

論 文 内 容 要 旨

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)

The Journal of Biological Chemistry, in press.

主指導教員：正木 崇生教授

(広島大学病院 腎臓内科学)

副指導教員：今泉 和則教授

(医歯薬保健学研究科 分子細胞情報学)

副指導教員：茶山 一彰教授

(医歯薬保健学研究科 消化器・代謝内科学)

前岡 侑二郎

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

【背景】 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。私達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報告した。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報告されていたが、これまで腎臓における RNF183 の解析はなされていなかった。そこで本研究では、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た。

【方法と結果】

1. RNF183 の発現分布

リコンビナントの RNF183 タンパク質 61–158aa 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。

2. 高浸透圧による RNF183 の誘導

腎髄質の解剖学的な特徴である高浸透圧ストレスによる RNF183 の誘導機構を解析した。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 (37.5, 75 mM) またはスクロース (75, 150 mM) を添加した培地で高浸透圧刺激を行った。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。

3. RNF183 の誘導と nuclear factor of activated T-cells 5 (NFAT5) の関与

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 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 の誘導が減弱した。

4. *Rnf183* のプロモーター解析

ECR browser と JASPAR software を用いたデータベース解析では、*Rnf183* の転写開始地点から 3466–3136 塩基対上流 (ヒトでは 4367–4049 塩基対上流) 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 箇所認めた (3342–3332 塩基対上流)。そこで、3465, 1952 塩基対上流までの *Rnf183* プロモーター領域を有するルシフェラーゼベクター (pGL4-3.5 kbp-Luc, pGL4-2.0 kbp-Luc) を作製した。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 pGL4-3.5 kbp-Luc 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 の結合が増強した。

5. RNF183 の細胞内局在

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) と共局在した。

6. RNF183 の発現と高浸透圧による細胞死

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。RNF183

をノックダウン後に高濃度の塩化ナトリウム (200 mM) を添加し培養した。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%低下した。

【考察とまとめ】 RNF183 は高浸透圧により 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が明らかとなった。腎髄質では生理的条件下で NFAT5 は常に活性化しているため、RNF183 が腎髄質に高発現していることと合致する。RNF183 のノックダウンによるアポトーシスへの影響は、既存の NFAT5 標的遺伝子のノックダウンもしくはノックアウトした報告と同等であり、高浸透圧への適応における RNF183 の役割は重要と考えられる。今後の検討により RNF183 の基質を同定することで、NFAT5 による高浸透圧応答機構の詳細を明らかにできる可能性がある。