

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08305

研究課題名(和文) アンジェルマン症候群責任遺伝子産物Ube3aの新たな転写制御機構に関する研究

研究課題名(英文) The target gene of Ube3a is implicated in transcriptional regulation

研究代表者

古米 亮平 (Furumai, Ryohei)

国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・客員研究員

研究者番号：30450414

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：アンジェルマン症候群はUbe3a というユビキチン化酵素の変異や欠失で起こる。Ube3a の標的は数多く知られるが、中枢神経細胞のシナプスにおける特定の蛋白分解機能でこの病態を説明できるとされている。一方で、Ube3a は核内でp53 や核内受容体などの転写因子を介して転写に直接関与することが古くから知られており、そもそも神経細胞の核内に主に局在する。本研究はこの症候群の病態にはUbe3a の核内機能、特に転写制御機構が重要な関わりを持つ可能性があるという仮説の元、分子生物学・生化学的アプローチからUbe3a の新たな機能を見出し、アンジェルマン症候群の新たな治療法への可能性を探る。

研究成果の概要(英文)：UBE3A is a responsible gene for the pathogenesis of Angelman syndrome (AS), a neurodevelopmental disorder. Since UBE3A encodes an E3 ubiquitin ligase, several targets have been identified including synaptic molecules. Although proteolysis occurs mainly in the cytoplasm, UBE3A localizes not only in the cytoplasm but also in the nucleus. In fact, UBE3A has been classically known as a transcriptional regulator of nuclear receptor family. However, the function of UBE3A in the nucleus remains unclear especially in neurophysiology. Thus, we focused on the involvement of UBE3A in transcription in the nuclei of neurons. Genome-wide transcriptome analysis revealed that downstream of Interferon Regulatory Factor (IRF) was changed in UBE3A-deficient AS model mice. In vitro biochemical analyses further demonstrated that UBE3A could enhance IRF-dependent transcription. These results suggested the novel function of UBE3A as a transcriptional regulator of immune system in brain.

研究分野：病態医化学

キーワード：発達障害 アンジェルマン症候群 ユビキチン化酵素 転写制御

### 1. 研究開始当初の背景

アンジェルマン症候群(Angelman Syndrome, AS)は、幼少時における重篤な知的障害・発育障害をはじめとし、睡眠障害・てんかん・ぎこちない体の動き・頻繁に笑うなどの症状を示す、約二万人に一人の確率で発症する神経遺伝病である。この病気はUbe3aという単一遺伝子の変異や欠失によって引き起こされることから、長い間研究対象となってきた。Ube3a遺伝子産物はユビキチン転移酵素(E3 リガーゼ)活性ドメインを持ち、その標的としてがん抑制蛋白質p53を含む多くの標的が同定されてきたが、AS病態との関連、特に中枢神経細胞における役割に関しては長い間不明であった。2010年、M. Greenberg のグループにより、Ube3aのユビキチン化標的として二つのシナプス分子ArcとEphexin5が同定され、ASにおいてこれらが分解されずに過剰に発現していることから、中枢神経系に異常をきたしている可能性が報告された(Greer et al., Cell, 2010; Margolis et al., Cell, 2010)。

一方、古くから癌細胞の研究において、Ube3aは核内受容体などと協調して転写制御を行うという報告もあり(Nawaz et al., Mol Cell Biol, 1999 etc.)、神経細胞においてもUbe3aは主に核内に局在することが多数報告されている(Godavarthi et al., Hum Mol Genet, 2012 etc.)。Greenberg らの主張は、Ube3a があくまでシナプスにおいて特定の分子の分解に関わっているというものであり、中枢神経細胞の核内におけるUbe3aの役割に関しては不明である。重要なことには、Greenberg らの論文に対して、その後すぐにArcはUbe3aの標的ではなく、核内受容体を介して転写レベルで制御されているという反論論文が出されている(Kuhnle et al., Proc Natl Acad Sci, 2013)。つまり、Ube3aの神経細胞における機能に関しては、Arcへの関与を含め、まだ多くの未知の点が残されていることを示唆している。

### 2. 研究の目的

重篤な発育障害・知的障害を起こす神経遺伝病、アンジェルマン症候群はUbe3aというユビキチン化酵素の変異や欠失で起こる。Ube3aの標的は数多く知られるが、中枢神経細胞のシナプスにおける特定の蛋白分解機能でこの病態を説明できるとされている。一方で、病態との関連は全く不明であるが、Ube3aは核内でp53や核内受容体などの転写因子を介して転写に直接関与することが古くから知られており、そもそも神経細胞の核内に主に局在する。本研究はこの症候群の病態にはUbe3aの核内機能、特に転写制御機構が重要な関わりを持つ可能性があるという仮説の元、分子生物学・生化学的アプローチからUbe3aの新たな機能を見出し、アンジェルマン症候群の新たな治療法への可能性を探ることを目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) Ube3aの核内における役割に注目し、マイクロアレイによってUbe3aの欠損したASモデルマウスと野生型マウスの脳海馬組織神経細胞のトランスクリプトーム比較解析を行った。

(2) 標的として同定した IRF(Interferon Response Factor)との関係を明らかにするために免疫沈降法やルシフェラーゼリポーターアッセイ法などの生化学的手法を用いた。

(3) 標的としての IRF2 のノックアウトマウスを用いて、網羅的行動解析を行った。行ったテストバッテリーは、general health、light/dark transition、open field、USV、Marble bury、Y-maze、3-chamber、rotarod、Morris water maze、ear conditioning、foot print、tail suspension、Locomotor activity の 12 種類であり、マウスにとってストレスが少ないと思われるテストから順に行った。その結果より補足実験として、IRF2 ノックアウトマウスの小脳の形態的解析を行った。小脳の各葉の数、分子層の厚さを解析するため、

マウスの脳組織切片を用いてニッスル染色を行った。加えてプルキンエ細胞の樹状突起の形態を解析するため、カルピンジン抗体を用いた脳組織切片の免疫組織染色、クロム酸銀を用いたゴルジ染色を行った。また、ゴルジ染色サンプルを用いてスパイン数を計測した。

#### 4. 研究成果

(1) マイクロアレイの結果、約300個の遺伝子の発現に有意な変化があることが分かり、Ube3aによる広範囲な転写レベルでの制御機構が示唆された。興味深いことにパスウェイ解析の結果、これらの遺伝子群には免疫関連遺伝子が有意に多く存在することが分かった。それらの遺伝子群の上流因子として、IRF (Interferon Response Factor) というウィルス感染に対する免疫応答を担う転写因子が多く存在することが分かった。これはUbe3aが核内で転写因子IRFの転写を制御していることを示唆するものだが、実はUbe3aはヒトパピローマウィルス由来蛋白質E6の結合因子として、古くは別名E6-AP (E6-Associated Protein) とも呼ばれていたことを想起させる。また、一般的に発達障害や精神疾患などの中枢神経系の疾患における免疫系の関与は昔から示唆されてきているものの、明確な証拠はまだないのが現状であり、本成果が一つの具体例となるかもしれない。

(2) 免疫沈降実験の結果、IRF1, IRF2はUBE2Aと結合することを明らかにした。またルシフェラーゼリポーターアッセイ実験の結果、UBE3AはIRFによる転写制御E3ユビキチンリガーゼ活性を介して活性化することを明らかにした。IRFファミリーの中でIRF2に注目した。IRF2は転写抑制的に働き、ASモデルマウスではIRF2の機能が低下していることが示唆された。

(3) 網羅的行動テストバッテリーの結果から、ロータロッドテストにおいて IRF2 ノック

アウトマウスは野生型マウスと比較して加速するロッド上を歩ける時間が短い傾向を得たが統計的に有意ではなかった。また、foot print テストにおける歩行時の後肢の角度 (paw abduction) に関して、IRF2 ノックアウトマウスは野生型マウスと比較して広い傾向がみられた。また、左右前肢の幅 (paw width) が広い傾向がみられた。

以上の結果から、IRF2 ノックアウトマウスは小脳由来の運動機能に異常がある可能性が考えられたため、IRF2 ノックアウトマウスの小脳の形態的解析を行った。まず、小脳の各葉の数、分子層の厚さを解析するため、マウスの脳組織切片を用いてニッスル染色を行ったが、これらの形態に異常は認められなかった。プルキンエ細胞の樹状突起の形態を解析するため、カルピンジン抗体を用いて脳組織切片の免疫組織染色を行った。組織染色の結果、ノックアウトマウスではプルキンエ細胞の樹状突起の伸長に異常がある可能性が考えられた。しかし、免疫染色では樹状突起の先端までを定量的に測定することが難しいため、クロム酸銀を用いたゴルジ染色を行ったが、ゴルジ染色において樹状突起の伸長の異常はみられなかった。

#### 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)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔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：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

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

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

古米 亮平 (FURUMAI Ryohei)  
国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総合  
研究センター・客員研究員  
研究者番号：30450414

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

内匠 透 (TAKUMI Toru)  
国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総合  
研究センター・チームリーダー  
研究者番号：00222092

##### (4) 研究協力者

( )