

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：32620
研究種目：若手研究
研究期間：2020～2021
課題番号：20K16161
研究課題名（和文）UFM1修飾によるCYB5R3の機能変換とその異常による脳症発症機構の解明

研究課題名（英文）Regulation of CYB5R3 function by Ufmylation

研究代表者
石村 亮輔（Ishimura, Ryosuke）

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：00816960
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究ではUFM1の新規基質CYB5R3の機能解析を行った。mCherry-GFPタンデムタグを使った解析からCYB5R3がUFM1化されると小胞体選択的オートファジーを誘導することを明らかにした。またUFM1化不能CYB5R3ノックインマウスを作製し解析したところ、この変異マウスは小頭症を示した。これらのことからUFM1システムを介した小胞体選択的オートファジー不全がヒト病態に関与していることが考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

てんかんや小頭症を伴なう遺伝性重度発達障害患者からUFM1システム関連遺伝子の変異を特定し、UFM1システムの活性低下により病態を発症することを明らかにしてきた。しかしながら、UFM1の基質が不明であり、病態の発症メカニズムが不明であった。本研究では新たなUFM1の基質を同定し、その機能を明らかにした。この基質自身の変異もUFM1システム関連遺伝子の変異による疾患と同様の症状を示すことが報告されている。本研究で明らかになった分子メカニズムがヒト疾患発症機構の解明や予防機序の解明に役立つことが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we analyzed the function of CYB5R3, a novel substrate of UFM1. mCherry-GFP tandem tag analysis revealed that CYB5R3 induces ER-phagy upon UFM1 conversion. In addition, UFM1-incompetent CYB5R3 knock-in mice were generated and analyzed, and these mutant mice exhibited microcephaly. These findings suggest that the UFM1 system-mediated endoplasmic ER-phagy deficiency is involved in human pathology.

研究分野：分子生物学

キーワード：UFM1 CYB5R3 小頭症 小胞体選択的オートファジー

1. 研究開始当初の背景

ユビキチン様修飾システムは、活性化酵素 (E1)、結合酵素 (E2)、連結酵素 (E3) のカスケード反応により、ユビキチン様タンパク質 (UBLs) (ユビキチン、UFM1、SUMO、ATG12、ATG8 など) の C 末端グリシンのカルボキシル基が標的タンパク質などに共有結合するシステムである。UFM1 システムはユビキチン様修飾システムの一つであり、基質タンパク質を UFM1 修飾することで、基質の機能変換を引き起こす。UFM1 システムの活性の低下によりてんかんや小頭症を伴う重度発達障害を引き起こすことを明らかにしてきた [Muona*, Ishimura* (*co-first authors) et al, Am J Hum Genet 2016 など]。しかしながら病態を引き起こす基質が不明であるため、重度発達障害の原因となる分子メカニズムが不明である。

2. 研究の目的

質量分析により UFM1 の新規基質として NADH-cytochrome b5 reductase 3 (CYB5R3) を同定し、214 番目のリジンに UFM1 が修飾することを見出した。近年 UFM1 システムと小胞体選択的オートファジーの関わりが報告されている [Liang et al., Cell 2020, Stephani et al. eLife 2020]。本研究課題では CYB5R3 と小胞体選択的オートファジーとの関わり及びマウス個体における CYB5R3 の UFM1 化の生理的意義を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) CYB5R3 による小胞体選択的オートファジーの解析

CYB5R3 がリソソームで分解されているか否か検証するために、CYB5R3 に mCherry と GFP の蛍光タグをタンデムにつなげた。通常状態では小胞体上に局在する CYB5R3 は mCherry と GFP 共に蛍光を発するが、CYB5R3 がリソソームに運ばれ、酸性条件下になると GFP の蛍光のみが消光し、mCherry の蛍光のみが観察できる (図 1)。この発現ベクターを HeLa 細胞に導入し、飢餓処理を行うことで小胞体選択的オートファジーの誘導し解析を行った。

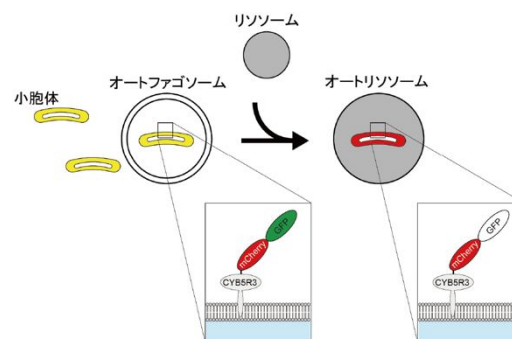


図 1. タンデムタグを用いたリソソームによる分解の検証
小胞体上に局在する CYB5R3 に mCherry-GFP タグをつなげた。

(2) マウス個体における CYB5R3 の UFM1 化の意義の解析

全身性の UFM1 化できない *Cyb5r3* ノックインマウス (214 番目のリジンをアルギニンに置換している (*Cyb5r3*^{K214R/K214R})) マウスを作出した。中枢神経特異的 *Ufm1* 欠損マウスでは小頭症となり、出生後 1 日以内に死亡したことから、脳の形態学的・組織学的解析を行った。

4. 研究成果

(1) CYB5R3 による小胞体選択的オートファジーの解析

CYB5R3-mCherry-GFP を HeLa 細胞に導入すると GFP と mCherry 共に蛍光を発し重ね合わせると黄色になった。CYB5R3 の野生型に飢餓処理を行うと赤単独のドットが見られた。一方、UFM1 化

できない K214R 変異体を細胞に導入した際には野生型に比べ赤単独のドットが減少していた(図 2)。さらにオートファジー必須遺伝子である ATG7 を欠損した細胞やオートファジー阻害剤である Bafilomycin A₁ 処理を行うと小胞体選択的オートファジーが抑制されていた(図 3)。このことから CYB5R3 の UFM1 化が小胞体選択的オートファジーを誘導することが示唆された。

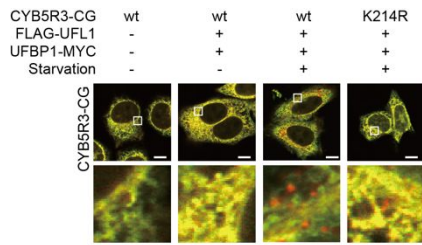


図 2. CYB5R3 による小胞体選択的オートファジーの検証
Hela 細胞に野生型ないしは K214R 変異体 (UFM1 化不能変異体) の CYB5R3-mCherry-GFP を導入した。小胞体選択的オートファジー誘導のため飢餓処理を行った。

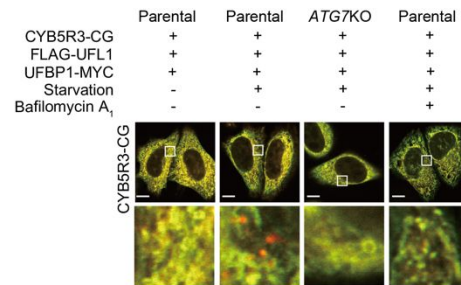


図 3. ATG7 欠損における CYB5R3 の分解の検証
Hela 野生型細胞ないしは ATG7 欠損細胞に CYB5R3-mCherry-GFP を導入した。小胞体選択的オートファジー誘導のため飢餓処理を行った。

(2) マウスにおける CYB5R3 の UFM1 化の生理的意義の解析

マウス個体における CYB5R3 の UFM1 化の生理的意義を検証するために 4 ヶ月齢のマウスの脳の大きさを調べたところ、*Cyb5r3*^{K214/K214R} ではわずかに萎縮が見られた(図 4)。しかしながら、大脳皮質の厚さには差はなかった(図 5)。中枢神経特異的 *Ufm1* 欠損マウスと比較すると症状はマイルドであるため他の基質の寄与も考えられる。

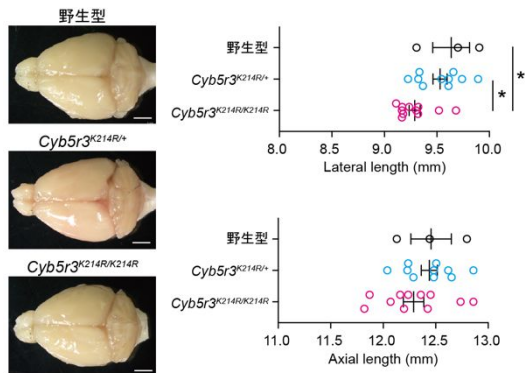


図 4. UFM1 化不能変異マウスの脳

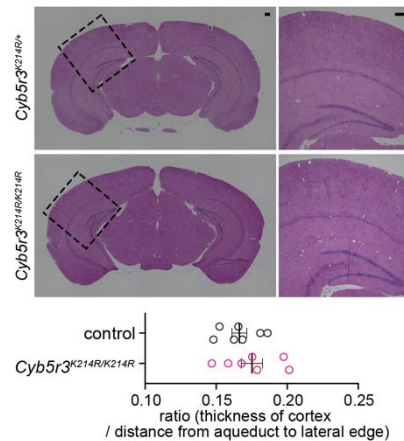


図 5. UFM1 化不能変異マウスの組織染色

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Cabrera-Serrano M, Coote DJ, Azmanov D, Goullée H, Andersen E, McLean C, Davis M, Ishimura R, Stark Z, Vallat JM, Komatsu M, Kornberg A, Ryan M, Laing NG, Ravenscroft G.	4. 巻 57
2. 論文標題 A homozygous UBA5 pathogenic variant causes a fatal congenital neuropathy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Med Genet.	6. 最初と最後の頁 835-842
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1136/jmedgenet-2019-106496	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 該当する

1. 著者名 Briere LC, Walker MA, High FA, Cooper C, Rogers CA, Callahan CJ, Ishimura R, Ichimura Y, Caruso PA, Sharma N, Brokamp E, Koziura ME, Mohammad SS, Dale RC, Riley LG; Undiagnosed Diseases Network, Phillips JA, Komatsu M, Sweetser DA.	4. 巻 7
2. 論文標題 A description of novel variants and review of phenotypic spectrum in <i>UBA5</i>-related early epileptic encephalopathy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Case Studies	6. 最初と最後の頁 a005827 ~ a005827
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/mcs.a005827	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Sakai Shun-suke, Hasegawa Atsushi, Ishimura Ryosuke, Tamura Naoki, Kageyama Shun, Komatsu-Hirota Satoko, Abe Manabu, Ling Yiwei, Okuda Shujiro, Funayama Manabu, Kikkawa Mika, Miura Yoshiki, Sakimura Kenji, Narita Ichiei, Waguri Satoshi, Shimizu Ritsuko, Komatsu Masaaki	4. 巻 42
2. 論文標題 Loss of <i>Atg2b</i> and <i>Gskip</i> Impairs the Maintenance of the Hematopoietic Stem Cell Pool Size	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular and Cellular Biology	6. 最初と最後の頁 e0002421
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/MCB.00024-21	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Ishimura R, El-Gowily A. H., Noda NN, Komatsu M
2. 発表標題 E3-ligase for the UFM1-system acts as an adaptor for ER-phagy
3. 学会等名 KEYSTONE SYMPOSIA Autophagy: Mechanisms and Disease（国際学会）
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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------