

厚生科学研究費補助金
(脳科学研究事業)

神経変性疾患におけるユビキチン
システムの分子病態解明と
治療法開発への応用に関する研究
(H 1 2—脳—0 0 8)

平成12年度 総括研究報告書

主任研究者 和田 圭司
平成13(2001)年3月

目 次

I. 総括研究報告書

| | | |
|--|-------|---|
| 神経変性疾患におけるユビキチン システムの分子病態解明と治療法 開発への応用に関する研究 和田圭司 | _____ | 1 |
|--|-------|---|

II. 分担研究報告書

| | | |
|---|-------|---|
| 生体内ユビキチン-蛋白質結合体の 単離・同定に関する研究 高田耕司 | _____ | 8 |
|---|-------|---|

| | | |
|---------------------------------------|-------|----|
| ユビキチン・プロテアソーム系と 神経伝達に関する研究 野田百美 | _____ | 11 |
|---------------------------------------|-------|----|

| | | |
|---------------------|-------|----|
| III. 研究成果の刊行に関する一覧表 | _____ | 16 |
|---------------------|-------|----|

| | | |
|-----------------|-------|----|
| IV. 研究成果の刊行物・印刷 | _____ | 17 |
|-----------------|-------|----|

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）

総括研究報告書

神経変性疾患におけるユビキチンシステムの分子病態
解明と治療法開発への応用に関する研究

主任研究者 和田 圭司 国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第四部長

有効な治療法の乏しい難治性の神経変性疾患に対して、ユビキチンシステムの制御というこれまでとは全く異なった新しい視点から神経変性の予防・治療法を開発し臨床的に確立することをめざした。そのため我々が独自に gad マウスで見出した神経変性の原因遺伝子の一つである脱ユビキチン化酵素を中心に研究を展開した。申請した3年間の研究期間中に1) ユビキチンシステムを基盤に神経変性疾患が共有する分子機序を解明し、2) ユビキチンシステムの機能の適正化をベースにした画期的な変性疾患治療法を開発することを目標としたが、初年度の今年度は gad マウスにおける変異 UCH-L1 の発現・機能解析を行うとともに、結合型ユビキチン認識抗体を用いたイムノアフィニティークロマトグラフィーとゲル濾過によるユビキチン-蛋白質結合体の単離・同定法を確立し、同法を用いて UCH-L1 の生体内基質の検出、gad マウスのユビキチンプールの検討、UCH-L1 と相互作用する蛋白質の解析を行った。また、UCH-L1 発現トランスジェニックマウスとの交配により gad マウスの症状が改善することを確認し、さらに神経伝達機序におけるユビキチンシステムの機能解析のため、神経終末シナプス後電流やグリア・ニューロン連関に及ぼすプロテアソーム阻害剤の急性作用を検討したところ、ユビキチン・プロテアソーム系がシナプス前神経終末やグリアにおいて神経伝達物質の放出に重要な役割を果たしていることが示唆された。

分担研究者 高田耕司 慈恵会医科大学・講師
野田百美 九州大学大学院薬学研
究院・助教授

る軸索ジストロフィーマウス（略して gad マウス）のポジショナルクローニングを行い、その原因が脱ユビキチン化酵素の一つで神経特異的な発現を示す ubiquitin C-terminal hydrolase I (UCH-L1) 遺伝子の欠失であることを明らかにした (Nature Genetics, 1999)。「ユビキチン化された蛋白質の凝集」が共通して認められることが多い神経変性疾患の研究において、ユビキチンシステムの変異により実際神経変性が直接もたらされることを初めて示した重要な報告である。本研究ではこの成果をもとに、脱ユビキチン化酵素と相互作用する蛋白質の同定・機能解明を行い、神

A. 研究目的

本研究では、蛋白質分解系として近年重要性が高まっているユビキチンシステムに焦点を当て、神経変性の分子機序を蛋白質の品質コントロール破綻の面から解析することでまだまだ不明の点の多い神経変性疾患の分子機序解明に新たなメスを入れる。ごく最近我々は、逆行性神経軸索変性ならびに軸索末端の異常物蓄積を特徴とす

経変性疾患が共有する分子機構を解き明かす。また、ユビキチンサイクルの補正という新しい観点から治療法を開拓する。

今年度は *gad* マウスにおける変異 UCH-L1 の発現・機能解析を行うとともに、結合型ユビキチン認識抗体を用いたイムノアフィニティークロマトグラフィーとゲル濾過によるユビキチン-蛋白質結合体の単離・同定法を確立し、同法を用いて UCH-L1 の生体内基質の検出、*gad* マウスのユビキチンプールの検討、UCH-L1 と相互作用する蛋白質の解析を行った。また、UCH-L1 発現トランスジェニックマウスを作製し UCH-L1 遺伝子の導入により *gad* マウスの症状が改善するかどうか検討した。さらに神経伝達機序におけるユビキチンシステムの機能解析のため、神経終末シナプス後電流やグリア・ニューロン連関に及ぼすプロテアソーム阻害剤の急性作用を解析した。

B. 研究方法

(1) *gad* マウスにおける変異 UCH-L1 の発現・機能解析

大腸菌発現系で正常型および *gad* allele に由来する欠失型の UCH-L1 を精製し、人工基質である ubiquitin-AMC を用い活性を測定した。次に精製 *gad* protein を認識する抗 UCH-L1 抗体を用い、ウエスタンブロッティングを行った。また種々の方法により不溶性分画を可溶化し、ドットプロットを行った。さらに結晶化されたヒト UCH-L3 を鋳型にして、マウス UCH-L1 の 3 次元構造をモデリングした。

(2) ユビキチン-蛋白質結合体の単離・同定法の確立

結合型ユビキチンを認識するモノクローナル抗体 (FK2 または FK1) をリガンドとしたイムノアフィニティークロマトグラフィー、次いで Superdex 75 によるゲル濾過を用いて分画した。精製の評価は、SDS-PAGE、および抗ユビキチン抗体を用いた Western blotting と ELISA によるマ

ルチユビキチン鎖定量によった。また、一部の精製標品は、逆相 HPLC による再精製、ならびに lysylendopeptidase を用いた消化後、質量分析 (TOF-MS) とアミノ酸配列解析 (自動化 Edman 分解) に供した。

(3) UCH-L1 の生体内基質の検出

生体内で UCH-L1 の基質は不明である。この同定を目的として 1) 脳可溶化分画を抗ユビキチン抗体カラムにて吸着、特異的な結合物に対し 2 次元電気泳動をおこない、野生型マウスに比べ *gad* マウスで増加しているスポットの有無を検討した。さらに、2) 活性中心のシステインをセリンに置換した UCH-L1 を作製し、可溶性分画を共沈させ 2 次元に展開した。

(4) *gad* マウスのユビキチンプールの検討

EIA 法にて日令 1, 14, 28, 56, 224 の小脳、脳幹可溶性分画の free, mono-ub を測定した。

(5) UCH-L1 と相互作用する蛋白質の同定

脳抽出液をゲル濾過によりサイズで分画し UCH-L1 活性を測定した。UCH-L1 全長に対するポリクローナル抗体を作成し、抗体アフィニティークラムにて免疫沈降する検体を 2 次元電気泳動し、in gel digestion、MALDI-TOF MASS を用いたペプチドマッピングを行った。

(6) UCH-L1 発現トランスジェニックマウスの作製

EF1 α プロモーターの下流に UCH-L1 cDNA をつなぎ、マウス受精卵前核に注入し UCH-L1 発現トランスジェニックマウスを作製した。

(7) シナプスにおける神経伝達機序の解析

ラット単離中枢ニューロンで、かつ機能的シナプス前終末がついたままのシナプス・ブートン標本を用い、ニスタチン穿孔パッチ法で自発性シナプス後電流を測定した。

(8) グリア細胞におけるユビキチンシステムの機能解析

グリア細胞の 1 種であるアストロサイトを由来とする C6 グリオーマを用い、膜電位固定下ホ

ールセル・パッチクランプ法で神経伝達物質の受容体応答、および輸送体電流を測定した。

(倫理面への配慮)

動物を使用する研究計画はすべて国立精神・神経センター神経研究所動物実験倫理問題検討委員会や分担研究者の所属する施設の倫理問題検討委員会で審議され承認を受けた。実際の動物使用に当たっては国の法律・指針並びに米国 NIH の基準を守り動物が受ける苦痛を最小限に留めた。ヒト標本を用いた研究計画は研究対象者の不利益、危険性の排除を行い、インフォームドコンセントに十分配慮し、厚生科学審議会等の定める規定を遵守した。

C. 研究結果

(1) *gad* マウスにおける変異 UCH-L1 の発現・機能解析

大腸菌発現系で精製した欠失型 UCH-L1 は活性を有さなかった。抗 UCH-L1 抗体を用いたウエスタンブロットでは、*gad* マウスでは可溶性分画で全くバンドを検出しなかった。また、ドットブロットでも *gad* マウスでは抗 UCH-L1 抗体によるシグナルを検出しなかった。さらに、マウス UCH-L1 の 3 次元構造モデリングでは、42 アミノ酸からなる欠失部位は活性中心を含む、コアドメインの β -sheet 部であることが、構造上からも非常に不安定なタンパクであることが示唆された。

(2) ユビキチン-蛋白質結合体の単離・同定法の確立

検討したすべての生体材料において、内在するユビキチン-蛋白質結合体は FK2 抗体カラムに結合し、3.5 M $MgCl_2$ で溶出された。その際、総蛋白質量の 99%以上が除去され、マルチユビキチン鎖量を指標にした回収率は 70-100%に上った。K562 細胞の精製成分をゲル濾過し、その成分を解析した結果、高分子量領域 (約 40 kDa 以上) においてマルチユビキチン化蛋白質が、低分子量領域

(約 40 kDa 以下) において、モノユビキチン、遊離ユビキチン鎖、および 2 種類の E2 (UbcH7 と Ube2N) とユビキチンのチオエステル結合体ならびにイソペプチド結合体が同定された。この他、OCI/AML 1a 細胞からはユビキチン化ヒストン H2A の限定分解産物、大腸癌組織からはモノユビキチン化ホスホグリセリン酸ムターゼなど未報告のユビキチン-蛋白質結合体が単離・同定された。

(3) UCH-L1 の生体内基質の検出

可溶化分画のウエスタンブロット解析で野生型マウスに比べ *gad* マウスで増加しているスポットを検出した。システインをセリンに置換した UCH-L1 は酵素活性は消失していたがユビキチンへのアフィニティーは保たれていた。この変異型 UCH-L1 を用い可溶性分画を共沈させ 2 次元に展開し、*gad* マウスで蓄積していると想定される基質の検出を試み、複数の候補を得た。

(4) *gad* マウスのユビキチンプールの検討

UCH-L1 の機能として、ユビキチン結合蛋白ないし化合物よりユビキチンを遊離させ、free-mono ユビキチンプールを保つ作用が考えられている。このプールの低下と病態の関係を探るため、小脳、脳幹可溶性分画の free, mono-ub を測定したところ、*gad* マウスでは野生型に比して減少していた。

(5) UCH-L1 と相互作用する蛋白質の同定

脳抽出液をゲル濾過によりサイズで分画したところ一部は予想よりも高分子域に活性分画が回収された。UCH-L1 全長に対するポリクローナル抗体を作成、抗体アフィニティーカラムにて相互作用する蛋白を検討したところ、*gad* マウスでは UCH-L1 に対応するスポットに加え、少なくとも 2 つのスポットが消失していた。さらに、2 次元電気泳動後 in gel digestion, MALDI-TOF MASS を用い、ペプチドマッピングを行い複数の候補蛋白を得た。

(6) UCH-L1 発現トランスジェニックマウスの作製

UCH-L1発現トランスジェニックマウスとの掛け合わせにより gad マウスの症状は軽減した。

(7) シナプスにおける神経伝達機序の解析

海馬 CA1 ニューロンにおける GABA 性自発性抑制性シナプス後電流は、プロテアソーム阻害剤(MG-132)を数分間作用させることによって、amplitude は変化しなかったが frequency は 1、10 μM で 1.4-1.7 倍に増加した。

(8) グリア細胞におけるユビキチンシステムの機能解析

C6 グリオーマにおいて ATP 受容体反応(カチオン電流)はプロテアソーム阻害剤(MG-132、10 μM)処置前は 11.6 ± 2.2 pA/pF (n=8)であったが、5分間処置後は 7.5 ± 1.5 pA/pF (n=8)に減少した。

逆向きグルタミン酸輸送体電流を測定したところ、 0.31 ± 0.06 (n=4)であったが、プロテアソーム阻害剤(MG-132、10 μM)処置(10分)によってほぼ完全に抑制された。

D. 考察

ユビキチンシステムやシャペロン分子など蛋白質分解・蛋白質品質管理系が神経変性疾患の謎を解くキーでありその研究からブレイクスルーが生じるだろうという期待がここ1、2年急速に高まっている。若年性パーキンソニズムにおいて同定された原因遺伝子産物の Parkin はユビキチンに相同性を示すだけでなくユビキチンリガーゼ活性を持つことが判明した。また、UCH-L1 にミスセンス変異を有するドイツ人のパーキンソン病家系も報告されている。さらにはポリグルタミン病の病態が E6-AP ユビキチンリガーゼに変異をもたらすことでより重篤化することがモデル動物を用いた系で報告されている。このように神経変性疾患におけるユビキチンシステムの重要性は疑うべくもない。しかしユビキチンシステムの全容解明はいまだなされておらず、とりわけユビキチンシステムを構成する分子群の分子間

ネットワークについてはまだまだ不明の点が多い。本研究は細胞質や核におけるこれら分子間のネットワークを明らかにし個々の神経変性疾患が発病に至る基本メカニズムを解き明かすことで治療技術の高度化をめざす。神経変性の基本メカニズムの解明と根本的治療法の開発は社会の要求であり、世界に先駆けた成果をめざす本研究は行政的にみてもその達成が期待されている。

本年度の結果からは、欠失型 UCH-L1 は活性を欠き、更に構造上不安定で生体内では検出感度以下であることが示された。UCH-L1 のトランスジーンで症状が軽減されることと合わせ、gad マウスの病態は UCH-L1 の loss of function によると考えられる。UCH-L1 の loss of function によってもたらされる病態としては(1)代謝される基質の増加(2)ユビキチン-プロテオソームシステムの破綻、なかんずくユビキチンプールの減少(3)相互作用する蛋白質への影響(不安定化など)が考えられるが、我々は実際 gad マウスにおいて遊離ユビキチン量が減少していることを示し、少なくとも一部の UCH-L1 は複合体を形成している可能性が高いことを示した。

生物材料からのユビキチン-蛋白質結合体の精製・同定は、少数ながら過去に報告されているが、その多くは蓄積した特定成分をその物理化学的性質に基づき単離したものであり、その方法は限定的で普遍化し得ない。本研究では、世界で初めて同蛋白質のイムノアフィニティー精製法を確立した。特に FK2 抗体を用いた方法では、細胞/組織/体液に存在するユビキチン-蛋白質結合体の大半を夾雑蛋白から分離可能と思われる。例えば、この方法によって我々は、ユビキチン-E2 チオエステル結合体やユビキチン化されたヒストン H2A-C 端断片やホスホグリセリン酸ムターゼなどを同定した。このことは、基質蛋白質や共有結合の種類に関らず、FK2 抗体が様々なユビキチン-蛋白質結合体を認識し得ることを示している。

ユビキチンシステムは蛋白質分解のみならず、細

胞周期、蛋白合成の調節にも深く関わるため、細胞内現象に幅広く関係する可能性がある。gad マウスは、劣性遺伝形式をとり、遺伝子産物が細胞質内に局在し、比較的分子量であるため治療検討のよいモデルとなりうるが、現在治療として蛋白導入を検討しており、TAT シグナルシーケンスを付加した UCH-L1 を作成、培養神経細胞内への導入効率を検定している。今後、gad マウスを用いて治療効果および免疫応答などを検討し、臨床応用を目指したい。

また今回の電気生理学的解析の結果、ユビキチン・プロテアソーム系が、シナプス前神経終末において神経伝達物質の放出に重要な役割を果たしていること、および、今回は培養グリア細胞を用いた結果であるが、細胞膜イオンチャネルおよび神経伝達物質を細胞外から速やかに消失させる役割をもつ輸送体の機能に同じく重要な役割を果たしていることが示唆された。このことはユビキチン・プロテアソーム系が中枢神経系において、脳機能全体に重要な機能を果たしていることを示唆するもので、世界に先駆けた研究として今後の発展が大いに期待されることになった。

E. 結論

gad マウスにおける変異 UCH-L1 の発現・機能解析から gad マウスの病態は UCH-L1 の loss of function で説明可能なことを示した。また各種生体材料からのユビキチン-蛋白質結合体の実用的な精製法を確立した。さらに、同法を用いて UCH-L1 の生体内基質の検出、gad マウスのユビキチンプールの検討、UCH-L1 と相互作用する蛋白質の解析を行った。他方、UCH-L1 発現トランスジェニックマウスとの交配により gad マウスの症状が改善することを確認した。世界に先駆けた試みとして神経伝達機序におけるユビキチンシステムの機能解析を行い、ユビキチン・プロテアソーム系がシナプス前神経終末やグリアにおいて神経伝達物質の放出に重要な役割を果たして

いることを示唆する結果を得た。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kiryu-Seo, S., Sasaki, M., Yokohama, H., Nakagomi, S., Hirayama, T., Aoki, S., Wada, K. and Kiyama, H., Damage induced neuronal endopeptidase (DINE) is a novel metallopeptidase expressed in response to neuronal damage and promotes superoxide scavengers expressions. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 97, 4345-4350, 2000
- 2) Harada, T., Harada, C., Nakayama, N., Okuyama, S., Yoshida, K., Kohsaka, S., Matsuda, H. and Wada, K., Modification of glial-neuronal interactions prevents photoreceptor apoptosis during light-induced retinal degeneration. **Neuron**, 26, 533-541, 2000
- 3) Wang, Y.L., Saigoh, K., Osaka, H., Yamanishi, T., Suh, J.G., Kiyosawa, H., Sakai, Y., Wakana, S. and Wada, K., A YAC/BAC-based physical and transcript mapping around the gracile axonal dystrophy (*gad*) locus identifies *Uchl1*, *Pmx2b*, *Atp3a2*, and *Hip2* genes. **Genomics**, 66, 333-336, 2000
- 4) Harada, C., Harada, T., Slusher, B.S., Yoshida, K., Matsuda, H. and Wada, K., N-acetylated-alpha-linked-acidic dipeptidase inhibitor has a neuroprotective effect on mouse retinal ganglion cells after pressure-induced ischemia. **Neurosci. Lett.**, 292, 134-136, 2000
- 5) Daino, H., Matsumura, I., Takada, K., Odajima, J., Tanaka, H., Ueda, S., Shibayama, H., Ikeda, H., Hibi, M., Machii, T., Hirano, T., Kanakura, Y. Induction of apoptosis by extracellular ubiquitin in human hematopoietic cells: possible involvement

of STAT3 degradation by proteasome pathway in interleukin 6-dependent hematopoietic cells. *Blood*, 95, 2577-2585, 2000.

6) Ohkawa, K., Takada, K., Asakura, T., Hashizume, Y., Okawa, Y., Tashiro, K., Ueda, J., Itoh, Y., and Hibi, N. Calpain inhibitor inhibits secretory granule maturation and secretion of GH. *NeuroReport*, 11, 4007-4011, 2000.

7) Higashida, H., Yokoyama, S., Hoshi, N., Hashii, M., Egorova, A., Zhong, Z-G., Noda, M., Shahidullah, M., Taketo, M., Yasuhiro, K., Takahashi, H., Chen, X-L., Shin Y. and Zhang, J-S.: Signal transduction from bradykinin, angiotensin, adrenergic and muscarinic receptors to effector enzymes, including ADP-ribosyl cyclase. *Biol. Chem.*, 382, 20-33, 2001.

8) Higashida, H., Hashii, M., Yokoyama, S., Hoshi, N., X-L. Chen, X-L., Egorova, A., Noda, M., and Zhang, J-S.: Cyclic ADP-ribose as a second messenger revisited from a new aspect of signal transduction from receptors to ADP-ribosyl cyclase. *Pharmacol. Therapeut.*, in press.

2. 学会発表

1) 和田圭司、ユビキチンシステムと神経変性、文部省特定領域研究「神経細胞死制御」夏のワークショップ、軽井沢、6.28, 2000

2) Wada K, Wang, YL, Saigoh K, Aoki S, Osawa Y, Li H, Takizawa S, Sakurai M, Hara Y, Osaka H, Kikuchi T、THE *gad* MOUSE: A USEFUL MODEL FOR INVESTIGATING NEURO-DEGENERATION AND REGENERATION、第4回日独共同ワークショップ、箱根、9.27, 2000

3) 薄葉輝之、高田耕司、石橋由朗、青木照明、大川 清。大腸癌におけるユビキチン化蛋白質の精製と同定。第59回日本癌学会総会。横浜。10月。2000。

4) 高田耕司、平河多恵、大川 清。マルチユビキ

チン化蛋白質の効率的同定法の検討。第73回日本生化学会大会。横浜。10月。2000。

5) 大川 清、朝倉 正、高田耕司、大川 豊、日比望。成長ホルモン分泌に対するカルパイン阻害剤の効果。第73回日本生化学会大会。横浜。10月。2000。(生化学 72: 776, 2000)

6) 大川 豊、高田耕司、青木勝彦、薄井 紀子、田嶋尚子、大川 清。THP-1細胞の分化誘導によるユビキチン化ヒストンH2Aとその限定分解産物量の変動。第73回日本生化学会大会。横浜。10月。2000。

7) Takada, K., Tokunaga, T., Iwamuro, S., Hirakawa, T., and Ohkawa, K. Purification of ubiquitin conjugates from PC12h cells. 30th Annual Meeting Society for Neuroscience. New Orleans. Nov. 2000.

8) 東田陽博、野田百美、ラット心室筋内でのサイクリック ADP リボース産生のイソプロテレノールによる上昇、生理学会、横浜、4月

9) 野田百美、興奮性神経伝達物質と神経—グリア連関、第6回グリアクラブ・招待講演(東京) 8月

10) 東田陽博、野田百美、交感神経興奮によるβアドレナリンを介するラット心室筋内でのサイクリック ADP リボース産生の上昇、日本神経科学大会・日本神経回路学会 合同大会(横浜) 9月

11) 東田陽博、Egorova Alla、東田知陽、Zhong Zhen-Guo、横山茂、野田百美、Zhang Jia-Sheng、交感神経興奮によるラット心室筋内でのサイクリック ADP リボース産生の上昇、日本生化学会大会、(横浜) 10月

12) 野田百美、「シンポジウム：脳のホメオスタシスとミクログリアの機能」グルタミン酸を介した神経—ミクログリア連関、日本神経化学会(金沢) 10月

13) 野田百美、岡田三津子、安田さつき、萩野由紀子、島田亜希、岩田伸生、グリア細胞にお

けるセロトニン5-HT_{5A} 受容体の新しい機能、
第5回 グリア研究会 (名古屋) 11月

14)安田さつき、岡田三津子、萩野由紀子、金掘佳子、岩田仲生、野田百美、グリア細胞におけるセロトニン 5-HT_{5A} 受容体の機能、第11回日本病態生理学会 (福岡) 1月

15)金掘佳子、岡田三津子、浦江隆次、岩田仲生、尾崎紀夫、野田百美、マイクロフィジオメーターを用いた細胞外 pH 変化に及ぼすフォルスコリンの作用の検討、第11回日本病態生理学会 (福岡) 1月

16)萩野由紀子、関口正幸、和田圭司、野田百美、新規 AMPA 型受容体増強薬 (PEPA) のラット・ミクログリアに及ぼす作用、第74回日本薬理学会 (横浜) 3月

17)岡田三津子、金掘佳子、野田百美、浦江隆次、岩田仲生、尾崎紀夫、浦江明憲、フォルスコリンとイソプロテレノールの C6 グリオーマ細胞の細胞外 pH 調節機構に及ぼす効果の相違、第74回日本薬理学会 (横浜) 3月

II. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

生体内ユビキチン-蛋白質結合体の単離・同定に関する研究

分担研究者 高田耕司（東京慈恵会医科大学 生化学講座第1 講師）

ユビキチンシステムの機能酵素分子や基質蛋白にはユビキチンが共有結合し、ユビキチン-蛋白質結合体を形成する。本研究では、結合型ユビキチン認識抗体を用いたイムノアフィニティークロマトグラフィーとゲル濾過によってこれらの単離・同定を試みた。その結果、哺乳類培養細胞やヒト大腸癌組織から、ユビキチン-蛋白質結合体が簡便に精製され、低分子量領域（約 40 kDa 以下）の新規ユビキチン化蛋白質やユビキチン-E2 チオエステル結合体が同定された。本方法は、脳・血漿・精漿等、検討したすべての生体材料に存在するユビキチン-蛋白質結合体の精製に有効であり、神経系疾患における研究への応用が期待される。

A. 研究目的

ユビキチンシステムは細胞内蛋白質の選択的分解を司る。その際、ユビキチンはユビキチン結合酵素 E2/ユビキチンリガーゼ E3 とのチオエステル結合を経て、基質蛋白にイソペプチド結合し、分解誘導シグナル“ユビキチン鎖”を付与する。同システムが関る生命現象は多岐にわたり、現在までに見出された E2/E3 分子種や基質蛋白は氷山の一角と目されている。本研究では、様々な生体内に存在する機能 E2/E3 分子や基質蛋白の効率的同定を目的として、その簡便な精製法の構築を検討した。

B. 研究方法

精製の出発材料として、株化ヒト白血病細胞 (K562、OCI/AML 1a)、株化ラット褐色細胞腫細胞 (PC12h)、ヒト大腸癌組織、マウス大脳組織、ヒト血清、ヒト精漿、を用いた。ヒトの血清・精漿はボランティアから、大腸癌組織は癌摘出手術を受けた患者から得たもので事前に研究目的を説明し承諾を得た。精製の第一段階には、結合型ユビキチンを認識するモノクローナル抗体 (FK2 ま

たは FK1) をリガンドとしたイムノアフィニティークロマトグラフィーを用いた。これによって得た標品は、次いで Superdex 75 によるゲル濾過を用いて分画した。精製の評価は、SDS-PAGE、および抗ユビキチン抗体を用いた Western blotting と ELISA によるマルチユビキチン鎖定量によった。また、一部の精製標品は、逆相 HPLC による再精製、ならびに lysylendopeptidase を用いた消化後、質量分析 (TOF-MS) とアミノ酸配列解析 (自動化 Edman 分解) に供した。

(倫理面への配慮)

動物使用に当たっては国の法律・指針を守り動物が受ける苦痛を最小限に留めた。ヒト標本を用いた研究計画は研究対象者の不利益、危険性の排除を行い、インフォームドコンセントに十分配慮し、厚生科学審議会等の定める規定を遵守した。

C. 研究結果

検討したすべての生体材料において、内在するユビキチン-蛋白質結合体は FK2 抗体カラムに結合し、3.5 M MgCl₂ で溶出された。その際、総蛋白質量の 99% 以上が除去され、マルチユビキチン鎖

量を指標にした回収率は70-100%に上った。ただし、大腸・大腸癌抽出液および血清、精漿の場合、事前に脂質等精製を妨げる成分の除去処理を必要とした。K562細胞の精製成分をゲル濾過し、その成分を解析した結果、高分子量領域(約40 kDa以上)においてマルチユビキチン化蛋白質が、低分子量領域(約40 kDa以下)において、モノユビキチン、遊離ユビキチン鎖、および2種類のE2(UbcH7とUbe2N)とユビキチンのチオエステル結合体ならびにイソペプチド結合体が同定された。この他、OCI/AML 1a細胞からはユビキチン化ヒストンH2Aの限定分解産物、大腸癌組織からはモノユビキチン化ホスホグリセリン酸ムターゼなど未報告のユビキチン-蛋白質結合体が単離・同定された。一方、FK1抗体カラムは、マルチユビキチン化蛋白質の精製に適用可能であったが、低分子量領域のユビキチン-蛋白質結合体やモノユビキチンは同カラムに結合せず、これらの単離には不適切と判断された。

D. 考察

生物材料からのユビキチン-蛋白質結合体の精製・同定は、少数ながら過去に報告されている。しかし、その多くは蓄積した特定成分をその物理化学的性質に基づき単離したものであり、その方法は限定的で普遍化し得ない。本研究では、世界で初めて同蛋白質のイムノアフィニティー精製法を確立した。特にFK2抗体を用いた方法では、細胞/組織/体液に存在するユビキチン-蛋白質結合体の大半を夾雑蛋白から分離可能と思われる。例えば、この方法によって我々は、ユビキチン-E2チオエステル結合体やユビキチン化されたヒストンH2A-C端断片やホスホグリセリン酸ムターゼなどを同定した。このことは、基質蛋白質や共有結合の種類に関らず、FK2抗体が様々なユビキチン-蛋白質結合体を認識し得ることを示している。ユビキチンシステムの理解を深めるため、今後も精製産物の同定と解析を系統的に進めていきたい。なお、本研究において、蛋白分解の基質本体であ

るマルチユビキチン化蛋白質も分離された。そこから基質蛋白質の情報を引き出すことも重要な課題であり、検討を開始している。

E. 結論

各種生物材料からのユビキチン-蛋白質結合体の実用的な精製法が確立された。本方法は、特に低分子量領域(約40 kDa以下)のユビキチン化蛋白質やユビキチン-E2チオエステル結合体の単離・同定に有用であり、ユビキチンシステムの関与が推定されている神経系疾患のメカニズム解明にも寄与すると思われる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Daino, H., Matsumura, I., Takada, K., Odajima, J., Tanaka, H., Ueda, S., Shibayama, H., Ikeda, H., Hibi, M., Machii, T., Hirano, T., Kanakura, Y. (2000) Induction of apoptosis by extracellular ubiquitin in human hematopoietic cells: possible involvement of STAT3 degradation by proteasome pathway in interleukin 6-dependent hematopoietic cells. *Blood* 95: 2577-2585.

Ohkawa, K., Takada, K., Asakura, T., Hashizume, Y., Okawa, Y., Tashiro, K., Ueda, J., Itoh, Y., and Hibi, N. (2000) Calpain inhibitor inhibits secretory granule maturation and secretion of GH. *NeuroReport* 11: 4007-4011.

2. 学会発表

薄葉輝之、高田耕司、石橋由朗、青木照明、大川 清. 大腸癌におけるユビキチン化蛋白質の精製と同定. 第59回日本癌学会総会. 横浜. 10月. 2000. (*Jpn. J. Cancer Res.* 91(suppl.): 492, 2000)

高田耕司、平河多恵、大川 清. マルチユビキチン化蛋白質の効率的同定法の検討. 第

73 回日本生化学会大会. 横浜. 10 月. 2000.
(生化学 72: 772, 2000)

大川 清、朝倉 正、高田耕司、大川 豊、日
比 望. 成長ホルモン分泌に対するカルパ
イン阻害剤の効果. 第 73 回日本生化学会
大会. 横浜. 10 月. 2000. (生化学 72: 776,
2000)

大川 豊、高田耕司、青木勝彦、薄井 紀子、
田嶋尚子、大川 清. THP-1 細胞の分化誘
導によるユビキチン化ヒストン H2A とそ
の限定分解産物量の変動. 第 73 回日本生
化学会大会. 横浜. 10 月. 2000. (生化学 72:
1085, 2000)

Takada, K., Tokunaga, T., Iwamuro, S., Hirakawa,
T., and Ohkawa, K. Purification of ubiquitin
conjugates from PC12h cells. 30th Annual
Meeting Society for Neuroscience. New
Orleans. Nov. 2000.

H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)
なし

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）

分担研究報告書

ユビキチン・プロテアソーム系と神経伝達に関する研究

分担研究者 野田 百美（九州大学・大学院・薬学研究院・病態生理学分野・助教授）

研究協力者：赤池 紀生・九州大学・大学院・医学系研究院

・細胞システム生理学・教授

神経伝達機序におけるユビキチンシステムの機能解析のため、神経終末シナプス後電流やグリア・ニューロン連関に及ぼすプロテアソーム阻害剤の急性作用を検討した。その結果、ユビキチン・プロテアソーム系が、シナプス前神経終末において神経伝達物質の放出に重要な役割を果たしていること、および、今回は培養グリア細胞を用いた結果であるが、細胞膜イオンチャネルおよび神経伝達物質を細胞外から速やかに消失させる役割をもつ輸送体の機能に同じく重要な役割を果たしていることが示唆された。このことはユビキチン・プロテアソーム系が中枢神経系において、脳機能全体に重要な機能を果たしていることを示唆している。

A. 研究目的

ユビキチンシステムによる神経伝達の修飾機構はまだわかっていない。神経伝達の病態時におけるユビキチンシステムの変化についてもわかっていない。そこで、シナプスにおける神経伝達機序におけるユビキチンシステムの機能解析のため、まず神経終末シナプス後電流に及ぼすプロテアソーム阻害剤の急性作用を検討し、シナプス前、シナプス後におけるユビキチンシステムの破綻の影響を解析した。

また、神経伝達物質はグリア細胞にも作用し、神経・グリア連関の重要性が近年示唆されている。グリア細胞にも神経細胞に劣らず様々な受容体や神経伝達物質の輸送体が存在することが明らかになってきた。

ユビキチン・プロテアソーム系は全ての細胞に存在すると言われていたが、グリア細胞におけるユビキチンシステムの機能はやはりまだわかっていない。そこで、神経細胞とはほぼ同等に存在されている受容体の機能、およびグリア細胞でより重要な働きをしていると考えられているグルタミン酸輸送体の機能におけるユビキチンシステムの機能あるいは修飾機構を検討すべく、受容体応答、およびグルタミン酸輸送体機能に及ぼすプロテアソーム阻害剤の影響を解析した。さらに神経に特異的に発現していると言われていた脱ユビキチン化酵素の機能を検討するため、グリア細胞に強制発現させて、同様に受容体応答、およびグルタミン酸輸送体機能の変化を観察した。

B. 研究方法

(1) シナプスにおける神経伝達機序の解析

ラット単離中枢ニューロンで、かつ機能的シナプス前終末がついたままのシナプス・ブートン標本を用い、ニスタチン穿孔パッチ法で自発性シナプス後電流を測定した。ニスタチン穿孔パッチ法は、抗生物質の1種であるニスタチンにより細胞膜に1価のイオン (Na^+ , K^+ , Cl^-) を通す穿孔が作られ、従来のホールセル様式のパッチ・クランプ法に比べるとピペット内の人工液が細胞内に拡散して細胞内を灌流することによってイオンチャネルを修飾又は制御している細胞内活性物質が経時的に流出する "washout" という現象が起こりにくい。また、外液交換は、赤池らが1986年に Krishtal 教授と共同で開発した concentration clamp 法 (濃度固定法) を用いた。これは中枢神経の小型細胞では 250 μs の超スピードで瞬時に細胞外液を交換できる技術である。本法の開発により化学受容体応答 (キネティックも含めて) や G 蛋白の活性化速度などの正確な解析が可能となり、電位依存性チャネルに比べて40年も遅れていた化学受容体応答の研究を一挙に邁進させることになった。実際の測定には海馬 CA1 領域の脳スライス標本を作成し、酵素処理をせずに赤池ら独自に開発した機械的単離法を用いて神経細胞をバラバラにした。酵素処理をしない理由は機能的なシナプス前終末を保つためである。単離した神経細胞は数時間以内に観察に使用した。

(2) グリア細胞におけるユビキチンシステムの機能解析

グリア細胞の1種であるアストロサイトを由来とする C6 グリオーマを用い、膜電位固定下ホールセル・パッチクランプ法で神経伝達物質の受容体応答、および輸送体電流を測定した。外液交換には上述の concentration clamp 法よりも液交換が 20 ms とやや遅いが、培養皿上に付着した細胞などに応用するのに適した Y-tube 外液交換法を用いた。本法も、赤池が福井大学工学部の村瀬教授と共同で開発した技術である。受容体応答の代表として、近年、新しい神経伝達物質として注目を浴びており、C6 グリオーマに発現している ATP 受容体チャネル応答を観察した。ATP 受容体にはイオンチャネル型である P2X と G 蛋白共役型である P2Y との2種類あり、C6 グリオーマには P2Y が存在する。この P2Y 受容体を ATP で刺激すると、百日咳毒素非感受性の G 蛋白を介する細胞内 Ca 上昇が起こり、それによって Ca 依存性 K 電流が観察される。また、グルタミン酸輸送体については、ロンドン大学の D.A. Attwell らによって電気発生性であることが報告されており、グルタミン酸の取り込み、排出のいずれにおいても、1分子のグルタミン酸と3個の Na^+ イオンが同方向へ動く際、反対方向に K^+ イオンと HCO_3^- が移動するため、結果としてグルタミン酸が移動する方向に電荷が移動し、電流が流れる。細胞外にグルタミン酸を作用させる場合、グルタミン酸受容体チャネルを活性化するためには種々の阻害剤が必要である。従って、細胞内からグルタミン酸が排出される「逆向きグルタミン酸輸送体電流」を測定するべく、パッチ・ピペット内液にグルタミン酸と Na^+ イオンを入れ、細胞外灌流液に K^+ イオンが加わった

ものを瞬時与えることによってグルタミン酸輸送体を活性化させ、それによって生じる外向き電流を測定した。またグルタミン酸輸送体をより細胞膜表面へ発現させるため細胞をプロテインキナーゼ C 活性化剤である PMA (500 nM) で 1 日処理した。

ユビキチン C 末端加水分解酵素 1 型 (UCH-L1) 遺伝子導入は UCH-L1 のプラスミドと蛍光剤 GFP とのキメラ分子のベクター (pEGFP-N1-mUCHL1) と GFP のみのベクターを用い、リポフェクタミン法で細胞に遺伝子を導入した。

(倫理面への配慮) 動物実験は、九州大学動物実験倫理問題検討委員会で承認されており、かつ米国 NIH の実験動物取り扱い基準を満たしている。

C. 研究結果

(1) 海馬 CA1 ニューロンにおける GABA 性自発性抑制性シナプス後電流は、プロテアソーム阻害剤(MG-132)を数分間作用させることによって、amplitude は変化しなかったが frequency は 1、10 μM で 1.4-1.7 倍に増加した。

(2) C6 グリオーマにおいて ATP 受容体反応 (Ca 依存性 K 電流) は、プロテアソーム阻害剤(MG-132、10 μM)を 5 分間処置した際は 11.6 ± 2.2 pA/pF (n=8) から 7.5 ± 1.5 pA/pF (n=8) に減少し、10 分間処置した際は 5.4 ± 1.6 pA/pF (n=5) から 0.4 ± 0.4 pA/pF (n=5) に有意に減少した。

逆向きグルタミン酸輸送体電流を測定したところ、 0.31 ± 0.06 (n=4)であったが、プロテアソーム阻害剤(MG-132、10 μM)処置 (10 分) によってほぼ完全に抑制された。一方、ユビキチン C 末端加水分解酵素 1 型

(UCH-L1) を C6 グリオーマに遺伝子導入した細胞では、GFP のみのベクターを使用したコントロール群では、7 例中 3 例の細胞が 10 μM ATP に応答し、電流の大きさは 143 ± 19 pA/pF (n=3)であったが、UCH-L1 を強制発現させた群では 10 μM ATP による応答は皆無であった (n=9)。逆向きグルタミン酸輸送体電流は、コントロール群では 12 例中 5 例で観測され、 20 ± 3 pA/pF (n=5)であったが、UCH-L1 を強制発現させた群で逆向きグルタミン酸輸送体電流が観測されたのは 6 例中、皆無であった。

D. 考察

(1) シナプスにおける神経伝達機序に及ぼすプロテアソーム阻害剤の影響

海馬 CA1 ニューロンにおける GABA 性自発性抑制性シナプス後電流は、プロテアソーム阻害剤によって、amplitude は変化せず frequency が増加した。このことは、シナプス後反応の変化ではなく、プロテアソーム阻害剤がシナプス前終末に作用して GABA の放出を増加させたことを示唆している。GABA の放出増加のメカニズムはまだ不明であるが、作用時間が短いことからシナプス前終末の膜直下においてシナプス小胞に作用しているか、シナプス小胞が膜融合してシナプス小胞内の神経伝達物質の放出を起こす exocytosis のメカニズムに作用していることが考えられる。また、シナプス小胞形成に関与する細胞内情報伝達系への修飾も考えられる。いずれにせよ、ユビキチンシステムが神経伝達物質の放出にかなり直接的に関与していることが示唆された。しかも、神経伝達物質の放出がプロテアソーム阻害剤によって抑制されるのではな

く、増強されるということは、ユビキチンシステムが神経伝達物質の放出を速やかに終らせる役割を演じているという興味ある結果を示唆している。

(2) グリア細胞におけるユビキチンシステムの機能解析

C6 グリオーマにおいて、プロテアソーム阻害剤およびユビキチン C 末端加水分解酵素 1 型 (UCH-L1) の遺伝子導入によって、ATP 受容体反応およびグルタミン酸輸送体のいずれの反応も抑制された。このことは、グリア細胞においてもユビキチン・システムが機能しており、受容体や輸送体の機能を管理していることを示唆している。長時間のプロテアソーム阻害剤作用、あるいは脱ユビキチン酵素の過剰発現により神経細胞および培養グリア細胞がアポトーシスを起こすことは報告されているが、今回の実験結果は 5—10 分という短い時間で観察されたことより、アポトーシスに附随する作用ではないと思われる。中枢神経系において、神経細胞のみならずグリア細胞において、細胞膜イオンチャネルおよび輸送体の機能をユビキチン・システムがコントロールしている可能性が明らかとなり、今後、そのメカニズムを詳細に検討する予定である。

E. 結論

ユビキチン・プロテアソーム系が、シナプス前神経終末において神経伝達物質の放出に重要な役割を果たしていること、および、今回は培養グリア細胞を用いた結果であるが、細胞膜受容体反応および神経伝達物質を細胞外から速やかに消失させる役割をもつ輸送体の機能に同じく重要な役割を

果たしていることが示唆された。このことはユビキチン・プロテアソーム系が中枢神経系において、脳機能全体に重要な機能を果たしていることを示唆している。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1、論文発表

Higashida, H., Yokoyama, S., Hoshi, N., Hashii, M., Egorova, A., Zhong, Z-G., Noda, M., Shahidullah, M., Taketo, M., Yasuhiro, K., Takahashi, H., Chen, X-L., Shin Y. and Zhang, J-S.: Signal transduction from bradykinin, angiotensin, adrenergic and muscarinic receptors to effector enzymes, including ADP-ribosyl cyclase. *Biological Chemistry*, 382, 20-33, 2001.

Higashida, H., Hashii, M., Yokoyama, S., Hoshi, N., X-L. Chen, X-L., Egorova, A., Noda, M., and Zhang, J-S.: Cyclic ADP-ribose as a second messenger revisited from a new aspect of signal transduction from receptors to ADP-ribosyl cyclase. *Pharmacology & Therapeutics*, in press.

2、著書

東田陽博、横山茂、木村康宏、武田久、橋井美奈子、星直人、高橋博人、申然淑、張家生、陳小良、大巻深穂、武藤恵、野田百美、金中振国、Alla Egorova: 血漿キニンの受容体と細胞内情報伝達の分子生物学、血漿と内皮、メジカルビュー社、vol. 10, No. 1, p9-13 (2000)

3、学会発表

東田陽博、野田百美、ラット心室筋内でのサイクリック ADP リボース産生のインプロテレノールによる上昇、生理学会（横浜）4月

野田百美、興奮性神経伝達物質と神経—グリア関連、第6回グリアクラブ・招待講演（東京）8月

東田陽博、野田百美、交感神経興奮によるβアドレナリンを介するラット心室筋内でのサイクリック ADP リボース産生の上昇、日本神経科学大会・日本神経回路学会 合同大会（横浜）9月

東田陽博、Egorova Alla、東田知陽、Zhang Zhen-Guo、横山茂、野田百美、Zhang Jia-Sheng、交感神経興奮によるラット心室筋内でのサイクリック ADP リボース産生の上昇、日本生 化学会大会、（横浜）10月

野田百美、「シンポジウム：脳のホメオスタシスとミクログリアの機能」グルタミン酸を介した神経—ミクログリア関連、日本神経化学会（金沢）10月

野田百美、岡田三津子、安田さつき、萩野由紀子、島田亜希、岩田仲生、グリア細胞におけるセロトニン 5-HT_{5A} 受容体の新しい機能、第5回 グリア研究会（名古屋）11月

安田さつき、岡田三津子、萩野由紀子、金掘佳子、岩田仲生、野田百美、グリア細胞におけるセロトニン 5-HT_{5A} 受容体の機能、第11回日本病態生理学会（福岡）1月

金掘佳子、岡田三津子、浦江隆次、岩田仲生、尾崎紀夫、野田百美、マイクロフィジオメーターを用いた細胞外 pH 変化に及ぼすフォルスコリンの作用の検討、第

11回日本病態生理学会（福岡）1月
萩野由紀子、関口正幸、和田圭司、野田百美、新規 AMPA 型受容体増強薬（PEPA）のラット・ミクログリアに及ぼす作用、第74回日本薬理学会（横浜）3月

岡田三津子、金掘佳子、野田百美、浦江隆次、岩田仲生、尾崎紀夫、浦江明憲、フォルスコリンとインプロテレノールのC6グリオーマ細胞の細胞外 pH 調節機構に及ぼす効果の相違、第74回日本薬理学会（横浜）3月

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

なし

別紙 5

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

書籍

| 著者氏名 | 論文タイトル名 | 書籍全体の編集者名 | 書籍名 | 出版社名 | 出版地 | 出版年 | ページ |
|------|---------|-----------|-----|------|-----|-----|-----|
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |

雑誌

| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表誌名 | 巻号 | ページ | 出版年 |
|---|---|---------------------------|-----|-----------|------|
| Kiryu-Seo, S., Sasaki, M., Yokohama, H., Nakagomi, S., Hirayama, T., Aoki, S., Wada, K. and Kiyama, H., | Damage-induced neuronal endopeptidase (DINE) is a unique metallopeptidase expressed in response to neuronal damage and activates superoxide scavengers | Proc. Natl. Aca. Sci. USA | 97 | 4345-4350 | 2000 |
| Harada, T., Harada, C., Nakayama, N., Okuyama, S., Yoshida, K., Kohsaka, S., Matsuda, H. and Wada, K., | Modification of glial-neuronal interactions prevents photoreceptor apoptosis during light-induced retinal degeneration | Neuron | 26 | 533-541 | 2000 |
| Wang, Y.L., Saigoh, K., Osaka, H., Yamanishi, T., Suh, J.G., Kiyosawa, H., Sakai, Y., Wakana, S. and Wada, K., | A YAC/BAC-based physical and transcript mapping around the gracile axonal dystrophy (<i>gad</i>) locus identifies <i>Uchl1</i> , <i>Pmx2b</i> , <i>Atp3a2</i> , and <i>Hip2</i> genes. | Genomics | 66 | 333-336 | 2000 |
| Harada, C., Harada, T., Slusher, B.S., Yoshida, K., Matsuda, H. and Wada, K. | N-acetylated-alpha-linked-acidic dipeptidase inhibitor has a neuroprotective effect on mouse retinal ganglion cells after pressure-induced ischemia. | Neurosci. Lett. | 292 | 134-136 | 2000 |
| Daino, H., Matsumura, I., Takada, K., Odajima, J., Tanaka, H., Ueda, S., Shibayama, H., Ikeda, H., Hibi, M., Machii, T., Hirano, T., Kanakura, Y. | Induction of apoptosis by extracellular ubiquitin in human hematopoietic cells: possible involvement of STAT3 degradation by proteasome pathway in interleukin 6-dependent hematopoietic cells. | Blood | 95 | 2577-2585 | 2000 |
| Ohkawa, K., Takada, K., Asakura, T., Hashizume, Y., Okawa, Y., Tashiro, K., Ueda, J., Itoh, Y., and Hibi, N. | Calpain inhibitor inhibits secretory granule maturation and secretion of GH. | NeuroReport | 11 | 4007-4011 | 2000 |
| Higashida, H., Yokoyama, S., Hoshi, N., Hashii, M., Egorova, A., Zhong, Z-G., Noda, M., Shahidullah, M., Taketo, M., Yasuhiro, K., Takahashi, H., Chen, X-L., Shin Y. and Zhang, J-S. | Signal transduction from bradykinin, angiotensin, adrenergic and muscarinic receptors to effector enzymes, including ADP-ribosyl cyclase. | Biol. Chem. | 282 | 20-33 | 2001 |

20000441

以降のページは雑誌／図書等に掲載された論文となりますので
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。