

家族性モヤモヤ病の遺伝解析

京都大学大学院医学研究科・環境衛生学分野

小泉 昭夫

研究要旨

RNF213 遺伝子 p.R4810K 多型は東アジアにおいてもやもや病と非常に強い相関を示し、また近年は他の血管狭窄性疾患のリスクを上昇させることも報告されている。RNF213 は、機能的には ATP のリン酸の化学結合のエネルギーを物理的エネルギーに変換する AAA+ドメインと、蛋白の分解や蛋白間のシグナル伝達の機能を有する E3 コピキチンリガーゼドメインを有する。もやもや病発症における RNF213 の変異の役割は不明である。そこで、本研究では、RNF213 の AAA+および E3ligase 活性に注目し、RNF213 の機能と変異の影響の検討を行った。まず、12 種類の E2 について探索したところ、RNF213 は Ubc13 を E2 として E3ligase 機能を発揮することを見出した。さらに、RNF213 の E3Ligase は K63 残基を ubiquitin 化することを見出した。E3ligase の活性中心に存在するもやもや病患者で報告されている 9 変異のうち、3 変異は E3 の活性低下を示さず、残りの 6 変異では、E3 の活性の低下を示した。この 6 つの E3ligase の機能喪失変異では、NF κ B の活性化し、引き続き Caspase3 の分解、Apoptosis を引き起こすことを見出した。一方、E3ligase の活性低下を起こさない 3 つの変異では、NF κ B の活性化を起こさず、Apoptosis も誘導させないことが見いだされた。さらに、NF κ B の活性化は、AAA+の喪失により大きく減少することが明らかとなり、AAA+依存性であることが判明した。

A. 研究目的

RNF213 遺伝子 p.R4810K 多型は東アジアにおいてもやもや病と非常に強い相関を示し、また近年は他の血管狭窄性疾患のリスクを上昇させることも報告されている。さらに、脳梗塞、肺高血圧や心筋梗塞の発症との相関も報告され、RNF213 は、頭蓋内血管病変に関わらず多くの循環器系疾患の発症に関与することから RNF213 vasculopathy (Bang et.al .2019) の概念が提唱されるに至った。

RNF213 は、機能的には ATP を使い物理的

にエネルギーに変換する AAA+ドメインと、蛋白の分解や蛋白間のシグナル伝達の機能を有する E3 コピキチンリガーゼドメインを有する。もやもや病発症における RNF213 の変異の役割は不明である。もやもや病の発症と相関を有する変異の一部は、Bioinformatics の予測によれば E3 コピキチンリガーゼの機能喪失変異を有することが予測される。

本研究においては、RNF213 の機能に注目し、1) 現在未知である E2 を明らかにし Ubiquitin Ligase の性格の解明、2) もやもや

病の発症との相関が報告されている変異体のうち E3ligase ドメインに存在する変異に関して Ubiquitin ligase の活性を評価、3) E3ligase によって制御を受け RNF213 との関連が示唆される NF k B 活性化による Apoptosis シグナル系に注目し、E3ligase の変異体の影響の評価および E3 以外の機能ドメインである AAA+ の役割の解明、の 3 点にわたり解明することを目指す。以上をもって、RNF213 による機能及び関与するシグナル系を解明し RNF213 vasculopathy の解明に資する。

B. 研究方法

本研究においては、研究対象は Human embryonic kidney 293 (HEK293T) cells を用いた。E3ligase の生化学的特徴付けにおいては、DNA constructs として、12 種類の E2, GST-RNF213 RNG WT(野生型) および変異体を用いた。また、NF k B の活性化に関しては、NF k B の応答エレメントにルシフェラーゼを接合した Plasmid を用い、ルシフェラーゼ活性で評価した。Full length の RNF213 WT および、AAA+ を喪失した変異体、E3ligase の変異体を用いて HEK293T に transfection を行い、Apoptosis を検討した。尚 Apoptosis の評価は、FACS を用いて行った。詳細は論文に記載した(Takeda et al. 2020)。上記研究は、京都大学遺伝子組み換え実験委員会の承認のもとに実験を行った。

C. 研究結果

1) E3 Ligase の特徴付け : 12 の E2 を検討した結果、Ubc13 のみが RNF213 と complex を形成し、RNF213 を autoubiquitin 化することを見した。次いで、Ubiquitin 鎖の特定を試みたところ、K48 を ubiquitin 化せず、K63 を選択的に ubiquitin 化することを見した。以上の結果から、RNF213 は、Ubc13 を E2 として、K63 の lysine 残基を polyubiquitin 化

すると結論された。

2) RNF213 の変異体の E3 活性 : 現在まで、9 種類(C3997Y CY, P400R PR, D4013N DN, H4014N HN, C4017S CS, R4019C RC, W4024R WR, C4032R CR, P4033L PL) の E3 ドメイン内部の変異が、もやもや病患者および家族で報告されている。そこで、これらの変異を用いて、CA 変異を喪失変異の対照として、E3ligase 活性を見た。DN、CR、WR の 3 変異を除いて残り 6 変異で CY, PR, HN, CS, RC, PL の何れも E3 の活性は低下していた。

3) NF k B の活性化 : K63 の Ubiquitination は、NF k B を含む多くの細胞内でのシグナル経路にかかわることが示唆されてきた。そこで、NF k B の活性化と E3ligase の関係を見たところ、E3ligase の活性がある WT, DN, CR, WR では、NF k B の活性化はなかったが、E3ligase の活性を喪失する 7 変異 (CA, CY, PR, HN, CS, CR, PL) では、NF k B を強く活性化していた。

4) E3ligase 活性の喪失による AAA+ 依存性 Apoptosis の誘導 : 最近、RNF213 のノックダウンにより palmitate による NF k B 活性化による Apoptosis の抑制が起こることが報告されている。そこで、CA を陰性対照として E3 の活性喪失型変異が、Apoptosis を誘導するか検討してみた。その結果、E3ligase の活性を喪失させる 6 変異 (CY, PR, HN, CS, CR, PL) で、Apoptosis は増加していた。一方、E3 活性を喪失させない 3 変異では、apoptosis の誘導は見られなかった。NF k B 活性化との関連を見るために、NF k B の抑制剤 (QNZ) で処理したところ CY, NH とともに apoptosis の誘導は QNZ 処理で抑制された。また、Apoptosis の誘導に介在する Caspase3 の分解を見たところ、WT で認められなかった分解が CY, HN では検出され、Apoptosis は caspase3

を介するシグナルによって仲介されていることが分かった。さらに、AAA+の影響を、CY, HN を用い検討したところ、AAA+を喪失させた変異体では、NFkB の活性化が認められず、同時に Apoptosis の誘導も抑制されていた。以上の結果から、E3ligase の機能喪失は、NFkB の活性化に引き続く Caspase3 の分解を介して Apoptosis を誘導することが明らかになった。さらに、このシグナル系の活性化には、AAA+ドメインが必要なことが判明した。

D. 考察

本研究では、RNF213 は Ubc13 を E2 として complex を形成して E3ligase 活性を発現させることが見いだされた。E3ligase による ubiquitin 化は、K48 に関わるタンパク分解系の経路あるいは K63 を介するシグナル伝達系など細胞機能制御に関わる経路の 2 つが知られているが、RNF213 では K63 の ubiquitin 化することから後者の細胞機能制御に関わることが判明した。さらに本研究では、そのシグナル系の一つとして NFkB-Caspase3-Apoptosis の経路を見た。

RNF213 は、既に 2011 に我々が証明したように ubiquitin 活性を有するが、もう一つの機能性ドメインとして AAA+がある。AAA+は、ATPase 活性を有するが、その活性は 6 量体など高次構造の形成に必要である。本研究において、高次構造を形成できない場合、E3ligase 活性を喪失する変異を有していても NFkB も誘導せず、Apoptosis を誘導しないことが明らかになった。このことは、RNF213 が NFkB-Caspase3-Apoptosis を活性化させるためには、RNF213 の高次構造の形成が必要なことを意味している。多くの AAA+では、高次構造をとることで、物理的な運動などの機能が付与され、細胞内輸送などを通じて機能を発現することが知られている。以上から、RNF213 の変異のうち、E3ligase の活性中心の変異では、

Gain of function あるいは Dominant negative 機序により NFkB-Caspase3-Apoptosis の経路を活性化されている可能性が強く推測される。

一方、活性中心に変異を有する DN, RC, WR に関しては、E3ligase 活性は有していた。しかし、これらの変異は患者で証明されていた。このうち DN 変異は、ヨーロッパにおける創始者変異であり、浸透率が低いことと関連する可能性がある。このような allelic heterogeneity に関しては今後さらに検討が必要である。

最後に、本研究で明らかにされたように、AAA+の喪失変異は、E3ligase ドメインの変異や他の部位の変異を null 化する可能性が示唆された。また RNF213 機能をロックアウトされたマウスで特異的な形質上の異常が確認されないという事実から AAA+の Null の健康への機能障害は少ないものと考えられる。この点は創薬上重要であり、AAA+の拮抗剤は、RNF213 の変異体による vasculopathy に対して創薬の候補となる可能性を示唆する。また、本研究で明らかにされた事実から、RNF213 vasculopathy は、NFkB-Caspase3-Apoptosis 経路の活性による内皮細胞の apoptosis の可能性が示唆される。今後さらなる検証が待たれる。

D. 結論

RNF213 は、Ubc13 を E2 として Complex を形成し E3ligase 機能を発揮する。この E3Ligase は K63 残基を ubiquitin 化し、E3ligase の機能喪失は、NFkB の活性化を引き起こす。この NFkB の活性化は、AAA+依存性であり高次構造の形成を前提とすることが明らかとなった。

E. 文献

Takeda M, Tezuka T, Kim M, Choi J, Oichi Y,

Kobayashi H, Harada KH, Mizushima T, Taketani S, Koizumi A, Youssefian S. Moyamoya disease patient mutations in the RING domain of RNF213 reduce its ubiquitin ligase activity and enhance NFκB activation and apoptosis in an AAA+ domain-dependent manner. *Biochem Biophys Res Commun.* 2020 Mar 2. pii: S0006-291X(20)30290-4. doi: 10.1016/j.bbrc.2020.02.024.

2. Bang OY, Chung JW, Kim DH, Won HH, Yeon JY, Ki CS, Shin HJ, Kim JS, Hong SC, Kim DK, Koizumi A. Moyamoya Disease and Spectrums of RNF213 Vasculopathy. *Transl Stroke Res.* 2019 Oct 24. doi: 10.1007/s12975-019-00743-6. PMID: 31650369

3. Kamimura T, Okazaki S, Morimoto T, Kobayashi H, Harada K, Tomita T, Higashiyama A, Yoshimoto T, Takahashi JC, Nakagawara J, Koga M, Toyoda K, Maruyama H, Koizumi A, Ihara M. Prevalence of RNF213 p.R4810K Variant in Early-Onset Stroke With Intracranial Arterial Stenosis. *Stroke.* 2019 Jun;50(6):1561-1563. doi: 10.1161/STROKEAHA.118.024712. Epub 2019 May 7.