

令和 2 年 7 月 3 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15061

研究課題名（和文）UFM1修飾システムの異常による重度発達障害発症機構の解明

研究課題名（英文）The mechanism of severe developmental disorders caused by abnormalities in UFM1 system

研究代表者

石村 亮輔 (Ishimura, Ryosuke)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：00816960

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：私たちはUFM1システムに関する遺伝子変異によりUFM1システムの活性低下が起こると、てんかんや小頭症などの重篤な発達障害を引き起こすことを明らかにしてきた。しかしながら、原因となるUFM1の標的分子が未同定であることからその分子メカニズムが不明であった。質量分析を用いることでUFM1の新たな標的遺伝子としてNADH-Cytochrome b5 Reductase 3 (CYB5R3)を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでにUFM1システム関連遺伝子に変異を持つ遺伝性重度発達障害家系を特定してきたが、UFM1の基質が不明であり、詳細が不明であった。本研究では新たなUFM1の基質を同定した。この基質自身の変異もUFM1システム関連遺伝子の変異による疾患と同様の症状を示す。UFM1システムの修飾低下が病気の発症となるため、この基質への修飾を促進することで治療法の開発につながりうる。

研究成果の概要（英文）：We have shown genetic mutations related to the UFM1 system lead to severe developmental disorders such as epilepsy and microcephaly when the UFM1 system activity is reduced. However, since the causative target molecule of UFM1 has not been identified, its molecular mechanism was unclear. NADH-Cytochrome b5 Reductase 3 (CYB5R3) was identified as a new target gene of UFM1 by using mass spectrometry.

研究分野：生化学

キーワード：UFM1 UBA5 ユビキチン様修飾システム 発達障害

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

てんかんや小頭症を伴う遺伝性重篤発達障害の原因遺伝子として、ユビキチン様修飾分子 UFM1 の活性化酵素 UBA5 をコードする遺伝子を特定、UFM1 によるタンパク質の修飾障害が遺伝性重篤発達障害を引き起こすことを見出した。しかしながら、病態発症に関与する UFM1 の標的タンパク質が未同定であること、病態モデルマウスが未開発であることから UFM1 システムの異常を起因とする病態発症メカニズムは手つかずのままであった。

2. 研究の目的

UFM1 システムの解析を遅らせてきた最大の理由は標的タンパク質の未同定にあったが、我々が開発した UFM1 化検出系 (Ishimura, R., et al., *Febs Lett* 2017) と質量分析により発達障害発症に関与する標的タンパク質 NADH-Cytochrome b₅ reductase (CYB5R3) の同定に成功した。本研究課題では、我々が確立した UFM1 活性評価系、質量分析により同定した UFM1 の標的タンパク質を基盤に、UFM1 システムの作動機構、細胞内制御、生理機能、そしてその破綻と病態発症機構の解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) HEK293T 細胞を用いて細胞内で CYB5R3 の UFM1 化を行った。また、UFM1 化されているリジンを決定的するために、保存されているリジンをアルギニンに置換した変異体を作製し、UFM1 化されるリジンの同定を行った。

(2) CYB5R3 は小胞体局在型と細胞質局在型が存在しているため、どこで UFM1 の修飾を受けるか調べた。

(3) CRISPR/cas9 で作製した *CYB5R3;UFSP2* 二重欠損細胞に CYB5R3 の野生型ないしは UFM1 化できない変異体を発現させた後、ミクロソーム画分を精製し、CYB5R3 の酵素活性を測定した。

4. 研究成果

(1) UFM1 の新規基質 CYB5R3

同定した CYB5R3 の UFM1 化の有無を調べた。CYB5R3 を HEK293T 細胞の野生型ないしは *UFSP2* 欠損細胞に発現させた。野生型の細胞では UFM1 と UFL1, UFBP1 (E3 リガーゼ) を発現させると UFM1 化した CYB5R3 (UFM1-CYB5R3) がみられた。脱 UFM1 化酵素である *UFSP2* 欠損細胞では UFM1 を発現させると野生型に比べ UFM1-CYB5R3 が蓄積していた (図 1)。

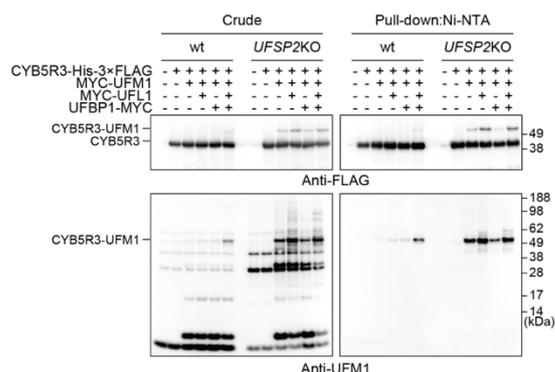


図 1. CYB5R3 は UFM1 化される

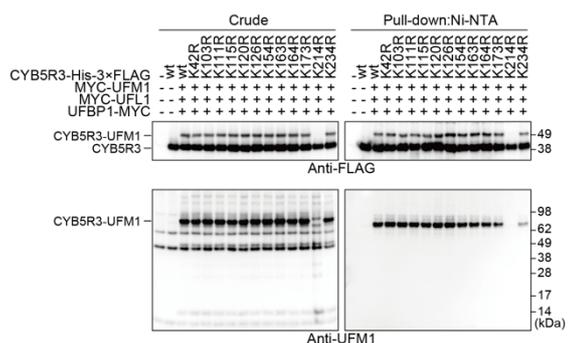


図 2. CYB5R3 の 214 番目のリジンが UFM1 化される

続いて、CYB5R3 の UFM1 化されるリジンの場所を調べた。他の種でも保存されているリジンをアルギニンに置換した変異体を作製し、*UFSP2* 欠損細胞に発現させた。214 番目のリジンにおいて CYB5R3 は UFM1 化されていた (図 2)。

(2) CYB5R3 は小胞体において UFM1 化される

CYB5R3 は小胞体局在型と細胞質局在型が存在している。そこで小胞体局在型 (野生型) と細胞質局在型 ($\Delta N26$) を作製した。これらのコンストラクトを *Hela* 細胞に発現させたところ、小胞体局在型は小胞体マーカーである PDI と共局在した。一方、細胞質局在型 ($\Delta N26$) は細胞質に散っていた (図 3)。続いて、HEK293T *CYB5R3;UFSP2* DKO に発現させ、ミクロソーム画分 (M) と細胞質画分 (C) に分画した。野生型のミクロソーム画分において UFM1 化された CYB5R3 が確認できた。一方、細胞質局在型 ($\Delta N26$) ではほとんど UFM1 化された CYB5R3 が確認できなかった。このことから小胞体上で UFM1 化されている (図 4)。

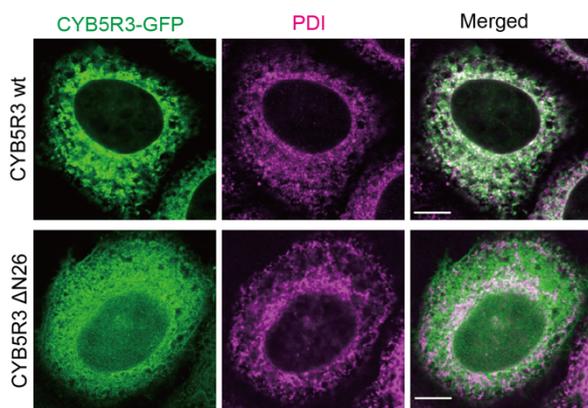


図 3. CYB5R3 は小胞体に局在する

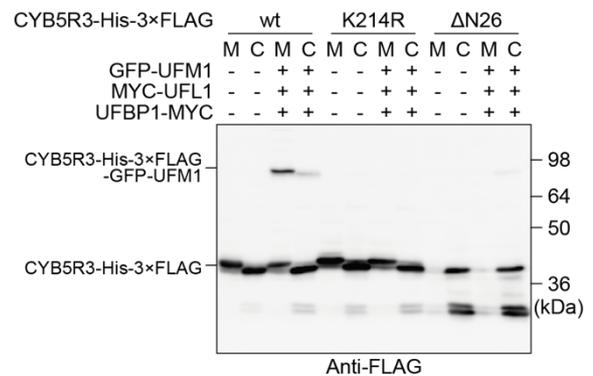


図 4 CYB5R3 は小胞体にて UFM1 化される

(3) UFM1 化した CYB5R3 の酵素活性の変化

CYB5R3;UFSP2 DKO 細胞に CYB5R3 の野生型ないしは K214R 変異体を戻し、精製したミクロソームを用いて CYB5R3 の活性測定を行った。*CYB5R3;UFSP2* DKO では野生型に比べ活性が低下していた。そこに CYB5R3 の野生型のみを戻すと活性が増加した。しかし、UFM1、UFL1、UFBP1 を同時に発現させると CYB5R3 の活性が低下した。CYB5R3 の K214R のみを発現させたときには CYB5R3 の野生型のみを発現させたときと同様の活性がみられた。CYB5R3 の K214R に UFM1、UFL1、UFBP1 を同時に発現させても活性の低下がみられなかった (図 5)。このことから CYB5R3 の UFM1 化は CYB5R3 の活性を抑制する。

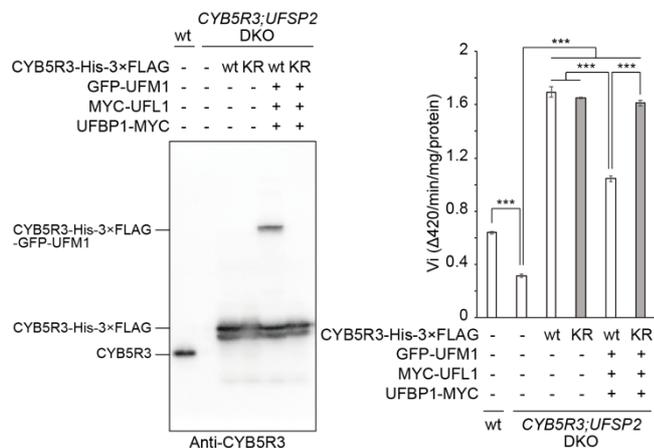


図 5. UFM1 化された CYB5R3 は活性が低下する

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nahorski MS, Maddirevula S, Ishimura R, Alsaifi S, Brady AF, Begemann A, Mizushima T, Guzman-Vega FJ, Obata M, Ichimura Y, Alsaifi HS, Anazi S, Ibrahim N, Abdulwahab F, Hashem M, Monies D, Abouelhoda M, Meyer BF, Alfadhel M, Eyaid W, Zweier M, Steindl K, Rauch A, Arold ST, Woods CG, Komatsu M, Alkuraya FS.	4. 巻 141
2. 論文標題 Biallelic UFM1 and UFC1 mutations expand the essential role of ufmylation in brain development.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Brain	6. 最初と最後の頁 1934-1945
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/brain/awy135	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Cabrera-Serrano Macarena, Coote David Joseph, Azmanov Dimitar, Goullee Hayley, Andersen Erik, McLean Catriona, Davis Mark, Ishimura Ryosuke, Stark Zornitza, Vallat Jean-Michel, Komatsu Masaaki, Kornberg Andrew, Ryan Monique, Laing Nigel G, Ravenscroft Gina	4. 巻 -
2. 論文標題 A homozygous UBA5 pathogenic variant causes a fatal congenital neuropathy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Medical Genetics	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1136/jmedgenet-2019-106496	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Ryosuke Ishimura, Shun-suke Sakai, Atsushi Hasegawa, Naoki Tamura, Ichiei Narita, Satoshi Waguri, Ritsuko Shimizu and Masaaki Komatsu
2. 発表標題 A synergistic effect of Atg2b and Gskip on the maintenance of hematopoietic stem cells
3. 学会等名 The 9th International Symposium on Autophagy（国際学会）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----