

図2 活性型FOXOによるZNF216遺伝子発現誘導 A, Cre-loxP系を利用した恒常的活性型FOXO転写因子発現誘導系。B, ZNF216の発現 (ノーザンブロットング)

ZNF216 の分子機能に関する知見はほとんど報告されていなかったため、ZNF216の結合分子の探索を行った。酵母2ハイブリッド法により、相互作用分子としてユビキチンを同定し、リコンビナント ZNF216タンパクとポリユビキチン鎖を用いた *in vitro*での解析により、直接結合能があることを明らかにした。さらに、N 末端側 Znフィンガー領域ならびにC 末端側 Znフィンガー領域について、点変異変異体および欠失変異体を作製し、ポリユビキチン鎖結合部位の検討を行ったところ、N 末端側 Znフィンガー領域の変異もしくは欠失

によりポリユビキチン鎖結合能を失うことなどから、同部位がポリユビキチン鎖結合に必要な十分であることを示した。また同時に nano-LC-MS/MS を用いた ZNF216 の網羅的相互作用解析により、26 Sプロテアソーム構成サブユニットが検出された。

また、ZNF216 は、神経変性疾患などの病理との関連が示唆されるユビキチン化タンパクの細胞内凝集 (アグリソーム) に共存することから、ユビキチン-プロテアソーム系のタンパク質分解系に関わっていることが示唆された (図3)。

③ZNF216 ノックアウトマウスでの筋萎縮 筋萎縮時の発現誘導ならびにタンパク質

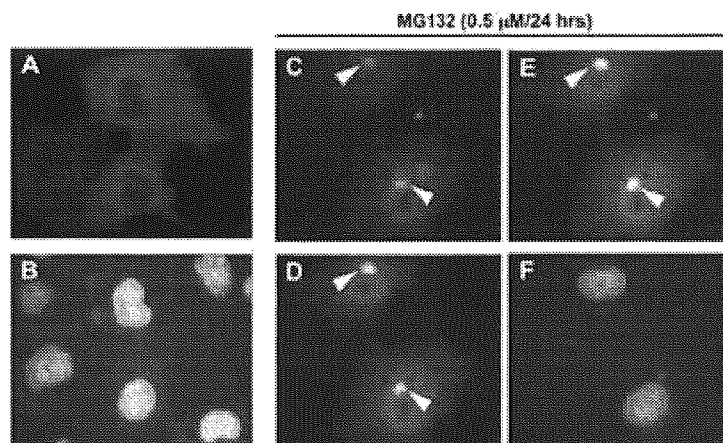


図3 細胞内ユビキチン化タンパク質沈着 (Aggresome) 誘導時のZNF216の局在 A, B, 未処理細胞、C~F, 処理細胞 (同一視野)。A, B, ZNF216 (赤)、B, F, 核染色 (青)、D, ユビキチン (緑)、E, ZNF216とユビキチンの共局在。矢頭は、誘導されたAggresome。

分解系への関与という知見から、ZNF216の機能を抑えることにより、筋萎縮へ抵抗性を獲得する可能性があるのではないかと考えられた。そこで、ZNF216 ノックアウト(ZNF216KO)マウスを作製した。坐骨神経切除による筋萎縮モデル実験を行ったところ、

パク質分解系、とりわけユビキチン化タンパク質の分解が抑制されている可能性が考えられた。

D. 考察

ZNF216 には、ポリユビキチン結合活性が

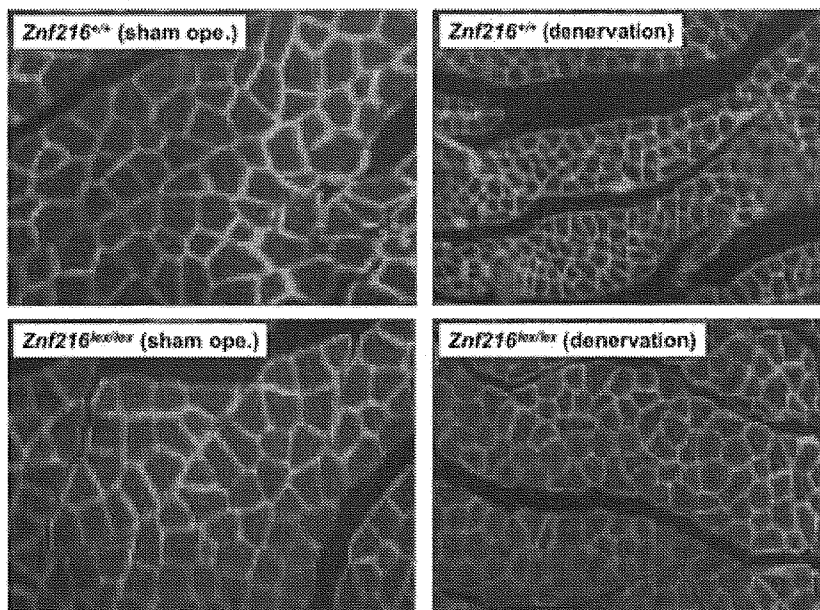


図4 坐骨神経切除による萎縮筋断面（左が偽手術、右が切除；上が野生型、下がZNF216KOマウス）

ろ、野生型マウスでは、1週間で20～30%の筋重量の減少が観察されたのに対し、ZNF216KOマウスでは10%程度と筋萎縮が顕著に抑制されていた（図4）。

さらに、萎縮筋でのユビキチン-プロテアソーム系について検討を行った。筋萎縮において筋肉内にユビキチン化タンパク質の蓄積が認められるが、ZNF216KOマウス由来筋肉においてはWTマウス由来筋肉と比べてより多くのユビキチン化タンパク質の蓄積が認められた。このことから、ZNF216KOマウスにおいて、筋萎縮時にユビキチン-プロテアソーム系を介したタン

あり、26Sプロテアソームと複合体を形成している可能性が示唆された。これらのことから、ユビキチン化されたタンパク質とプロテアソームをリンクするような機能が予想される。ただ、

プロテアソーム画分には細胞内ZNF216の一部が検出されるのみで、プロテアソームに常駐しているタイプのものではないと考えられ、ユビキチン化タンパク質のプロテアソームへのターゲティングに寄与している可能性が示唆される。事実、ZNF216KOマウスの筋萎縮モデル実験では、プロテアソーム活性に差がないにもかかわらず、野生型の筋肉より、より多くのユビキチン化タンパク質が検出されることも、ターゲティング機能の可能性を支持している。また、一時的な細胞内ユビキチン化タンパクの増加は、脱ユビキチン化酵素によるユビ

キチン除去や代償的経路による分解により解消されることが知られており、このターゲット機能の抑制が、重篤な筋疾患を招くというよりはむしろ、筋萎縮速度を抑制し、軽減させていると考えられる。

E. 結論

ZNF216 が実際に *in vivo* の筋萎縮時に関与していることが明らかになり、廃用性筋萎縮の抑制の創薬ターゲットとなる可能性が考えられる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

論文発表

Hishiya A, Iemura S, Natsume T, Takayama S, Ikeda K, Watanabe, K. A novel ubiquitin-binding protein ZNF216 functioning in muscle atrophy. *EMBO J* 25: 554-564, 2006.

Hishiya A, Ikeda K, Watanabe, K. A RANKL-inducible gene *Znf216* in osteoclast differentiation. *J Recept Signal Transduct Res* 25: 199-216, 2005.

Hishiya A, Ito M, Aburatani H, Motoyama N, Ikeda K, Watanabe K. Ataxia telangiectasia mutated (*Atm*) knockout mice as a model of osteopenia due to impaired bone formation. *Bone* 37: 497-503, 2005.

Watanabe K and Hishiya A. Mouse models of senile osteoporosis. *Mol Aspects Med* 26: 221-231, 2005.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

Furukawa-Hibi Y, Kobayashi Y, Chen C, **Motoyama N**. FOXO Transcription Factors in Cell Cycle Regulation and the Response to Oxidative Stress. *Antioxid. Redox Signal.* 7: 752-760, 2005.

Kobayashi Y, Furukawa-Hibi Y, Chen C, Horio Y, Isobe K, Ikeda K, **Motoyama N**. SIRT1 is critical regulator of FOXO-mediated transcription in response to oxidative stress. *Int. J. Mol. Med.* 16: 237-243, 2005.

Chen C, Shimizu S, Tsujimoto Y, **Motoyama N**. Chk2 regulates transcription-independent p53-mediated apoptosis in response to DNA damage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 333: 427-431, 2005.

Hishiya A, Ito M, Aburatani H, **Motoyama N**, Ikeda K, **Watanabe K**. Ataxia telangiectasia mutated (Atm) knockout mice as a model of osteopenia due to impaired bone formation. *Bone* 37: 497-503, 2005.

Bergsmedh A, Ehnfors J, Kawane K, **Motoyama N**, Nagata S, Holmgren L. DNase II and the Chk2 DNA Damage Pathway Form a Genetic Barrier Blocking Replication of Horizontally Transferred DNA. *Mol Cancer Res* 4: 187-195, 2006.

Sasaki A, Hinck L, **Watanabe K**. RumMAGE-D the Members: Structure and Function of a New Adaptor Family of MAGE-D Proteins. *J Recept Signal Transduct Res* 25: 181-198, 2005.

Hishiya A, Ikeda K, **Watanabe K**. A RANKL-Inducible Gene Znf216 in Osteoclast Differentiation. *J Recept Signal Transduct Res* 25: 199-216, 2005.

Watanabe K, Hishiya A. Mouse models of senile osteoporosis. *Mol Aspects Med* 26: 221-231, 2005.

Hishiya A, Iemura S, Natsume T, Takayama S, Ikeda K, **Watanabe K**. A novel ubiquitin-binding protein ZNF216 functioning in muscle atrophy. *EMBO J* 25: 554-564, 2006.

Henmi C, Sawa H, Iwata H, Orba Y, Tanaka S, Nagashima K. Establishment of an immunoscreening system using recombinant VP1 protein for the isolation of a monoclonal antibody that blocks JC virus infection. *Biochem Biophys Res Commun* 327: 242-251, 2005.

Suzuki T, Okada Y, Semba S, Orba Y, Yamanouchi S, Endo S, Tanaka S, Fujita T, Kuroda S, Nagashima K, Sawa H. Identification of FEZ1 as a Protein That Interacts with JC Virus Agnoprotein and Microtubules. *J Biol Chem* 280: 24948-24956, 2005.

Okada Y, Suzuki T, Sunden Y, Orba Y, Kose S, Imamoto N, Takahashi H, Tanaka S, Hall WW, Nagashima K, Sawa H. Dissociation of heterochromatin protein 1 from lamin B receptor induced by human polyomavirus agnoprotein: role in nuclear egress of viral particles. *EMBO Rep* 6: 452-457, 2005.