

京都大学	博士 (社会健康医学)	氏 名	武田 美都里
論文題目	<p>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 (もやもや病感受性遺伝子産物RNF213のRINGドメイン内もやもや病患者変異はユビキチンリガーゼ活性を低下させ、NFκB活性化およびアポトーシスをAAA+ドメイン依存的に促進する)</p>		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>もやもや病は、頭蓋内のウイリス動脈輪近傍動脈の閉塞を伴う脳血管疾患であり、動脈の進行的な閉塞によって、脳卒中を発症させることが知られている。閉塞部位の外科手術による治療法は確立されているが、根本的な内科療法や予防法は確立されていない。当該疾患には遺伝的要因の関与が示唆されていたが、2011年にその感受性遺伝子としてRNF213 (RING finger protein 213)遺伝子が同定された。さらに、近年の疫学的研究により、RNF213遺伝子の変異がもやもや病だけでなく、心筋梗塞や脳梗塞、肺高血圧等のリスク要因となることも見出され、多様な血管閉塞性疾患との関連が飛躍的に解明されている。しかしながら、RNF213遺伝子の変異が血管閉塞を引き起こす分子機構は未解明であり、その理由として、RNF213蛋白質の機能が十分理解されていないことが挙げられる。</p> <p>RNF213は、ATPase活性を持つAAA+ドメインとユビキチンリガーゼ(E3)活性を持つRINGドメインを有する591 kDaの巨大蛋白質であり、そのAAA+ドメインはオリゴマー形成の制御に関わることが先行研究によって明らかになっている。一方、もやもや病患者の変異がRINGドメイン内に9つ同定されていることから、RINGドメインを介するユビキチン化ともやもや病発症との深い関連が予想されている。しかしながら、RNF213の標的ユビキチン化基質は未解明であり、また、共役するユビキチン連結酵素(E2)や生成するポリユビキチン鎖の様式も全く分かっていない。そこで本研究では、RNF213のRINGドメインによるE3活性の性質、及び、当該活性に対するRINGドメイン内患者変異の影響を解明し、さらに、これらの変異が細胞内機能に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。</p> <p>まず、RNF213のRINGドメインが持つE3活性を評価するために、当該ドメインを含むRNF213の部分断片の組み換え精製蛋白質を用いたin vitroユビキチン化反応系を確立した。この反応系を使用してE2スクリーニングを行い、RNF213がUbc13-Uev1Aを共役E2としてLys-63型のポリユビキチン鎖を生成することを発見した。そこで、もやもや病患者のRINGドメイン内変異がこのE3活性に及ぼす影響を検討した結果、殆どの変異が当該E3活性を大きく低下させることを見出した。次に、上述のRINGドメイン内変異がRNF213の細胞内機能に与える影響について、NFκBシグナル系とアポトーシスに着目し、検討した。全長RNF213を培養細胞に一過性に過剰発現させ、ルシフェラーゼレポーター系を用いて、NFκB経路の活性化を調べた結果、野生型RNF213と比較して、E3活性を喪失したRING内患者変異体ではNFκB活性化能が大きく亢進することを発見した。また、これらのRNF213変異体の過剰発現により、アポトーシスが誘導されることも見出した。これらのNFκB活性化とアポトーシスは、AAA+ドメインに依存的であることが判明し、AAA+とRINGドメイン間の機能的な相互作用が示唆された。</p> <p>以上の結果から、RNF213によるNFκBとアポトーシスの誘導能が自身のE3活性によって負に制御されていること、また、RNF213変異によるこの制御機構の障害がもやもや病の発症に関与する可能性が考えられた。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

もやもや病は、頭蓋内動脈の閉塞を伴う脳血管疾患であり、感受性遺伝子としてRNF213遺伝子が同定されている。RNF213蛋白質の機能が十分理解されていないため、遺伝子変異が血管閉塞を引き起こす分子機構は未解明である。

そこで本研究では、RNF213のRINGドメインのE3活性の性質と、RINGドメイン内患者変異のE3活性・細胞内機能に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

RINGドメインのE3活性を評価するために、部分断片の組み換え精製蛋白質を用いたin vitroユビキチン化反応系を確立し、RNF213がUbc13-Uev1Aを共役E2としてLys-63型のポリユビキチン鎖を生成することを発見した。また、もやもや病患者のRINGドメイン内変異の殆どが当該E3活性を大きく低下させることを見出した。次に、NFκBシグナル系とアポトーシスを検討した。全長RNF213を一過性に過剰発現させた培養細胞において、野生型と比較して、E3活性を喪失したRING内患者変異体ではNFκB活性化能が大きく亢進することを発見した。また、アポトーシスが誘導されることも見出した。これらのNFκB活性化とアポトーシスは、AAA+ドメインに依存的であることが判明した。

以上の研究は、RNF213のE3活性と細胞内機能の解明に貢献し、今後、血管閉塞性疾患への予防、創薬の研究に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士(社会健康医学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、令和2年7月20日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日以降