

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26650012

研究課題名(和文)Ufm1タンパク質修飾システムによる生体制御機構の解明

研究課題名(英文)Physiological role of Ufm1 system

研究代表者

小松 雅明 (Komatsu, Masaaki)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：90356254

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：1.Ufm1を活性化するE1様酵素UBA5をコードする遺伝子変異(コンパウンドヘテロ)が、小頭症、癲癇などを示す遺伝性重篤発達障害を引き起こすことを見出した。2.上記遺伝性疾患を引き起こす変異を有するUba5ノックインマウスを作成した。3.Ufm1結合反応を細胞内で容易に検出できる実験系を立ち上げ、Ufm1の標的タンパク質を同定した。

研究成果の概要(英文)：1.We identified UBA5 as a causative gene for a hereditary developmental disease. 2.We generated knock-in mice harboring the disease-related Uba5 mutation. 3.We developed an experiment system that we can easily detect Ufm1-conjugated proteins, and we identified several novel targets for Ufm1 using this system.

研究分野：分子細胞生物学、生化学

キーワード：タンパク質修飾 Ufm1 Uba5 ノックアウトマウス 遺伝性発達障害

1. 研究開始当初の背景

タンパク質修飾は、タンパク質機能の多様性を生む。すなわち、限られた遺伝情報を増幅させる。高等動物には約 10 のユビキチン様タンパク質 (Ubiquitin-like proteins: UBLs) が存在し、それぞれ特異的な E1、E2、E3 を介して基質タンパク質に共有結合される。基質タンパク質への UBLs の付加は、基質の分子集合や機能変換を引き起こし、生命活動に必須な多彩な生物学的プロセスを変容させる (van der Veen, AG., et al., *Annu. Rev. Biochem.* 2012)。我々は、ゲノム上に残された最後のユビキチン様タンパク質反応系 Ufm1 システムを同定し (Komatsu, M., et al., *EMBO J.* 2004、Kang, S.H., et al., *J Biol Chem.* 2007、Tatsumi, K., et al., *J Biol Chem.* 2010)、そのマウス遺伝学的解析から Ufm1 システムが赤血球分化に不可欠 (Tatsumi, K., et al., *Nat Commun.* 2011) であることを明らかにした。

2. 研究の目的

我々は、新規ユビキチン様修飾システム Ufm1 システムを発見し、その活性化酵素 Uba5 の遺伝子破壊からこのシステムが造血に必要不可欠であることを明らかにしてきた。しかし、他のユビキチン様タンパク質の原子レベルにおけるタンパク質修飾機構や個体レベルにおける病態生理が判明しつつある一方、Ufm1 システムはともに進展していない。本研究課題では、独自に作出した Ufm1 システムの遺伝学的解析ツールを駆使し、Ufm1 システムの分子から個体までの研究を包括的に展開し、Ufm1 タンパク質修飾システムによる生体の制御機構の全容解明を目指す。

3. 研究の方法

我々は遺伝性の新規重症発達障害の複数の家系において UFM1 の活性化酵素 UBA5 をコードする遺伝子の変異を同定した (未発表デー

タ)。本研究課題では、確立済みの試験管内再構成系、作製済みの神経特異的 Ufm1 ノックアウトおよび基質探索用の FLAG-His-Ufm1 トランスジェニックマウスを基盤に、Ufm1 標的基質の同定、Ufm1 修飾による細胞内制御機構を明らかにする。特に、新規遺伝性発達障害の原因遺伝子として UBA5 の変異が複数の家系で同定されたので、その変異がどのように病態に結びつくのかを解明し、他の UBLs 同様に Ufm1 システムの重要性を本邦から提唱する。

4. 研究成果

(1) 新規遺伝性重症発達障害と Ufm1 システム

重症発達障害患者を持つヨーロッパの 4 家系のエキソーム解析から、患者は UBA5 のミスセンス変異ないしはナンセンス変異との複合ヘテロ接合体であることが判明した (未発表データ。Dr. Anna-Elina Lehesjoki らとの共同研究)。フランスのグループも同様の変異を同定している (Personal communication)。すでに確立済みの試験管内再構成系および細胞発現系において変異 UBA5 の酵素活性を測定した結果、患者由来の変異 UBA5 は酵素活性が低下していることが判明した。患者由来線維芽細胞における UBA5 活性を評価したところ、やはり UBA5 活性の低下が確認された。

(2) 神経特異的 Ufm1 欠損マウスの表現系解析

条件付き Ufm1 欠損マウスと nestin-Cre トランスジェニックマウスとを交配させ、神経特異的 Ufm1 欠損マウス *Ufm1^{fl/fl}; nestin-Cre* マウスを作出した。このマウスは、新皮質後頭領域、間脳、視床の萎縮を伴った小頭症を示し、生後 1 日以内に死亡した。

この表現型は変異 UBA5 複合ヘテロ接合体を持つ重症発達障害患者の症状と一致する。本

変異マウスの胚性期から新生児期の神経細胞死、神経分化、神経幹細胞維持を形態学的に解析したところ、新皮質後頭部において神経細胞死が確認された。

(3) 新規遺伝性重篤発達障害モデルマウスの作成

新規遺伝性重篤発達障害において $UBA5^{xxx/xxx^*}$ のコンパウンドヘテロを持つ患者が複数存在する。 $Uba5^{xxx^*}$ の mRNA は Nonsense-mediated mRNA decay により分解されることから、本患者では $Uba5^{xxx}$ のみ発現する。我々は $Uba5$ ヘテロマウス ($Uba5^{+/-}$) を作出済みである (Tatsumi, K., et al., *Nat Commun.* 2011)。また、患者変異の一つを持つ $Uba5$ ノックインマウス ($Uba5^{+/xxx}$) も作出した。この2ラインのマウスを交配させることにより、 $Uba5$ に関しては患者 ($Uba5^{xxx/xxx^*}$) と同等の遺伝型となるマウスを作出できた。現在、本マウスの表現型解析を推進し、モデルマウスとなるか検証中である。

(4) Ufm1 の基質探索-1

Ufm1 システムの機能解明において必要不可欠な課題は基質タンパク質 (群) の同定である。我々は HEK293T 細胞を用いた Ufm1 の基質探索を行い、基質として小胞体局在タンパク質 UFBP1 を同定した (Tatsumi, K., et al., *J Biol Chem.* 2010.)。しかし、 $Uba5$ 欠損マウスの解析から複数の Ufm1 標的タンパク質が存在することが判明した (Tatsumi, K., et al., *J Biol Chem.* 2010., *Nat Commun.* 2011)。Ufm1 の基質を同定するため、全身性に FLAG-His-Ufm1 を発現するトランスジェニックマウスを作製した。このマウスの様々な細胞、組織からニッケルカラム、FLAG 抗体を用いて FLAG-His-Ufm1 と基質タンパク質共有結合体を精製し、LC-MS/MS による基質の同定を行い、幾つかの基質候補を得た。同定した基質候補は、すでに確立している *in vitro*

Ufm1-conjugation assay にて真の基質か否かの確認を行う予定である。

(5) Ufm1 の基質探索-2

Ufm1 の基質の一つである Ufbp1 の Lys267 に Ufm1 が結合すると Ufm1 の E3 リガーゼである Uf11 のアダプター分子として機能する (Yoo, H.M., et al., *Mol Cell* 2014, 未発表データ)。興味深いことに、HEK293T 細胞に FLAG-Ufm1、Uf11 および Ufbp1 を過剰発現させるだけで、複数の Ufm1 が共有結合したタンパク質が出現することを見出した。さらに、この Ufm1 共有結合体は脱酵素である Ufsp2 を CRISPR-Cas9 システムによりノックアウトすることで飛躍的に高感度で検出できることが分かった。この系を用いて、FLAG 抗体を用いて FLAG-Ufm1 と基質タンパク質共有結合体を精製し、LC-MS/MS による基質の同定を行った。その結果、幾つかの新規 Ufm1 ターゲットを同定した。

(6) オートファジー関連 UBL GABARAP と UBA5 結合領域の同定

$Uba5$ のオートファジー関連タンパク質 GABARAP の結合領域を決定するとともに、その結合様式を X 線構造解析にて決定し、論文報告を行った (Habisov, S., et al., *J Biol Chem.* 2016.)。

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1件)

1 Habisov S, Huber J, Ichimura Y, Akutsu M, Rogova N, Loehr F, McEwan DG, Johansen T, Dikic I, Doetsch V, Komatsu M, Rogov VV, Kirkin V. Structural and Functional Analysis of a Novel Interaction Motif within UFM1-activating Enzyme 5 (UBA5)

Required for Binding to Ubiquitin-like
Proteins and Ufmylation. J Biol Chem. 査
読 有 291, 2016, 9025-41 doi:
10.1074/jbc.M116.715474.

〔学会発表〕(計1件)

1 石村亮輔、植村武文、和栗聡、田中啓二、
小松雅明 神経系におけるユビキチン様修飾
システム Ufm1 システムの役割 BMB2015 2015
年 11 月 30 日～2015 年 12 月 04 日 神戸ポ
ートアイランド(兵庫県神戸市)

〔図書〕(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.niigata-u.ac.jp/bc1/welcome.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

小松 雅明 (KOMATSU, Masaaki)

新潟大学・医歯学系 教授

研究者番号：90356254