

厚生労働科学研究費補助金
(こころの健康科学研究事業)

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—こころ—0 1 7)

平成 1 4 年度総括・分担研究報告書

主任研究者 和田 圭司
平成 1 5 (2 0 0 3) 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	_____	7
ユビキチンシステムと神経伝達に 関する研究 野田百美	_____	10
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	_____	13
IV. 研究成果の刊行物・印刷	_____	14

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、UCH-L1、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する。研究3年目の今年度（最終年度）は世界に先駆けて変異型 UCH-L1 発現トランスジェニックマウスを開発し、同マウスが新たなパーキンソン病モデルマウスである可能性が高いこと、さらに UCH-L1 自身が酸化を受けることおよび UCH-L1 の *hydrolase* 活性とパーキンソン病発症との間に関連性があることを見出した。また UCH-L1 と神経回路機能の関連性を解析し、UCH-L1 がモノアミントランスポーター活性を制御している可能性を見出した。さらに高分子量ユビキチン化蛋白質の解析を行い、脳虚血およびカドミウム曝露で増加するユビキチン化蛋白質の基質候補として Cdk5、FGFR-2 等を見出した。

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

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、UCH-L1 の生理的・病態生理的機能解明を行い、神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1) I93M 変異型 UCH-L1 蛋白質が野

生型 UCH-L1 に比べ、凝集性が高いことを見出し、また 2) 世界に先駆けて変異型 UCH-L1 発現トランスジェニックマウスを開発したところ同マウスが新たなパーキンソン病モデルマウスである可能性が高いことを見出した。さらに 3) UCH-L1 自身が酸化を受け、酸化ストレスにより hydrolase 活性が低下することを見出し、4) I93M 変異、S18Y 多型について UCH-L1 の hydrolase 活性を測定し、hydrolase 活性とパーキンソン病発症との間に関連性があることを見出した。また 5) シナプス機能と UCH-L1 の関連に関してが UCH-L1 がモノアミントランスポーター活性を抑制することを見出した。さらに、6) 蛋白質の蓄積が実際神経変性に結びつく機序を解析するためマルチユビキチン化蛋白質の単離・同定を試み脳虚血およびカドミウム曝露で増加するユビキチン化蛋白質の基質候補として Cdk5、FGFR-2 等を見出した。

B. 研究方法

(1) UCH-L1 蛋白質の生化学的性状の測定

大腸菌発現系を利用し、UCH-L1 蛋白を発現・精製し、円二色偏光法で二次構造の組成を解析した。

(2) UCH-L1 発現トランスジェニックマウスの作成と解析

マウス受精卵前核にマイクロインジェクションする通常の方法で遺伝子発現マウスを作製した。表現型の解析は行動科学的、病理組織学的に行った。

(3) UCH-L1 の hydrolase 活性の測定

ユビキチン-AMC を基質に、水解時に産生される AMC 量を測定し、酵素活性を算出した。酸化剤は HNE を使用し、UCH-L1 については野生型、I8S 型、I8Y 型、I93M 変異体を使用した。

(4) UCH-L1 による神経伝達物質トランスポーター反応増強作用の解析

UCH-L1 発現 SHSY5Y 細胞におけるノルアド

レナリントランスポーター活性をアイソトープ標式されたノルアドレナリンを用いてその取り込みを測定することで解析した。

(5) マルチユビキチン化蛋白質の単離・同定技術の開発

ユビキチン結合領域部分に注目し、endoprotease Asp-N で切断生成されるユビキチン C 末端領域ペプチド (UCP) を含むペプチド断片群を UCP 特異的抗体で分離し、TOF-MS による質量分析とプロテインシーケンサーによるアミノ酸配列解析に供した。

(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、国等の定める法律・規定を遵守した。

C. 研究結果

(1) I93M UCH-L1 は凝集性が高まっている

円二色偏光法で二次構造の組成を解析したところ、野生型 UCH-L1 に比べ I93M 変異体のベータシート構造の割合が増加し、アルファヘリックス構造の割合が減少していることを見出した。このことは I93M UCH-L1 は凝集性が高まっているを示唆する。

(2) I93M 変異型 UCH-L1 発現トランスジェニックマウスの開発と解析

ヒト I93M 変異体発現トランスジェニックマウスを作製したところ、極めて優れたパーキンソン病モデルであることを見出した。すなわち、臨床的には尾硬直を有し、神経病理学的には黒質の細胞脱落があり、線条体ドーパミン含量が低下して

いた。

(3) UCH-L1 hydrolase 活性とパーキンソン病病態との相関性の発見

S18Y 多型に関して、パーキンソン病発症に防止的に働くとされる Y 型の方が S 型に比してユビキチン C 末端 hydrolase 活性が高いことを見出した。また I93M 変異体の hydrolase 活性は野生型の約 50%であった。また、パーキンソン病の誘因の一つとされる酸化ストレスが直接的に UCH-L1 を酸化し hydrolase 活性を抑制することを見出した。

(4) 神経伝達におけるユビキチンシステムの病態生理解析

SHSY5Y 細胞には内在性のノルエピネフリントランスポーターが存在しており、遺伝子導入をしない細胞においてもノルエピネフリンの取り込みを測定できた。UCHL1 を過剰発現させた SHSY5Y 細胞では、ノルエピネフリン取り込み速度がコントロールベクター発現細胞における取り込み速度の 60%程度まで低下した。SHSY5Y 細胞へのノルエピネフリン取り込み速度はカルモジュリンキナーゼ II (CaMKII) 阻害薬である KN-93 により有意に減少し、逆にチロシンキナーゼ阻害薬である Daphnetin により増加する事も明らかになった。

(5) マルチユビキチン化蛋白質の単離・同定

マウス大脳の尿素溶性画分から得られた UC1 抗体免疫沈降物は 4 群に分類された。(1) K48 型マルチユビキチン鎖由来 UCP-ユビキチン断片複合体、(2) ユビキチン化蛋白質由来 UCP-ペプチド断片複合体、(3) UCP および UCP-X、(4) ユビキチン N 末端領域ペプチド。脳虚血再灌流により、(1)は大きく増加し、(2)の種類は変化した。すなわち、正常マウスで見出されたユビキチン化 histone H2A 等のペプチド断片は虚血マウスでは減少または消失し、代わりにユビキチン化 cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) 等の断片を検出した。SH-SY5Y 細胞の尿素溶性画分の高分子量

成分の解析においても上記 4 群の免疫沈降ペプチドを見出したが、カドミウムストレスで増加した (2) の種類は虚血脳のものとは異なり、ユビキチン化 fibroblast growth factor receptor 2

(FGFR-2) 等の断片が見出された。一方、水溶性の低分子量精製蛋白質画分の解析では、虚血再灌流後の大脳においてユビキチン-UbE2D2 (E2 酵素の一種) チオエステル結合体が同定され、虚血ストレスに関連したユビキチン化反応が UbE2D2 を経由することが示唆された。

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。若年性パーキンソン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、ユビキチンシステムの機能異常が神経変性に結びつく分子カスケードはまだ不明の点が多い。本研究はユビキチンシステムの病態生理学的意義をとりわけ *gad* マウスの原因遺伝子である UCH-L1 の機能解析から明らかにし、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もので、その成果は治療技術の高度化につながる。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、1) 新たなパーキンソン病モデルマウスを開発したこと、2) UCH-L1 の hydrolase 活性とパーキンソン病発症との関連性を見出したことが大きな成果といえる。新たなパーキンソン病モデルマウスを開発した意義は発症機序解明・治療法開発の点から極めて大きく、当初計画を上回る成果であった。既存のモデルに比べても優れた点を多々有しており、特許取得に向けて準備中である。また、UCH-L1 の in vivo における生理機能を同定し、かつ UCH-L1 自身が酸化修飾を受け、その酵素活性と発症との間に密接な相関があることを確認できたことはUCH-L1 が酸化ストレスの生体センサーとして機能している可能性が考えられ、他の神経変性疾患における検討が待たれるところである。また、本研究で開発された生体内ユビキチン-蛋白質結合体の単離・同定法は、脳虚血再灌流やカドミウムといったストレスによって増加変動するユビキチン-蛋白質結合体の精製・同定に有用であり、ストレス応答におけるユビキチンシステムの意義解明に役立つと考えられる。さらに UCHL1 によるノルエピネフリントランスポーター機能の抑制の発見はユビキチンシステムがシナプス伝達を制御している可能性を示唆するものでその意義は大きい。UCH-L1 による取り込み速度抑制の機序はまだ不明であるが、カルモジュリンキナーゼ II (CaMKI) 阻害薬である KN-93 やチロシンキナーゼ阻害薬である Daphnetin がノルエピネフリンの取り込み速度に影響を与えたことから UCH-L1 に加えて CaMKII・チロシンキナーゼが関与するノルエピネフリントランスポーターの未知の制御機構が細胞内に存在する可能性が示された。ノルエピネフリンは交感神経系の mediator であるが、パーキンソン病では自律神経症状も生じることから、本研究の成果はパーキンソン病における自律神経症状の防止・治療法開発の礎として今後の発展が期待される。

E. 結論

本年度の研究からパーキンソン病発症における UCH-L1 の重要性が確立した。UCH-L1 を対象にしたパーキンソン病の創薬が期待できる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Namura, S., Maeno, H., Takami, S., Jiang, X.F., Kamichi, S., Wada, K., and Nagata, I. Inhibition of glial glutamate transporter GLT-1 augments brain edema after transient focal cerebral ischemia in mice. *Neurosci. Lett.*, 324, 117-120, 2002
- 2) Harada, T., Harada, C., Kohsaka, S., Wada, E., Yoshida, S., Ohno, S., Mamada, H., Tanaka, K., Parada, L.F., and Wada, K. Microglia-Müller glia cell interactions control neurotrophic factor production during light-induced retinal degeneration. *J. Neurosci.*, 22, 9228-9236, 2002
- 3) Aoki, S., Li, H., Su, Q., Nishikawa, K., Ayukawa, K., Hara, Y., Namikawa, K., Kiryu-Seo, S., Kiyama, H. and Wada, K., Identification of a novel axotomy-induced protein, AIGP1, possibly involved in cellular apoptosis triggered by endoplasmic reticulum-Golgi stress. *J. Neurosci.*, 22, 10751-10760, 2002
- 4) Nishikawa, K., Li, H., Kawamura, R., Osaka, H., Wang, Y.L., Hara, H., Hirokawa, T., Manago, M., Amano, J., Noda, M., Aoki, S. and Wada, K. Alterations of structure and hydrolase activity of parkinsonism-associated human ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 variants., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, in press
- 5) Noda, M., Kariura, Y., Amano, T., Manago, Y., Nishikawa, K., Aoki, S. and Wada, K.,

Expression and function of bradykinin receptors in microglia. *Life Sciences*, 72, 1573 – 1581, 2003.

- 6) Noda, M., Yasuda, S., Okada, M. Higashida, H., Shimada, A., Iwata, N., Ozaki, N., Nishikawa, K., Shirasawa, S., Uchida, M., Aoki, S., Wada, K. Recombinant human 5-HT_{5A} receptors stably expressed in C6 glioma cells couple to multiple signal transduction pathways. *J. Neurochemistry*, 84; 222-232, 2003.
- 7) Takagi, M., Yamauchi, M., Takada, K., and Ohkawa, K. (2002) Serum ubiquitin-protein conjugates in normal subjects and patients with alcoholic liver diseases: immunoaffinity isolation and electrophoretic mobility. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 26: 1692-1696.
- 8) Higashida, H., Hossain, K. Z., Takahagi, H. and Noda M.: Measurement of adenylyl cyclase by separating cyclic AMP on silica gel thin-layer chromatography. *Analytical Biochemistry*, 308, 106-111, 2002.
- 9) Higashida H, Zhang JS, Mochida S, Chen XL, Shin Y, Noda M, Hossain KZ, Hoshi N, Hashii M, Shigemoto R, Nakanishi S, Fukuda Y, Yokoyama S. Subtype-specific coupling with ADP-ribosyl cyclase of metabotropic glutamate receptors in retina, cervical superior ganglion and NG108-15 cells. *J. Neurochemistry*, in press.

2. 学会発表 (国際学会)

- M. Noda, S. Satsuki, H. Higashida, K. Wada Cellular function of serotonin 5-HT_{5A} receptor in glial cells. The Third International Symposium on the Study of Brain Function (福岡) 5月、2002.
- Y. Kariura, K. Nishikawa, S. Aoki, K. Wada, M. Noda Expression and function of bradykinin receptor in microglia. The Third International

Symposium on the Study of Brain Function (福岡) 5月、2002.

- S. Shimada, Y. Kanahori, K. Wada, M. Noda Regulation of ATP receptor by de-ubiquitinating isozyme. The Third International Symposium on the Study of Brain Function (福岡) 5月、2002.
- Wada, K., Osaka, H., Wang, Y-L., Harada, T., Takada, K., Noda, M., Role of ubiquitin carboxy-terminal hydrolase in ubiquitin stability and neural cell function. FASEB Summer Conference 2002 [Amyloids and Other Abnormal Protein Folding Processes], Snowmass, Colorado, June 18, 2002
- Takada, K., Ohkawa, K., Wada, K., Ohtaki, H., and Shioda, S. Direct identification of ubiquitin-protein conjugates accumulated in post-ischemic reperfused brains. FASEB Summer Research Conference: Amyloids and Other Abnormal Protein Folding Processes. Snowmass Colorado, June. 2002.
- Noda, M., Kanahori, Y., Shimada, A., Nishikawa, K., Aoki, S., Osaka, H., Wada, K. Regulation of ATP receptor by a de-ubiquitinating isozyme. Society for Neuroscience, 32nd Annual Meeting, 482.21 (Orlando, USA), Nov. 2002.
- Osaka, H., Wang, Y. L., Sato, Y., Setsuie, R., Sakurai, M., Takada, K., Noda, M., Wada, K. Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase mediates ubiquitin stability and function in neurons. Society for Neuroscience, 32nd Annual Meeting, 482.22 (Orlando, USA) Nov. 2002
- Noda, M. Kariura, Y., Amano, T., Manago, Y., Nishikawa, K., Aoki, S., Wada, K. Expression and function of bradykinin receptors in microglia. Gordon Research Conference. (Ventura, USA) Feb. 2003
(国内学会)
- 滝澤修一、小坂仁、王玉来、佐藤野衣、櫻井省花子、原洋子、孫英傑、李航、青木俊介、和田

- 圭司、ユビキチンC末端水解酵素の機能解析、第43回日本神経学会総会、札幌、5.30, 2002
- 小坂仁、王玉来、佐藤野衣、節家理恵子、李航、西川香里、青木俊介、高田耕司、野田百美、和田圭司 脱ユビキチン化酵素によるユビキチン代謝制御と神経変性、第25回日本神経科学大会（東京）7月、2002.
- 和田圭司、原田高幸、原田知加子、王玉来、野田百美、小坂仁 グリア・ニューロン相互作用を利用した神経変性疾患の治療法の開発、第45回日本神経化学学会大会（札幌）7月、2002.
- 野田百美、金堀佳子、野田亜希、青木俊介、王玉来、小坂仁、和田圭司 Regulation of P2X receptor by ubiquitin C-terminal hydrolase 1、第45回日本神経化学学会大会（札幌）7月、2002.
- 真子好正、野田亜希、青木俊介、西川香里、和田圭司、野田百美 パーキンソン病遺伝子産物による受容体チャネルの制御、第2回神経科学合同セミナー（福岡）9月、2002.
- 小坂仁、王玉来、佐藤野衣、節家理恵子、安田 理人、工藤佳久、高田耕司、野田百美、和田圭司、脱ユビキチン化酵素による新たなユビキチン代謝制御、第75回日本生化学会大会、京都、10月、2002.
- 高田耕司、青木勝彦、高橋紗夜子、大滝博和、塩田清二、和田圭司、大川 清、脳内ユビキチン化蛋白質の網羅的解析—虚血再還流はなにをもたらすのか、第75回日本生化学会大会、京都、10月、2002.（生化学、74: 1015, 2002）
- 和田圭司、野田百美 神経変性・神経伝達におけるユビキチンシステムの関与と神経再生に向けた神経幹細胞の機能解析、第13回日本病態生理学会大会、（千葉）1月、2003.
- 高田耕司、大川 清、ユビキチンC末端断片をタグに用いたユビキチン化蛋白消化産物の解析、第54回日本動物学会関東支部総会、早稲田、3月、2002.
- 青木勝彦、高田耕司、南 次郎、大川 清、ヒストンシヤベロン NAP-1はコアヒストンのユビキチン化を阻害する、第25回日本分子生物学会年会、横浜、12月、2002.
- 村上安子、棚橋伸行、高田耕司、村井法之、松藤千弥、無細胞抽出液中におけるアンチザイムの分解、日本ポリアミン研究会第18回研究発表会、東京、2月、2003.
- 東田陽博、陳小良、張家生、野田百美、星直人、橋井美奈子、横山茂 網膜内グループ III グルタミン酸受容体の ADP リボシールシクラーゼへのカップリング、第45回日本神経化学学会大会（札幌）7月、2002.
- H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）
1. 特許取得
ユビキチンC末端水解酵素発現マウス（特許出願準備中）
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
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

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助教授）

これまでに構築した方法を用いて、脳虚血モデルマウスの大脳組織、およびカドミウムストレスを負荷した神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞のユビキチン-蛋白質結合体を解析した。その結果、脳虚血およびカドミウム曝露で増加する非水溶性尿素可溶性の高分子量ユビキチン化蛋白質は、主に K48 型マルチユビキチン鎖を含有していた。また、それらの基質蛋白質の候補として、前者において Cdk5 等、後者においては FGFR-2 等を見出した。さらに、虚血再灌流を受けた大脳の水溶性蛋白質画分から、ユビキチンとチオエステル結合した E2 酵素 Ube2D2 が同定され、虚血ストレスに应答したユビキチン化反応への関与が推定された。以上の結果から、本研究によって確立した方法は、各種ストレス応答におけるユビキチンシステムの役割を解明する上で有用な情報をもたらすことが証明された。

A. 研究目的

ユビキチンシステムは、細胞内の基質蛋白質にユビキチンを付加する。ユビキチンによる修飾が K48 マルチ鎖型の場合、基質はプロテアソーム依存性に分解される。この蛋白質分解系は、ストレス応答を含む様々な生物学的役割を担う。本研究では、生物材料からユビキチン-蛋白質結合体を精製・同定する方法の開発を進め、昨年度までに「ユビキチン化蛋白質の簡便な精製法」と「ユビキチン結合領域ペプチド断片の分離・分析法」を確立した。本年度はこれらの方法を用いて、脳虚血再灌流およびカドミウムストレスにより変動するユビキチン-蛋白質結合体の解析を行った。

B. 研究方法

材料には、マウス（大脳皮質）ならびに株化ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞を用い、前者は一過性中大脳動脈閉塞で虚血ストレスを、後者はカドミウム（5 μ M）曝露により酸化ストレスを負荷した。各々の組織および細胞から、水溶性蛋白質を含む抽出液（水溶性画分）と 8 M 尿素で可溶化後、4 M 尿素溶媒に平衡化した非水溶性蛋白質の抽出液（尿素溶性画分）を調製した。ユビキチ

ン-蛋白質結合体は FK2 抗体カラムで精製し、次いでゲル濾過によって、主にマルチユビキチン化蛋白質からなる高分子量成分（約 40 kDa 以上）と低分子量蛋白質成分に分画した。前者においては、ユビキチン鎖の不均一性によりこれ以上の蛋白質分画が不可能なため、このまま endoprotease Asp-N で断片化した。この消化物からユビキチン結合領域のペプチド断片を得るため、ユビキチン C 末端断片 D₅₈-G₇₆ (UCP) に対するモノクローナル抗体 UC1 を用いた免疫沈降を行った。分離された UCP-ペプチド複合体群は逆相 HPLC で分画の後、プロテインシーケンサーでアミノ酸配列を決定した。後者（低分子量蛋白質成分）は、SDS-PAGE ならびに逆相 HPLC による再精製、および限定分解酵素処理を経て、TOF-MS による質量分析とアミノ酸配列解析に供した。

（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。

C. 研究結果

マウス大脳の尿素溶性画分から得られた UC1 抗体免疫沈降物は 4 群に分類された。(1) K48 型マルチユビキチン鎖由来 UCP-

ユビキチン断片複合体、(2) ユビキチン化蛋白質由来 UCP-ペプチド断片複合体、(3) UCP および UCP-X、(4) ユビキチン N 末端領域ペプチド。脳虚血再灌流により、(1)は大きく増加し、(2)の種類は変化した。すなわち、正常マウスで見出されたユビキチン化 histone H2A 等のペプチド断片は虚血マウスでは減少または消失し、代わりにユビキチン化 cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) 等の断片を検出した。SH-SY5Y 細胞の尿素溶性画分の高分子量成分の解析においても上記 4 群の免疫沈降ペプチドを見出したが、カドミウムストレスで増加した (2) の種類は虚血脳のものとは異なり、ユビキチン化 fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR-2) 等の断片が見出された。

一方、水溶性の低分子量精製蛋白質画分の解析では、虚血再灌流後の大脳においてユビキチン-UbE2D2 (E2 酵素の一種) チオエステル結合体が同定され、虚血ストレスに関連したユビキチン化反応が UbE2D2 を経由することが示唆された。また、同画分からは、非ユビキチン化型の macrophage migration inhibitory factor (MIF) が多量に単離され、MIF が中枢神経系においてユビキチンを含む蛋白質と非共有結合型の複合体を形成する可能性を見出した。

D. 考察

今回の検討で用いた脳虚血およびカドミウム曝露の条件は、組織および細胞内に難溶性のユビキチン化蛋白質を増加させる。こうしたユビキチン化蛋白質は、細胞ストレスによって異常化・変性した蛋白質の分解中間産物と考えられている。今回、本研究で開発した方法によって、これらの構成成分の一端が初めて明らかとなった。今後、各々のストレスが、Cdk5 や FGFR-2 等といった蛋白質にどのような変化を与え、ユビキチン化に導くのかという問題を解明しなければならない。

昨年度、UCP-ペプチド断片群の同定の高感度化と迅速化という課題を指摘した。そこで今回これらの MS/MS 解析 (質量タグスペクトルおよび de novo アミノ酸配列解

析) も試行したが、基質ペプチド断片と UCP は直列でなく枝状に結合しているため、現状の分析環境ではきわめて困難であると判明した。これに関しては今後、新規ソフトウェアを開発することで解決し、分析のハイスループット化を目指したい。

マウス脳の水溶性低分子量蛋白質の解析からは、ユビキチン-UbE2D2 チオエステル結合体と MIF という興味ある成分が同定された。中枢神経系におけるユビキチン-蛋白質結合体の全体像を知るには、未検討の尿素不溶性画分も含め、網羅的な単離・同定が望まれる。

E. 結論

本研究で開発された方法は、脳虚血再灌流やカドミウムといったストレスによって増加変動するユビキチン-蛋白質結合体の精製・同定に有用であり、ストレス応答におけるユビキチンシステムの意義解明に役立つと考えられる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

論文発表

Takagi, M., Yamauchi, M., Takada, K., and Ohkawa, K. (2002) Serum ubiquitin-protein conjugates in normal subjects and patients with alcoholic liver diseases: immunoaffinity isolation and electrophoretic mobility. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 26: 1692-1696.

学会発表

高田耕司, 大川 清. ユビキチン C 末端断片をタグに用いたユビキチン化蛋白質消化産物の解析. 第 54 回日本動物学会関東支部総会. 早稲田. 3月. 2002.

Takada, K., Ohkawa, K., Wada, K., Ohtaki, H., and Shioda, S. Direct identification of ubiquitin-protein conjugates accumulated in post-ischemic reperfused brains. FASEB Summer Research Conference: Amyloids and Other Abnormal Protein Folding Processes. Snowmass Colorado,

June. 2002.

高田耕司, 青木勝彦, 高橋紗夜子, 大滝博和, 塩田清二, 和田圭司, 大川 清. 脳内ユビキチン化蛋白質の網羅的解析－虚血再還流はなにをもたらすのか. 第 75 回日本生化学会大会. 京都. 10 月. 2002. (生化学, 74: 1015, 2002)

青木勝彦, 高田耕司, 南 次郎, 大川 清. ヒストンシャペロン NAP-1 はコアヒストンのユビキチン化を阻害する. 第 25 回日本分子生物学会年会. 横浜. 12 月. 2002.

村上安子, 棚橋伸行, 高田耕司, 村井法之, 松藤千弥. 無細胞抽出液中におけるアンチザイムの分解. 日本ポリアミン研究会第 18 回研究発表会. 東京. 2 月. 2003.

H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)

なし

ユビキチンシステム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）

家族性パーキンソン病の原因遺伝子の一つである脱ユビキチン化酵素の変異はユビキチンシステムの機能障害をもたらしパーキンソン病など神経変性疾患を引き起こす。しかし神経系、特に神経伝達における脱ユビキチン化酵素の機能は殆ど不明である。そこで我々はまず、脱ユビキチン化酵素の一つである UCH-L1（ユビキチン C 末水解酵素）を神経様培養細胞に導入し、シナプス関連分子の機能に与える影響を検討した。今年度はモノアミントランスポーターの一つであるノルアドレナリントランスポーター機能を検討したところ UCH-L1 が基質取り込み速度を抑制することを見いだした。またノルエピネフリンの取り込みはリン酸化酵素 CaMKII・チロシンキナーゼの各阻害剤で影響を受けた。これらの結果、UCH-L1 ならびに CaMKII・チロシンキナーゼが関与するノルエピネフリントランスポーターの未知の制御機構が細胞内に存在する可能性が示された。

A. 研究目的

神経難病のパーキンソン病では残存ニューロンの細胞質内に沈着するレビー小体に脱ユビキチン化酵素 UCH-L1 がユビキチンとともに多量に蓄積していることが見出されている。最近ドイツの常染色体優性家族性パーキンソン病家系で UCH-L1 遺伝子のミスセンス変異が原因となっていることが報告され、さらにはほぼ同時期に、劣性遺伝する神経変性疾患モデルマウス（逆行性神経軸索変性マウス：gracile axonal dystrophy, 略して *gad* マウス）の原因遺伝子が UCH-L1 遺伝子の部分欠失によることが示された。ユビキチン-プロテアソームシステムの異常と“ユビキチン化タンパク質の凝集を伴う神経変性”の関連性の解明は神経変性疾患の治療法開発に大きな進展をもたらす可能性が高く、UCH-L1 についても近年研究が盛んになってきている。しかしながら、UCH-L1 の機能喪失がどのように神経細胞死を誘導しているのかという点はまだ詳しくわかっておらず、実際の細胞内での UCH-L1 の機能や神経伝達における生理的・病態生理的役割は完全には解明されていない。

他方、パーキンソン病では黒質線条体の変性に加えて、青斑核ノルアドレナリンニューロン、縫線核セロトニンニューロンなどにも変性がお

よぶことが知られており、ノルエピネフリンならびにセロトニン自体の減少も報告されている。また最近、ノルエピネフリントランスポーター遺伝子のノックアウトマウスにおいて黒質線条体のドーパミンの減少が示され、ドーパミン作動性ニューロン以外の他のモノアミン系ニューロンとパーキンソン病との関連性に注目が集まっている。

本研究ではこれらの状況を考慮し UCH-L1 とノルエピネフリントランスポーターに着目した以下の実験を行った。

B. 研究方法

SHSY5Y 細胞の培養法：2mM グルタミン、10% 胎児牛血清、50unit/mL ペニシリン、50unit/mL ストレプトマイシンを補った DMEM medium を用いて SHSY5Y 細胞をまき、37℃で 5%CO₂ にて 96 穴型ディッシュで培養した。

レトロウイルスベクターによる遺伝子導入法：ハーバード大学の中谷氏から供与されたレトロウイルスベクターを用い遺伝子工学的手法により UCH-L1 を発現する組換え体ウイルスを構築した。この組換え体ウイルスを SHSY5Y 細胞に感染させることによって表面抗原を利用した細胞集団の濃縮ステップを 3 回繰り返すことで導入効

率が 95%をこえる UCH-L1 安定発現細胞株を得た。

ノルエピネフリンの SHSY5Y 細胞による取り込み測定法： $[^3\text{H}]$ 標識したノルエピネフリンを KRH バッファー (125mM NaCl, 4.8mM KCl, 1.3mM CaCl_2 , 1.2mM MgSO_4 , 1.2mM KH_2PO_4 , 5.6mM glucose and 25mM HEPES, pH 7.35)にて 300nM に希釈して 37°C、5% CO_2 の条件下で 30 分間 SHSY5Y 細胞に取り込ませた。氷冷した KRH バッファーで 3 回細胞を洗浄した後、1N NaOH で細胞を溶解させその懸濁液を固体シンチレーター上に添加・乾燥後、96 穴対応型シンチレーションカウンター MicroBeta-1450 (パーキンエルマー社)にて細胞へのノルエピネフリンの取り込み速度を測定した。

(倫理的配慮)

今年度は動物個体、ヒト標本を用いた研究は行っていない。

C. 研究結果

(1) UCH-L1 安定発現 SHSY5Y 株の調製

外来性 UCH-L1 の発現を UCH-L1 に付加した tag に対する抗体で western blot 法により確認した。発現量は内在性 UCH-L1 の発現量とほぼ同等であった。

(2) ノルエピネフリントランスポーターに及ぼす UCH-L1 の影響

SHSY5Y 細胞には内在性のノルエピネフリントランスポーターが存在しており、遺伝子導入をしない細胞においてもノルエピネフリンの取り込みを測定できた。

UCHL1 を過剰発現させた SHSY5Y 細胞では、ノルエピネフリン取り込み速度がコントロールベクター発現細胞における取り込み速度の 60% 程度まで低下した。

SHSY5Y 細胞へのノルエピネフリン取り込み速度はカルモジュリンキナーゼ II (CaMKI) 阻害薬である KN-93 により有意に減少し、逆にチロシンキナーゼ阻害薬である Daphnetin により増加する事も明らかになった。

D. 考察

今回の結果から UCH-L1 の発現増加がモノアミントランスポーターの一つであるノルエピネフリントランスポーター機能を抑制することが示された。UCH-L1 による取り込み速度抑制の機序はまだ不明であるが、カルモジュリンキナーゼ II (CaMKI) 阻害薬である KN-93 やチロシ

ンキナーゼ阻害薬である Daphnetin がノルエピネフリンの取り込み速度に影響を与えたことから UCH-L1 が蛋白質のリン酸化に影響を与え、その結果ノルエピネフリントランスポーター機能が修飾された可能性が考えられる。また、KN-93 と Daphnetin の効果がそれぞれ抑制、増加であったことからにより増加する事も明らかになったこのことからノルエピネフリントランスポーター機能の制御機構は多様化している可能性が考えられる。

ノルエピネフリンは交感神経系の mediator であるが、パーキンソン病では自律神経症状も生じることから、本研究の成果はパーキンソン病における自律神経症状の防止や治療法開発の礎として今後の発展が期待される。

D. 結論

本研究は、細胞内での UCH-L1 の機能として、ノルエピネフリントランスポーターの基質取り込み速度を減少させることが示された。このことは、ユビキチンシステムが神経伝達物質の放出およびシナプス応答を制御している可能性を示唆しており、UCH-L1 は脳機能に重要な役割を果たしていると考えられる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Higashida, H., Hossain, K. Z., Takahagi, H. and Noda M.: Measurement of adenylyl cyclase by separating cyclic AMP on silica gel thin-layer chromatography. *Analytical Biochemistry*, 308, 106-111, 2002.

Noda, M., Kariura, Y., Amano, T., Manago, Y., Nishikawa, K., Aoki, S. and Wada, K., Expression and function of bradykinin receptors in microglia. *Life Sciences*, 72, 1573 - 1581, 2003.

Noda, M., Yasuda, S., Okada, M. Higashida, H., Shimada, A., Iwata, N., Ozaki, N., Nishikawa, K., Shirasawa, S., Uchida, M., Aoki, S., Wada, K. Recombinant human 5-HT_{5A} receptors stably expressed in C6 glioma cells couple to multiple signal transduction pathways. *J. Neurochemistry*, 84; 222-232, 2003.

Higashida H, Zhang JS, Mochida S, Chen XL, Shin

Y, Noda M, Hossain KZ, Hoshi N, Hashii M, Shigemoto R, Nakanishi S, Fukuda Y, Yokoyama S. Subtype-specific coupling with ADP-ribosyl cyclase of metabotropic glutamate receptors in retina, cervical superior ganglion and NG108-15 cells. *J. Neurochemistry*, in press.

2、著書

野田百美、安田さつき、東田陽博、和田圭司：セロトニン 5A 受容体とグリア細胞：その機能と病態について、「脳機能の解明」、ガイア出版会、p179-184 (2002)

Higashida, H., Zhang, J-S., Yokoyama, S., Noda, M., Zhong, Z-G., Mochida, S., Egorova, A. Sympathetic potentiation of cyclic ADP-ribose formation in rat cardiac myocytes. In: *Catecholamine research, From Molecular Insights to Clinical Medicine*, Nagatsu, T., Nabeshima, T., McCarty, R. and Goldstein, D. S. (eds.) *Advance in Behavioral Biology*, Vol. 53, p73-76. Kluwer Academic/Plenum Publishers (2002)

野田百美、前野浩巳、和田圭司：グルタミン酸トランスポーター、「感覚器官と脳内情報伝達処理」、御子柴克彦、清水孝雄（編）日本生化学会編集、共立出版、p100-107 (2003)

3、学会発表

(国際学会)

Noda, M., Kanahori, Y., Shimada, A., Nishikawa, K., Aoki, S., Osaka, H., Wada, K. Regulation of ATP receptor by a de-ubiquitinating isozyme. Society for Neuroscience, 32nd Annual Meeting, 482.21 (Orlando, USA), Nov. 2002.

Osaka, H., Wang, Y. L., Sato, Y., Setsuie, R., Sakurai, M., Takada, K., Noda, M., Wada, K. Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase mediates ubiquitin stability and function in neurons. Society for Neuroscience, 32nd Annual Meeting, 482.22 (Orlando, USA) Nov. 2002

Noda, M. Kariura, Y., Amano, T., Manago, Y., Nishikawa, K., Aoki, S., Wada, K. Expression and function of bradykinin receptors in microglia. Gordon Research Conference. (Ventura, USA) Feb. 2003

(国内学会)

M. Noda, S. Satsuki, H. Higashida, K. Wada Cellular

function of serotonin 5-HT_{5A} receptor in glial cells. The Third International Symposium on the Study of Brain Function (福岡) 5月、2002.

Y. Kariura, K. Nishikawa, S. Aoki, K. Wada, M. Noda Expression and function of bradykinin receptor in microglia. The Third International Symposium on the Study of Brain Function (福岡) 5月、2002.

S. Shimada, Y. Kanahori, K. Wada, M. Noda Regulation of ATP receptor by de-ubiquitinating isozyme. The Third International Symposium on the Study of Brain Function (福岡) 5月、2002.

小坂仁、王玉来、佐藤野衣、節家理恵子、李航、西川香里、青木俊介、高田耕司、野田百美、和田圭司 脱ユビキチン化酵素によるユビキチン代謝制御と神経変性、第25回日本神経科学大会(東京)7月、2002.

和田圭司、原田高幸、原田知加子、王玉来、野田百美、小坂仁 グリア・ニューロン相互作用を利用した神経変性疾患の治療法の開発、第45回日本神経化学学会大会(札幌)7月、2002.

東田陽博、陳小良、張家生、野田百美、星直人、橋井美奈子、横山茂 網膜内グルーブ III グルタメート受容体の ADP リボシールシクラーゼへのカップリング、第45回日本神経化学学会大会(札幌)7月、2002.

野田百美、金堀佳子、嵩田亜希、青木俊介、王玉来、小坂仁、和田圭司 Regulation of P2X receptor by ubiquitin C-terminal hydrolase 1、第45回日本神経化学学会大会(札幌)7月、2002.

真子好正、嵩田亜希、青木俊介、西川香里、和田圭司、野田百美 パーキンソン病遺伝子産物による受容体チャネルの制御、第2回神経科学合同セミナー(福岡)9月、2002.

和田圭司、野田百美 神経変性・神経伝達におけるユビキチンシステムの関与と神経再生に向けた神経幹細胞の機能解析、第13回日本病態生理学会大会、(千葉)1月、2003.

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
Harada, T., Harada, C., Kohsaka, S., Wada, E., Yoshida, S., Ohno, S., Mamada, H., Tanaka, K., Parada, L.F., and Wada, K.	Microglia-Müller glia cell interactions control neurotrophic factor production during light-induced retinal degeneration.	J. Neurosci.	22	9228-9236	2002
Aoki, S., Li, H., Su, Q., Nishikawa, K., Ayukawa, K., Hara, Y., Namikawa, K., Kiryu-Seo, S., Kiyama, H. and Wada, K.	Identification of a novel axotomy-induced protein, AIGP1, possibly involved in cellular apoptosis triggered by endoplasmic reticulum-Golgi stress.	J. Neurosci.	22	10751-10760	2002
Nishikawa, K., Li, H., Kawamura, R., Osaka, H., Wang, Y.L., Hara, H., Hirokawa, T., Manago, M., Amano, J, Noda, M., Aoki, S. and Wada, K.	Alterations of structure and hydrolase activity of parkinsonism-associated human ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 variants.	Biochem. Biophys. Res. Comm.		印刷中	2003
Takagi, M., Yamauchi, M., Takada, K., and Ohkawa, K.	Serum ubiquitin-protein conjugates in normal subjects and patients with alcoholic liver diseases: immunoaffinity isolation and electrophoretic mobility.	Alcohol. Clin. Exp. Res	22	1692-1696	2002
Noda, M., Yasuda, S., Okada, M. Higashida, H., Shimada, A., Iwata, N., Ozaki, N., Nishikawa, K., Shirasawa, S., Uchida, M., Aoki, S., Wada, K.	Recombinant human 5-HT _{3A} receptors stably expressed in C6 glioma cells couple to multiple signal transduction pathways.	J. Neurochem.	84	222-230	2003
Noda, M., Kariura, Y., Amano, T., Manago, Y., Nishikawa, K., Aoki, S. and Wada, K.	Expression and function of bradykinin receptors in microglia.	Life Sci.	725	1573-1581	2003

20020906

以降は雑誌/図書に掲載された論文となりますので、
P.13の「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。