

令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号：22701
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2018～2020
課題番号：18K07504
研究課題名（和文）Loss of functionモデルに基づいたUBQLN2の機能解析

研究課題名（英文）Analysis of UBQLN2 based on loss of function model

研究代表者
田中 健一（TANAKA, Kenichi）

横浜市立大学・附属病院・助教

研究者番号：50722881
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：神経特異的UbqIn2 CK0マウスでは、Wire-hang testにおいて、運動機能低下を示唆する有望な所見を得たが、表現型が軽微であった。そのため、機能喪失仮説をさらに検証する目的でTamoxifen誘導によるThy1.2プロモーター下（Thy1-cre/ERT2, -EYFP）にCreを発現するマウスとUbqIn2-floxマウスの交配をおこない、成長発達期を過ぎた後でUbqIn2発現を神経特異的に停止するモデルマウスの系統を樹立し、運動機能評価を行っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの研究では筋萎縮性側索硬化症の病態は不明な点が多く、現時点では進行を止める治療法は見いだされていない。本研究では、家族性筋萎縮性側索硬化症の原因として明らかとなっているUBQLN2に着目し、神経特異的なノックアウトを作成することにより、Loss of functionの観点からUBQLN2の病態を明らかにすることを目的としている。

研究成果の概要（英文）：In nerve-specific UbqIn2 CK0 mice, the Wire-hang test showed promising findings suggestive of hypokinesia, but the phenotype was minor. Therefore, for the purpose of further testing the hypothesis of loss of function, mice expressing Cre under the Thy1.2 promoter (Thy1-cre / ERT2, -EYFP) induced by Tamoxifen were mated with UbqIn2-flox mice, and the growth and development phase was passed. After that, we established a strain of a model mouse that arrests UbqIn2 expression in a nerve-specific manner, and evaluated motor function.

研究分野：神経内科

キーワード：筋萎縮性側索硬化症 ノックアウトマウス UBQLN2

1. 研究開始当初の背景

家族性 ALS の原因遺伝子の中で *C9orf72* のイントロン領域のリピート伸長、*TARDBP* (TDP-43 遺伝子)、*FUS* (FUS/TLS 遺伝子)、*MATR3* (Matrin3 遺伝子) 変異などに基づく RNA 代謝に関連した分子の異常が多い中、ユビキチン-プロテアソーム系 (UPS) の構成タンパク質としては初めて FALS 責任遺伝子であることが示された *UBQLN2* (Ubiquilin2:UBQLN2 遺伝子) に関する研究が増えてきていた。UBQLN2 は、*UBQLN2* 変異 FALS 患者のみならず、*C9orf72* 変異患者、さらには SALS 患者の病理組織においても、TDP-43 や FUS/TLS と同様に封入体への蓄積が認められ、UBQLN2 が RNA 結合タンパクの TDP-43、FUS/TLS と並ぶ ALS/FTLD 病態形成のキープレイヤーであることを強く示唆していた。UBQLN2 は UPS におけるポリユビキチン化タンパクのプロテアソームへのシャトル機能のほか、小胞体関連分解 (ERAD)、飢餓誘導性オートファジーの活性制御に関わるとともに、FALS 関連分子である RNA 結合タンパク質の hnRNPA1 と結合することも報告され、RNA 代謝への関与も示唆されている。UBQLN2 のこのような多彩な機能が明らかになる一方、ALS の病態形成において UBQLN2 変異が果たす役割は不明であった。2015 年に初めて発表された *Ubqln2* P497H 変異導入トランスジェニックラットでは 20 日齢で神経細胞凝集体形成、130 日齢で高次機能障害、神経細胞脱落をきたす一方で、*Ubqln2* ノックアウトラットは 300 日齢でも表現型も神経細胞脱落も呈さないと報告されたことから、凝集性獲得による神経障害説が強く示唆された。以降、*Ubqln2* P497H 変異導入トランスジェニックマウス、野生型 *Ubqln2* トランスジェニックマウスでも同様の報告が続いている。しかしながら、そもそも UBQLN2 は UPS 経路の重要な分子であるにも関わらず、過剰発現下ではむしろプロテアソーム活性を阻害することが知られており、過剰発現モデルは必ずしも疾患病態を反映していない可能性がある。実際、2016 年に UBQLN2 は野生型、変異型とも、過剰発現では同じように凝集し、変異によって凝集能を獲得するわけではないこと、UBQLN2 P506T 変異により、HSP70 への結合が阻害されること、P506T に相当する *Ubqln2* P520T 変異ノックインマウスでもやはり HSP70 への結合、凝集体処理能が低下することなどから、機能喪失が病態に非常に強く関与する所見が得られていた。

2. 研究の目的

UBQLN2 変異による神経変性機序については、凝集性獲得説から機能喪失説まで様々な機序が想定されており、不明な点が多かった。哺乳類において UBQLN は 1-4 のアイソフォームが存在し、特に UBQLN1 との相同性が高いことから、我々はこれまでのトータルノックアウトモデルでは Gene redundancy のため表現型が出現しなかった可能性もあると考えている。機能喪失の視点に立って、神経特異的ノックアウトマウス、アダルトマウスでのノックアウトの表現型を解析していくことによって、UBQLN2 を介する神経変性機序は明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

研究の方法

UBQLN2 と Hsc71 の結合低下の評価

UBQLN2 P479H 変異では Hsc71 との結合性低下は軽度であったため、単純な結合能低下のみではなく、ADP 結合状態、ATP 結合状態の差、変異がリフォールディング活性に与える影響などを *in vitro* での結合実験を行い評価する

Ubqln2 ノックアウトマウスの運動機能、認知機能、病理学的解析

成長発達期を過ぎた後で *Ubqln2* の発現を停止することで神経症状を発症する可能性があると考えており、神経特異的ノックアウトマウス、アダルトマウスでのノックアウトの運動機能、認知機能、病理学的解析を行う。

Ubqln2 ノックアウトマウスの初代培養神経細胞を用いた UBQLN2 の役割の解析

Ubqln2 ノックアウトマウスから初代培養細胞を作成し、飢餓、ヒートショック、 H_2O_2 など種々のストレス下においてユビキチン陽性凝集体が認められるか確認する。また、Hsc71 の refolding 活性や、オートファジー阻害薬による脆弱性、シャペロン介在性オートファジー基質 MEF2D の増加の有無を解析する。

4. 研究成果

UBQLN2 と Hsc71 の結合低下の評価

UBQLN2 の変異体と Hsc71 との *in vitro* での結合実験では、ATP S 存在下では、UBQLN2 WT、UBQLN2 P479H、UBQLN2 P506S で結合の差は認めなかった。一方、ADP

存在下では、UBQLN2 WT、UBQLN2 P479H はいずれも Hsc71 との結合に差が見られなかったが、UBQLN2 P506S では Hsc71 との結合の低下を認めた。

Ubqln2 ノックアウトマウスの運動機能、認知機能、病理学的解析

Tubb3-Cre マウスとの掛け合わせにより神経特異的 *Ubqln2* CKO を作成し、Wire-hang test を行ったところ、運動機能低下を示唆する所見を得たが(図 1)、表現型が軽微であった。そのため、申請者らは機能喪失仮説をさらに検証する目的で Tamoxifen 誘導による *Thy1.2* プロモーター下 (*Thy1-cre/ERT2,-EYFP*) に Cre を発現するマウスと *Ubqln2*-flox マウスの交配をおこない、成長発達期を過ぎた後で *Ubqln2* 発現を神経特異的に停止するモデルマウスの系統を樹立した(図 2)。このように、これまでの一般的なマウスモデルと異なる新規の戦略に基づく ALS モデルマウスを用いて、ALS の病態を解明することをめざしている。

Ubqln2 ノックアウトマウスの初代培養神経細胞を用いた UBQLN2 の役割の解析

まず、UBQLN2 WT、UBQLN2 P479H、UBQLN2 P506S をそれぞれ培養細胞 HEK293T に大量発現し、シャペロン介在性オートファジーへの影響をみた。飢餓、 H_2O_2 など種々のストレス下において、シャペロン介在性オートファジー基質 MEF2D の増加を認めた。*Ubqln2* ノックアウトマウスの初代培養細胞でも、MEF2D の増減を確認する。

図1. 神経特異的UBQLN2 KOマウスの解析

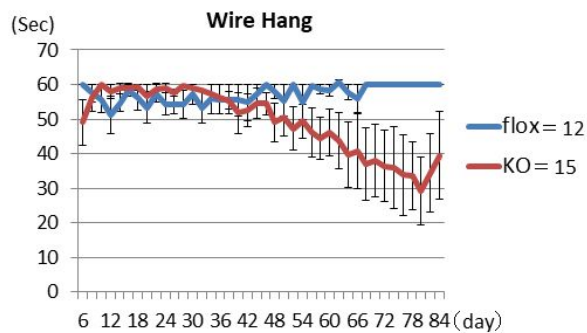
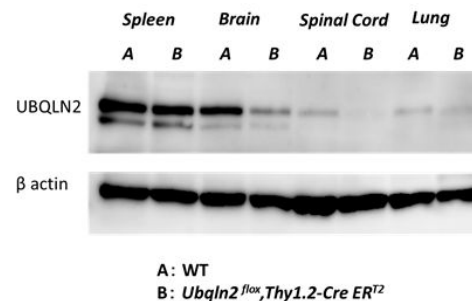


図2. 薬剤誘導性神経特異的UBQLN2 KO マウス



参考文献

1. Xia Y, et al. Pathogenic mutation of UBQLN2 impairs its interaction with UBXD8 and disrupts endoplasmic reticulum-associated protein degradation. *J Neurochem.* 2014;129:99-106.
2. Gilpin KM, et al. ALS-linked mutations in ubiquilin-2 or hnRNPA1 reduce interaction between ubiquilin-2 and hnRNPA1. *Hum Mol Genet.* 2015;24:2565-77.
3. Gorrie GH, et al. Dendritic spinopathy in transgenic mice expressing ALS/dementia-linked mutant UBQLN2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111:14524-9.
4. Hjerpe R, et al. UBQLN2 Mediates Autophagy-Independent Protein Aggregate Clearance by the Proteasome. *Cell.* 2016;166:935-949.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nakamura H, Komiya H, Uematsu E, Nakae Y, Tanaka K, Kunii M, Tada M, Joki H, Koyano S, Matsumoto N, Doi H, Takeuchi H, Tanaka F	4. 巻 9
2. 論文標題 Adult-onset vocal cord paralysis in slow-channel congenital myasthenic syndrome	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neurol Clin Pract	6. 最初と最後の頁 e45-e47
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1212/CPJ.0000000000000599	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hayashi N, Doi H, Kurata Y, Kagawa H, Atobe Y, Funakoshi K, Tada M, Katsumoto A, Tanaka K, Kunii M, Nakamura H, Takahashi K, Takeuchi H, Koyano S, Kimura Y, Hirano H, Tanaka F	4. 巻 19
2. 論文標題 Proteomic Analysis of Exosome-Enriched Fractions Derived From Cerebrospinal Fluid of Amyotrophic Lateral Sclerosis Patients	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neurosci Res	6. 最初と最後の頁 30487-0
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neures.2019.10.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hashiguchi Sら	4. 巻 130
2. 論文標題 Ataxic phenotype with altered CaV3.1 channel property in a mouse model for spinocerebellar ataxia	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neurobiol Dis	6. 最初と最後の頁 104516
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.nbd.2019.104516	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yamaura G, Higashiyama Y, Kusama K, Kunii M, Tanaka K, Koyano S, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Saitsu H, Iwahashi Y, Joki H, Matsumoto N, Doi H, Tanaka F	4. 巻 58
2. 論文標題 Novel VRK1 Mutations in a Patient with Childhood-onset Motor Neuron Disease	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Intern Med	6. 最初と最後の頁 2715-2719
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2169/internalmedicine.2126-18	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kunii M, Doi H, Ishii Y, Ohba C, Tanaka K, Tada M, Fukai R, Hashiguchi S, Kishida H, Ueda N, Kudo Y, Kugimoto C, Nakano T, Uda N, Miyatake S, Miyake N, Saito H, Ito Y, Takahashi K, Nakamura H, Tomita-Katsumoto A, Takeuchi H, Koyano S, Matsumoto N, Tanaka F	4. 巻 94
2. 論文標題 Genetic analysis of adult leukoencephalopathy patients using a custom-designed gene panel	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Clin Genet	6. 最初と最後の頁 232-238
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cge.13371	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Doi H, Koyano S, Miyatake S, Nakajima S, Nakazawa Y, Kunii M, Tomita-Katsumoto A, Oda K, Yamaguchi Y, Fukai R, Ikeda S, Kato R, Ogata K, Kubota S, Hayashi N, Takahashi K, Tada M, Tanaka K, Nakashima M3, Tsurusaki Y, Miyake N, Saito H, Ogi T, Aihara M, Takeuchi H, Matsumoto N, Tanaka F	4. 巻 63
2. 論文標題 Cerebellar ataxia-dominant phenotype in patients with ERCC4 mutation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Hum Genet.	6. 最初と最後の頁 417-423
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s10038-017-0408-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Komiya H, Takasu M, Hashiguchi S, Uematsu E, Fukai R, Tanaka K, Tada M, Joki H, Takahashi T, Koyano S, Doi H, Takeuchi H, Tanaka F	4. 巻 5
2. 論文標題 A Case of McLeod Syndrome with A Novel XK Missense Mutation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Mov Disord Clin Pract.	6. 最初と最後の頁 333-336
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/mdc3.12614	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 磯田 将徳, 山浦 弦平, 山田 隼, 古泉 龍一, 田中 健一, 横山 睦美
2. 発表標題 皮質脊髄路に沿って病変拡大を呈したLymphomatosis Cerebriの70歳男性例
3. 学会等名 第231 回日本神経学会関東・甲信越地方会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木村 瑞希, 橋口 俊太, 田中 健一, 高橋 慶太, 宮地 洋輔, 上木 英人, 土井 宏, 竹内 英之, 田中 章景
2. 発表標題 たこつぼ型心筋症を合併したBickerstaff脳 幹脳炎の68歳女性例
3. 学会等名 第38回日本神経治療学会学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	土井 宏 (Doi Hiroshi) (10326035)	横浜市立大学・医学部・准教授 (22701)	
研究分担者	竹内 英之 (Takeuchi Hideyuki) (30362213)	横浜市立大学・医学部・准教授 (22701)	
研究分担者	田中 章景 (Tanaka Fumiaki) (30378012)	横浜市立大学・医学研究科・教授 (22701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------