

論文内容の要旨

論文題目 ユビキチン様修飾システム UFM1 システムの生物学的意義の解明

氏名 石村 亮輔

緒言

タンパク質修飾は、タンパク質の多様性を生み、限られた遺伝情報を増幅させる。高等動物には 8 つのユビキチン様タンパク質 (Ubiquitin-like modifiers: UBLs) が存在し、それぞれ特異的な活性化酵素 (E1)、結合酵素 (E2)、連結酵素 (E3) のカスケード反応により基質タンパク質に共有結合される。基質タンパク質への UBLs の付加は、基質タンパク質の分子集合や機能変換を引き起こし、生命活動に必須な多彩な生物学的プロセスを変容させる。申請者が所属する研究室では、ゲノム上に最後に残された UBLs である Ubiquitin-fold modifier 1 (UFM1) を同定し、UFM1 修飾システムに関わる E1、E2、E3 そして脱 UFM1 化酵素を特定した (EMBO J 2004, JBC 2010)。UFM1 は前駆体として合成され、その C 末端が脱酵素 UFSP2 により切断されグリシンが露出した成熟型となる (JBC 2007: UFSP1 は不活性型である)。成熟型 UFM1 は E1 酵素 UBA5 により ATP 依存的に活性化され、E2 酵素 UFC1 に転移される。最終的に、UFM1 は E3 酵素である UFL1 を介して細胞内の基質タンパク質に共有結合される。UFL1 結合タンパク質である UFBP1 は UFM1 の基質タンパク質であり、UFM1 の修飾により UFL1 の E3 酵素活性を促進する (Mol Cell 2014)。標的タンパク質に結合した UFM1 は UFSP2 により切断されることから、UFM1 修飾システムは可逆的な反応系である (図 1)。他の UBLs と同様に、UFM1 の基質タンパク質への付加 (UFM1 化) は、様々な細胞内制御に関与すると考えられる。実際、マウスにおいて *Uba5* を欠損させると貧血により胚性致死となること (Nat Commun 2011) や UFM1 システムの調節異常が乳がんの増殖に寄与すること (Mol Cell 2014) を明らかにした。さらに、UFM1 システムに関わる分子の遺伝子変異が家族性股関節形成不全症や常染色体劣性小脳失調症と関連があること (S Fr Med J 2016, PLoS One 2016) が示された。

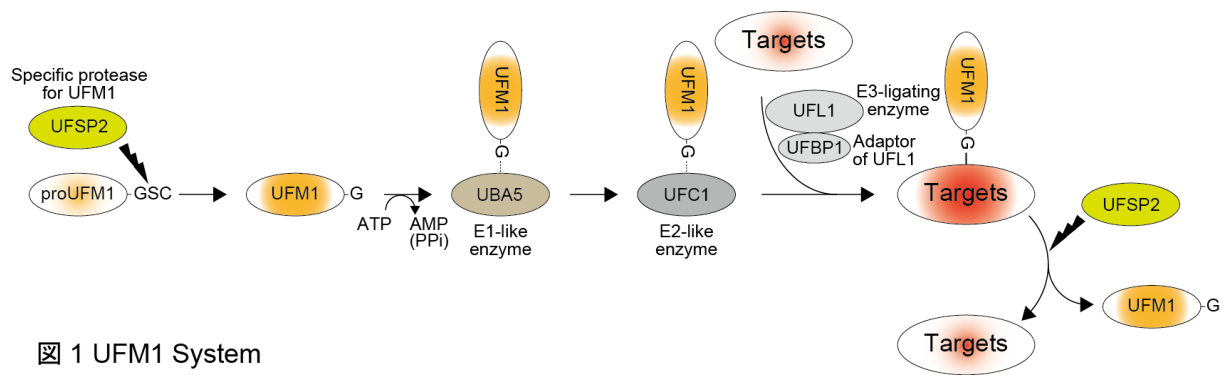


図 1 UFM1 System

UBA5 の複合ヘテロ接合体変異が遺伝性重度発達障害を引き起こす

今回、申請者らは原因不明のてんかんや小頭症を伴う遺伝性重度発達障害患者 5 家系の遺伝子解析を行った。その結果、患者は *UBA5* の c.164G>A (p.Arg55His) と c.1111G>A (p.Ala371Thr) ないしはナンセンス変異と c.1111G>A (p.Ala371Thr) の複合ヘテロ接合体であった (図 2)。患者由来の線維芽細胞では、*UBA5* の発現量、*UBA5* と UFM1 との中間体量および UFC1 と UFM1 との中間体量の有意な低下が確認された。*UBA5* 欠損 HEK293T 細胞に患者由来の変異を持つ *UBA5* を発現させたところ、*UBA5*^{R55H} 変異体発現細胞では *UBA5* と UFM1 との中間体量も UFC1 と UFM1 との中間体量も低下していた。一方、*UBA5*^{A371T} 変異体発現細胞では UFC1 と UFM1 との中間体量の減少のみが確認された。さらに、*UBA5* と *UFSP2* の二重欠損 HEK293T 細胞を作製し、*UBA5* 変異体の基質タンパク質の 1 つである *UFBP1* への UFM1 化に対する影響を検討した。両 *UBA5* 変異体に戻したそれぞれの細胞では、野生型 *UBA5* を戻した細胞に比較して、*UFBP1* の UFM1 化が有意に低下していた。最後に、中枢神経特異的 *Ufm1* ノックアウトマウスを作製、解析した結果、神経細胞死を伴った小頭症を呈し、生後数日以内に死亡することを見出した (Am J Hum Genet 2016a)。これらのことは UFM1 システムの異常が遺伝性重度発達障害を引き起こすことを意味する。また、今回特定した c.1111G>A (p.Ala371Thr) は欧州人の 0.28% がキャリアーであり、多数の *UBA5* の変異を有する重度発達障害患者が存在することが予想される。さらに、Bonneau らのグループも同様の症状を呈する別の 4 家系から *UBA5* が遺伝性重度発達障害の原因遺伝子であることを報告した (Am J Hum Genet 2016b)。申請者の所属する研究室ではすでに *UBA5* ヘテロマウス (*UBA5*^{+/−}) を作出済みである。また、申請者は患者変異の一つを持つ *UBA5* ノックインマウス (*UBA5*^{+/A371T}) も作出した。この 2 ラインのマウスを交配させることにより、*UBA5* に関しては患者 (*UBA5*^{Y280*/A371T}) と同等の遺伝型となる (*UBA5*^{/A371T}) マウスを作出した。今後、本マウスの表現型解析を推進し、遺伝性重篤発達障害モデルマウスとなるか否かを検証する予定である。



図 2 UBA5 domain

小胞体における UFM1 化

申請者らは、UFM1 脱酵素である UFSP2 を欠損させた細胞において「前駆体 UFM1 の減少」と「UFM1 化した基質タンパク質の蓄積」が起こることを見出した。このことは UFSP2 以外に前駆体 UFM1 の C 末端を切断する酵素が存在すること、UFSP2 は標的タンパク質から UFM1 を切断する酵素であることを意味する。さらに、申請者らは、UFSP2 欠損細胞に E3 酵素 UFL1、そのアダプタータンパク質 UFBP1 と成熟型 UFM1 を共発現させるだけで UFM1 化が顕著に促進されることに気づいた。小胞体に局在する UFL1 ないしは UFBP1 の単独発現下において UFM1 は細胞全体に拡散していたが、UFL1 と UFBP1 の共発現下では小胞体へ移行した。この時、細胞質画分ではなくミクロソーム画分で UFM1 化が顕著に促進したことから、UFM1 の小胞体局在化は UFBP1 を含む小胞体局在タンパク質の UFM1 化に起因すると考えられる。UFM1 の小胞体局在もミクロソーム画分での UFM1 化も、UFM1 と共有結合できない UFBP1^{K267R} 変異体の発現では確認されなかった。これらのことは、UFM1 化 UFBP1 と UFL1 の E3 複合体は小胞体上で UFM1 化を促進することを意味する (図 3)。

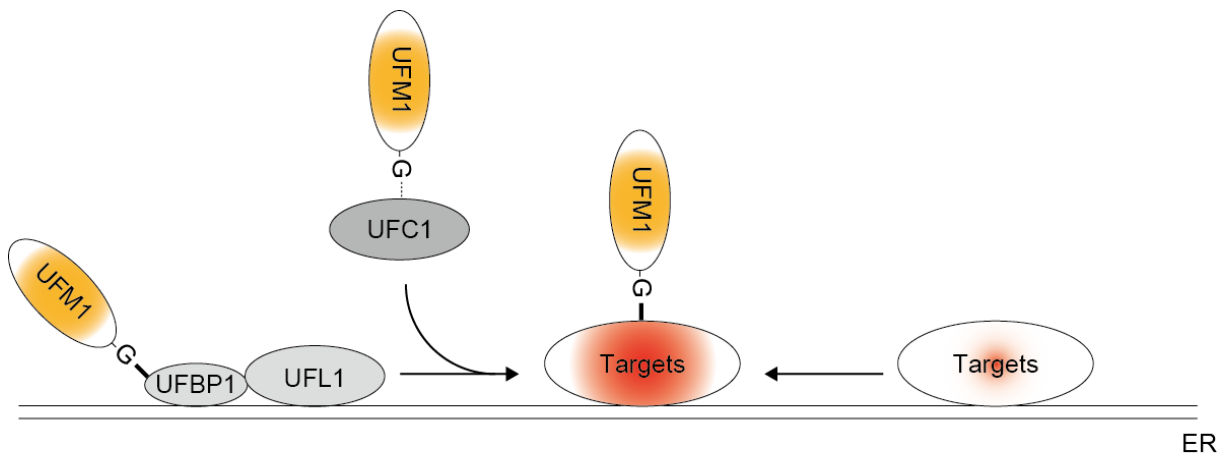


図 3 標的タンパク質の UFM1 化反応機構のモデル

次に、申請者らが確立した小胞体上での UFM1 化が遺伝性重度発達障害患者や常染色体劣性小脳失調症患者で同定された 7 種類の UBA5 のミスセンス変異により影響を受けるか否かを検証した。UBA5 と UFSP2 の二重欠損 HEK293T 細胞に成熟型 UFM1、UFL1 と UFBP1 とともに野生型ないしは UBA5 変異体を過剰発現し、ミクロソーム画分の UFBP1 の UFM1

化を調べた。その結果、遺伝性重度発達障害患者由来の *UBA5* 変異体を発現する細胞では、*UFBP1* の *UFM1* 化の有意な減少が確認された。

病態関連 *UFM1* 標的タンパク質 *CYB5R3*

UFM1 システムの異常がヒト疾患を引き起こすメカニズムは未解明である。その最大の原因は、病態発症に関与する *UFM1* の標的タンパク質の未同定にある。*UFM1* 標的タンパク質を同定するため、上述の方法により *UFM1* 化を促進させ、*UFM1* 化タンパク質を精製し、質量分析を行った。その結果、*UFM1* の基質として Cytochrome b₅ reductase 3 (*CYB5R3*) の同定に成功した。変異体を用いた解析から、*CYB5R3* の 214 番目のリジン残基に *UFM1* が共有結合することを見出した。*CYB5R3* は赤血球に発現する細胞質型とその他の組織に発現する小胞体型が存在し、それぞれヘモグロビンの還元酵素、脂肪酸の不飽和化などに関与する還元酵素として働く。重要なことに *CYB5R3* をコードする遺伝子変異は *UBA5* 複合ヘテロ接合体を持つ重度発達障害患者とよく似た脳症である Type II recessive congenital methaemoglobinaemia (RCM) を引き起こす。*CYB5R3* は脂肪酸の不飽和化を介して多価不飽和脂肪酸の合成に必須な役割を担う。この働きは、食事からの取り込みが無い胎生期に極めて重要であり、*CYB5R3* 変異による多価不飽和脂肪酸合成不全が病態発症に関与する可能性が高い。さらに申請者が所属する研究室では、*Uba5* 欠損マウスの解析から胎仔肝や羊膜において赤血球の形態異常を伴った重篤な貧血を呈して胚性 12.5 日で死亡することを明らかにしている。赤血球において *CYB5R3* は細胞質で酸素運搬タンパク質であるヘモグロビンの Fe³⁺ を Fe²⁺ へ還元することによりヘモグロビンの酸素運搬を可能にしている。*CYB5R3* に変異を持つ Type I RCM (細胞質型 *CYB5R3* に変異)、Type II RCM (細胞質型および小胞体型 *CYB5R3* に変異) 患者ともに、チアノーゼを引き起こす。*Uba5* 欠損マウスで確認された表現型は *CYB5R3* の *UFM1* 化異常により引き起こされている可能性がある。

考察

UFM1 の生理的意義については、不明な点が多いが、その理由は標的基質が不明なことに起因する。今回、その候補基質の一つとして Cytochrome b₅ reductase 3 (*CYB5R3*) を見出したので、*CYB5R3* の *UFM1* 化の意義について詳細に解析を進めるとともに、今後、新たな基質を探索、*UFM1* 翻訳後修飾機構の全貌解明を目指す。