

平成22年 4月28日現在

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2007～2010

課題番号：19200032

研究課題名（和文） 脱ユビキチン化酵素による神経細胞機能発現の統合的制御

研究課題名（英文） Integrative regulation of the neuronal cell function by ubiquitinating enzymes

研究代表者

和田 圭司 (WADA KEIJI)

(独) 国立精神・神経医療研究センター 神経研究所疾病研究第4部・部長

研究者番号：70250222

研究代表者の専門分野：神経化学、神経科学

科研究費の分科・細目：神経科学、神経化学・神経薬理学

キーワード：ユビキチン、オートファジー、シヌクレイン、酸化ストレス、マウス、創薬、脂肪、代謝

## 1. 研究計画の概要

代表的蛋白質代謝制御系であるユビキチンシステム、その中でも脱ユビキチン化酵素を中心座標にすえた新たな制御コミュニティの存在を、脳神経系内の情報処理系としてだけでなく、末梢組織からの生体情報をも統合処理するものとして位置づけ、神経細胞の生存や機能発現に伝達（インターフェイス）するインテグレイティブコンダクターとしての仮説を実験的に実証する。具体的には、神経細胞特異的発現を示す UCH-L1、ならびに相同性の高い UCH-L3 の2種の脱ユビキチン化酵素を主な題材にし、(1) 神経細胞機能発現における UCH-L1, UCH-L3 分子カスケードの確立、(2) 両カスケードの相互作用の有無の実証ならびにその量的・質的バランスと神経細胞機能との相関性解析、(3) 外的因子が UCH-L1/UCH-L3 システムに与える影響の細胞・個体レベルでの検出と UCH-L1/UCH-L3 の多様性・多機能性との関連性解明、(4) リソソーム系など他の蛋白質品質管理系との相互ネットワークの実証と蛋白質代謝制御系を基軸に持つ新たな情報処理システム概念の確立、を申請した研究期間中に実施する。

## 2. 研究の進捗状況

(1) 神経細胞機能発現と UCH-L1, UCH-L3 分子カスケード

UCH-L1, UCH-L3 それぞれにつき結合蛋白質を抗体アレイ法、two-hybrid 法などにより半網羅的に探索した。その結果両分子は予想を超えて多数の蛋白質と相互作用をする可能

性を見出した。UCH-L1 については特に病態時にチューブリン、LAMP2A などの結合性がより亢進し、これら機能分子の本来の作用に対して影響を及ぼすという新規機序を見出した。UCH-L3 についても細胞膜との関連で重要な役割を担う可能性を新たに見出している。また、UCH-L1 の発現が欠損する gracile axonal dystrophy (gad) マウスを用い、UCH-L1 がシナプス可塑性、記憶学習に関わることを見出した。

## (2) 両カスケードの相互作用の有無

UCH-L1, UCH-L3 の両分子の内在性酵素活性阻害因子としてモノユビキチンを見出した。さらに、UCH-L3 により選択的な内在性酵素活性阻害因子としてジユビキチンを発見した。すなわち、モノユビキチンあるいはジユビキチンを介して UCH-L1, UCH-L3 の両分子の機能が協調的に制御される場合と独自に制御される場合があることを見出した。

## (3) 外的因子と UCH-L1/UCH-L3 システム

神経変性疾患の危険因子の一つである酸化ストレスについて検討した。その結果、UCH-L1 自身が酸化修飾を受け、さらにその際非酸化型に比べ凝集性が亢進し、先に述べた蛋白質の結合性も亢進的に作用することを見出した。酸化型 UCH-L1 の性状は家族性パーキンソン病 PARK5 の原因遺伝子と考えられる I93M UCH-L1 の性状と近似しており、パーキンソン病発症の共通機序に UCH-L1 の凝集性亢進、蛋白質相互作用の変動が寄与する可能性を示した。

(4) リソソーム系など他の蛋白質品質管理系との相互ネットワーク



酸化あるいは遺伝子変異によるアミノ酸置換の結果、UCH-L1 の構造変化が生じ、その結果 chaperon mediated オートファジー (CMA) の構成成分である LAMP2 等との結合性が亢進し CMA を阻害し、本来 CMA で分解されるべきアルファシヌクレインの蓄積を引き起こす可能性を提唱した。さらに、UCH-L1 が量的に少なくなっても CMA に影響することを UCH-L1 の発現のない gracile axonal dystrophy マウスで示した。同マウスでは CMA 基質である GAPDH が蓄積していた。

#### (5) その他

UCH-L3 についてはその生理作用として脂肪細胞の分化を促進することを新たに見出した。UCH-L3 を欠損するマウスでは、脂肪蓄積量の減少によると考えられる痩せが存在し筋肉における脂肪酸酸化が亢進していた。末梢情報が中枢神経系にどのように影響するのかを検討する上で UCH-L3 欠損マウスは有用と考えられる。

#### (6) まとめ

以上の成果は UCH-L1, UCH-L3 が相互作用を有しつつ、酸化ストレスという外部因子の受容においてインターフェース的役割を果たす可能性を示したものである。神経細胞の機能発現とその維持において脱ユビキチン化酵素がネットワークを形成し制御する機序の提唱はこれまでの知見を大きく拡大するもので、病態に関する今回の成果と合わせ、神経細胞の機能不全の克服に今後貢献するものと考えられる。

### 3. 現在までの達成度

「おおむね順調に進展している」

#### 判断理由

UCH-L1 については当初計画以上に研究が進展した。UCH-L3 については、予想外に、神経細胞における役割よりも末梢組織において重要な役割を担うと考えられる成果が上がった。今後、末梢-中枢連関に関する研究を進めることで UCH-L3 の神経機能における位置づけが明らかになると考えられる。

### 4. 今後の研究の推進方策

おおむね順調に推移していることから、現在の研究計画を基本的には継続する。大きな修正は行わない。ただし、UCH-L1 研究の方がより進展気味であるので、UCH-L3 についても当初計画を上回る成果があがるよう努める。

### 5. 代表的な研究成果

[雑誌論文] (計 13 件)

- (1) Setsuie, R., Suzuki, M., Kabuta, T., Fujita, H., Miura, S., Ichihara, N., Yamada D., Wang, Y.L., Ezaki, O., Suzuki, Y., Wada, K. Ubiquitin C-terminal hydrolase-L3 knockout mice

are resistant to diet-induced obesity and show increased activation of AMP-activated protein kinase in skeletal muscle. *FASEB J*, 23, 4148-4157, 2009.

- (2) Goto, A., Wang, Y.L., Kabuta, T., Setsuie, R., Osaka, H., Sawa, A., Ishiura, S., Wada, K. Proteomic and histochemical analysis of proteins involved in the dying-back-type of axonal degeneration in the gracile axonal dystrophy (*gad*) mouse. *Neurochem. Int.*, 54, 330-338, 2009.
- (3) Setsuie, R., Sakurai, M., Sakaguchi, Y., Wada, K. Ubiquitin dimers control the hydrolase activity of UCH-L3. *Neurochem. Int.*, 54, 314-321, 2009.
- (4) Kabuta, T., Furuta, A., Aoki, S., Furuta, K., Wada, K. Aberrant interaction between Parkinson's disease-associated mutant UCH-L1 and the lysosomal receptor for chaperone-mediated autophagy. *J. Biol. Chem.*, 283, 23731-23738, 2008
- (5) Kabuta, T., Setsuie, R., Mitsui, T., Kinugawa, A., Sakurai, M., Aoki, S., Uchida, K., Wada, K. Aberrant molecular properties shared by familial Parkinson's disease-associated mutant UCH-L1 and carbonyl-modified UCH-L1. *Hum. Mol. Genet.*, 17, 1482-1496, 2008.

[学会発表] (計 17 件)

- (1) 和田圭司、脱ユビキチン化酵素と axonal dystrophy: *gad* マウス研究からの教訓. 第 41 回日本臨床分子形態学会総会・学術集会、神戸、9. 4, 2009
- (2) Nagamine S, Kabuta T, Yamamoto K, Takahashi A, Wada K: The de-ubiquitinating enzyme, UCH-L1, and lipid peroxidation. 第 51 回日本神経化学学会大会、富山、9. 11, 2008
- (3) 株田智弘, 節家理恵子, 三井丈史, 衣川亜衣子, 櫻井省花子, 青木俊介, 内田健康, 和田圭司:カルボニル化 UCH-L1 とパーキンソン病関連変異型 I93M UCH-L1 に共通した異常な分子的性質. 第 31 回日本神経科学大会、東京、7. 9, 2008
- (4) 節家理恵子, 古田晶子, 和田圭司: ユビキチン C 末端加水分解酵素の機能. 神経組織の成長・再生・移植研究会第 23 学術集会. 千葉, 5. 17, 2008