

機関番号：82611

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2007～2010

課題番号：19200032

研究課題名（和文） 脱ユビキチン化酵素による神経細胞機能発現の統合的制御

研究課題名（英文） Regulation of neuronal cell function organized by deubiquitinating enzymes

研究代表者 和田 圭司 (WADA KEIJI)

(独) 国立精神・神経医療研究センター・神経研究所疾病研究第 4 部・部長

研究者番号：70250222

## 研究成果の概要（和文）：

脱ユビキチン化酵素 UCH-L1 は脳神経系では神経細胞特異的発現を示し、パーキンソン病との関わりが深い。本研究において新たに UCH-L1 が孤発性、家族性パーキンソン病の両者を繋ぐ共通因子として作用する可能性を見いだした。代表的環境要因である酸化修飾、あるいは発症原因である I93M 遺伝子変異によるアミノ酸置換の結果、UCH-L1 自身に構造変化が生じるが、その結果表出する作用は共通であった。また、UCH-L1 は細胞膜の脆弱性防護や、代表的環境要因である酸化ストレス亢進時の生体防護に重要であることを UCH-L1 の発現のない gracile axonal dystrophy (gad) マウスを用いて示した。

他方、UCH-L1 と近縁の UCH-L3 については、筋や脂肪における代謝に重要な役割を果たしていることを UCH-L3 欠損マウスを用いて見いだした。さらに、モノユビキチン、ジユビキチンが UCH-L1、UCH-L3 の内在性酵素活性制御因子であることを見いだした。UCH-L1、UCH-L3 に代表される脱ユビキチン化酵素が、神経細胞の内在的機序だけでなく、末梢生体情報とのコミュニケーションにおいて、何らかの相互作用を有しながら神経機能維持に関わっている可能性が考えられた。

## 研究成果の概要（英文）：

In this study, we analyzed the effect of genetic (I93M mutation) and environmental modification (oxidative stress) of a deubiquitinating enzyme, UCH-L1. In the brain, UCH-L1 shows neuron-specific expression and is believed to be involved in the pathogenesis of Parkinson's disease. We found that oxidized UCH-L1 showed its increased insolubility, and the formation of aggregation. These features were also observed in I93M UCH-L1. Both oxidized UCH-L1 and I93M UCH-L1 showed the increased interaction with other proteins, and some of the proteins were overlapped. These findings suggest that oxidized UCH-L1 and I93M UCH-L1 share some molecular features.

We next observed that gad mice, which lack the expression of UCH-L1, showed the deterioration of motor discoordination when they were fed with vitamin E-deficient diet. Wild type mice did not show any changes in motor function when they were fed with the diet. These observations suggest that UCH-L1 may play a protective role against oxidative stress in vivo, because vitamin E deficiency is known to cause the increase of oxidative stress in vivo.

Then, we analyzed UCH-L3 null mutant. UCH-L3 is a homologue of UCH-L1 and shows ubiquitous expression in vivo. We observed that, in the mutant, lipid metabolism was altered in the muscle and adipose tissue. We also detected that monoubiquitin and di-ubiquitin are endogenous regulator of the enzyme activities of UCH-L1 and UCH-L3. These results suggest that the two enzymes co-operatively work in vivo.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計

2007年度	10,100,000	3,030,000	13,130,000
2008年度	9,100,000	2,730,000	11,830,000
2009年度	9,100,000	2,730,000	11,830,000
2010年度	9,100,000	2,730,000	11,830,000
年度			
総計	37,400,000	11,220,000	48,620,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学 ・ 神経化学 ・ 神経薬理学

キーワード：

### 1. 研究開始当初の背景

ユビキチンシステムなど蛋白質分解系は不用になった蛋白質を分解するだけの受動的な処理システムと考えられてきたが、近年の研究からそうではなく、積極的に生体機能を制御していることが明らかになってきていた。当時でも、ユビキチン研究は臨床神経学および神経化学分野における最重要研究課題の一つとして位置づけられていたが、ユビキチンシステムの脳における生理的・病態生理的役割は全面的に解明されてはいなかった。そのため新たな展開が待ち望まれていた。なかでも、UCH-L1 は酵素としての側面に加えて酵素活性非依存的に神経細胞機能を制御する面を合わせ持つ極めてユニークな分子であることが明らかになっていった。これは脱ユビキチン化酵素が、想定される神経細胞機能の統合制御だけでなくその量的豊富さを反映して、細胞機能に影響を及ぼす外的・内的要因を検出する重大な役割を担っている可能性を示唆した。他方、UCH-L3 は全身性の発現を示すことが知られていた。末梢-中枢連関における情報処理において脱ユビキチン化酵素が何らかの生物学的役割を果たしている可能性が考えられた。以上の背景により、本研究では、UCH-L1 とUCH-L3 について取り上げることにした。

### 2. 研究の目的

脱ユビキチン化酵素を中心座標にすえた新たな制御コミュニティの存在を、脳神経系内の情報処理系としてだけでなく、末梢組織からの生体情報をも統合処理し神経細胞の生存や機能発現に伝達するインテグレイティブコンダクターとしての役割を実験的に実証する。

### 3. 研究の方法

神経細胞特異的発現を示すUCH-L1、ならび

に相同性の高いUCH-L3 の2種の脱ユビキチン化酵素を主な題材にし、(1) 神経細胞機能発現におけるUCH-L1, UCH-L3 分子カスケードの確立、(2) 両カスケードの相互作用の有無の実証ならびにその量的・質的バランスと神経細胞機能との相関性解析、(3) 外的因子がUCH-L1/UCH-L3 システムに与える影響の細胞・個体レベルでの検出UCH-L1 とUCH-L3 の多様性・多機能性との関連性解明、(4) リソソーム系など他の蛋白質品質管理系との相互ネットワークの実証と蛋白質代謝制御系を基軸に持つ新たな情報処理システム概念確立、の各項目に関する研究を機能形態学的手法、生化学的手法を中心に、マウス、培養細胞等を使用して実施した。

### 4. 研究成果

(1) 神経細胞機能発現とUCH-L1, UCH-L3 分子カスケード

UCH-L1, UCH-L3 それぞれにつき結合蛋白質を抗体アレイ法、two-hybrid 法などにより半網羅的に探索した。その結果両分子は予想を超えて多数の蛋白質と相互作用をする可能性を見出した。UCH-L1 については特に病態時にチューブリン、LAMP2A などとの結合性がより亢進し、これら機能分子の本来の作用に対して影響を及ぼすという新規機序を見出した。具体的に、chaperon mediated オートファジー (CMA) の構成成分である LAMP2 との結合性が亢進し、CMA を阻害し本来 CMA で分解されるべきアルファシヌクレインの蓄積を引き起こす機序、tubulin 等の結合性亢進による神経細胞機能障害機序などを提唱した。また、UCH-L1 の発現が欠損する gracile axonal dystrophy (gad) マウスを用い、UCH-L1 がシナプス可塑性、記憶学習に関わることを見出した。

(2) 両カスケードの相互作用の有無

UCH-L1, UCH-L3 の両分子の内在性酵素活性阻害因子としてモノユビキチンを見出した。さらに、UCH-L3 により選択的な内在性酵素活性阻害因子としてジユビキチンを発見した。すなわち、モノユビキチンあるいはジユビキチンを介し

てUCH-L1, UCH-L3の両分子の機能が協調的に制御される場合と独自に制御される場合があることを見出した。

### (3) 外的因子と UCH-L1/UCH-L3 システム

神経変性疾患の危険因子の一つである酸化ストレスについて検討した。その結果、UCH-L1 自身が酸化修飾を受け、さらにその際非酸化型に比べ凝集性が亢進し、先に述べた蛋白質の結合性も亢進的に作用することを見出した。酸化型 UCH-L1 の性状は家族性パーキンソン病 PARK5 の原因遺伝子と考えられる I93M UCH-L1 の性状と近似しており、パーキンソン病発症の共通機序に UCH-L1 の凝集性亢進、蛋白質相互作用の変動が寄与する可能性を示した。さらに、UCH-L1 は細胞の生存性だけでなく細胞膜の脆弱性にも関わることを後根神経節細胞を用いて示した。その分子機序として phosphatidic acid との結合が関与する可能性が考えられた。個体においても UCH-L1 が酸化ストレスに対して防護的に作用することを *gad* マウスを用いて示した。ビタミン E 欠乏食投与の *gad* マウスでは神経症状の増悪が認められた。

### (4) リソソーム系など他の蛋白質品質管理系との相互ネットワーク

酸化あるいは遺伝子変異によるアミノ酸置換の結果、UCH-L1 の構造変化が生じ、その結果 chaperon mediated オートファジー (CMA) の構成成分である LAMP2 等との結合性が亢進し CMA を阻害し、本来 CMA で分解されるべきアルファシヌクレインの蓄積を引き起こす可能性を提唱した。さらに、UCH-L1 が量的に少なくともなくても CMA に影響することを UCH-L1 の発現のない *gad* マウスで示した。同マウスでは CMA 基質である GAPDH が蓄積していた。

### (5) その他

UCH-L3 についてはその生理作用として脂肪細胞の分化を促進することを見出した。UCH-L3 を欠損するマウスでは、脂肪蓄積量の減少によると考えられる痩せが存在し筋肉における脂肪酸酸化が亢進していた。末梢情報が中枢神経系にどのように影響するのかを検討する上で UCH-L3 欠損マウスは有用と考えられる。予備的ではあるが、*gad* マウスにおいても糖代謝障害の存在が考えられた。

### (6) まとめ

以上の成果は UCH-L1, UCH-L3 が相互作用を有しつつ、酸化ストレスという外部因子の受容においてインターフェース的役割を果たす可能性を示したものである。神経細胞の機能発現とその維持において脱ユビキチン化酵素がネットワークを形成し制御する機序の提唱はこれまでの知見を大きく拡大するもので、病態に関する今回の成果と合わせ、神経細胞の機能不全の克服に今後貢献する

ものと考えられる。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 15 件)

- ① Pfeffer, M., Plenzig, S., Gispert, S., Wada, K., Korf, H.W., von Gall, C. Disturbed sleep/wake rhythms and neuronal cell loss in lateral hypothalamus and retina of mice with a spontaneous deletion in the ubiquitin c-terminal hydrolase L1 gene. **Neurobiol. Age.** 2010 Apr 1. [Epub ahead of print], 査読有
- ② Nagamine, S. Kabuta, T., Furuta, A., Yamamoto, K., Takahashi, A., Wada, K. Deficiency of ubiquitin carboxy-terminal hydrolase-L1 (UCH-L1) leads to vulnerability to lipid peroxidation. **Neurochem. Int.** 57, 102-110, 2010. 査読有
- ③ Setsuie, R., Suzuki, M., Tsuchiya, Y., Wada, K. Skeletal muscles of *Uchl3* knockout mice show polyubiquitinated protein accumulation and stress responses. **Neurochem. Int.** 56, 911-918, 2010. 査読有
- ④ Mitsui, T., Hirayama, K. Aoki, S., Nishikawa, K., Uchida, K., Matsumoto, T., Kabuta, T., Wada, K. Identification of a novel chemical potentiator and inhibitors of UCH-L1 by in silico drug screening. **Neurochem. Int.** 56, 679-686, 2010. 査読有
- ⑤ Setsuie, R., Sakurai, M., Sakaguchi, Y., Wada, K. Ubiquitin dimers control the hydrolase activity of UCH-L3. **Neurochem. Int.**, 54, 314-321, 2009. 査読有
- ⑥ Goto, A., Wang, Y.L., Kabuta, T., Setsuie, R., Osaka, H., Sawa, A., Ishiura, S., Wada, K. Proteomic and histochemical analysis of proteins involved in the dying-back-type of axonal degeneration in the gracile axonal dystrophy (*gad*) mouse. **Neurochem. Int.**, 54, 330-338, 2009. 査読有
- ⑦ Yasuda, T., Nihira, T., Ren, Y.R., Cao, X.Q., Wada, K., Setsuie, R., Kabuta, T., Wada, K., Hattori, N., Mizuno, Y., Mochizuki, H. Effects of UCH-L1 on alpha-synuclein over-expression

- mouse model of Parkinson's disease. **J Neurochem.** 108, 932-944, 2009. 査読有
- ⑧ Setsuie, R., Suzuki, M., Kabuta, T., Fujita, H., Miura, S., Ichihara, N., Yamada D., Wang, Y.L., Ezaki, O., Suzuki, Y., Wada, K. Ubiquitin C-terminal hydrolase -L3 knockout mice are resistant to diet-induced obesity and show increased activation of AMP-activated protein kinase in skeletal muscle. **FASEB J**, 23, 4148-4157, 2009. 査読有
- ⑨ Suzuki, M., Setsuie, R., Wada, K. Ubiquitin carboxyl -terminal hydrolase L3 promotes insulin signaling and adipogenesis. **Endocrinology**, 150, 5230-5239, 2009. 査読有
- ⑩ Sakurai, M., Sekiguchi, M., Zushida, K., Yamada, K., Nagamine, S., Kabuta, T. Wada, K. Reduction of memory in passive avoidance learning, exploratory behavior and synaptic plasticity in mice with a spontaneous deletion in the ubiquitin C-terminal hydrolase L1 gene. **Eur. J. Neurosci.**, 27, 691-701, 2008. 査読有
- ⑪ Kabuta, T., Setsuie, R., Mitsui, T., Kinugawa, A., Sakurai, M., Aoki, S., Uchida, K., Wada, K. Aberrant molecular properties shared by familial Parkinson's disease-associated mutant UCH-L1 and carbonyl-modified UCH-L1. **Hum. Mol. Genet.**, 17, 1482-1496, 2008. 査読有
- ⑫ Kabuta, T., Furuta, A., Aoki, S., Furuta, K., Wada, K. Aberrant interaction between Parkinson's disease-associated mutant UCH-L1 and the lysosomal receptor for chaperone-mediated autophagy. **J. Biol. Chem.**, 283, 23731-23738, 2008. 査読有
- ⑬ Kabuta T Wada, K. Insights into links between familial and sporadic Parkinson's disease: Physical relationship between UCH-L1 variants and chaperone-mediated autophagy. **Autophagy**, 4, 827-829, 2008. 査読有
- ⑭ Setsuie, R., Wada, K. The functions of UCH-L1 and its relation to neurodegenerative diseases. **Neurochem. Int.**, 52, 105-111, 2007. 査読有
- ⑮ Hirayama, K., Aoki, S., Nishikawa, K., Matsumoto, T., Wada, K. Identification of novel chemical inhibitors for ubiquitin C-terminal hydrolase-L3 by virtual screening. **Bioorgan. Med. Chem**15, 6810-6818, 2007. 査読有
- [学会発表] (計20件)
- ① 紺谷千穂, 藤原悠紀, 永井義隆, 内田健康, 和田圭司, 株田智弘: 家族性パーキンソン病変異によるUCH-L1の分泌減少, BMB2010, 神戸, 12.7, 2010
- ② 和田圭司: 脱ユビキチン化酵素と axonal dystrophy: gadマウス研究からの教訓, 第41回日本臨床分子形態学会総会・学術集会, 神戸, 9.4, 2009
- ③ Hirayama K, Aoki S, Nishikawa K, Matsumoto T, Wada K: Identification of novel inhibitors for ubiquitin C-terminal hydrolase-L3 by virtual screening, 3DSig 2008. Structural Bioinformatics and Computational Biophysics, pp.40-42, Canada, 7. 18, 2008
- ④ Hirayama K, Aoki S, Nishikawa K, Matsumoto T, Wada K: Identification of novel inhibitors for ubiquitin C-terminal hydrolase-L3 by virtual screening", 16th International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology (ISMB), Canada, 7. 21, 2008
- ⑤ Hirayama K, Aoki S, Nishikawa K, Matsumoto T, Wada K: Identification of novel inhibitors for ubiquitin C-terminal hydrolase-L3 by virtual screening", The 2nd Taiwan-Japan Young Researchers Conference on Computational and Systems Biology, p.45, Tokyo, 11. 4, 2008
- ⑥ 三井丈史, 株田智弘, 株田千華, 内田健康, 和田圭司: UCH-L1 による細胞増殖促進. BMB2008, 兵庫, 12. 11, 2008
- ⑦ Suzuki M, Setsuie R, Wada K: Regulation of energy homeostasis by UCH-L1 and UCH-L3. 第51回日本神経化学会大会, 富山, 9. 11, 2008
- ⑧ Kabuta T, Furuta A, Aoki S, Furuta K, Wada K: Aberrant interaction between familial Parkinson's disease-associated mutant UCH-L1 and the lysosomal receptor for chaperone-mediated autophagy. 第51回日本神経化学会大会, 富山, 9. 11, 2008

- ⑨ Konya C, Kabuta T, Kinugawa A, Wada K: Decreased secretion of UCH-L1 and SOD1 by the mutations associated with neurodegenerative diseases. 第51回日本神経化学学会大会, 富山, 9. 11, 2008
- ⑩ Nagamine S, Kabuta T, Yamamoto K, Takahashi A, Wada K: The de-ubiquitinating enzyme, UCH-L1, and lipid peroxidation. 第51回日本神経化学学会大会, 富山, 9. 11, 2008
- ⑪ 安田徹, 和田圭司, 服部信孝, 水野美邦, 望月秀樹:  $\alpha$ -synuclein のドパミン神経毒性に対する UCH-L1 の効果. 第31回日本神経科学大会, 東京, 7. 9, 2008
- ⑫ 株田智弘, 節家理恵子, 三井丈史, 衣川亜衣子, 櫻井省花子, 青木俊介, 内田健康, 和田圭司: カルボニル化 UCH-L1 とパーキンソン病関連変異型 I93M UCH-L1 に共通した異常な分子的性質. 第31回日本神経科学大会, 東京, 7. 9, 2008
- ⑬ 節家理恵子, 古田晶子, 和田圭司: ユビキチン C 末端加水分解酵素の機能. 神経組織の成長・再生・移植研究会第23学術集会. 千葉, 5. 17, 2008
- ⑭ 和田圭司: 脱ユビキチン化酵素と神経変性. 第12回パーキンソン病フォーラム—基礎と臨床. 京都, 9. 29. 2007
- ⑮ 青木俊介, 平山和徳, 和田圭司: UCH-L ファミリー分子群を標的とした in silico ドッキング・シミュレーションによる新規作用薬剤の同定. 東京, 第15回日本精神・行動遺伝医学会, 11. 17, 2007
- ⑯ Yasuda T, Wada K, Mizuno Y, Mochizuki H: Effect of UCH-L1 on the  $\alpha$ -synuclein-induced dopaminergic neurodegeneration in vivo. Society for Neuroscience 37<sup>th</sup> Annual Meeting. San Diego, California, U. S. A., 11. 4, 2007
- ⑰ Hirayama K, Aoki S, Nishikawa K, Matsumoto T, Wada K: Identification of novel UCH-L1-potentiating compounds by in silico drug screening. Neuro 2007. Yokohama, 9. 10, 2007
- ⑱ Naito S, Ikeda S, Shimizu H, Mochizuki H, Yasuda T, Mizuno Y, Furusaka M, Fujiwara S, Suzuki J, Wada K: Small-angle neutron scattering (SANS) and dynamic light scattering (DLS) analyses

of the initial aggregation process of tau by oxidative stress. Neuro2007. Yokohama. 9. 11, 2007

- ⑲ 平山和徳, 青木俊介, 西川香里, 松本隆, 和田圭司: Virtual screeningによる UCH-L3 の新規阻害剤同定. 第35回構造活性相関シンポジウム, 京都, 11. 15, 2007
- ⑳ 平山和徳, 青木俊介, 西川香里, 松本隆, 和田圭司: virtual screeningによる UCH-L ファミリー活性調節剤探索研究. 内閣府 第2回ナノバイオテクノロジー連携群成果報告会. 12. 5, 2007

[図書] (計2件)

- ① 和田圭司, 株田智弘: UCH-L1, 日本臨床, 67 Suppl 4, 41-45, 2009.
- ② 和田圭司, 節家理恵子: 脳の脱ユビキチン化酵素活性のユビキチン単量体と二量体による調節, 生体の科学, 60 546-550, 2009.

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.ncnp.go.jp/nin/guide/r4/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

和田 圭司 (WADA KEIJI)

(独) 国立精神・神経医療研究センター・  
神経研究所疾病研究第4部・部長  
研究者番号: 70250222