

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K21706

研究課題名(和文) ユビキチンリガーゼ破綻による神経変性疾患発症機構

研究課題名(英文) Pathogenic mechanism of neurodegenerative diseases associated with dysfunction of ubiquitin ligase

研究代表者

金子 雅幸 (Kaneko, Masayuki)

広島大学・医歯薬保健学研究院(医)・准教授

研究者番号：10322827

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者が同定した37種の膜貫通型ユビキチンリガーゼのうち、アルツハイマー病患者の脳において発現が増加しているRNF182を中心に解析を進めた。RNF182は中枢組織特異的に発現し、特に海馬に多く分布する。RNF182は、後期エンドソームおよびライソソームに局在していたが、RNF182結合タンパク質としてライソソームタンパク質LAPTM4Aを同定した。RNF182はLAPTM4AをK63型ポリユビキチン化することで、アミノ酸トランスポーターLAT1とLAPTM4Aの結合を増強する。結果的に、RNF182はmTORC1を活性化することでオートファジーを抑制している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We identified 37 transmembrane ubiquitin ligases. In this study, we focused on RNF182, which is upregulated in the brain of Alzheimer's disease patients. RNF182 is expressed specifically in the central nervous system and more intensely in the hippocampus. RNF182 is mainly localized in late endosomes and lysosomes. We identified the lysosome membrane protein, LAPTM4A, as an interactor with RNF182. RNF182 processed K63-linked polyubiquitin chains on LAPTM4A and promoted interaction of LAPTM4A with amino acid transporter, LAT1. Consequently, RNF182 may induce mTORC1 signaling that leads to inhibition of autophagy.

研究分野：神経化学

キーワード：ユビキチンリガーゼ 神経変性疾患 アルツハイマー病 ライソソーム オートファジー アミノ酸トランスポーター 神経細胞 ユビキチン化

## 1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病 (AD) や筋萎縮性側索硬化症 (ALS) などの神経変性疾患に対する現在の薬物療法は対症療法であり、根本的治療薬の創製が望まれている。神経変性疾患に共通してみられる病理的特徴は、神経組織における変性タンパク質の凝集・蓄積で、それに起因する神経細胞死によって神経変性疾患が発症すると考えられてきた。さらに近年、変性タンパク質の蓄積による小胞体機能の破綻が引き起こす小胞体ストレスが、神経変性疾患の発症に関与することが示唆されている。

研究代表者はこれまでの研究で、小胞体ストレスを抑制する因子として変性タンパク質を小胞体より排出し、プロテアソームにより分解する小胞体関連分解 (endoplasmic reticulum associated degradation: ERAD) に関与するヒト新規遺伝子 HRD1 を世界で始めて単離・同定した。そして、HRD1 が小胞体膜に局在し、ユビキチンリガーゼ (プロテアソームによるタンパク質分解に必要なユビキチンを標的タンパク質に付加する酵素) 活性を有することを明らかにし、HRD1 がその酵素活性依存的に小胞体ストレスを抑制することを示した (FEBS Lett 532:147-152, 2002)。最近、HRD1 が AD 発症に関わるアミロイドβ (Aβ) の前駆体タンパク質 (APP) の分解を促進することで、Aβ の産生を減少させることを明らかにするとともに、AD 患者の死後大脳皮質において、HRD1 タンパク質量が低下しているという事実を見出した (J Neurosci 30:3924-32, 2010)。さらに、この HRD1 の減少はタンパク質の不溶化によることや、その不溶化が酸化ストレスによって引き起こされることを明らかにした (PLoS One 9: e94576, 2014)。以上より、研究代表者は、AD 発症機構に酸化ストレスによる HRD1 不溶化が引き起こす ERAD の破綻と小胞体ストレスが関与する可能性を始めて提唱した。さらに研究代表者らは、ERAD に関与する可能性のある新規ユビキチンリガーゼをバイオインフォマティクスの手法で 37 種同定した。このうち 8 種の遺伝子をクローニングし、これらが ERAD に関与することを証明した (Sci Rep 6:30955, 2016)。

## 2. 研究の目的

神経変性疾患に共通した病理的特徴として変性タンパク質の蓄積があるが、その原因の一つとしてタンパク質分解系の異常が挙げられる。本研究では、神経変性疾患との関連性が示唆されている小胞体ストレスに対する防御機構、小胞体のタンパク質分解系 ERAD の中心的酵素であるユビキチンリガーゼ (E3) に焦点をあて、AD や ALS における E3 の機能破綻について検証する。そのために、中枢に存在する E3 を明らかにした上で、それらのノックダウンによる神経変性

疾患関連タンパク質の変動について解析することで、神経変性疾患発症に関わる ERAD の E3 を同定する。

## 3. 研究の方法

(1) E3 の培養細胞における発現解析: 研究代表者は既にヒト組織において、検索を行い組織特異的、胎生期特異的な E3 遺伝子を見いだしている。さらに、絞り込まれた組織に関連する培養細胞について、発現量の高い細胞を定量的 PCR により選出し、E3 遺伝子をノックダウンする細胞を選定する。

(2) E3 の組織内における発現解析: 中枢組織に発現が認められた E3 遺伝子に関して、さらに詳細な組織内分布を明らかにするため、免疫染色および *in situ* ハイブリダイゼーションにより検討する。

(3) E3 ノックダウンシステムの構築: 各種 E3 のノックダウンは、テトラサイクリン誘導型のシステムを構築して行う。RNAi は、RNAi 配列と一緒に GFP の配列を組み込み、shRNA に類似した方法で行う。さらに、これらの遺伝子の upstream に Tet リプレッサーが結合するプロモーターを組み込み、Tet リプレッサーを発現するベクターと一緒に感染させる。つぎに、抗生物質を用いることで安定発現株を選別することで、いずれの細胞においても 37 遺伝子を高効率かつ網羅的にノックダウンできるシステムを樹立する。なお、このシステムは HRD1 を用いて確立済みである。

(4) E3 発現低下によるオートファジー、ユビキチン封入体および Aβ への影響: ALS の病理的所見としてオートファジーの活性化とユビキチン化タンパク質の封入体が認められる。E3 のノックダウンによって、オートファジーの活性化やユビキチンタンパク質の増加が認められるか否かを検討する。また、Aβ 産生量への影響についても検討する。さらに、小胞体ストレスが惹起されるかについても検討する。

(5) ノックアウトマウスの作製と解析: ノックダウンの影響が認められた E3 遺伝子に関して、CRISPR/Cas9 システムを用いてゲノム編集を行い、当該遺伝子を欠損したノックアウトマウスを作出する。ALS および AD に関連した組織に注目し、E3 遺伝子を欠損した時の変化を個体レベルで、組織学的・生化学的に解析する。

## 4. 研究成果

(1) E3 の培養細胞における発現解析: 研究代表者が同定した 37 種の膜貫通型 E3 のうち、中枢組織に発現が認められた 28 遺伝子に関して、神経系組織由来の培養細胞 5 種における発現量を比較した。そのうち、24 遺伝子はいずれかの培養細胞において、発現量が高い細胞が認められた。さらに、レチノイン酸刺激により神経系に分化誘

導することができるマウス胚性腫瘍細胞 P19 を用いて、神経分化時に mRNA の発現が増加する遺伝子を調べた。その結果、RNF182、RNF152、RNF150 の発現が顕著に増加することが判明した。

- (2) E3 の組織内における発現解析：中枢組織に発現が認められた E3 遺伝子に関して、さらに詳細な組織内分布を明らかにするため、免疫染色および *in situ* ハイブリダイゼーションにより検討した。これまでに A $\beta$  の産生に関与することを明らかにしている RNF19A と RNF19B、および神経分化時に発現が増加する RNF182 および RNF150 の脳内の発現分布を調べた。RNF19A と RNF19B は、海馬、大脳皮質などの神経細胞に選択的に発現し、さらに同じ局在パターンを示した。また、RNF182 と RNF150 は、海馬および小脳プルキンエ細胞に多く発現していた。
- (3) E3 ノックダウンシステムの構築：レンチウイルスを用いて、テトラサイクリン誘導型のノックダウンシステムを構築に成功した。それによって、トランスフェクションによるノックダウンが難しい神経系細胞においても、高効率にノックダウンすることが HRD1 以外の E3 でも可能となった。加えて、CRISPR/Cas9 法を用いたノックアウトの系も確立して、複数の方法による E3 発現抑制による評価系を構築した。
- (4) E3 発現低下によるオートファジー、ユビキチン封入体および A $\beta$  への影響：

中枢特異的な発現パターンを示す RNF182 はアルツハイマー病において発現が増加することが報告されている。RNF182 は小胞体や後期エンドソームおよびライソゾームに局在していたが、ショットガンプロテオーム解析により、RNF182 結合タンパク質としてライソゾームタンパク質 LAPT M4A を同定した。つぎに、RNF182 による LAPT M4A のユビキチン化様式について検討したところ、RNF182 は K63 を介するユビキチン鎖を形成することが判明した。また、RNF182 はそのファミリータンパク質である LAPT M4B とも結合した。LAPT M4B は、オートファジー経路においてオートファゴソームとライソゾームの融合に関連することが報告されていることから、つぎに RNF182 のオートファジー経路への関与を検討した。神経芽細胞腫 SK-N-MC において RNF182 をノックダウンすると、LC3-II が増大した。また、オートファジーの基質タンパク質である p62 が増加したことから、RNF182 の発現低下により、オートファジーによるタンパク質分解過程が抑制されることが判明した。以上の結果より、RNF182 は、LAPT M ファミリーのユビキチン化を介してオートファジーの活性を制御している可能性が考えられる。

つぎに、LAPT M4A に対する RNF182 のユビキチン化の意義について検討を行った。LAPT M4A のユビキチン化部位(リジン残基)を解析した結果、C 末端にある 224 番目のリジンはライソゾームへの LAPT M4A の移行に重要であるが、RNF182 は移行に関与しないことが明らかとなった。LAPT M4B はアミノ酸トランスポーター-LAT1 と結合し、LAT1 を形質膜からライソゾームにリクルートさせ、その結果、mTORC1 を活性化させることが報告されている。そこで、LAPT M ファミリーと LAT1 の結合に対する RNF182 の関与を検討したところ、RNF182 によって LAT1 と LAPT M4A および LAPT M4B の結合が増強されることが判明した。さらにその結合には、LAPT M4A の N 末端にある 7 番目のリジンが重要であった。これらのことから、RNF182 は LAPT M ファミリーのユビキチン化を介してアミノ酸トランスポーターのライソゾームへの移行を促進し、mTORC1 を活性化させることでオートファジーを抑制している可能性が示唆された。

- (5) ノックアウトマウスの作製と解析：神経分化時に発現が顕著に増大した RNF182 および RNF150、RNF152 に関して、CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集によりノックアウトマウスの作製を試みた。結果的に、RNF150 のみ次世代でもノックアウトされた個体を得ることに成功した。RNF182 と RNF152 では変異が生殖系列に載らなかったため、再度検討する必要がある。

## 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 14 件)

- ① Seisuke M, Toru H, Masayuki K, Koichiro O, Tetsuto K, Akinori N, and Yasuyuki N: Neuroprotective Effects of 4-phenylbutyric Acid and Its Derivatives: Possible Therapeutics for Neurodegenerative Diseases. *J Health Sci*, 5: 9-17, 2017. (査読有)
- ② Cui X, Cui M, Asada R, Kanemoto S, Saito A, Matsuhisa K, Kaneko M, and Imaizumi K: The androgen-induced protein AIBZIP facilitates proliferation of prostate cancer cells through downregulation of p21 expression. *Sci Rep*, 6: 37310, 2016. (査読有)
- ③ Kanemoto S, Nitani R, Murakami T, Kaneko M, Asada R, Matsuhisa K, Saito A, and Imaizumi K: Multivesicular body formation enhancement and exosome release during endoplasmic reticulum stress. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 480: 166-172, 2016. (査読有)

- ④ Nomura J, Hosoi T, Kaneko M, Ozawa K, Nishi A, and Nomura Y: Neuroprotection by Endoplasmic Reticulum Stress-Induced HRD1 and Chaperones: Possible Therapeutic Targets for Alzheimer's and Parkinson's Disease. *Medical Sciences*, 4: 14, 2016. (査読有)
- ⑤ Kaneko M, Iwase I, Yamasaki Y, Takai T, Wu Y, Kanemoto S, Matsuhisa K, Asada R, Okuma Y, Watanabe T, Imaizumi K, and Nomura Y: Genome-wide identification and gene expression profiling of ubiquitin ligases for endoplasmic reticulum protein degradation. *Sci Rep*, 6: 30955, 2016. (査読有)
- ⑥ Kaneko M: Physiological Roles of Ubiquitin Ligases Related to the Endoplasmic Reticulum. *Yakugaku Zasshi*, 136: 805-809, 2016. (査読有)
- ⑦ Kawada K, Iekumo T, Kaneko M, Nomura Y, and Okuma Y: ER Stress-induced Aberrant Neuronal Maturation and Neurodevelopmental Disorders. *Yakugaku Zasshi*, 136: 811-815, 2016. (査読有)
- ⑧ Kanemoto S, Kobayashi Y, Yamashita T, Miyamoto T, Cui M, Asada R, Cui X, Hino K, Kaneko M, Takai T, Matsuhisa K, Takahashi N, and Imaizumi K: Luman is involved in osteoclastogenesis through the regulation of DC-STAMP expression, stability and localization. *J Cell Sci*, 128: 4353-4365, 2015. (査読有)
- ⑨ Asada R, Kanemoto S, Matsuhisa K, Hino K, Cui M, Cui X, Kaneko M, and Imaizumi K: IRE1alpha-XBP1 is a novel branch in the transcriptional regulation of Ucp1 in brown adipocytes. *Sci Rep*, 5: 16580, 2015. (査読有)
- ⑩ Cui M, Kanemoto S, Cui X, Kaneko M, Asada R, Matsuhisa K, Tanimoto K, Yoshimoto Y, Shukunami C, and Imaizumi K: OASIS modulates hypoxia pathway activity to regulate bone angiogenesis. *Sci Rep*, 5: 16455, 2015. (査読有)
- ⑪ Iwamoto H, Matsuhisa K, Saito A, Kanemoto S, Asada R, Hino K, Takai T, Cui M, Cui X, Kaneko M, Arihiro K, Sugiyama K, Kurisu K, Matsubara A, and Imaizumi K: Promotion of Cancer Cell Proliferation by Cleaved and Secreted Luminal Domains of ER Stress Transducer BBF2H7. *PLoS One*, 10: e0125982, 2015. (査読有)
- ⑫ Nomura M, Kaneko M, Okuma Y, Nomura J, Kusumi I, Koyama T, and Nomura Y: Involvement of serotonin transporter gene polymorphisms (5-HTT) in impulsive behavior in the Japanese population. *PLoS One*, 10: e0119743, 2015. (査読有)
- ⑬ Mimori S, Koshikawa Y, Mashima Y, Mitsunaga K, Kawada K, Kaneko M, Okuma Y, Nomura Y, Murakami Y, Kanzaki T, and Hamana H: Evaluation of synthetic naphthalene derivatives as novel chemical chaperones that mimic 4-phenylbutyric acid. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 25: 811-814, 2015. (査読有)
- ⑭ Kaneko M, Noguchi T, Ikegami S, Sakurai T, Kakita A, Toyoshima Y, Kambe T, Yamada M, Inden M, Hara H, Oyanagi K, Inuzuka T, Takahashi H, and Hozumi I: Zinc transporters ZnT3 and ZnT6 are downregulated in the spinal cords of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci Res*, 93: 370-379, 2015. (査読有)
- [学会発表] (計 17 件)
- ① 金子雅幸, 呉艶, 今泉和則: ライソゾームに局在するユビキチンリガーゼ RNF182 は神経分化時のオートファジーを調節する, 第 90 回薬理学会年会, 長崎ブリックホール(長崎市), 2017 年 03 月 16 日
- ② 金子雅幸, 前岡侑二郎, 呉艶, 今泉和則: ライソゾームに局在する膜貫通型ユビキチンリガーゼの生理機能, 第 11 回小胞体ストレス研究会(招待講演), 岐阜大学サテライトキャンパス(岐阜市), 2016 年 10 月 11 日
- ③ 金子雅幸, 高井知子, 呉艶, 今泉和則: 神経分化時に発現が増加するユビキチンリガーゼ RNF182 のオートファジーへの関与, 第 59 回日本神経化学学会大会, 福岡国際会議場(福岡市), 2016 年 09 月 09 日
- ④ 金子雅幸, 前岡侑二郎, 呉艶, 今泉和則: 膜貫通型ユビキチンリガーゼの組織特異的な機能, 第 16 回 ORIGIN 神経科学学会研究会 2016, あわら温泉 まつや千千(あわら市), 2016 年 08 月 27 日
- ⑤ 金子雅幸, 高井知子, 呉艶, 和田有希子, 今泉和則: 神経特異的ユビキチンリガーゼ RNF182 はオートファジー経路に参与する, 日本薬学会第 136 年会, パシフィコ横浜(横浜市), 2016 年 03 月 27 日
- ⑥ 金子雅幸: CRISPR/Cas9 システムを用いたユビキチンリガーゼの生理機能の解明, 第 89 回日本薬理学会年会(招待講演), パシフィコ横浜(横浜市), 2016 年 03 月 11 日
- ⑦ 金子雅幸: 小胞体のタンパク質分解機構と疾患, 第 89 回日本薬理学会年会(招待講演), パシフィコ横浜(横浜市), 2016 年 03 月 10 日
- ⑧ 大熊康修, 三森盛亮, 大高泰靖, 川田浩一, 金子雅幸, 神崎哲人, 野村靖幸: 4-フェニル酪酸およびその誘導体の小胞体ストレスに対する神経保護作用, 第 89 回日本薬理学会年会, パシフィコ横浜(横浜市), 2016 年 03 月 10 日
- ⑨ 金子雅幸, 呉艶, 前岡侑二郎, 今泉和則: 近位尿細管特異的膜貫通型ユビキチンリガーゼ RNF183 の生理機能, BMB2015, 神戸国際展示場(神戸市), 2015 年 12 月 02 日

- ⑩ 高井知子, 和田有希子, 白石貫馬, 今泉和則, 金子雅幸: 脳に発現する新規膜貫通型ユビキチンリガーゼの生理的意義, BMB2015, 神戸国際展示場(神戸市), 2015年12月01日
- ⑪ 金子雅幸, 高井知子, 呉艶, 前岡侑二郎, 和田有希子, 今泉和則: 膜貫通型ユビキチンリガーゼの生理機能, 第10回小胞体ストレス研究会, 淡路夢舞台国際会議場(淡路市), 2015年11月29日
- ⑫ 白石貫馬, 高井知子, 和田有希子, 今泉和則, 金子雅幸: 神経発達段階において異なる発現パターンを示す新規ユビキチンリガーゼの生理的意義, 第3回中国・四国地区医学生学術交流会, 愛媛大学(松山市), 2015年11月28日
- ⑬ 呉艶, 前岡侑二郎, 高井知子, 和田有希子, 今泉和則, 金子雅幸: RNF183の機能およびCOPII構成タンパク質Sec16Aとの結合の意義, 第128回日本薬理学会近畿部会, 千里ライフサイエンスセンター(豊中市), 2015年11月20日
- ⑭ 高井知子, 白石貫馬, 今泉和則, 金子雅幸: Involvement of novel mammalian transmembrane ubiquitin ligases in neuronal differentiation and function, 第58回日本神経化学学会大会, 大宮ソニックシティ(さいたま市), 2015年09月13日
- ⑮ 金子雅幸, 高井知子, 呉艶, 野村靖幸, 今泉和則: Expression profiling of ubiquitin ligases with transmembrane domain in the brain, 第58回日本神経化学学会大会, 大宮ソニックシティ(さいたま市), 2015年09月11日
- ⑯ 金子雅幸, 高井知子, 前岡侑二郎, 呉艶, 和田有希子, 今泉和則: 膜貫通型ユビキチンリガーゼの組織特異的な機能, 第15回ORIGIN神経科学学会研究会2015, 下関市豊北生涯学習センター(下関市), 2015年08月28日
- ⑰ 金子雅幸, 呉艶, 前岡侑二郎, 今泉和則: 近位尿細管に特異的に発現する膜貫通型ユビキチンリガーゼ RNF183の生理機能, 第127回日本薬理学会近畿部会, 長良川国際会議場(岐阜市), 2015年06月26日

[図書] (計1件)

- ① 一條秀憲: 医歯薬出版, ストレスシグナルと疾患—細胞恒常性維持機構の破綻と病態, 2016, 142 (69-74)

[その他]

ホームページ等

広島大学大学院医歯薬保健学研究科 分子細胞情報学

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/imaizumi/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

金子 雅幸 (Masayuki Kaneko)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院  
(医)・准教授

研究者番号: 10322827

### (2) 研究分担者

保住 功 (Isao Hozumi)

岐阜薬科大学・薬学部・教授

研究者番号: 20242430