

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月 30日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22791586

研究課題名（和文） 内耳におけるユビキチン・プロテアソームシステムの機能解析

研究課題名（英文） Functional analysis of the ubiquitin-proteasome system in inner ear.

研究代表者

鬼頭 良輔 (KITO RYOSUKE)

信州大学・医学部附属病院・助教（特定雇用）

研究者番号：80419358

研究成果の概要（和文）：

難聴の原因候補遺伝子探索を目的に、内耳に発現する遺伝子群をマイクロアレイを用いて解析を行った結果、UbA52が高発現していた。本研究では内耳においてユビキチン・プロテアソーム系がどのような役割を果たしているかについて明らかにすることを目的に、マウス内耳よりユビキチン結合タンパク質を同定する事を目的とした。その結果、内耳で高発現しているユビキチン（UbA52）についてユビキチン・プロテアソーム系の標的となるタンパク質と考え、質量分析による遺伝子の同定を行った。その結果、内耳におけるユビキチンの結合基質タンパク質として候補に挙げたものとして、システインスルフィン酸デカルボキシラーゼ（CSAD）とアルデヒドデヒドロゲナーゼ（ALDH）が同定された。

研究成果の概要（英文）：

Ubiquitin-Proteasome system was an important phenomena including protein degradation, DNA repair, translational control and signal transduction. In our cDNA microarray analysis of the inner ear, UbA52 protein was highly expressed than other tissues. But the functional roll of the UbA52 protein in the inner ear did not known. In this study we tried to investigate the functional roll of the UbA52 protein in the inner ear, we performed 2D gel electrophoresis and western blot, and found 4 significant protein targets. After MS/MS analysis, the 2 of these protein were cysteine sulfinic acid decarboxylase (CSAD) and aldehyde dehydrogenase (ALDH).

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：耳科学・内耳・ユビキチン・プロテアソーム

1. 研究開始当初の背景

ユビキチンは76アミノ酸からなる低分子タンパク質で、基質タンパク質と結合するこ

とによって、それがシグナルとなり、基質タンパク質の分解が行われることが報告されている。この経路はユビキチン・プロテアソ

ームシステムと呼ばれ、タンパク質の品質管理メカニズムとして非常に注目されている。

また、従来原因や発症機序が不明とされてきたアルツハイマー病やパーキンソン病などの神経疾患や、糖尿病性筋萎縮や腎症などの代謝性疾患などがユビキチン・プロテアソーム経路の異常によって引き起こされているということが報告されており、疾患との関連性という面からも注目を集めている。

我々の研究室では、先天性難聴の原因候補遺伝子の探索および内耳の生理機能の解明を目的に、ヒト内耳より抽出した Total RNA を用いたマイクロアレイ解析を行い、内耳において高発現している遺伝子群を抽出する試みをおこなった。

その結果、内耳に高発現する遺伝子群の中に、ユビキチン遺伝子の一つである UbA52 遺伝子が内耳が、他臓器に比較して特異的に高発現していることを明らかにした。

しかしながら、内耳におけるユビキチン・プロテアソーム系の役割は全く明らかと成っていないため、内耳におけるユビキチンの機能的役割の解明や疾患との関連性についての検討を行ってきた。その結果、我々は蛍光免疫組織染色を行い、内耳における UbA52 タンパク質の局在を検討し、蝸牛では血管条部分・前庭では暗細胞部分において陽性所見を認めることを報告した。

蝸牛血管条部分・前庭暗細胞部分の部位は、イオン輸送上皮としての共通性を有しており、内耳でのイオン輸送において何らかの機能的役割を果たしている可能性が高いことが示唆された。

2. 研究の目的

ユビキチンは 76 アミノ酸からなる低分子タンパク質で、タンパク質分解、DNA 修復、翻訳調節、シグナル伝達などさまざまな生命現象に関わることが報告されている。

基質タンパク質に対するユビキチンの付加には、ユビキチン活性化酵素 (E1)、ユビキチン結合酵素 (E2)、ユビキチンリガーゼ (E3) の 3 つの酵素が関与し、基質タンパクのリシンとユビキチンの C 末端のグリシンがアミド結合することで最初のユビキチンが付加されると、ユビキチンに更に次のユビキチンが付加し、複数のユビキチンが次々と付加される。ユビキチンの付加された基質タンパク質は、プロテアソームと呼ばれるタンパク質分解複合体に輸送され分解が行われるユビキチン・プロテアソーム系の重要なシグナル分子である。

我々の研究室では、先天性難聴の原因候補遺伝子の探索および内耳の生理機能の解明を目的に、ヒト内耳より抽出した Total RNA を用いたマイクロアレイ解析を行い、内耳において高発現している遺伝子群を抽出する

試みをおこなった。その結果、内耳に高発現する遺伝子群の中に、ユビキチン遺伝子の一つである UbA52 遺伝子が内耳が、他臓器に比較して特異的に高発現していることを明らかにした。

しかしながら、内耳におけるユビキチン・プロテアソーム系の役割は全く明らかと成っていないため、内耳におけるユビキチンの機能的役割の解明や疾患との関連性についての検討を行った。その結果、我々は蛍光免疫組織染色を行い、内耳における UbA52 タンパク質の局在を検討し、蝸牛では血管条部分・前庭では暗細胞部分において陽性所見を認めることを明らかにした。蝸牛血管条部分・前庭暗細胞部分の部位は、イオン輸送上皮としての共通性を有しており、内耳でのイオン輸送において何らかの機能的役割を果たしている可能性が高いことが示唆された。

このように、1) 内耳において高発現しており、また、2) イオン輸送に重要な役割を果たす蝸牛血管条部分・前庭暗細胞部分に発現が認められたことより、聴覚や平衡感覚機能維持に重要な役割を果たすことが示唆されるが、標的となるタンパク質などに関しては未知である。本研究では、内耳における UbA52 の標的となるタンパク質を同定し、内耳におけるユビキチン・プロテアソーム系の役割を明らかにすることを目的とした。

また、日本人難聴患者におけるユビキチン遺伝子変異の関与に関して検討を行うために UbA52 遺伝子のスクリーニングを行う事もあわせて目的とした。

3. 研究の方法

8 週齢の C57BL6/J マウスを深麻酔下にて断頭して、内耳を含む側頭骨を摘出する。摘出後速やかに PBS にて洗浄し、実態顕微鏡下で側頭骨より蝸牛を摘出する。蝸牛の摘出は PBS 中で行う。

得られた組織よりタンパク質を抽出し、2 次元ゲル電気泳動にてゲル上で分離する。抗ユビキチン抗体にて Western blot 法を用いてユビキチン結合タンパク質由来の band spot を同定する。ゲル内消化によって精製したタンパク質をタンデム質量分析にて部分アミノ酸配列を決定し、ユビキチンの標的タンパク質を同定する。

また、信州大学医学部耳鼻咽喉科の管理する日本人難聴遺伝子データベースよりランダムに選択した非症候群性感音難聴患者 192 名について UbA52 遺伝子の配列のうちアミノ酸をコードするコーディング領域およびスプライスサイト周辺を含むエクソン領域を PCR 法により増幅し、直接シーケンス法による配列の決定を行った。

4. 研究成果

本研究では内耳においてユビキチン・プロテアソーム系がどのような役割を果たしているかについて詳細に解析を行う事を目的に内耳における UbA52 の標的となる基質タンパク質の同定を試みた。

マウス内耳よりタンパク質を抽出し、2次元ゲル電気泳動法にて分離した後、UbA52 のユビキチンドメインのアミノ酸配列を抗原に作成した抗ユビキチン抗体を用いて Western blot 法を用いてユビキチン結合タンパク質由来の spot を同定した。その結果図にしめすように4つの強く染色される Spot を検出した (図1)。

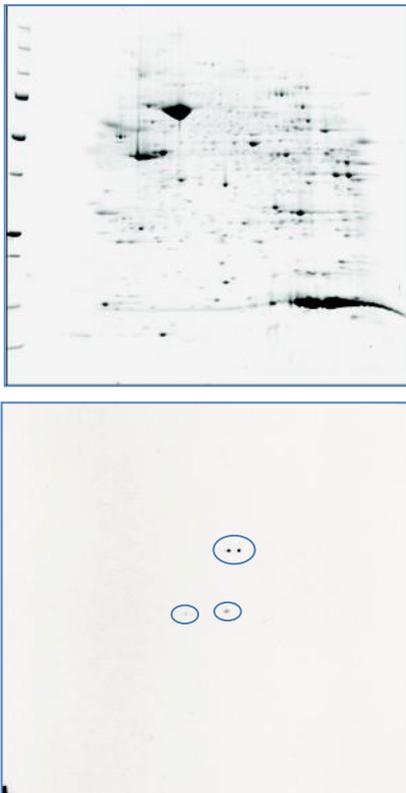


図1：マウス内耳におけるユビキチン化タンパク質の同定

上段はマウス内耳より抽出した total protein の2次元ゲル電気泳動の結果を示す。下段は上段のゲル電気泳動で分離されたタンパク質を用いて、UbA52 のユビキチンドメインのペプチドを抗原として作成した抗 UbA52 抗体による Western Blotting の結果を示す。抗 UbA52 抗体で強く標識されるタンパク質を4種類同定した。

Western Blotting により検出された spot は

UbA52 のユビキチンドメインが付加したタンパク質であり、内耳において UbA52 が高発現している事を考え合わせると、内耳における主要なユビキチン・プロテアソーム系の標的となるタンパク質と考え、ゲル内消化を行いタンパク質を抽出し、タンデム質量分析計を用いてタンパク質の部分アミノ酸配列を同定した。得られた部分アミノ酸配列を基にデータベースの検索を行い、ユビキチン標的遺伝子の同定を行った。

その結果、内耳におけるユビキチンの結合基質タンパク質として候補に挙げたものとして、システインスルフィン酸デカルボキシラーゼ (CSD) とアルデヒドデヒドロゲナーゼ (ALDH) が同定された。システインスルフィン酸デカルボキシラーゼ (CSD) とアルデヒドデヒドロゲナーゼ (ALDH) および UbA52 タンパク・推定ユビキチンリガーゼタンパクの相互作用についての機能解析を行うため、マウス内耳より RNA を抽出し、cDNA を合成した後に、動物細胞での発現ベクターおよび GFP 融合タンパク発現ベクターのクローニングを行った。得られたベクターを HEK293 細胞および COS 細胞に導入し、蛍光顕微鏡で局在を確認するとともに、抗 GFP 抗体を用いた免疫沈降をもちいることで、内耳における実際の結合の確認や細胞内の局在等を行った (論文投稿準備中)。

また、信州大学医学部耳鼻咽喉科の管理する日本人難聴遺伝子データベースよりランダムに選択した非症候群性感音難聴患者 192 名について UbA52 遺伝子の直接シーケンシング解析を行った結果、多型も含めてアミノ酸置換を伴うような塩基置換は検出されなかった。従って UbA52 遺伝子は日本人難聴患者の主要な原因では無いことが明らかとなった。

その一因として UbA52 はユビキチンとリボソームタンパク質 A52 が繋がった構造をしており、タンパク質構造に大幅な影響を及ぼすような変異の場合には、ユビキチンだけでなくリボソームによる翻訳にも大きな影響が出てしまうため、難聴以外の症状を伴う症候群性の疾患となる可能性が高く、今回対象とした難聴だけを呈する患者からは検出されないためであると考えられた。

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)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鬼頭 良輔 (KITO RYOSUKE)

信州大学・医学部附属病院・助教（特定雇用）

研究者番号：80419358