

200707009B

厚生労働科学研究費補助金
(創薬基盤推進研究事業：
ヒトゲノムテーラーメイド研究)

ユビキチンシステムの多機能性を活用した
脳神経系加齢性病態の克服に関する研究
(H17-ゲノム-一般-009)

平成17～19年度 総合研究報告書

主任研究者 和田 圭司
平成20(2008)年3月

目 次

I. 総合研究報告書		
ユビキチンシステムの多機能性を 活用した脳神経系加齢性病態 の克服に関する研究 和田圭司	—————	1
II 研究成果の刊行に関する一覧表	—————	13
III. 研究成果の刊行物・印刷	—————	15

厚生労働科学研究費補助金(創薬基盤推進研究事業)

総合研究報告書

ユビキチンシステムの多機能性を活用した脳神経系加齢性病態の克服

(H17-ゲノム一般-009)

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

本研究では、ユビキチンシステムが不用蛋白質の分解系として機能するだけでなく、多数の蛋白質の活性制御に関与し様々な生命現象に深く係わるという多機能性を活用し、脳神経系の老化ならびに老化がもたらす認知症などの病態について、ユビキチンシステム、特に脱ユビキチン化酵素から見た克服法を開発する。なかでも UCH-L1 は酵素として作用する以外にそれぞれユビキチンキャリア蛋白として機能しアポトーシス関連因子、細胞生存因子を統合的に制御することで神経細胞の生存と死に密接に関わっていることが研究代表者の和田らにより明らかにされてきた(Nat Genet, 1999; Hum Mol Genet, 2003; Am J Pathol 2004 など)。このように研究代表者は脱ユビキチン化酵素の生物学的研究で先駆的成果を収めてきたが、本研究ではこれらの成果をさらに発展させ、脱ユビキチン化酵素の機能変化がもたらす神経細胞老化の初期変化を解明するとともに、脱ユビキチン化酵素による老化関連蛋白質制御の分子実体を明らかにする。研究期間の3年間で、(1)細胞傷害性刺激である酸化ストレスによりUCH-L1自身が酸化修飾を受けること、また、酸化型UCH-L1は神経細胞の生存と機能発現に重要な tubulin との結合性が高まり tubulin の重合化を促進すること、(2)UCH-L1の発現欠損はマウスにおいてシナプス可塑性変化や記憶学習機能低下を誘導すること、(3)酵素以外としての生物活性も有し神経系前駆細胞の形態制御を行うこと、を明らかにし、さらに(4)中性子小角散乱法を活用しUCH-L1の水溶液中における蛋白構造を世界で初めて決定した。またUCH-L1に類縁のUCH-L3についても、(5)UCH-L3欠損マウス網膜ではミトコンドリアの変化を伴うカスパーゼ非依存的神経細胞死が増加すること、しかし(6)個体レベルでは寿命の延長が果たされることを見出した。このようにUCH-L1、UCH-L3はともに神経細胞の機能と生存に関して重要な因子であることが明らかになったことで、(7)さらに脱ユビキチン化酵素を標的にした治療法開発をめざし in silico drug screening を新たに開始し、新規のUCH-L3阻害剤3種を同定した。本研究の結果からはUCH-L1、UCH-L3はそれぞれ神経系老化、寿命の重要な調節因子であると結論される。本研究により脱ユビキチン化酵素を介した神経系老化の初期過程の検出ならびにその克服法確立の基盤が形成された。

A. 研究目的

本研究では、現時点では有効な予防診断法の乏しい脳に加齢変化に対してより信頼性と確度の高い生物学的検出法を提供し、さらには神経細胞老化がもたらす認知症などの病態の修復法を開拓し、その実施を通して健全な社会を実現することに貢献することを目標とする。その達成にむけてこれまで研究代表者が精力的に研究を続けてきたユビキチンシ

テムに焦点を当て、脱ユビキチン化酵素、UCH-L1とUCH-L3を機軸にした神経細胞老化の分子メカニズムの解明と脱ユビキチン化酵素の機能モニタリングによる神経系老化の評価系の構築をめざすことにした。

B. 研究方法

(1)酸化修飾がもたらすUCH-L1機能変化の解析

カルボニル修飾剤により酸化型 UCH-L1 を作成し、さらに生化学的手法を用いて、UCH-L1 と他の神経系機能蛋白質との相互作用の有無、その程度を非修飾型 UCH-L1 と比較した。また、点突然変異体を使用し、酸化修飾を受けるアミノ酸残基を解析した。

(2) 神経可塑性、記憶学習における UCH-L1 の機能解析

電気生理学的手法を用いて、UCH-L1 発現を欠く gad マウス胎仔海馬スライス標本における LTP (long term potentiation) の発現解析を行い野生型対照マウスと比較した。また、受動回避反応試験にて gad マウスの記憶学習能を野生型対照と比較検討した。

(3) 神経前駆細胞・神経細胞における UCH-L1 の機能解析

免疫組織化学的手法を用いて、マウス胎仔脳における UCH-L1 の発現解析を行った。どのような細胞に UCH-L1 が発現しているかを調べるため、未分化細胞のマーカーである nestin 抗体と初期神経マーカーである TuJ1 抗体それぞれと UCH-L1 抗体を用いた二重染色を、神経分化の盛んな胎生 14 日目とアストロサイトの分化が開始するといわれている胎生 16 日目で行った。あわせて、先の GPCR を対象にした解析で用いた神経前駆細胞の培養系を用い、神経前駆細胞を分化させた時どのような細胞に UCH-L1 が発現しているか、マーカーとの共染色を行うことにより解析した。さらに、UCH-L1 のどのような活性が神経分化において重要であるか調べるために、野生型 UCH-L1 と変異型 UCH-L1 を神経前駆細胞に遺伝子導入し解析を行った。また、同腹の gad マウスとヘテロマウスから神経前駆細胞を採取培養し比較実験を行った。

(4) UCH-L1 の水溶液中の構造解析

ヒト UCH-L1 蛋白質の大腸菌発現系を構築した。大腸菌発現系からニッケルアフィニティーならびにイオン交換の2段階の液体クロマトグラフィーにより UCH-L1 蛋白質の精製を行い、中性子小角散乱法

による構造計測用の試料を調製した。高エネルギー加速器研究機構のサイクロロン施設において冷中性子線(波長=0.5-16.1 Å)を UCH-L1 蛋白質溶液に対し照射し小角領域の散乱を検出する事でサブナノメートルレベルの構造を決定した。これと同時に円二色偏光法により UCH-L1 蛋白質 2 次構造計測も行った。さらにパーキンソン病等の神経変性疾患の発症に関与するヒト UCH-L1 の変異に関しても同様に精製蛋白質を調製して中性子線小角散乱法によって構造決定を行った。

(5) 神経細胞における UCH-L3 の機能解析

UCH-L3 遺伝子欠損マウスは生後数週間で網膜変性をきたす。その機序を解明することにより、神経細胞である視細胞において UCH-L3 が果たす役割を検討した。免疫組織化学的手法を用いて野生型マウスにおける UCH-L3 の網膜内局在を調べた後、生後 0 日、10 日、3 週、6 週、8 週、12 週齢の UCH-L3 遺伝子欠損マウスの網膜各層の厚さと TUNEL 陽性細胞数の経時的変化を測定し野生型マウスと比較した。また、電子顕微鏡を用いて変性網膜の微細構造を観察し、視細胞内節のミトコンドリアの形態学的変化を評価する為、ミトコンドリアの面積に対するクリステの面積比を算出した。さらに各種アポトーシス及び酸化ストレス関連タンパク質の網膜内各層における発現の変化を調べた。

(6) 寿命における UCH-L3 の役割解明

昨年度に引き続き UCH-L3 欠損マウスと野生型対照マウスの寿命を観察し、生存曲線を作成し統計処理を行った。

(7) UCH-L1、UCH-L3 の機能制御薬の開発

UCH-L1、UCH-L3 の 3 次元構造のデータを公的サイトから入手し in silico drug screening の系を構築した。その結果得られた高スコアの化合物を入手し、Ubiquitin-AMC を基質にした UCH-L3 の脱ユビキチン化酵素活性に及ぼす各作用薬の効果を酵素化学的に解析した。

(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は実施しなかった。

C. 研究結果

(1) 酸化修飾がもたらす UCH-L1 の機能変化の解析

複数のカルボニル修飾剤により酸化型 UCH-L1 を作成した。いずれの酸化体も、免疫沈降法などにより、非修飾型と比較して多数の蛋白質との相互作用が亢進していた。相互作用する蛋白質を質量分析計を用いた解析により同定したところ tubulin が含まれることが見出された。この tubulin と酸化型 UCH-L1 の相互作用は直接的であることが免疫共沈法でも確認された。さらに、tubulin の重合に及ぼす影響を検討したところ、酸化型 UCH-L1 は tubulin との結合性が野生型に比して亢進することから UCH-L1 の酸化修飾は tubulin の重合化を促進するという結果を得た。また UCH-L1 と tubulin との結合には UCH-L1 の Arg-63, His-185 のアミノ酸残基が重要である結果を得た。他方、酸化修飾には Cys-90, Cys-152 が関わることを示された。ついで酸化修飾がどのような構造変換を遂げるかを円二色偏光法で解析したところ、ペータシートの組成率が高くなることが判明し、その結果不溶性が亢進する結果を得た。

(2) 神経可塑性、記憶学習における UCH-L1 の機能解析

UCH-L1 発現を欠く gad マウスでは胎仔海馬スライス標本における LTP(long term potentiation) の導入には野生型対照マウスと差がないもののその維持は野生型対照マウスに比べて減弱していることが判明した。受動回避反応試験にて gad マウスの記憶学習能が野生型対照と比較して低下していることが見出された。

(3) 神経前駆細胞・神経細胞における UCH-L1 の機能解析

マウス胎仔脳を用いた発現解析により、UCH-L1 は分化した神経細胞だけでなく未分化な神経前駆細胞にも発現していることが示された。終脳における神経分化は E11 に始まり、E14 頃にピークとなり、E16 以降減少することが知られている。E14 においては、グリア細胞は存在せずその分化も始まっていないが、E16 にはグリア細胞の分化が始まると考えられている。nestin、TuJ1 とも各領域の発現量は E14 と E16 で変化がなかった。これに対して、UCH-L1 の免疫反応性は、E14 では神経細胞の存在する CP(cortical plate) より未分化神経前駆細胞の存在する VZ(ventricular zone)において強く、逆に E16 では VZ よりも CP において免疫反応性が強かった。神経前駆細胞の培養系を用いた解析からも UCH-L1 は、TuJ1 陽性の神経細胞だけでなく nestin 陽性の神経前駆細胞にも発現していることが示された。さらに、nestin 陽性細胞は分化時期特異的に、UCH-L1 が発現している細胞としていない細胞が存在し、それらの細胞を分類すると、UCH-L1 が発現している nestin 陽性細胞は神経突起が短く単極性の細胞が有意に多いことが示された。このことから、UCH-L1 は神経前駆細胞の形態を変化させ神経分化を促進している可能性が考えられた。そこで、野生型 UCH-L1 を神経前駆細胞に遺伝子導入する実験を行ったところ、UCH-L1 導入細胞では nestin 陽性突起の長さが有意に短くなった。この UCH-L1 の活性には水解酵素活性は要求されなかった。また、UCH-L1 の発現していない gad マウスにおける神経前駆細胞の神経突起の長さは、同腹のヘテロマウスから採取培養した細胞の神経突起の長さよりも有意に長かった。

(4) UCH-L1 の水溶液中の構造解析

水溶液中の UCH-L1 蛋白質に対して冷中性子を照射して小角領域の散乱強度を測定した。散乱角に対する散乱強度プロットを作製し数学的モデルとのフィッティング解析を行ったところ、UCH-L1 蛋白

質は水溶液中において球状蛋白質の2量体構造をとっている事が明らかになった。さらに詳細な数学的モデルとのフィッティング解析によってUCH-L1蛋白質は長径4.3 nm、短径2.9 nmの回転楕円体の2量体構造をとっている事が明らかになった。また、円二色偏光法による解析も同時に行いUCH-L1蛋白質の2次構造の計測を行った。その結果、UCH-L1蛋白質内の2次構造は α ヘリックス43%、 β シート24%、 β ターン7%、ランダムコイル26%であった。さらにパーキンソン病等の神経変性疾患の発症に関与する変異を有するI93M変位型ならびにS18Y多型UCH-L1蛋白質についても中性子小角散乱法で解析を行った。その結果、I93M変位型UCH-L1蛋白質は長径4.3 nm、短径2.0nmの扁平な回転楕円体の2量体構造をとり、S18Y多型UCH-L1蛋白質は長径と短径がほぼ等しい球状の2量体構造をとっている事が明らかになった。また同時に行った円二色偏光法による解析からも変異に伴った β ターン構造の有意な変化を見出すことが出来た。これらの研究からパーキンソン病等の神経変性疾患の発症に係るアミノ酸変異がもたらすUCH-L1蛋白質のサブナノメートルレベルの構造変化を中性子小角散乱法によって明らかにすることが出来た。

(5) 神経細胞におけるUCH-L3の機能解析

UCH-L3は野生型マウスの網膜では生後3週齢以降、主に視細胞内節に局在していた。UCH-L3遺伝子欠損マウスの網膜は発達期の生後10日齢までは明らかな組織学的変化は認められなかったが、3週齢で視細胞内節から萎縮が始まり12週齢では視細胞層はほぼ消失した。TUNEL陽性細胞は3週齢以降ではUCH-L3遺伝子欠損マウスの網膜外顆粒層に有意に増加していた。電子顕微鏡においてUCH-L3遺伝子欠損マウスの視細胞内節に空胞変性およびミトコンドリアの膨潤が観察され、クリステの面積比は有意に減少していた。また、UCH-L3遺伝子欠損マウスでは視細胞内節に酸化ストレスを示すCOX、Mn-SOD、AIFの発現が高かった。カスパーゼ依存性アポトーシスのマーカーであるcaspase-1と

活性型caspase-3の発現およびcytochrome-Cの細胞質への移行は認められなかったが、カスパーゼ非依存性アポトーシスの指標となるEndo Gの外顆粒層への核移行像が観察された。これらの結果より、UCH-L3遺伝子欠損マウスの視細胞死は、ミトコンドリアの変化と酸化ストレスマーカーの上昇を伴うカスパーゼ非依存性アポトーシスであることが示唆された。

(6) 寿命におけるUCH-L3の役割解明

UCH-L3欠損メスマウスの寿命は有意差を持って野生型対照マウスの寿命に比べ延長していることが判明した。

(7) UCH-L1、UCH-L3の機能制御薬の開発

既に報告されている結晶化UCH-L3のX線散乱法による解析結果を利用し分子モデルを構築した。また、血液脳関門を透過すると考えられる化合物5万個のデジタルデータを入手し、UCH-L3と各化合物のdocking simulationを市販コンピュータ3台で行った。その結果、高い結合性を予測する10個の化合物を同定した。そこで10種の化合物を実際に入手し、Ubiquitin-AMCを基質にしたUCH-L3の脱ユビキチン化酵素活性に及ぼす影響を酵素化学的に解析したところ3種の化合物が阻害活性を示すことを見出した。また、UCH-L1の3次元構造のデータを公的サイトから入手しin silico drug screeningの系を構築し、薬剤のスクリーニングをコンピュータにて開始した。

D. 考察

研究代表者は以前神経軸索ジストロフィーを主病変に持つgracile axonal dystrophy (gad)マウスの原因遺伝子がUCH-L1であることを見出した。神経軸索ジストロフィーは脊椎動物神経系で認められるもっとも普遍的な加齢所見を考慮すれば、脱ユビキチン化酵素が老化と密接に関わっていることを示す貴重な発見であった。その後もUCH-L1を始めとする脱ユビキチン化酵素の生物学的意義に着目した研究が展開され、研究開始時までにUCH-L1が多機

能蛋白質として機能し、神経細胞体においては神経細胞死との関連性において抗アポトーシス蛋白質や pro-survival 蛋白質と機能的リンクを形成し神経細胞の生存に密接に関わることが明らかになった。本研究はこれらの成果に基づいて提案、発展してきたもので、研究開始初年度は UCH-L1 が神経発生・新生制御にも関わっていることを見だし、また UCH-L3 が神経細胞死の重要な規定因子であることを示すなど脱ユビキチン化酵素の神経細胞における生物学的意義の一端を明らかにした。また水溶液中における UCH-L1 の微細構造に関しサブナノレベルで非破壊的に解析を行い決定することが出来た。2年目の昨年度は UCH-L1 の欠損がマウス個体において、記憶学習能力の低下を誘導し、記憶学習の神経生理学的基盤として考えられるシナプス可塑性についても低下を呈するなど神経細胞の機能維持に UCH-L1 が要求されるという貴重な発見を行った。さらには UCH-L3 が寿命の重要なキー蛋白質である可能性の高いことを見いだされた。最終年度においてはそれまでの2年間の成果をさらに発展させ、UCH-L1 の酸化修飾は UCH-L1 蛋白質のベータシート組成を高めるなど構造変化を来し、他の蛋白質との結合性が高まることを見出した。これらの蛋白質の中には、tubulin という神経細胞の生存と機能発現に無くてはならない蛋白質も含まれていた。また、酸化修飾、tubulin との結合に重要なアミノ酸残基の同定にも成功した。また、UCH-L1、UCH-L3 について in silico drug screening を実施し、UCH-L3 においては 5 万化合物の中から酵素活性阻害剤 3 種を新たに同定することに成功した。

これら3年間の研究成果は脱ユビキチン化酵素、UCH-L1 と UCH-L3 を機軸にした神経細胞老化の分子メカニズムの解明と脱ユビキチン化酵素の機能モニタリングによる神経系老化の評価系の構築をめざすうえで十分基盤形成を果たすものであったと考える。今後両分子の機能変化が醸し出す細胞老化の分子機序をゲノム、プロテオームの面から明らかにし老化プロセスの解明に新たなメスを入れることも

に、治療戦略上必要不可欠な遺伝子・蛋白質素子を抽出することを行うが、国民の健康増進という大きな目標達成に向けて研究が着実かつ独創性高く展開されていると考えられる。高齢者社会を迎えた我が国においては老化がもたらす様々な病態の克服は医療行政だけでなく、健全な国家財政の形成のためにも必要不可欠な社会的急務である。本研究の継続発展はこれら社会的要請に対して革新的治療法の提供という回答を出すだけでなく、老化の初期過程の検出という予防診断法を提供すると期待される。

E. 結論

UCH-L1、UCH-L3 はそれぞれ神経系老化、寿命の重要な調節因子であると結論される。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Naito S, Mochizuki H, Yasuda T, Mizuno Y, Furusaka M, Ikeda S, Adachi T, Shimizu HM, Suzuki J, Fujiwara S, Okada T, Nishikawa K, Aoki S, Wada K. Characterization of multimetric variants of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 in water by small-angle neutron scattering. **Biochem Biophys Res Commun.** 339, 717-725, 2006
- 2) Sakurai, M., Ayukawa, K., Setsuie, R., Nishikawa, K., Hara, Y., Ohashi, H., Nishimoto, M., Abe, T., Kudo, Y., Sekiguchi, M., Sato, Y., Aoki, S., Noda, M., Wada, K. Ubiquitin C-terminal hydrolase L1 regulates the morphology of neural progenitor cells and modulates their differentiation. **J. Cell Sci.** 119(Pt1), 162-171, 2006
- 3) Sano, Y., Furuta, A., Setsuie, R., Kikuchi, H., Wang, Y.L., Sakurai, M., Kwon, J., Noda, M., and Wada, K. Photoreceptor cell apoptosis in the retinal degeneration of Uchl3 deficient

- mice. *Am. J. Pathol.*, 169, 132-141, 2006
- 4) Sato, A., Arimura, Y., Manago, Y., Nishikawa, K., Aoki, K., Wada, E., Suzuki, Y., Osaka, H., Setsuie, R., Sakurai, M., Amano, T., Aoki, S., Wada, K. and Noda, M. Parkin potentiates ATP-induced currents due to activation of P2X receptors in PC12 cells. *J. Cell. Physiol.*, 209, 172-182, 2006. 2006 Jul 6; [Epub ahead of print]
 - 5) Kabuta, T., Suzuki, Y. and Wada, K. Degradation of amyotrophic lateral sclerosis-linked mutant SOD1 proteins by macroautophagy and the proteasome. *J. Biol. Chem.*, 281, 30524-30533, 2006 2006 Aug 18; [Epub ahead of print]
 - 6) Setsuie, R., Wang, Y.L., Mochizuki, H., Osaka, H., Hayakawa, H., Ichihara, N., Li, H., Furuta, A., Sano, Y., Sun, Y.J., Kowan, J., Kabuta, T., Yoshimi, K., Aoki, S., Mizuno, Y., Noda, M. and Wada, K. Dopaminergic neuronal loss in transgenic mice expressing the Parkinson's disease-associated UCH-L1 I93M mutant. *Neurochem. Int.*, 50, 119-129, 2007, 2006 Sep 6; [Epub ahead of print]
 - 7) Setsuie, R. Wada, K. The functions of UCH-L1 and its relation to neurodegenerative diseases. *Neurochem. Int.*, 52, 105-111, 2007.
 - 8) Hirayama, K., Aoki, S., Nishikawa, K., Matsumoto, T., Wada, K. Identification of novel chemical inhibitors for ubiquitin C-terminal hydrolase-L3 by virtual screening. *Bioorgan. Med. Chem* 15, 6810-6818, 2007
 - 9) Ohashi, H., Nishikawa, K., Ayukawa, K., Hara, Y., Nishimoto, M., Kudo, Y., Abe, T., Aoki, S., Wada, K. Alpha 1-adrenoceptor agonists protect against stress-induced death of neural progenitor cells. *Eur. J. Pharmacol.*, 573, 20-28, 2007.
 - 10) Sakurai, M., Sekiguchi, M., Zushida, K., Yamada, K., Nagamine, S., Kabuta, T. Wada, K. Reduction of memory in passive avoidance learning, exploratory behavior and synaptic plasticity in mice with a spontaneous deletion in the ubiquitin C-terminal hydrolase L1 gene. *Eur. J. Neurosci.*, in press
 - 11) Kabuta, T., Setsuie, R., Mitsui, T., Kinugawa, A., Sakurai, M., Aoki, S., Uchida, K., Wada, K. Aberrant molecular properties shared by carbonyl-modified UCH-L1 and familial Parkinson's disease-associated mutant UCH-L1. *Hum. Mol. Genet.*, in press
2. 学会発表
- (1) 特別講演・シンポジウム
 - 1) 和田圭司: 「たんぱく質分解の破綻と神経疾患 ユビキチン代謝異常と神経変性」第35回 新潟神経学夏期セミナー 2005.8.4
 - 2) 和田圭司: 「神経変性と脱ユビキチン化酵素」 “The ubiquitin system and neural cell function: Functional role of a deubiquitinating isozyme, UCH-L1, in neurogenesis and neurodegeneration.” 蛋白質研究所セミナー 「脳神経疾患の最前線」 大阪 2005.11.25
 - 3) 和田圭司: 「パーキンソン病とユビキチンシステム -UCH-L1の役割-」 第21回 Wako ワークショップ 「神経疾患その病態解明と治療法の開発」 2005.11.30
 - 4) 和田圭司: 神経変性疾患の根本的治療法の開発をめざして. 国立精神・神経センター神経研究所における研究活動. 1 平成18年度政策創薬総合研究推進事業. 第27回創薬等ヒューマンサイエンス基礎研究講習会, 東京, 6.13, 2006.
 - 5) 和田圭司: 精神神経疾患発症におけるグリア細胞の関与. 異常蛋白蓄積と神経変性, 特定領

域研究班「神経グリア回路網」サマーワーク
ショップ, 静岡, 7.28, 2006.

- 6) 和田圭司: 脳を育む母と子の生物学的な対話.
独立行政法人科学技術振興機構(JST)戦略的
創造研究推進事業(CREST)研究領域「脳の機
能発達と学習メカニズムの解明」第2回公開シ
ンポジウム. 東京, 12.9, 2006.
- 7) 和田圭司, 青木俊介: マウス神経系前駆細胞に
おけるGPCRの機能解析. 神経組織の成長・再
生・移植研究会第22回学術集会, 岡山, 5. 26,
2007
- 8) 和田圭司, 古田晶子, 和田恵津子: アストロサイト
に発現する GPCR の機能解析. *Neuro* 2007.
横浜, 9. 12, 2007
- 9) 和田圭司: 神経変性疾患の根本的治療をめざし
て. 第15回J・K・Wフォーラム, 東京, 9.22,
2007
- 10) 和田圭司: 脱ユビキチン化酵素と神経変性.
第12回パーキンソン病フォーラムー基礎と臨床.
京都, 9.29. 2007
- 11) 青木俊介, 平山和徳, 和田圭司: UCH-L1ファミ
リー分子群を標的とした in silico ドッキング・シ
ミュレーションによる新規作用薬剤の同定. 東
京, 第15回日本精神・行動遺伝医学会, 11.17,
2007

(2) 国際学会

- 1) Noda M, Kosai Y, Kido MA, Tanaka T, Wada K.
“AMPA-type of glutamate receptors in
microglia” Gordon Research Conference on
Glial Biology: Functional Interaction between
Glial & Neuron. Ventura, California, USA.
March 16, 2005
- 2) Noda, M., Kariura, Y., Kosai, Y., Pannasch, U.,
Wang, L., Kettenmann, H., Nishikawa, K.,
Okada, T., Aoki, S., Wada, K.
“Anti-inflammatory effects of kinins via
microglia in the central nervous system” 1st

International Conference Exploring the Future
of Local Vascular and Inflammatory Mediators.
Lund, Sweden. May 28, 2005

- 3) Wang, B., Pannasch, U., Hatano, Y., Aoki, S.,
Kettenmann, H., Wada, K., Noda, M.
“Characters of KCNQ channels in microglia.”
The Fifth Japan-Korea Joint Symposium of
Brain Sciences, and Cardiac and Smooth
Muscles. Kitakyushu, Japan. July 23, 2005
- 4) Noda, M., Kariura, Y., Pannasch, U., Wang, L.,
Ifuku, M., Nolte, C., Nishikawa, K., Wang, B.,
Aoki, S., Kettenmann, H., Wada, K.
“Anti-inflammatory effects of BK in
microglia” The Fifth Japan-Korea Joint
Symposium of Brain Sciences, and Cardiac and
Smooth Muscles. Kitakyushu, Japan. July 24,
2005
- 5) Wada, K., Yamauchi, R., Sakurai, M., Furuta, A.,
Wada, E., Sekiguchi, M., Aoki, S., “Novel
therapeutic targets in glia-neuron interaction:
G-Protein coupled receptors and
deubiquitinating enzymes” International Society
for Neurochemistry jointly with the European
Society for Neurochemistry. 20th Biennial
Meeting. August 22, 2005
- 6) Skiguchi, M., Zushida, K., Yoshida, M., Kamichi,
S., Yuko Santo-Yamada, Kumanogo, H.,
Yokosuka, H., Sahara, Y., Nakamura, S., Yuasa,
S., and Wada, K., “Deficit of dystrophin
facilitates mouse defensive behavior” Society for
Neuroscience 35th Annual Meeting, Washington
DC, November 12-16, 2005
- 7) Zushida, K., Wada, K., and Sekiguchi, M., “A
potentiator of AMPA receptors, PEPA,
accelerates the decay of conditioned fear
responses in mice” Society for Neuroscience 35th
Annual Meeting, Washington DC,
November 12-16, 2005

- 8) Noda, M., Sato, A., Manago, Y., Nishikawa, K., Amano, T., Aoki, K., Wada, E., Osaka, H., Setsuie, R., Sakurai, M., Aoki, S., Wada, K., "A possible role of parkin in neurotransmission; potentiation of P2X receptor channels." Society for Neuroscience 35th Annual Meeting, Washington DC, November 12-16, 2005
- 9) Noda, M., Ifuku, M., Farber, K., Seike, T., Wang, B., Kettenmann, H., Wada, K. "Protective effects of kinins via microglia in the brain" Asian Symposium for Pharmaceutical Science in JSPS Asian Core Program. Fukuoka, Japan. January 26, 2006
- 10) Noda, M., Ifuku, M., Farber, K., Kettenmann, H., Wada, K. "Kinin-induced microglial migration and anti-inflammatory effects in the central nervous system" 37th Annual Meeting of the American Society for Neurochemistry. Portland, USA. March 12-13, 2006
- 11) Yamauchi R, Wada E, Yamada D, Santo-Yamada Y, Delawary M, Nakazawa T, Yamamoto T, Goto Y, Wada K: Neurotensin type 2 receptor (NTR2) deficient mice show the impairment of memory construction. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, Kyoto, Japan, 6.20, 2006
- 12) Goto A, Wang YL, Setsuie R, Osaka H, Kabuta T, Sakurai M, Sawa A, Ishiura S, Wada K: The role of gapdh in sciatic nerve of gracile axonal dystrophy mouse. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, Kyoto, Japan, 6.20, 2006
- 13) Sano Y, Furuta A, Setsuie R, Wada K: Photoreceptor cell apoptosis in the retinal degeneration of Uchl3 deficient mice. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, Kyoto, Japan, 6.20, 2006
- 14) Sekiguchi S, Kwon J, Hamasaki H, Ichinose S, Ishii Y, Kyuwa S, Wada K, Yoshikawa Y: Localization of Ubiquitin C-terminal hydrolase L1 in mice oocytes and its function in the plasma membrane block to polyspermy. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, Kyoto, Japan, 6.20, 2006
- 15) Liu W, Wang Y, Wada K, Murata M, Mochizuki H, Wada K, Kanazawa I: Rescue of Huntington's disease in model mice by RNAi: shRNA treatments at early development stages yield significantly beneficial effects. 5th Forum of European Neuroscience, Vienna, Austria, 7.9, 2006
- 16) Noda M, Ifuku M, Farber K, Merrino VF, Wang B, Bader M, Nolte C, Wada K, Kettenmann H: Bradykinin-induced microglial migration mediated by B1-type of bradykinin receptors depends on Ca²⁺ influx via reverse mode of Na⁺/Ca²⁺ exchanger. 5th Forum of European Neuroscience, Vienna, Austria, 7.11, 2006
- 17) Sasaki R, Aoki S, Yamato M, Uchiyama H, Wada K, Okano T, Ogiuchi H: Dental pulp-derived neurospheres for peripheral nerve reconstruction. 18th Congress of the European Association for Cranio-Maxillofacial Surgery-EACMF, Barcelona, Spain, 12-16. 9, 2006
- 18) Zushida K, Wada K, Sekiguchi M: A potentiator of AMPA receptors, PEPA, accelerates the extinction of fear memory to contextual cues in mice. Society for Neuroscience 36th Annual Meeting. Atlanta, Georgia, U.S.A, 10.16, 2006

- 19) Amano T, Wada E, Yamada D, Noda M, Wada K, Sekiguchi M: Facilitated conditioned fear response and the amygdala long-term potentiation (LTP) in neurotensin receptor type-1 (NTR1) knockout (KO) mice. Society for Neuroscience 36th Annual Meeting. Atlanta, Georgia, U.S, 10.17, 2006
- 20) Sekiguchi M, Zushida K, Sahara Y, Yuasa S, Wada K: Impaired amygdala gabaergic synapses and enhanced unconditioned fear in dystrophin deficient mice. The GABAergic System, Cold Spring Harbor Laboratory Meeting. New York, U.S, 12.8, 2006
- 21) Aoki S, Sun Y, Nishikawa K, Yuda H, Osaka H, Wang Y, Fukazawa N, Wada K: Solo/trio8, A membrane-associated short isoform of trio modulates endosome dynamics and neurite elongation. The American Society for Cell Biology 46th Annual Meeting. San Diego, California, U.S, 12.10, 2006
- 22) Noda M, Wang B, Ishikawa E, Ooboshi H, Kido M.A, Wada K: Up-regulation of KCNQ channels in activated microglia. Society for Neuroscience 37th Annual Meeting. San Diego, California, U.S.A., 11. 3-7, 2007
- 23) Yasuda T, Wada K, Mizuno Y, Mochizuki H: Effect of UCH-L1 on the alpha-synuclein-induced dopaminergic neurodegeneration in vivo. Society for Neuroscience 37th Annual Meeting. San Diego, California, U.S.A., 11. 4, 2007
- (3) 一般学会
- 1) 関口正幸、圖子田 康、吉田瑞子、上地さり、山田祐子、佐原資謹、和田圭司:「Dystrophinのマウス中枢における機能についての研究」第46回日本神経学会総会、鹿児島 2005.5.25
- 2) 和田圭一郎、山田正典、安田徹、平井幸彦、小坂仁、望月秀樹、島田隆、和田圭司、水野美邦:「AAVベクターを用いたUCHL-1過剰発言系における神経細胞死の検討」第46回日本神経学会総会、鹿児島 2005.5.25
- 3) 安田徹、仁平友子、和田圭一郎、和田圭司、水野美邦、望月秀樹:「UCH-L1 transgenic マウスにおける α -synuclein の過剰発現」第46回日本神経学会総会、鹿児島 2005.5.26
- 4) Wang, Y., Setsuie, R., Mochizuki, H., Osaka, H., Hayakawa, H, Ichihara, N., Noda, M., Mizuno, Y., Aoki, S., and Wada, K., “UCH-L1193M Tg mice is an useful model of Parkinson’s disease” 第28回日本神経科学学会大会、パシフィコ横浜 2005.7.26
- 5) Sakurai, M., Ayukawa, K., Setsuie, R., Nishikawa, K., Aoki, S., Noda, M., Wada, K., “UCH-L1 Regulates the Morphology of Neural Progenitor Cells and Modulates their Differentiation” 第28回日本神経科学学会大会、パシフィコ横浜 2005.7.26
- 6) Sekiguchi, M., Zushida, K., Yoshida, M., Kamichi, S., Santo-Yamada, Y., Kumanogo, H., Yokosuka, M., Sahara, Y., Nakamura, S., and Wada, K., “Deficit of dystrophin facilitates mouse defensive behavior” 第28回日本神経科学大会、横浜 2005.7.28
- 7) Zushida, K., Wada, K., and Sekiguchi, M., “A potentiator of AMPA receptors, PEPA, accelerates the extinction of fear memory through AMPA receptors” 第28回日本神経科学大会、横浜 2005.7.27
- 8) Aoki, S., Nishikawa, K., Sun, YJ, Wang, YL., Osaka, H., Wada, K., “Solo, a membrane-associated Trio isoform, regulates early endosomes in Purkinje neurons” 第28回日本神経科学大会、横浜 2005.7.27
- 9) 有村由貴子、佐藤あゆみ、西川香里、青木公三

- 子、和田恵津子、青木俊介、和田圭司、野田百美。「P2X 受容体反応に及ぼすパーキンソン病原因遺伝子パーキンおよび alpha-シヌクレインの影響」生理学研究所研究会:「生理機能制御および病態におけるプリン作動性シグナリングの役割とその分子機構」於 岡崎生理学研究所 2005.9.1
- 10) 王 冰、パナシュ・ウルリケ、波田野佳子、青木俊介、ケテンマン・ヘルマト、和田圭司、野田百美 “Expression and function of KCNQ channels in microglia” 第48回日本神経化学会(福岡)大会 2005.9.28
- 11) 安田徹、仁平友子、和田圭一郎、和田圭司、水野美邦、望月秀樹 “Analysis for functional interaction between alfa-synuclein and UCH-L1 proteins in vivo” 第48回日本神経化学会(福岡)大会 2005.9.28
- 12) 野田百美、真子 好正、佐藤あゆみ、西川香里、天野大樹、青木公三子、和田恵津子、小坂仁、節家理恵子、櫻井省花子、王 玉来、青木俊介、和田圭司 “A possible role of parkin and ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 in neurotransmission; potentiation of P2X receptor channels” 第48回日本神経化学会(福岡)大会 2005.9.28
- 13) Naito, S., Mochizuki, H., Yasuda, T., Mizuno, Y., Furusaka, M., Ikeda, S., M Hirohiko Shimizu, Adachi, T., Suzuki, J., Fujiwara, S., Okada, T., Nishikawa, K., Aoki, S., Wada, K., “Characterization of multimetric variants related to Parkinson’s disease of Ubiquitin carboxyl-Terminal hydrolase L1 in water by small - Angle neutron scattering” 第78回日本生化学会大会、神戸 2005.10.19-22
- 14) 井福正隆、Katrin Farber、王 冰、Helmut Kettenmann、和田圭司、野田百美。「ブラジキニン B₁ 受容体を介したミクログリアの運動性・移動性増加とその要因解析」第10回グリア研究会、大阪 2005.10.22
- 15) 西川香里、青木俊介、孫 英傑、王 玉来、小坂仁、和田圭司 “Modulation of neurite elongation by Purkinje neuron-specific guanine nucleotide exchange factor” 「小脳プルキニエ細胞特異的に発現するグアニンヌクレオチド交換因子(GEF)の神経突起伸長に関する機能解析」 第28回日本分子生物学会年会 2005.12.7
- 16) 後藤章子、王玉来、節家理恵子、小坂仁、櫻井省花子、株田智弘、澤 明、石浦章一、和田圭司: Gracile Axonal Dystrophy (GAD) マウス坐骨神経のプロテオーム解析 “Role of Ubiquitin Carboxy Terminal Hydrolase - L1 in sciatic nerve” 第28回日本分子生物学会年会 2005.12.8
- 17) 大橋洋輝、君和田友美、西川香里、青木俊介、和田圭司: 成熟個体脳由来の神経系前駆細胞におけるG蛋白質共役型受容体の発現解析 “Expression profile of G-protein coupled receptor genes on adult mouse brain-derived neural progenitor cells.” 第28回日本分子生物学会年会 2005.12.9
- 18) Amano, T., Wada, E., Noda, M. Wada, K., Sekiguchi, M. “Enhancement of amygdala LTP in neurotensin receptor type-1 knockout mice; participation of the dopamine system” 第4回ニューロサイエンスワークショップ in 九州 於福岡 2005.12.9
- 19) 井福正隆、Katrin Farber、王 冰、和田圭司、Helmut Kettenmann、野田百美。「ブラジキニン B₁ 受容体を介したミクログリアの遊走性増加および化学走性とそのメカニズム解明」第126年会日本薬学会 於仙台 2006.3.28
- 20) 内藤幸男、望月秀樹、安田徹、水野美邦、古坂道弘、池田進、清水裕彦、安達智宏、鈴木淳市、藤原悟、岡田知子、西川香里、青木俊介、和田圭司: 中性子散乱法によるユビキチン

- 加水分解酵素(UCH-L1)の水溶液構造とパーキンソン病, 第47回日本神経学会総会, 東京, 5.11, 2006.
- 21) 古田晶子、天野大樹、岩城徹、和田圭司: てんかん重積状態におけるアストロサイト型グルタミン酸トランスポーターGLT-1の発現調節機構, 第47回日本神経病理学会総会学術研究会, 岡山, 5.25, 2006.
- 22) 佐野野衣、古田晶子、節家理恵子、和田圭司: UCH-L3 遺伝子欠損マウスにおける網膜変性の機序, 第47回日本神経病理学会総会学術研究会, 岡山, 5.26, 2006.
- 23) 和田圭司: 脳蛋白質の代謝異常と疾患. 小型・収束型中性子小角錯乱装置(MF-SANS)による水溶液中におけるタンパク質構造解析とその応用, 高エネルギー加速器研究機構研究会、茨城, 6.28, 2006.
- 24) 櫻井省花子、圖子田康、関口正幸、和田圭司: Ubiquitin C-terminal hydrolase (UCH) -L1 欠損 gad マウスの行動とシナプス可塑性の異常. Alteration of behavior and impairment of synaptic plasticity in Ubiquitin C-terminal hydrolase (UCH) - L1- deficient gad mice. 第29回日本神経科学学会大会, 京都, 7.19, 2006.
- 25) 天野大樹、和田恵津子、野田百美、和田圭司、関口正幸: 1型ニューロテンシン受容体欠損は扁桃体外側基底核のシナプス長期増強を促進する. Deficient of neurotensin receptor type-1 (NTR1) facilitates LTP in the basolateral amygdale. 第29回日本神経科学学会大会, 京都, 7.19, 2006.
- 26) 圖子田康、和田圭司、関口正幸: A potentiator of AMPA receptors. PEPA, accelerates the extinction of fear memory in mice. 第49回日本神経化学学会大会, 愛知, 9.16, 2006.
- 27) 株田智弘、鈴木泰行、和田圭司: Degradation of amyotrophic lateral sclerosis-linked mutant SOD1 proteins by macroautophagy. 日本分子生物学会 2006 フォーラム『分子生物学の未来』, 愛知, 12.8, 2006.
- 28) 佐々木賢次郎、和田圭司、野田百美: グリア細胞の神経栄養因子産生に対するニューロペプチドの影響. 第17回日本病態生理学会, 沖縄, 1.27, 2007.
- 29) 和田圭司、鈴木泰行、株田智弘: 変異 SOD1 タンパク質のマクロオートファージによる分解. 第48回日本神経学会総会、名古屋、5.16, 2007
- 30) 青木俊介、株田千華、和田圭司: G-蛋白共役型受容体(GPCR)を標的とした神経系前駆細胞の細胞表面マーカーの探索. 神経組織の成長・再生・移植研究会第22回学術集会、岡山、5.26, 2007
- 31) 宮島萌子、尾崎眞、和田圭司、関口正幸: Propofol による扁桃体抑制性神経伝達の二相性修飾作用. Biphasic actions of propofol on inhibitory neurotransmission in the mouse amygdale. 日本麻酔科学学会第54回学術集会、札幌、5.31-6.2 2007
- 32) 高松功、岩瀬彩乃、宮島萌子、和田圭司、関口正幸、尾崎眞、風間富栄: デクスメデトミジンが海馬 CA1 領域の長期増強(LTP)に及ぼす影響. 日本麻酔科学学会第54回学術集会、札幌、5.31-6.2, 2007
- 33) 佐々木亮、青木俊介、大和雅之、内山博人、和田圭司、岡野光夫、扇内秀樹: 歯髄を用いた癌切除後顔面神経欠損の再生. 第16回日本癌病態治療研究会、東京、6. 27, 28, 2007
- 34) Hirayama K, Aoki S, Nishikawa K, Matsumoto T, Wada K: Identification of novel UCH-L1-potentiating compounds by in silico drug screening. Neuro 2007. Yokohama, 9. 10, 2007.
- 35) Kimiwada T, Sakurai M, Ohashi H, Aoki S,

Tominaga T, Wada K: Clock genes regulate neurogenic transcription factors and the neuronal differentiation of adult neural stem/progenitor cells. Neuro2007. Yokohama, 9. 11, 2007.

36) Naito S, Ikeda S, Shimizu H, Mochizuki H, Yasuda T, Mizuno Y, Furusaka M, Fujiwara S, Suzuki J, Wada K: Small-angle neutron scattering (SANS) and dynamic light scattering (DLS) analyses of the initial aggregation process of tau by oxidative stress. Neuro2007. Yokohama. 9. 11, 2007.

37) Nishimoto M, Furuta A, Wada K: The functional regulatory mechanism in reactive astrocytes via VIP/VPAC2 system. Neuro2007. Yokohama, 9. 12, 2007.

38) 平山和徳、青木俊介、西川香里、松本隆、和田圭司: Virtual screening による UCH-L3 の新規阻害剤同定. 第 35 回構造活性相関シンポジウム、京都、11.15, 2007

G. 知的所有権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得

(出願中)

特許出願番号:2005-170412「神経細胞分化誘導剤または神経新生作用剤のスクリーニング方法」、
発明人:和田圭司他2名、出願人:国立精神・神経センター、他1名、出願年月日:平成17年6月10日

特許出願番号:2005-170413「神経分化誘導剤のスクリーニング方法」、発明人:和田圭司他5名、出願人:国立精神・神経センター、他1名、出願年月日:平成17年6月10日

2. 実用新案登録

なし

3. その他

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
Naito S, Mochizuki H, Yasuda T, Mizuno Y, Furusaka M, Ikeda S, Adachi T, Shimizu HM, Suzuki J, Fujiwara S, Okada T, Nishikawa K, Aoki S, <u>Wada K.</u>	Characterization of multimetric variants of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 in water by small-angle neutron scattering.	Biochem Biophys Res Commun.	339	717-725	2006
Sakurai, M., Ayukawa, K., Setsuie, R., Nishikawa, K., Hara, Y., Ohashi, H., Nishimoto, M., Abe, T., Kudo, Y., Sekiguchi, M., Sato, Y, Aoki, S., Noda, M., <u>Wada, K.</u>	Ubiquitin C-terminal hydrolase L1 regulates the morphology of neural progenitor cells and modulates their differentiation.	J. Cell Sci.	119(Pt1)	162-171	2006
Sano, Y., Furuta, A., Setsuie, R., Kikuchi, H., Wang, Y.L., Sakurai, M., Kwon, J., Noda, M., and <u>Wada, K.</u>	Photoreceptor cell apoptosis in the retinal degeneration of Uchl3 deficient mice.	Am. J. Pathol.	169	132-141	2006
Sato, A., Arimura, Y., Manago, Y., Nishikawa, K., Aoki, K., Wada, E., Suzuki, Y., Osaka, H., Setsuie, R., Sakurai, M., Amano, T., Aoki, S., <u>Wada, K.</u> , Noda, M.	Parkin potentiates ATP-induced currents due to activation of P2X receptors in PC12 cells.	J. Cell. Physiol.	209	172-182	2006
Kabuta, T., Suzuki, Y., <u>Wada, K.</u>	Degradation of amyotrophic lateral sclerosis-linked mutant SOD1 proteins by macroautophagy and the proteasome.	J. Biol. Chem.	281	30524-30533	2006
Setsuie, R., Wang, Y.L., Mochizuki, H., Osaka, H., Hayakawa, H., Ichihara, N., Li, H., Furuta, A., Sano, Y., Sun, Y.J., Kowan, J., Kabuta, T., Yoshimi, K., Aoki, S., Mizuno, Y., Noda, M.,	Dopaminergic neuronal loss in transgenic mice expressing the Parkinson's disease-associated UCH-L1 I93M mutant.	Neurochem. Int.	50	119-129	2007

Wada, K					
Setsuie, R. <u>Wada, K.</u>	The functions of UCH-L1 and its relation to neurodegenerative diseases.	Neurochem. Int.	52	105-111	2007
Hirayama, K., Aoki, S., Nishikawa, K., Matsumoto, T., <u>Wada, K.</u>	Identification of novel chemical inhibitors for ubiquitin C-terminal hydrolase-L3 by virtual screening.	Bioorgan. Med. Chem	15	6810-6818	2007
Ohashi, H., Nishikawa, K., Ayukawa, K., Hara, Y., Nishimoto, M., Kudo, Y., Abe, T., Aoki, S., <u>Wada, K.</u>	Alpha 1-adrenoceptor agonists protect against stress-induced death of neural progenitor cells.	Eur. J. Pharmacol.	573	20-28	2007
Sakurai, M., Sekiguchi, M., Zushida, K., Yamada, K., Nagamine, S., Kabuta, T. <u>Wada, K.</u>	Reduction of memory in passive avoidance learning, exploratory behavior and synaptic plasticity in mice with a spontaneous deletion in the ubiquitin C-terminal hydrolase L1 gene.	Eur. J. Neurosci.	27	691-701	2008
Kabuta, T., Setsuie, R., Mitsui, T., Kinugawa, A., Sakurai, M., Aoki, S., Uchida, K., <u>Wada, K.</u>	Aberrant molecular properties shared by carbonyl-modified UCH-L1 and familial Parkinson's disease-associated mutant UCH-L1.	Hum. Mol. Genet.	17		2008

研究成果の刊行物・印刷



Characterization of multimetric variants of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 in water by small-angle neutron scattering

Sachio Naito ^{a,b,*}, Hideki Mochizuki ^b, Toru Yasuda ^b, Yoshikuni Mizuno ^b,
Michihiro Furusaka ^c, Susumu Ikeda ^c, Tomohiro Adachi ^d, Hirohiko M. Shimizu ^d,
Junichi Suzuki ^e, Satoru Fujiwara ^e, Tomoko Okada ^f, Kaori Nishikawa ^f,
Shunsuke Aoki ^f, Keiji Wada ^f

^a High Energy Accelerator Research Organization, 1-1 Oho, Tsukuba-shi, Ibaraki 305-0801, Japan

^b Department of Neurology, Juntendo University School of Medicine, 2-1-1 Hongo 113-8421, Tokyo, Japan

^c Department of Mechanical Intelligence Engineering, Graduate School of Engineering, Hokkaido University, Kita 13, Nishi 8, Kita-ku, Sapporo 060-8628, Japan

^d RIKEN, 2-1 Hirosawa, Wako, Saitama 351-0198, Japan

^e Japan Atomic Energy Research Institute, 2-4 Tokaimura-shirakata-shirane, Naka-gun, Ibaraki 319-1195, Japan

^f Department of Degenerative Neurological Diseases, National Institute of Neuroscience, National Centre of Neurology and Psychiatry, 4-1-1 Ogawa Higashi, Kodaira, Tokyo 187-8502, Japan

Received 4 November 2005

Available online 21 November 2005

Abstract

Here, we illustrated that the morphological structures of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 (UCH-L1) variants and Parkinson's disease (PD) exhibit good pathological correlation by a small-angle neutron scattering (SANS). UCH-L1 is a neuro-specific multiple functional enzyme, deubiquitinating, ubiquitin ligase, and also involved in stabilization of mono-ubiquitin. To examine the relationship between multiple functions of UCH-L1 and the configuration of its variants [wild-type, I93M (linked to familial Parkinson's disease), and S18Y (linked to reduced risk of Parkinson's disease)], in this report, we proposed that these were all self-assembled dimers by an application of a rotating ellipsoidal model; the configurations of these dimers were quite different. The wild-type was a rotating ellipsoidal. The globular form of the monomeric component deformed by the I93M mutation. Conversely, the S18Y polymorphism promoted the globularity. Thus, the multiple functional balance is closely linked to the intermolecular interactions between the UCH-L1 monomer and the final dimeric configuration.

© 2005 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Small-angle neutron scattering; Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1; Structure in water; Parkinsonism

Although there are papers using neutron scattering to study the behavior of proteins in whole cells, this paper is actually about the conformation of a protein in solution. The crystal structure analysis of proteins by X-ray has advanced our understanding of the correlation between biological function and structure. Small-angle X-ray scattering and neutron scattering are useful analytical

methods to determine the configuration of proteins in water, such as hen egg-white lysozyme [1,2], myoglobin, hemoglobin, α -lactalbumin, ribonuclease [3], and bovine serum albumin [4]. Recently, in the field of small- and wide-angle X-ray scattering measurement, intense X-ray beams became available at third-generation X-ray sources; however, radiation damage to biomacromolecules is acknowledged as a serious problem in modern structural biology at room temperature [5,6]. The reaction of the incident X-ray with water molecules creates hydroxyl or hydroperoxyl radicals that rapidly attach to the backbones

* Corresponding author. Fax: +81 29 856 3202.
E-mail address: sachio@post.kek.jp (S. Naito).

and/or side chains of proteins. In many cases, the interactions between the radical-activated proteins give rise to radiation-induced aggregates connected to each other by covalent and/or non-covalent bonds, such as cystine bond [6–9].

On the other hand, neutron beam generated from a cold-neutron source causes less damage to protein solution. Small-angle neutron scattering (SANS) experiments can provide useful information regarding the aggregation number, shape, and dimensions of the structure [10]. The SANS technique has been applied to analyze the conformational changes in brain protein; amyloid β -protein fibrillation [11–13] because SANS allows observation of amyloid aggregates in Alzheimer's disease without the anxiety of artificial aggregation caused by X-ray radiation.

A topical and biologically important issue is the mechanism of protein metabolism in living cells through the proteasome system, ubiquitination, and deubiquitination. In particular, deubiquitination is considered essential for negative regulation of proteolysis and for recycling of ubiquitin from polyubiquitin chains [14]. Ubiquitin C-terminal hydrolase L1 (UCH-L1) is an abundant multi-functional neuronal enzyme (1–2% of brain-soluble proteins [15]) involved in deubiquitination [14], ubiquitinyl ligase activity varied by the oligomerization in an aqueous solution [16], and stabilization of mono-ubiquitin [17,18]. The disordered neuronal functions linked to Parkinson's disease (PD) may be associated with accumulation of unnecessary proteins in cells by a dysfunctional proteasome system. The partial loss of UCH-L1 hydrolase activity in an I93M missense mutant may contribute to the disease [15]. Furthermore, an S18Y polymorphism may be associated with decreased risk of PD in Caucasian, German, and Japanese populations [19–23]. The aim of this study was to clarify whether UCH-L1 variants exist as a monomer or multimer in water without adding any chemical and physical modifications to the cysteine hydrolase and, in particular, to discuss the relation between the configuration of the variants and the risk of PD.

Materials and methods

UCH-L1 variants preparation. Wild-type, I93M, S18Y, and I93/S18Y double-substituted recombinant proteins were cloned, expressed in *Escherichia coli*, and purified, as previously described [24]. Protein concentrations were determined using the BCA protein assay reagent (Pierce). The purified proteins were resolved by SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) under reducing conditions and visualized by Coomassie brilliant blue R-250 to confirm the purity. Each variant (0.85 mg) was dissolved into 1 ml of 40 mM Hepes buffer in deuterized water (D_2O) containing 5 mM dithiothreitol and 0.5 mM EDTA.

Small-angle neutron scattering. Small-angle neutron scattering was undertaken at the High Energy Accelerator Research Organization using a wide-angle neutron diffractometer (WINK) installed at the pulsed neutron scattering facility, Tsukuba, Japan. The energy of a cold neutron beam at λ is 0.5–16.1 Å, while the neutron wavelength using a SANS measurement by WINK installed at KEK, is ca. 11–80 meV. We obtained good scattering curves in the momentum-transfer q range of 0.03–0.15 Å⁻¹. Here, q is related to the Bragg angle (θ) by $q = (4\pi/\lambda)\sin\theta$. For every pair of

solution and solvent, the scattering intensity was measured as a function of q and the transmissions for the neutron beam, T_{sol} and T_{solv} . After background (noise) and normalization corrections, intensity data recorded on the two-dimensional PSD were radially averaged, resulting in scattering functions of $I(q)_{soln}$ and $I(q)_{solv}$. The scattering for the solvent was subtracted from that of the solution based on Eq. (1).

$$I(q) = I(q)_{soln} - I(q)_{solv}(T_{soln}/T_{solv}). \quad (1)$$

SANS data analysis. We obtained homology modeling structure information [(the atomic coordinates of the protein in the Protein Data Bank (PDB)) of human UCH-L1 from the highly homologous (57.7% identity) human UCH-L3 crystal structure [25] using SWISS-MODEL [26–28]]. The theoretical radius of gyration ($R_g = 16.5$ Å) of UCH-L1 was calculated using the CRYSON program by Svergun [29,30] and the real radius, R , was calculated to be 21.5 Å ($R = \sqrt{5/3}R_g$). In this measurement, the concentration of UCH-L1 variants (0.85 mg/ml, corresponding to 34 μ M) was sufficiently below C^* , the critical concentration, meaning that the molecules can disperse as a single molecule in a solvent. When a sphere protein having radius R disperses in a solution, the scattering intensity is described by

$$I(q) = \left(3 \frac{\sin(qR) - qR \cos(qR)}{(qR)^3} \right)^2 \quad (2)$$

where q is the momentum transfer. However, the actual SANS curves of UCH-L1 variants reflected that of dimer rather than monomer. Then, we assumed the dispersion of monomeric or dimeric and rotating ellipsoidal particle (short axis, a ; and long axis, b and c , $a \leq b = c$ or short axis, a and b ; and long axis, c , $a = b \leq c$) and obtained theoretical SANS curves by applying the following equation of Debye [31] based on the scattering intensity from correlations between one or two non-spherical bodies:

$$I(q) = \sum_i \sum_j f_i f_j \frac{\sin(qr_{ij})}{qr_{ij}}, \quad (3)$$

where r_{ij} is the distance between any two points in the protein molecule, and f_i and f_j are the scattering lengths at each point. We assumed that the volume of the particle is retained even though the proportion of the long axis and the short one is changed. In the q range of the SANS measurement, we assumed a constant scattering factor in the UCH-L1 variants, and thus divided the rotating ellipse by the resolution of a 5 Å cube. We confirmed that the scattering curve of a spherical monomer obtained from Eq. (3) resembled that from Eq. (2). Therefore, Eq. (3) can be applied not only to the monomer but also the dimer. The scattering intensity, calculated from Debye's equation [31], was evaluated by the following equation:

$$R = \frac{\sum_q \{ (mI_e(q) - n - I_c(q))q^2 \}^2}{\sum_q (I_c(q)q^2)^2}, \quad (4)$$

where m is a scaling factor, n is a background factor, and $I_e(q)$ and $I_c(q)$ are the experimental and calculated scattering intensities, respectively. The factor, R , becomes minimum when the parameters, m and n , are changed [29,30].

Circular dichroism. Circular dichroism (CD) measurements were performed as described previously [24]. Purified recombinant human UCH-L1 and mutants were adjusted to a concentration of 8.7×10^{-4} M and dialyzed against a 20 mM Hepes buffer (pH 7.8). Far-UV CD spectra (195–250 nm) were recorded in a 1-mm quartz cuvette on a Jasco J-820 spectropolarimeter (Jasco, Tokyo, Japan) equipped with a temperature controller by scanning at a rate of 50 nm/min at 20 °C. For all spectra, six scans were averaged. All CD spectra were corrected by background subtraction of the spectrum obtained with the buffer alone and smoothed. The observed ellipticity was normalized to units of degrees $cm^2 = dmol$. The spectra were analyzed for percent secondary structural elements by a computer program based on an algorithm that compares the experimental spectra with those of known proteins [32].

Result

Characterization of purified recombinant human UCH-L1 proteins

To avoid artificial polymerisation among proteins by disulfide bonds, we carefully purified wild-type UCH-L1, I93M (linked to familial PD), and S18Y (linked to reduced risk of PD), and I93/S18Y double-substituted recombinant proteins (Fig. 1A) under reducing conditions as described

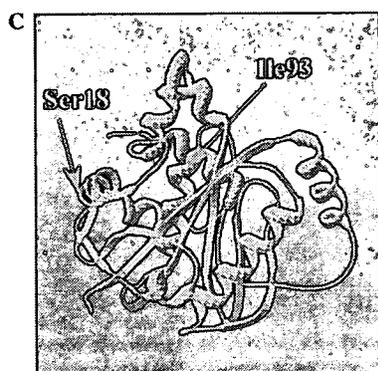
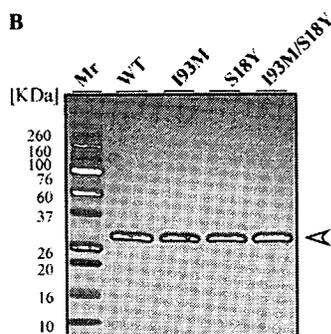
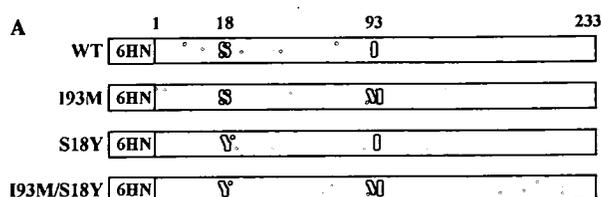


Fig. 1. Characterization and analysis of purified recombinant 6HN-tagged human UCH-L1s. (A) Schematic representation of 6HN-tagged human UCH-L1 wild-type (WT) and mutants I93M, S18Y, and I93/S18Y double-substituted recombinant. The numbers indicate the amino acid residues of the N- and C-termini of UCH-L1 (open reading frame). The positions of the point mutations are indicated. The N-terminal 6HN-tag is shown in white. (B) Visualization of recombinant human UCH-L1s by SDS-PAGE under reducing conditions and Coomassie staining. One microgram of each sample was subjected to analysis. The arrow indicates the 28.9-kDa 6HN-tagged human UCH-L1 bands. Mr, molecular weight markers (kDa). (C) The crystal structure of UCH-L1 was modeled after the crystal structure of human UCH-L3 [25] using SWISS-MODEL protein modeling [26–28]. The residue 93 is proximal to the active center (C90), while the location of residue 18 on the protein surface, distal from the active site.

previously [24]. SDS-PAGE showed a single 28.9-kDa band for each of the 6HN-tagged proteins (Fig. 1B) in good agreement with the theoretical 27.8-kDa molecular mass of the 6HN-tagged UCH-L1. The expression levels for the wild-type and variant UCH-L1 proteins were equivalent. The residue 93 is proximal to the active site (C90), while the location of residue 18 is on the protein surface, distal from the active site (Fig. 1C).

SANS analysis of tertiary structure of wild-type and human UCH-L1 variants in water

SANS curves of a protein mostly reflect the characteristics of the aggregation number, shape, and dimensions of the structure. The experimental profile for the wild-type fitted well to the theoretical SANS curve (calculated from Eq. (2), based on the distance between the center of the two particles being 43 Å) of the dimer consisting of the two spherical monomers rather than that of the monomeric one ($R = 21.5$ Å) calculated from Eq. (2) (Fig. 2). We noted a rotating ellipsoidal monomer and dimer when the axis (a) was changed by the resolution of a 5 Å (Fig. 3A) and calculated the theoretical curves by Eq. (3) (Fig. 3B–D). The ambiguous difference between the theoretical SANS curves of the rotating ellipsoidal monomer (Fig. 3B) and the rotating ellipsoidal dimer (Fig. 3C) was observed in the q range of 0.03–0.1. However, $I(q)_{\text{dimer}}$ markedly diminished in the q range of 0.1–0.15, and then reached the first minimum value at $q = 0.15$, although the scattering intensity ($I(q)_{\text{monomer}}$), gradually declined with increasing q value. Thus, the characteristic decrease of the scattering intensity

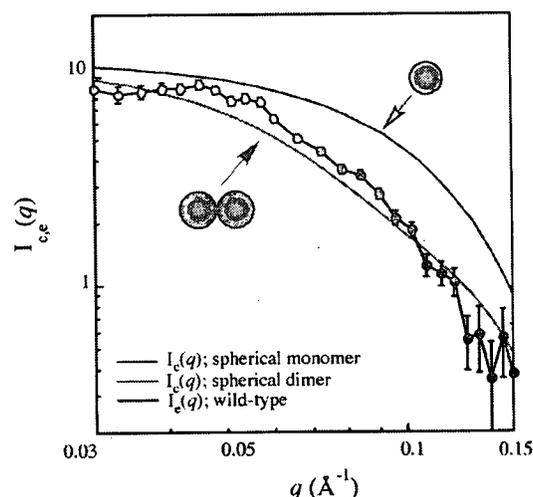


Fig. 2. The relative neutron scattering intensity ($I(q)$) versus the magnitude of the scattering vector q . $I_c(q)$ for the wild-type UCH-L1 (black closed circle). The blue line indicates theoretical curves; $I_c(q)$, monomeric sphere (diameter = 21.5 Å calculated from Eq. (3), based on the $R = \sqrt{5/3}Rg$ value obtained using CRYSON program by Svergun [29,30]). The red line indicates theoretical curves; $I_c(q)$, dimeric spheres (calculated from Eq. (2), based on the distance between the center of the two particles being 43 Å).