

論 文 内 容 要 旨

Inflammatory bowel disease-associated ubiquitin ligase RNF183 promotes lysosomal degradation of DR5 and TRAIL-induced caspase activation

(炎症性腸疾患に関連するユビキチンリガーゼ RNF183 はリソソームでの DR5 の分解および TRAIL によって誘導されるカスパーゼの活性化を促進する)

Scientific Reports, 2020, in press.

主指導教員：今泉 和則 教授
(医系科学研究科 分子細胞情報学)
副指導教員：浅野 知一郎 教授
(医系科学研究科 医化学)
副指導教員：橋本 浩一 教授
(医系科学研究科 神経生理学)

呉 艶

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

ユビキチンリガーゼ (E3) はユビキチン化機構において最も重要な酵素であり、基質の認識やユビキチン鎖の形成などを行うことで、基質の分解や機能調節に重要な役割を果たしている。ユビキチンリガーゼ RNF183 は、潰瘍性大腸炎やクローン病などの炎症性腸疾患 (inflammatory bowel disease, IBD) 患者の大腸や、トリニトロベンゼンスルホン酸 (TNBS) で誘導した IBD モデルマウスの大腸において発現が増加していることが最近報告されている。そこで、同じく大腸炎を誘導するデキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 用いた IBD モデルにおける RNF183 の発現変化について解析し、RNF183 の基質を同定することで分子メカニズムを解明することを本研究の目的とした。

IBD モデルマウスは、C57BL/6 (雄、8 週齢) に 3.5% DSS を 1, 3, 5 日間自由飲水させることで作成した。定量的 PCR により RNF183 の mRNA の発現量は DSS 投与に伴って 1 日目から有意に増加し、5 日間まで経時的に増加することが判明した。一方、DSS 投与 5 日目では IL-1 β や TNF- α などの炎症マーカーが顕著に増加したものの、DSS 投与 1 日目では有意な増加は認められなかった。このことから RNF183 は比較的早期に発現が上昇していることがわかり、炎症による二次的応答ではないことが示唆された。さらに、DSS で誘導された RNF183 が大腸組織のどの細胞に局在するかを調べた。セルソータにより大腸組織から上皮系細胞と免疫系細胞をそれぞれ抗 EpCAM 抗体と抗 CD45 抗体を用いて分離し、定量的 PCR を行ったところ、RNF183 が大腸の上皮系細胞に発現することが判明した。つぎに、大腸炎における RNF183 の機能を明らかにするため、ショットガンプロテオーム解析により RNF183 の基質同定を試みた。その結果、TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) のレセプターである Death receptor 5 (DR5) が同定された。DR5 は TRAIL が作用するとカスパーゼ-8 を活性化し、カスパーゼ-3 を介してアポトーシスを誘導する。そこで、DR5 が RNF183 の基質となるか検証した。まず、RNF183 と DR5 の結合を確認するため、FLAG タグで標識した RNF183 安定発現細胞を FLAG 抗体で免疫沈降し、DR5 抗体でプロットした結果、RNF183 が DR5 と結合することを確認した。つぎに、RNF183 による DR5 のユビキチン化様式を調べたところ、RNF183 は DR5 に対してエンドサイトーシスやリソソームへの輸送を促進する K63 型ポリユビキチン鎖を形成することが明らかとなった。さらに、RNF183 によって DR5 がリソソームに移行するかどうかを調べるために GFP 標識した RNF183 を HeLa 細胞にトランスフェクトし、免疫染色を行った。RNF183 が発現していない細胞では DR5 はリソソームにほとんど局在していなかったが、RNF183 が発現している細胞では DR5 はリソソームに局在した。また、RNF183 安定発現細胞において RNF183 をノックダウンし、DR5 発現量への影響を検討した。その結果、RNF183 の発現を抑制すると DR5 の発現量が有意に増加した。このことから、RNF183 はリソソームへの DR5 の輸送と分解を促進することが明らかとなった。最後に TRAIL が誘導するアポトーシスへの RNF183 の影響を調べたところ、RNF183 を過剰発現した細胞において、TRAIL によるカスパーゼ-3 およびカスパーゼ-8 の活性化が有意に増強した。そして、アネキシン V を用いてフ

オスファチジルセリンの露出を指標に、アポトーシス細胞の検出を行った。その結果、RNF183を過剰発現した細胞において、TRAILによってアポトーシスした細胞が増加した。このことから、RNF183はTRAILによって誘導されるカスパーゼの活性化とアポトーシスを促進することが判明した。

以上のことから、IBDにおいて発現が増加するRNF183は、DR5のリソソームへの輸送とカスパーゼの活性化を促進することでIBDの病態に関与する可能性が示唆された。