導され、高浸透圧によるアポトーシスを抑制していることを明らかにしたと考えられる。

よって審査委員会委員全員は、本論文が前岡侑二郎に博士（医学）の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。

別記様式第７号（第 16 条第３項関係）

最 終 試 験 の 結 果 の 要 旨

博士の専攻分野の名称	博士（　医学　）	氏名	前岡　侑二郎
学 位 授 与 の 条 件	学位規則第４条第１・２項該当		

論　文　題　目

NFAT5 up-regulates expression of the kidney-specific ubiquitin ligase gene *Rnf183* under hypertonic conditions in inner-medullary collecting duct cells

（腎特異的ユビキチンリガーゼ RNF183 の発現は高浸透圧により NFAT5 を介して誘導される）

最終試験担当者

主　　査　　教授　　吉栖　正生　　　　　　　印

審査委員　　教授　　松原　昭郎

審査委員　　准教授　仲　一仁

〔最終試験の結果の要旨〕

判　定　合　格

上記３名の審査委員会委員全員が出席のうえ、平成 31 年１月７日の第 77 回広島大学研究科発表会（医学）及び平成 31 年１月 10 日本委員会において最終試験を行い、主として次の試問を行った。

1　高浸透圧ストレスを与えたモデルにおける RNF183 ノックアウトマウスの表現系。
2　RNF183 の発現と糖尿病性腎障害等の病態との関連性。
3　プロテアソーム阻害薬及び免疫沈降を用いて、RNF183 の基質を同定できる可能性。
4　高浸透圧における RNF183 がアポトーシスを抑制する機序と形態変化。
5　低浸透圧における RNF183 の発現。精巣で RNF183 が高発現する理由。
6　NFAT5 の核内移行における p38MAPK や TGF-β シグナルとの関連性。
7　哺乳類と非哺乳類における高浸透圧応答及び尿の濃縮機構の違い。

これらに対して極めて適切な解答をなし、本委員会が本人の学位申請論文の内容及び関係事項に関する本人の学識について試験した結果、全員一致していずれも学位を授与するに必要な学識を有するものと認めた。