

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 2 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：8 2 6 1 1

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：2 3 6 5 0 1 9 9

研究課題名（和文）細胞外に存在する脱ユビキチン化酵素の分子病態学的意義の解明

研究課題名（英文）Study on the role of extracellular deubiquitinating enzymes

研究代表者

和田 圭司 (WADA KEIJI)

独立行政法人国立精神・神経医療研究センター神経研究所疾病研究第四部部长

研究者番号：7 0 2 5 0 2 2 2

研究成果の概要（和文）：培養細胞を用いて、UCH-L1が細胞外に分泌されるか否か、分泌される場合はその分泌形式について、また分泌されることの生物学的意義について明らかにすることをめざした。その結果、UCH-L1の分泌はunconventional pathwayによること、また、exosomeを介した分泌が存在することを見いだした。パーキンソン病関連I93M変異が存在すると、その分泌量が低下した。また、病原性変異型 α シヌクレイン、ハンチンチンの存在はUCH-L1の分泌を低下させた。これらの結果は、UCH-L1の細胞外分泌に関し、パーキンソン病関連物質間で相互作用が存在することを示唆する。

研究成果の概要（英文）：We aimed to elucidate the biological role of extracellular UCH-L1. To achieve this purpose, we used cultured cells and studied whether the protein was secreted or not into the media. We observed that UCH-L1 was secreted into the media via a unconventional pathway. Interestingly, exosome contained UCH-L1. I93M UCH-L1 mutant was less secreted compared with wild type of UCH-L1. Then we studied a possible interaction of UCH-L1 with other disease-related proteins in the secretory event. We found that the secretion of UCH-L1 was modified by the presence of mutated alpha-synuclein and huntingtin. These results suggest that secretion of UCH-L1 into extracellular space might be related to the pathophysiological conditions of neurodegenerative disorders.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経化学・神経薬理学

キーワード：蛋白質、脳神経疾患、神経科学、生理活性、細胞・組織

1. 研究開始当初の背景

神経変性疾患の病変部位の形成は、個々の神経細胞が内在的な機序に基づき神経細胞機

能不全、神経細胞死を呈することで進行すると長らく考えられてきた。しかし、我々はおよそ3～4年前に、パーキンソン病の原因となりアルツハイマー病の進行にも関与する脱ユビキチン化酵素UCH-L1が不思議なことに培養細胞外液中に存在することを見いだした（神経化学学会大会、2008）。関連して、UCH-L1は逆行性神経軸索変性に伴う感覚失調や運動麻痺、さらには記憶障害に関わることを我々はgracile axonal dystrophy (gad)マウスで示した（Nature Genetics, 1999; Eur J Neurosci, 2008）。他方、患者試料を用いた他者の研究で、I93M変異体は家族性パーキンソン病PARK5の原因となることが示され、またアルツハイマー病患者では酸化型UCH-L1が蓄積することが別グループにより報告されている。

UCH-L1は神経細胞特異的な発現を示すことを特徴とするが、奇しくも2008年にパーキンソン病患者の移植ニューロン中にレビー小体（UCH-L1も存在する）が存在することが海外で確認された。この報告は、詳細な機序は不明であるものの、宿主から移植片へ疾患が伝播することを示唆する。すなわち、我々のUCH-L1の細胞外液中の観察と併せ、神経変性疾患の発症と病変形成には原因蛋白質自身をもたらすnon-cell autonomousな機序が想定されることとなった。これに呼応するように筋萎縮性側索硬化症の原因遺伝子SOD1やPARK1, PARK4の原因である α -synucleinについても細胞外放出されることがこれまでに報告されている。

2. 研究の目的

脱ユビキチン化酵素UCH-L1は神経変性疾患や癌の病態に関わることを見いだされている。我々は、UCH-L1が細胞内在的に多機能蛋白として作用することをこれまで報告してきたが、

今回の研究では培養細胞を用いて、UCH-L1が細胞外に分泌されるか否か、分泌される場合はその分泌形式について、また分泌されることの生物学的意義について明らかにすることをめざすことにした。

3. 研究の方法

Neuro-2a細胞などの株化細胞、マウス初代培養神経細胞などを使用した。遺伝子発現はpCI-neoプラスミドに必要な構築を行い、transfection法にて行った。細胞中、細胞培養液中のUCH-L1の検出western blot法で行い、対照蛋白質に対する発現比で評価した。Transfection効率の標準化もGFP蛋白質など使用し実施した。分泌経路の確認は薬理的に実施した。

4. 研究成果

- (1) UCH-L1の分泌が既知のconventional pathwayによるものでは無いことを見いだした。すなわち、その分泌は現時点ではunconventional pathwayによるものと考えられる。
- (2) 分泌されるUCH-L1の形状については、遊離体に加えて、exosomeを介した分泌が存在することを見いだした。
- (3) パーキンソン病関連I93M変異体は野生型に比しその分泌量が低下することを見いだした。
- (4) 神経変性疾患原因蛋白質との相互作用について解析し、細胞内における病原性変異型 α シヌクレイン、ハンチンチンの存在はUCH-L1の分泌を低下させることを見いだした。
- (5) 以上の結果は、UCH-L1の細胞外分泌に関し、パーキンソン病関連物質間で新規相互作用が存在することを示唆する。細胞外分泌にされたUCH-L1は何らかの生理学的作用を有する可能性が考えられる。

(6) そこで、細胞外に存在するUCH-L1が細胞内に取り込まれるかどうかを検討したが、現時点では、遊離UCH-L1を使用した場合は、明確な細胞内取り込みを確認するには到らなかった。

(7) 現在exosomeなど遊離型でない状態でUCH-L1の取り込みについて検討中である。

(8) また、細胞外分泌の生理的、病態生理的意味を明らかにする目的で、細胞内事象についての解析も行い、UCH-L1の新規作用として、CDK分子の内在性アクチベーターであることを見いだした。UCH-L1と細胞周期が関係する病態との関連性が示唆される。

(9) また、アミロイドベータ産生に関わる酵素、BACE、の機能を調整する可能性も見いだした。

(10) さらに、S18Y多型体が野生型に比してドパミン作動性システムで、神経細胞保護的に作用をするを見いだした。

(11) 細胞外UCH-L1量と病態の関連性についても、神経疾患に罹患した患者由来脳脊髄液を解析している。

(12) UCH-L1の末梢性作用として膵臓beta細胞の生存性と機能に関わることを新たに見いだした。

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6件)

- ① Kabuta, T., Mitsui, T., Takahashi, M., Fujiwara, Y., Kabuta, C., Konya, C., Tsuchiya, Y., Hatanaka, Y., Uchida, K., Hohjoh, H., Wada, K. Ubiquitin C-terminal hydrolase L1 (UCH-L1) act as a novel potentiator of cyclin-dependent kinases to enhance cell proliferation, independent of its hydrolase activity. **J. Biol. Chem.**,

査読有、288, 12615-12626, 2013.

DOI: 10.1074/jbc.M112.435701

- ② Onishi, K., Tasumi, Y., Wada, K., Yang, H.J., Sugiura, Y., Setou, M., Yoshikawa, H. Sulfatide accumulation in the dystrophic terminals of gracile axonal dystrophy mice: lipid analysis using matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry. **Med. Mol. Morphol.**, 査読有、2013 Feb 16. [Epub ahead of print]

DOI:未設定

- ③ Zhang, M., Deng, Y., Luo, Y., Zhang, S., Zou, H., Cai, F., Wada, K., Song, W., Control of BACE1 and APP processing by ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 in Alzheimer's Disease Pathogenesis. **J. Neurochem.**, 査読有、120, 1129-1138, 2012.

DOI:

10.1111/j.1471-4159.2011.07644.x

- ④ Xilouri, M., Kyratzi, E., Pitychoutis, P.M., Papadopoulou-Daifoti, Z., Celine Perier, C., Vila, M., Maniati, M., Ayse Ulusoy, A., Kirik, D., David S. Park, D.S., Wada, K., Stefanis, L. Selective Neuroprotective Effects of the S18Y Polymorphic Variant of UCH-L1 in the dopaminergic system. **Hum. Mol. Genet.**, 査読有、21, 874-879, 2012.

DOI: 10.1093/hmg/ddr521

- ⑤ Chu, K.Y., Li, H., Wada, K., Johnson, J.D. Uchl1 is required for β -cell survival and function in prediabetic lipotoxic conditions. **Diabetologia**, 査読有、55, 128-140, 2012.

DOI: 10.1007/s00125-011-2323-1

- ⑥ Konya, C., Hatanaka, Y., Fujiwara, Y., Uchida, K., Nagai, Y., Wada, K., Kabuta, T. Parkinson's disease-associated mutations in alpha-synuclein and UCH-L1 inhibit the unconventional secretion of UCH-L1. **Neurochem Int.**, 査読有、59, 251-258, 2011.
DOI: 10.1016/j.neuint.2011.05.012

〔学会発表〕（計3件）

- ① 和田圭司：神経変性疾患の予防をめざして：脳-臓器間ネットワークからの解析，大阪大学蛋白質研究所セミナー 神経疾患の克服に向けて，大阪，3.1-2, 2012.
- ② 和田圭司：中枢神経系-神経症状のようなものを見つけたときにどうするか：論文化への道標-。第58回日本実験動物学会総会，2011 5.25-27，東京.
- ③ 大西沙代子，芳川浩男，辰己吉記，杉浦悠毅，梁賢正，和田圭司，瀬藤光利：gadmouse 延髄薄束核における神経軸索内蓄積物の検討。第52回日本神経学会学術大会，名古屋，5.18-20，2011.

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ncnp.go.jp/nin/guide/r4/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

和田 圭司 (WADA KEIJI)

独立行政法人国立精神・神経医療研究センター神経研究所疾病研究第四部・部長