

機関番号： 84503  
研究種目： 国際共同研究加速基金(帰国発展研究)  
研究期間： 2017~2019  
課題番号： 15K21769  
研究課題名(和文) ユビキチン化による神経細胞スパインの制御機構  
研究課題名(英文) Regulation of neuronal spine by ubiquitination  
研究代表者  
川辺 浩志 (KAWABE, Hiroshi)  
公益財団法人神戸医療産業都市推進機構・上席研究員  
研究者番号： 00582454  
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 44,000,000円

研究成果の概要(和文)：脳内の神経ネットワークで、神経細胞間で情報はシナプスを介して軸索から樹状突起へと伝わる。シナプスの樹状突起側は棘のような構造を取り、スパインと呼ばれている。スパインの大きさは記憶や学習の過程で変化することが報告されており、その制御機構の解析は精神疾患の病態を理解する上でも重要と考えられている。本研究ではタンパク質の HECT 型 E3 ユビキチンリガーゼによって触媒されるユビキチン化に注目して、特異的なユビキチン化がどのようにスパイン形成をはじめとした神経細胞の発達を制御するかを明らかにしてきた。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

本課題の研究で、これまで未知の部分が多かったユビキチン化による神経細胞発達の制御機構に関して、多くの知見が得られた。中でも知的障害を伴う発達障害である Kaufman 症候群の原因遺伝子で E3 ユビキチンリガーゼをコードする Ube3B が、スパインの形成と形態を制御する機構を見出した。この成果は将来的に知的障害の原因の解明や治療に発展する可能性がある。

研究成果の概要(英文)： In the neuronal network, information is transferred between two neurons via synapses. Postsynapse is integrated in the dendritic spine. The size of spine is related to the number of neurotransmitter receptors on it and the regulation of spine morphology is of particular importance for the understanding of the pathology of psychiatric disorders. In our project, we studied the role of specific protein ubiquitination mediated by HECT type E3 ligases in the regulation of neuronal development including the spine formation.

研究分野： 神経科学

キーワード： スパイン、ユビキチン化、超解像顕微鏡

#### 1. 研究開始当初の背景

シナプス形成は神経回路を形成するのに非常に重要なステップである。多くの細胞内情報伝達経路が、細胞骨格の再構成と細胞内膜輸送を制御することでこのステップを制御している。こういった細胞内情報伝達の異常がダウン症候群や自閉症などの多くの神経発達障害で報告されている。ユビキチン化はリン酸化と同様、タンパク質の翻訳後修飾で、E1, E2, E3 の3つのクラスの酵素によって段階的に触媒される。中でも E3 リガーゼはユビキチン化の基質特異性を決定するため、最も重要と考えられている。ドメイン構造から E3 リガーゼは HECT 型と RING Finger 型に分類できる。ヒトゲノムには 28 種類の HECT 型 E3 リガーゼと約 570 種類の RING Finger 型 E3 リガーゼがコードされている。古くからアルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患にはユビキチン化が関与していると知られているが、最近、神経細胞発達にも特異的なユビキチン化が重要な役割を果たすことが報告され始めた。しかしながら、特にスパイン形成に関してユビキチン化の役割は十分に明らかになっていなかった。本研究では HECT 型 E3 リガーゼの中でも特に Nedd4-2, WWP1, WWP2, そして Ube3B の神経細胞発達における機能に注目して研究した。

#### 2. 研究の目的

哺乳類の体内で神経細胞は最も複雑な機能と構造をもっている。神経細胞の発達は、タンパク質や脂質のリン酸化やカルシウムの流入などでトリガーされるシグナル経路ネットワークによって細胞骨格の再構成や細胞膜の供給が制御されることで起こることが報告されている。タ

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

ンパク質のユビキチン化は基質タンパク質の分解だけでなく、その局在や機能を制御することが知られているが、特に神経細胞における機能は未解明である。本研究では知的障害を伴う Kaufman 症候群原因遺伝子 Ube3B と遺伝性てんかん関連遺伝子 Nedd4-2 そしてこれらの相同遺伝子である Wwp1 と Wwp2 の条件付き欠損マウスを使い、これらの E3 リガーゼを介した特異的ユビキチン化の神経細胞発達、主にスパインの形成への関与を明らかにすることを目的とした。次に CRISPR/Cas9 法を使い、網羅的にユビキチン関連遺伝子をノックアウトし、スパイン形成に関与する遺伝子ネットワークの全容を明らかにすることも目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) Nedd4-2, WWP1, WWP2, そして Ube3B の生理的基質を同定とその性状解析: まず、HECT 型 E3 リガーゼの中でも特に Nedd4-2, WWP1, WWP2, そして Ube3B に注目して、これらの脳特異的条件付き欠損マウス (bKO) を使って質量分析で生理的基質をスクリーニングした。これらの bKO ではそれぞれの E3 リガーゼの基質はユビキチン化されないために分解されず、細胞内でその発現量が増加していることが期待される。すでに Nedd4-2 bKO に関して、bKO マウスとコントロールマウスから精製したシナプス膜画分を使って比較定量的プロテオミクスにより bKO で発現が上昇しているタンパク質を 3 種類同定した。これらは *in vitro* ユビキチン化アッセイで効率よく Nedd4-2 によってユビキチン化された。本課題では同様の方法で、Ube3B bKO と Wwp1/Wwp2 bKO マウスを使ってそれぞれの E3 リガーゼの基質のスクリーニングを行なった。

(2) それぞれの E3 リガーゼによるスパイン形成をはじめとした神経細胞発達の制御機構の解明: 超解像 STED 顕微鏡とコンフォーカル顕微鏡を使って海馬と大脳皮質の神経細胞のスパイン形態と観察した。この目的で、*in utero* electroporation 法 (IUE) で神経細胞に EGFP を発現させて、生後に脳を PFA で化学固定して脳組織内でスパイン形態と観察した。すでにそれぞれの E3 リガーゼの bKO に関しては、それぞれに特異的な表現型を観察していたが、本課題では、(1)で同定した E3 リガーゼの基質を野生型神経細胞に過剰発現させて、スパイン数を観察した。

本実験を遂行中に、Wwp1/Wwp2 bKO マウスの大脳皮質神経細胞の皮質内の神経細胞移動に異常が確認できた。この予想外の結果を詳細に検討するために、IUE で Wwp1 と Wwp2 に関連する遺伝子をノックダウンや過剰発現させる目的で、shRNA やリコンビナントタンパク質を発現させて神経細胞移動に対する影響を研究した。

(3) 神経ネットワークと高次機能におけるそれぞれのユビキチン化の機能の解明: Nedd4-2 bKO と Ube3B bKO に関してスパインの数と形態に異常が観察されたため、それぞれの E3 リガーゼの神経ネットワークにおける機能を検討した。その目的で、Nedd4-2 bKO と Ube3B bKO から海馬スライスを調整して、低濃度のグルタミン酸を投与して  $\gamma$ -oscillation を測定した。さらに行動学的実験で、それぞれの E3 リガーゼの欠損マウスを解析した。

### 4. 研究成果

(1) Nedd4-2, WWP1, WWP2, そして Ube3B の生理的基質を同定とその性状解析:すでに Nedd4-2 の基質候補として 3 つの膜貫通タンパク質を同定しており、これらのリコンビナントタンパク質は Nedd4-2 によってユビキチン化されることも確認していた。また、これらの基質はいずれも Nedd4-2 bKO で発現量が増加していた。これらの基質のユビキチン化の生理的意義を確認するために、Nedd4-2 bKO の海馬スライスから  $\gamma$ -oscillation を測定したところ、特徴的な表現型を確認した。今回同定した基質に対する阻害剤を投与したところ、これらの表現型は効率よく回復した。この結果から、Nedd4-2 bKO で基質が分解されずに発現量が増加することが、 $\gamma$ -oscillation の制御に重要であると結論した。この成果から、Nedd4-2 を介したユビキチン化が局所神経ネットワークの活性に重要であることが明らかになった。

Wwp1/Wwp2 bKO を使った基質のスクリーニングでいくつかのアクチン結合タンパク質が同定され、*in vitro* ユビキチン化実験で、これらの基質のリコンビナントタンパク質が Wwp1 と Wwp2 によってユビキチン化されることを明らかにした。

Ube3B bKO を使った基質のスクリーニングの結果、統合失調症の発症に関連している脱リン酸化酵素である Ppp3cc を基質候補として同定した。*in vitro* ユビキチン化実験で、Ppp3cc のリコンビナントタンパク質が Ube3B によってユビキチン化されることを明らかにした。

(2) それぞれの E3 リガーゼによるスパイン形成をはじめとした神経細胞発達の制御機構の解明: IUE で神経細胞に EGFP を発現させて、PFA で固定した脳を使って超解像 STED 顕微鏡やコンフォーカル顕微鏡で EGFP からのシグナルを観察してスパイン形態の解析を行った。E3 リガーゼの bKO マウスでは各々固有の表現型が観察できた。それぞれの E3 リガーゼの一つ一つの基質を野生型神経細胞に過剰発現させることで、E3 リガーゼの bKO と同様の表現型を確認した。例えば、(1)の実験で 5 つの Ube3B の基質候補を同定したが、そのうちの一つである Ppp3cc を野生型海馬神経細胞に過剰発現させた場合、Ube3B bKO と同様にスパイン数が増加していた。この結果から Ube3B によって Ppp3cc がユビキチン化されて分解に導かれることが、スパイン

数の抑制につながると結論した。Ppp3cc をコードする遺伝子が統合失調症と強い関連があることが複数の研究グループから報告されており、Ube3B による Ppp3cc の発現制御がヒトでもスパイン数の制御を介して脳高次機能に影響する可能性が考えられた(Ambrozkiewicz, 川辺ら, Mol Psychiatry, 2020)。

Wwp1/Wwp2 bKO マウスを使って同様の研究を計画していたが、予想外の結果が得られ、研究計画を一部変更した。神経細胞は発達中の大脳皮質内で脳室帯から辺縁帯に移動する。脳室帯にある誕生直後の神経細胞に IUE で EGFP 発現ベクターを導入して移動中の神経細胞を可視化した。その結果、Wwp1/Wwp2 欠損神経細胞は辺縁帯に移動する速度が遅くなっていることが明らかになった。また、Wwp1 と Wwp2 の発現制御が神経細胞の移動に重要であることも明らかになった(Ambrozkiewicz, 川辺ら, Neuron, 2018)。

(3) 神経ネットワークと高次機能におけるそれぞれのユビキチン化の機能の解明：Ube3B bKO で認められたスパイン数の増加が神経ネットワークにどのように影響するか観察する目的で、Ube3B bKO を使って電気生理学的実験を行なった。海馬スライスに低濃度のグルタミン酸を投与して  $\gamma$ -oscillation を測定したところ、対照群マウスに比べてその強度が増加していることが明らかになった。一方、Ppp3cc が関連していると考えられている統合失調症の患者では  $\gamma$ -oscillation が低下していることが報告されている。また、行動学的解析では Ube3B bKO でプレパルス抑制が増加していることも明らかになった。プレパルス抑制は統合失調症患者で減少することが知られている。このように発達障害である Kaufman 症候群の原因遺伝子 Ube3B の欠損が、一部で統合失調症と正反対の表現型につながる事が明らかになった。これらの成果は Ube3B の基質で統合失調症関連遺伝子産物である Ppp3cc の発現量の調節が正常な脳高次機能に非常に重要であることを示唆しており、その異常が精神疾患につながる可能性が考えられる(Ambrozkiewicz, 川辺ら, Mol Psychiatry, 2020)。

なお、一連の研究で多くの条件付き欠損マウスを解析してきた。その過程で、脳特異的に Cre 組換え酵素が発現すると信じられてきた Cre 発現マウスの多くで、稀に生殖細胞にも Cre 組換え酵素が発現する可能性があることを発見した。このために、脳特異的に標的遺伝子を欠損させることが不可能になる。この問題とその解決法を世界にさきがけて報告した(Luo, 川辺ら, Neuron, 2020)。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

1. The murine ortholog of Kaufman oculocerebrofacial syndrome protein Ube3b regulates synapse number by ubiquitinating Ppp3cc. Ambrozkiewicz, M.C.\*\* , ... Tarabykin, V.\* , and **Kawabe, H.\* , \*\***, *Mol Psychiatry* (査読有) オンラインで発表されたばかりなので、巻やページなどの情報は未定 (他 21 名、全 24 名中 24 番目、\*Senior authors, \*\*Co-corresponding authors) doi.org/10.1038/s41380-020-0714-8
2. Optimizing Nervous System-Specific Gene Targeting with Cre Driver Lines: Prevalence of Germline Recombination and Influencing Factors. Luo, L., ... **Kawabe, H.\***, and Craig, A.M. \*, *Neuron* (査読有) 106(1), 37-65, 2020. (他 53 名、全 56 名中 55 番目、\*Co-corresponding authors) doi.org/10.1016/j.neuron.2020.01.008
3. Polarity acquisition in cortical neurons is driven by synergistic action of Sox9-regulated Wwp1 and Wwp2 E3 ubiquitin ligases and intronic miR-140. Ambrozkiewicz, M.C.\*\* , ... Tarabykin, V.\* , and **Kawabe, H.\* , \*\* , \*\*\***, *Neuron* (査読有) 100(5), 1097-1115, 2018. (他 18 名、全 21 名中 21 番目、\*Senior authors, \*\*Co-corresponding authors, \*\*\*Lead contact) doi.org/10.1016/j.neuron.2018.10.008

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

出願年：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

[その他]  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号 (8 桁)：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。