

博士論文（要約）

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

石村亮輔

はじめに

本論文は、2014 年 4 月から 2017 年 3 月の期間、東京大学大学院新領域創成科学研究科にて博士論文研究として行った研究をまとめたものである。

目次

略語

要旨	・ ・ ・ 1
第 1 章 緒言	・ ・ ・ 2
第 2 章 実験材料と方法	・ ・ ・ 5
第 3 章 結果	・ ・ ・ 14
第 4 章 考察	・ ・ ・ 50
第 5 章 謝辞	・ ・ ・ 54
第 6 章 引用文献	・ ・ ・ 55

略記一覽

UBLs	Ubiquitin-like modifiers
E1	Ubiquitin activating enzyme
E2	Ubiquitin conjugating enzyme
E3	Ubiquitin protein ligase
UFM1	Ubiquitin-fold modifier 1
UBA5	Ubiquitin like modifier activating enzyme 5
UFC1	UFM conjugating enzyme 1
UFL1	UFM1 specific ligase 1
UFBP1	UFM1 binding protein 1
UFSP1	UFM1 specific protease 1
UFSP2	UFM1 specific protease 2
CYB5R3	Cytochrome b ₅ reductase 3
SPF	Specific pathogen-free
IPTG	Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
HEK293	Human embryonic kidney 293
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
FBS	Fetal bovine serum
NEAA	Non-essential amino acids
PEI	Polyethylenimine

EDTA	Ethylendiaminetetraacetic acid
DTT	Dithiothreitol
PVDF	Polyvinylidene difluoride
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

要旨

単行本として出版する計画があるため公表できない。

第 1 章 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。酵母を除く真核生物には 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¹⁻⁴。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。UFM1 は前駆体として合成され、その C 末端がプロテアーゼ UFSPs により切断されグリシンが露出した成熟型となる。成熟型 UFM1 は E1 酵素 Ubiquitin like modifier activating enzyme 5 (UBA5) により ATP 依存的に活性化され、E2 酵素 Ubiquitin-fold modifier conjugating enzyme 1 (UFC1) に転移される。最終的に、UFM1 は E3 酵素である UFM1 specific ligase 1 (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 UFM1 binding protein 1 (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。標的タンパク質に結合した UFM1 は脱 UFM1 化酵素 UFSP2 (UFSP1 は不活性化型である) 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)⁵⁻⁷。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

において UFM1 システムに関わる遺伝子を欠損させると貧血により胚性致死となること⁸⁻¹⁰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¹¹を明らかにした。さらに、小胞体ストレス応答¹²⁻¹⁵やオートファジーとの関連¹⁶⁻¹⁷も報告されている。ごく最近では、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¹⁸や常染色体劣性小脳失調症¹⁹を引き起こしヒト疾患と関連も明らかになりつつある。

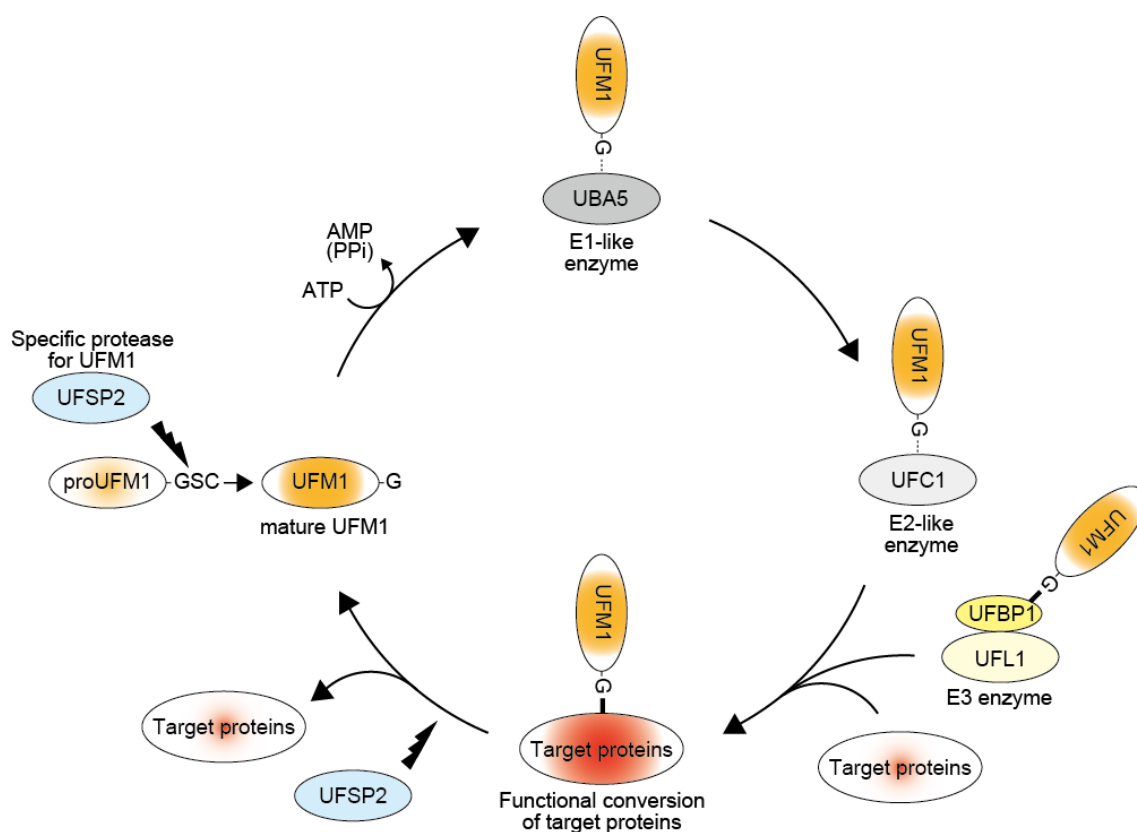


図 1 UFM1 システム

UFM1 はプロテアーゼ UFSPs により C 末端が切断され、グリシンが露出した成熟型になる。その後、E1 様酵素 UBA5 により活性化され、E2 様酵素である UFC1 へ転移される。そして E3 酵素である UFL1 を介して基質タンパク質に共有結合される (UFM1 システム)。他のユビキチン様タンパク質と同様に、UFM1 の基質タンパク質への付加 (UFM1 化) は、基質の分子集合や機能変換を引き起こすと考えられる。基質に結合した UFM1 は脱 UFM1 化酵素 UFSP2 により切断・解離されることからこの修飾システムは可逆的な反応系であると考えられる。

第2章 材料と方法

抗体

1次抗体として抗 UFM1 抗体 (Abcam, ab10935、希釈比 1:1,000)、抗 UBA5 (ポリクローナル抗体、希釈比 1:500) ⁶、抗 UFC1 (ポリクローナル抗体、希釈比 1:500) ⁶、抗 UFL1 (ポリクローナル抗体、希釈比 1:500) ⁶、抗 UFBP1 (ポリクローナル抗体、希釈比 1:500) ⁶、抗 UFSP2 抗体 (Abcam, ab185965、希釈比 1:1,000)、抗 ACTIN 抗体 (Chemicon International, MAB1501R、希釈比 1:1,000)、抗 FLAG 抗体 (MBL, M185-3L、希釈比 1:1,000)、抗 Cleaved caspase-3 (Cell Signaling Technology、希釈比 1:500)、抗 8III-Tubulin 抗体 (Promega、希釈比 1:1,000)、抗 Calreticulin 抗体 Thermo Fisher Scientific、希釈比 1:500)、2次抗体として抗マウス抗体 (Jackson ImmunoResearch、希釈比 1:10,000)、抗ラビット抗体 (Jackson ImmunoResearch、希釈比 1:10,000)、Alexa fluor 488 結合型抗ラビット抗体 (Life Technologies、希釈比 1:10,000)、Alexa fluor 594 結合型抗マウス抗体 (Life Technologies、希釈比 1:10,000)、Alexa fluor 647 結合型抗ラビット抗体 (Life Technologies、希釈比 1:10,000) を使用した。

培養細胞の培養方法

HEK293T 細胞、HeLa 細胞、ヒト線維芽細胞は 37°C、5% CO₂ の条件で培養を行った。HEK293T 細胞、HeLa 細胞の培養には Dulbecco's modified Eagle's

medium (DMEM) supplemented with high glucose and L-glutamine (Sigma) に penicillin / streptomycin / Glutamine (PSG, Gibco) と 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco)、1×MEM non-essential amino acids (1×MEM NEAA, Gibco)、1 mM sodium pyruvate (Gibco) を、ヒト線維芽細胞の培養には DMEM supplemented with high glucose and no L-glutamine (Gibco) に penicillin / streptomycin (PS, Gibco) と 15% FBS (Gibco)、1×GlutaMAX (Gibco) を添加した培地を使用した。

遺伝子導入法

HEK293T 細胞と HeLa 細胞への一過的な遺伝子導入は Polyethylenimine (PEI, Polyscience Inc.) を用いて行った。HEK293T 細胞は 4.0×10^5 cell/well (6well Dish)、Hela 細胞は 2.0×10^5 cell/well (6well Dish) を播種した。播種 18 時間後に、トランスフェクションを行った。

遺伝子改変マウス

条件付き *Ufm1* 欠損マウスはトランスジェニック社に作製を依頼した。条件付き *Ufm1* 欠損マウスと中枢神経特異的に *Cre* リコンビナーゼを発現する nestin-*Cre* トランスジェニックマウスと交配し、中枢神経特異的 *Ufm1* 欠損マウス (*Ufm1^{fl/fl}*; nestin-*Cre*) を作製した。マウスは SPF 施設で飼育し、マウス実験に関しては東京都医学総合研究所、新潟大学における研究倫理会のプロトコールに従った。

リコンビナントタンパク質精製

大腸菌発現ベクターを大腸菌 BL21 株に形質転換を行った。前培養（37℃、一晩）を行い、翌日の本培養後（37℃、3 時間）、Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) を添加し、タンパク質発現の誘導（25℃、3 時間）を行った。収菌後、TNE（10mM Tris-HCl pH 7.5、150 mM NaCl、1mM EDTA pH 8.0、1% NP-40）で溶解し、さらに超音波破碎を行った。遠心分離（9,000 rpm、30 分間、4℃）した後、上清を Glutathione Sepharose 4B（GE Healthcare）と反応させた。TNE で洗浄した後、PreScission Protease（GE Healthcare）で一晩、4℃で切断した。回収したタンパク質は 50 mM Bis-Tris pH 6.5、100 mM NaCl、10 mM MgCl₂、0.1 mM DTT で透析を行った。精製したタンパク質は Pierce BCA Protein Assay Kit（Life Technologies）を用いてタンパク質濃度を測定した。

In vitro thioester formation assay

50 mM Bis-Tris pH 6.5、100 mM NaCl、10 mM MgCl₂、0.1 mM DTT、5mM ATP の反応液中にタンパク質を混合し、25℃で 5 分間反応させた。反応後、4×LDS sample buffer を添加し、37℃で 10 分間緩やかな反応を行った。12 % Bis-Tris gels を用いて NuPAGE system (Invitrogen)で分離後、CBB 染色を行った。

タンパク質抽出

培養細胞は PBS で洗浄後、TNE (10 mM Tris-HCl pH 7.5、150 mM NaCl、1 mM EDTA pH 8.0、protease inhibitor (Roche)、1% NP-40、1% Triton X-100) により細胞を溶解し、遠心分離 (15,000 rpm、4℃、10 分間) を行い、上清を細胞全抽出液として回収した。マウス胎仔の脳を 0.25 M スクロース、1 mM DTT を含んだ 10 mM HEPES 緩衝液 (pH 7.4) でホモジナイズしたものを全抽出物とした。抽出液は、Pierce BCA Protein Assay Kit を用いてタンパク質濃度を定量した後に、4×LDS sample buffer 及び DTT を添加し、95 ℃で 5 分間煮沸を行った。

ミクロソーム分画

microsome isolation kit (Abcam) のプロトコールに従い、ミクロソーム画分を採取した。ミクロソーム画分を採取した際の上清を超遠心分離 (100,000g、4℃、1 時間) し、その上清を細胞質画分とした。ミクロソーム画分と細胞質画分をそれぞれ Pierce BCA Protein Assay Kit を用いてタンパク質濃度を定量した後に、4×LDS sample buffer 及び 20mM DTT を添加し、95℃で 5 分間煮沸を行った。

ウェスタンブロッティング

12 %および 4-12 % Bis-Tris gels を用いて NuPAGE system により MES-SDS running buffer ないしは MOPS-SDS running buffer で分離し、

PVDF 膜へ転写した。転写膜をブロックエース（雪印）溶解液に室温で 30 分浸してブロッキングを行った。その後、TBST で希釈した 1 次抗体を一晩 4℃で反応させ、TBST で希釈した 2 次抗体を室温で 30 分反応させた。Western Lightning Plus-ECL (PerkinElmer, Inc) を発光試薬とし LAS-4000 (Fuji Film) を用いて検出した。

CRISPR/Cas9 による欠損細胞の作製

Guide RNA の配列は CRISPR Design tool (<http://crispr.mit.edu/>)にて設計を行い、pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9 (Addgene #42230, Cambridge, MA, USA)に ligation した²⁰。作製したベクターと pEGFP-C1 を HEK293T 細胞ないしは HeLa 細胞へトランスフェクションを行った。トランスフェクション 2 日後に、セルソーターで 96well plate へ GFP 陽性の細胞をシングルセルソーティングした。この時、96well plate にはコンディショニングメディウムを使用した。細胞がコンフルエントになると 24well plate に継代した。さらに、コンフルエントになると遺伝子の欠損の有無をウエスタンブロットングにて確認した。

定量 PCR

TRIzol (Invitrogen) のプロトコールに従い調製した 1 µg の RNA から Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche Applied Science, Indianapolis, IN) を用いて cDNA を合成した。LightCycler 480 Probes Master

(Roche Applied Science) を使用し LightCycler® 480 (Roche Applied Science) によって定量 PCR を行った。ヒト細胞株の値は *GAPDH*、マウスサンプルの値は *Gusb*(β -glucuronidase)を用いて標準化した。

ヒト細胞株に用いたプライマーの配列は、

UBA5 left, CAGCACTGCCTAAACAAGAGG

UBA5 right, TGAAACCTCAGATACCAGCTCA

UFC1 left, TTTGGACTAGCTCATCTCATGG

UFC1 right, GAATCAGATCAGGGATTTCCAC

UFM1 left, GGCTGCCGTACAAAGTACTCA

UFM1 right, TTCCATCATTGGTAATAATTGCAC

GAPDH left, AGCCACATCGCTCAGACAC

GAPDH right, GCCCAATACGACCAATCC

マウス組織に用いたプライマーの配列は、

Ufm1 Left, AGTACGCCGTTTACAGCAG

Ufm1 Right, CATTAGTAATAATCGCACTTGTAGCTG

Gus Left, GATGTGGTCTGTGGCCAAT

Gus Right, TGTGGGTGATCAGCGTCTT

組織学的解析

胎生期 14.5 日ないしは 18.5 日のマウスの脳を迅速に取り出し 4% パラホルムアルデヒドと 4% スクロースを含む 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) により浸

透固定した。固定したブロックを洗浄し、示した抗体を用いて染色用のパラフィンに包埋した。

免疫染色

HeLa 細胞をガラスディッシュが敷かれた 35 mm dish に播種した。4 % パラホルムアルデヒド / PBS で固定を 10 分間行い、0.1 % Triton-X / PBS で Permealize を 10 分間行った。0.1 % ゼラチン/PBS を用いて 30 分間のブロッキングを行った後に、1 次抗体を 4℃で一晩反応させて、2 次抗体を室温で 1 時間反応させた。最後に Slow Fade Gold Antifade (Life Technologies) を用いて封入を行った。染色した細胞の画像習得には共焦点顕微鏡 FV1000 (OLYMPUS) を使用した。

Pull-down assay

培養細胞は PBS で洗浄後、TNE+EDTA (10 mM Tris-HCl pH 7.5、150 mM NaCl、protease inhibitor (Roche)、1% NP-40、1% Triton X-100) により細胞を溶解し、遠心分離 (15,000 rpm、4℃、10 分間) を行い、上清を細胞全抽出液として回収した。Ni-NTA Agarose (Life Technologies) と 4℃で 30 分間反応させ、アフィニティー精製した。その後、Denaturing binding buffer (8 M urea, 20 mM sodium phosphate, pH 7.8 and 500 mM NaCl) と室温で 30 分間反応させた。Denaturing wash buffer (8 M urea, 20 mM sodium phosphate, pH 6.0, and 500 mM NaCl) で 3 回洗浄し、さらに、Wash buffer (20 mM sodium phosphate,

pH 6.0, and 500 mM NaCl) で 3 回洗浄した。最後に、Elution buffer (20 mM sodium phosphate, pH4.0, 500 mM NaCl, and 500 mM imidazole)で 2 回溶出した。

FLAG-His-UFM1 の精製と質量分析

100mm Dish×20 枚にトランスフェクションを行った。トランスフェクション 24 時間後に培養細胞は PBS で洗浄後、TNE-EDTA (10 mM Tris-HCl pH 7.5、150 mM NaCl、protease inhibitor (Roche)、1 % NP-40、1 % Triton X-100) により細胞を溶解し、遠心分離 (15,000 rpm、4℃、10 分間) を行い、上清を細胞全抽出液として回収した。細胞抽出液を抗 FLAG 抗体結合アガロース (M2 アガロース、Sigma) と反応させ、4℃で一晩免疫沈降を行った。3×FLAG ペプチド (Sigma) で溶出し、Ni-NTA Agarose と 4℃で 30 分間反応させ、アフィニティー精製した。その後、Denaturing binding buffer (8 M urea, 20 mM sodium phosphate, pH 7.8 and 500 mM NaCl)と室温で 30 分間反応させた。Denaturing wash buffer (8 M urea, 20 mM sodium phosphate, pH 6.0, and 500 mM NaCl)で 3 回洗浄し、wash buffer (20 mM sodium phosphate, pH 6.0, and 500 mM NaCl) で 3 回洗浄した。最後に、elution buffer (20 mM sodium phosphate, pH 4.0, 500 mM NaCl, and 500 mM imidazole)で 2 回溶出した。12 % Bis-Tris gels を用いて NuPAGE system により MES-SDS running buffer で分離した。Oriole 染色 (BioRad) をした後、UV 照射下で、ゲル片を切り出した。ゲル片を真空遠心分離機で乾燥させ、37℃で 16 時間、100 mM NH₄HCO₃

中の 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ トリプシンで処理した。得られたペプチドを 60 %アセトニトリル中でゲルから抽出し分析した。

統計学的解析

グラフ中に示した値は、平均値 \pm 標準誤差である。統計学的解析は、独立 t 検定 (Welch test) に基づいて行った。0.05 以下の p 値は、統計学的有意性を意味する。これらのデータ処理を行うために Microsoft office の Excel を用いた。

第 3 章 結果

1. *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

1-1 *UBA5* の複合ヘテロ接合体変異

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 9 患者の遺伝子解析を行った²¹⁻³³。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変異を持っていた (図 2A)。p.Ala371Thr 変異体はすべての患者が有していた。この変異は UFM1 を *UBA5* から E2 酵素 UFC1 へと転移に関わるドメイン内にある変異であった (図 2B)³⁴。

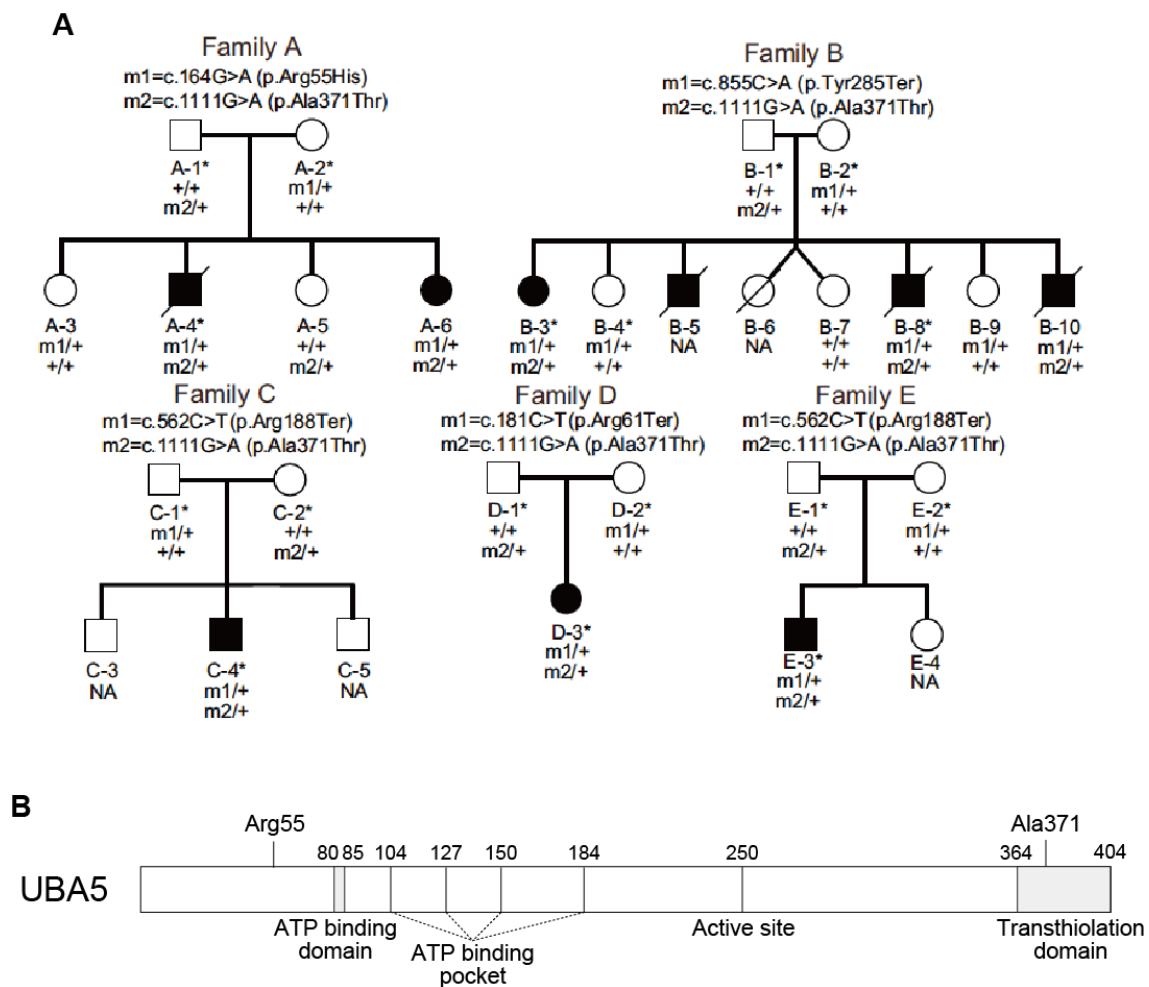


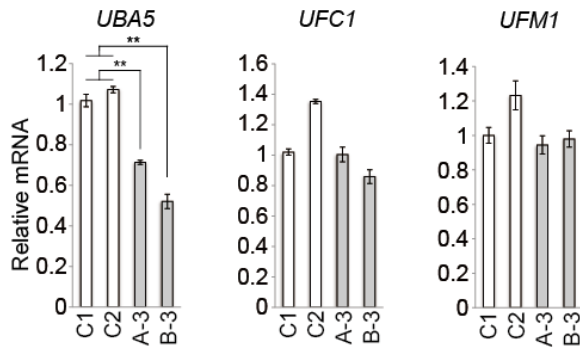
図 2 UBA5 の複合ヘテロ接合体変異

(A) UBA5 に変異を持つ 5 家系の家系図。(B) UBA5 のドメイン図。

1-2 重度発達障害患者由来の線維芽細胞では UBA5 の E1 活性は不完全である

重度発達障害患者由来の線維芽細胞における *UBA5* の mRNA の発現量を調べた。患者由来の線維芽細胞 (A-4、B-3) (図 2A) では *UBA5* の mRNA の発現量はコントロール (C1、C2) に比べ半分に低下していた (図 3A)。B-3 ではナンセンス変異を持つため不安定化した mRNA が nonsense-mediated mRNA decay に分解されたと考えられる。A-4 における変異 c.164G>A (p.Arg55His) はエキソン 2 の 5'末端にあるため、スプライシングに影響が出て、不安定化 mRNA が nonsense-mediated mRNA decay に分解されたと考えられる。続いて、ヒト線維芽細胞の全抽出物を抗 UBA5 抗体でウェスタンブロッティングした。DTT を添加した還元状態において、UBA5 のタンパク質量はコントロールに比べ患者由来の線維芽細胞ではおよそ半分に減少していた。さらに、UBA5 と UFM1 の中間体量および UFC1 と UFM1 の中間体量を調べるために、DTT を添加せずに非還元状態でサンプルを調製した。これを抗 UBA5 抗体、抗 UFC1 抗体、抗 UFM1 抗体でウェスタンブロッティングした。コントロールでは非還元状態で UBA5 と UFM1 の中間体 (UBA5-UFM1) が確認できた。しかしながら、患者由来の線維芽細胞では、コントロールに比べ UBA5 と UFM1 の中間体の量が有意に減少していた。続いて、UFC1 と UFM1 の中間体 (UFC1-UFM1) を調べた。コントロールでは非還元状態で UFC1 と UFM1 の中間体が形成されたが、患者由来の線維芽細胞ではいずれも有意に減少していた (図 3B)。

A



B

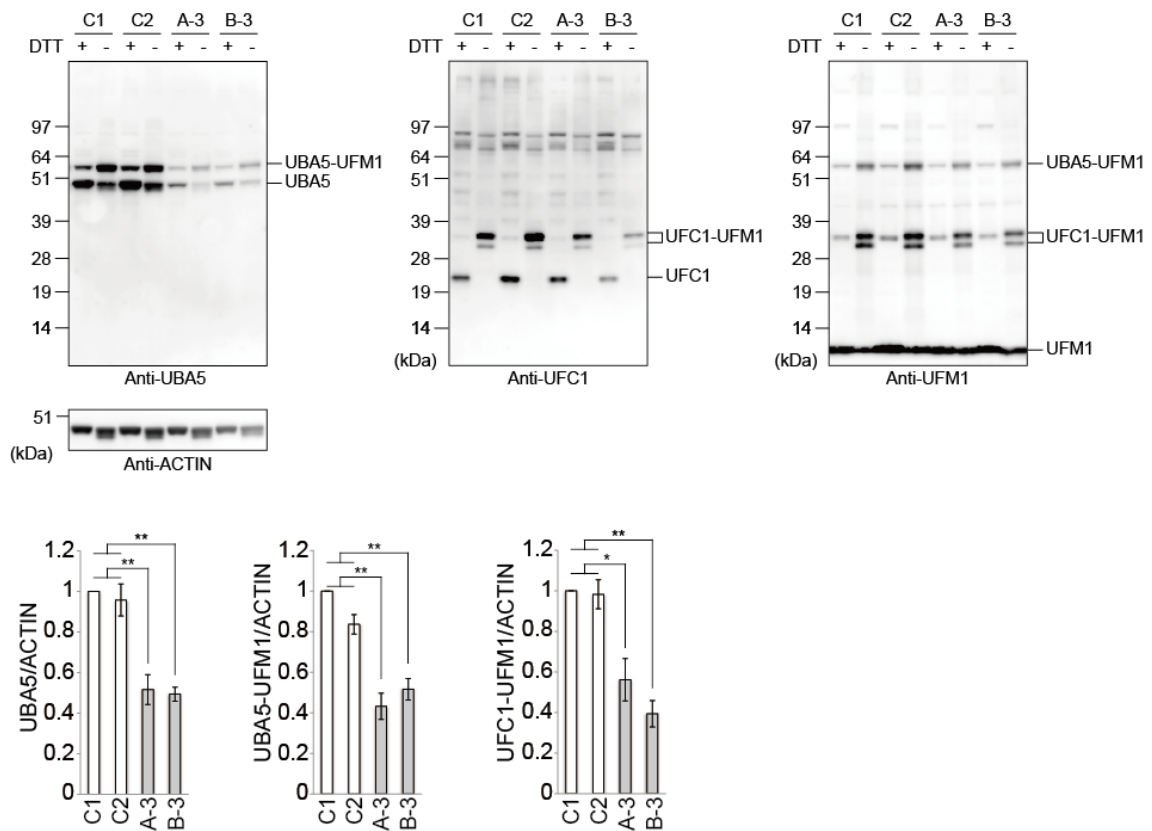


図 3 重度発達障害患者由来の線維芽細胞では UBA5 の E1 活性は不完全である

(A) ヒト線維芽細胞から RNA を調整し、cDNA を合成し定量 PCR を行った。標記の遺伝子の発現レベル解析を行った。**P < 0.01。(B) 全抽出物に DTT を添加したサンプル（還元状態）と未添加のサンプル（非還元状態）を作製した。NuPAGE で分離後、標記の抗体を用いてウェスタンブロッティングにより検出した。ACTIN はローディングコントロール。標記のバンドのシグナルを定量化した。*P < 0.05、 **P < 0.01。

1-3 UBA5 の変異体の機能は低下する

細胞における UBA5 変異体の E1 活性を調べるために、UBA5 の活性中心のシステイン（250 番目のシステイン）をセリンへ置換した（UBA5^{C250S}）。この変異体はチオエステル結合ではなくエステル結合を形成するため、還元条件下においても中間体形成を安定的に維持したままである³⁵。さらに、内在性の UBA5 の影響を取り除くため、CRISPR/Cas9 システムを用いて *UBA5*KO 細胞を作製した（図 4A）。*UBA5*KO 細胞に FLAG-UBA5^{C250S} と MYC-UFM1 Δ C2（C 末グリシンが露出した成熟型）を共発現させると FLAG-UBA5-MYC-UFM1 Δ C2 中間体が形成された。FLAG-UBA5^{R55H/C250S} では中間体が減少していたが、FLAG-UBA5^{A371T/C250S} では有意な減少はみられなかった（図 5A）。次に、UBA5 が UFM1 を E2 酵素の UFC1 への転移活性を有するか調べた。UBA5 同様に UFC1 の活性部位のシステインをセリンに置換した（UFC1^{C116S}）。*UBA5*KO 細胞に FLAG-UFC1^{C116S} と MYC-UFM1 Δ C2 と MYC-UBA5 を共発現させると FLAG-UFC1-MYC-UFM1 Δ C2 中間体が形成された。MYC-UBA5^{R55H} ないしは MYC-UBA5^{A371T} では、この中間体は減少した（図 5B）。リコンビナントタンパク質を用いた *in vitro* thioester formation assay を行った。UBA5 は ATP 依存的に UBA5-UFM1 中間体を形成した。UBA5^{R55H} と UBA5^{A371T} のいずれも E1 様活性が減弱していた（図 5C）。加えて UFC1 への転移活性も消失していた（図 5D）。さらに、反応時間を長くすると、UBA5^{A371T} の活性はあるものの野生型に比べ有意に活性が減弱していた（図 5E）。最後に UBA5 変異体による UFM1 の基質への修飾に影響があるか調べた。基質に共有結合した UFM1 は脱酵素 UFSP2 により切断されるため、HEK293T

UBA5;UFSP2 DKO 細胞を作製した (図 4B)。*UBA5 UFSP2* DKO 細胞に UFL1 と UFBP1 を共発現させると、*UBA5* KO 細胞に比べて UFM1 化が顕著に促進した (図 6A)。そこで、この条件を用いて基質への UFM1 化を調べた。しかしながら、UFM1 の修飾は *UBA5*^{A371T} において有意な差がなかった (図 6B)。

UFM1 の基質の一つである UFBP1 の UFM1 化を調べた。UFBP1 の UFM1 化は *UBA5*^{A371T} において減少していた (図 6C)。

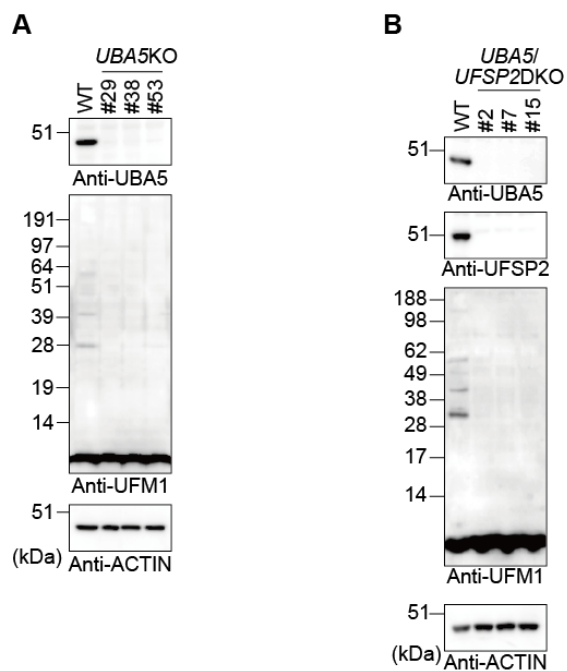


図 4 *UBA5* 欠損と *UBA5 UFSP2* 二重欠損細胞の作製

(A, B) CRISPR/Cas9 システムで作製した *UBA5*KO 及び *UBA5 UFSP2*DKO HEK293T 細胞各 3 クローンずつタンパク質抽出を行った。NuPAGE で分離後、標記の抗体を用いてウエスタンブロッティングにより検出した。ACTIN はローディングコントロール。

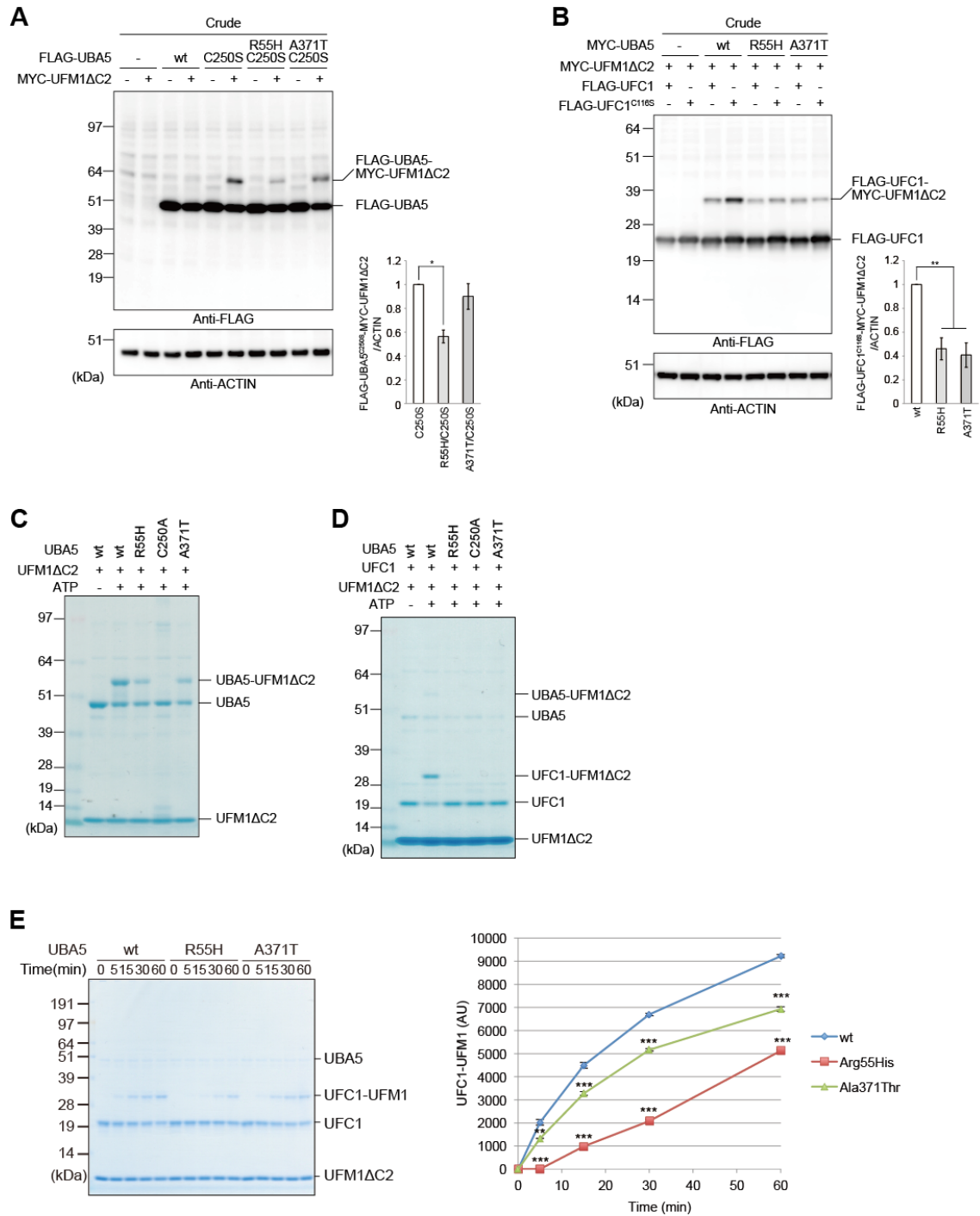


図 5 UBA5 の変異体の機能は低下する

(A, B) HEK293T *UBA5*KO 細胞に標記の DNA をトランスフェクションした。全抽出物は NuPAGE で分離後、抗 FLAG 抗体を用いてウエスタンブロッティングにより検出した。ACTIN はローディングコントロール。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 。(C, D) In

vitro thioester formation assay。標記のタンパク質を混合し、25°Cで5分間反応させた。NuPAGE で分離後、CBB 染色を行った。(E) In vitro thioester formation assay。標記のタンパク質を混合し、25°Cで5分から60分間反応させた。NuPAGE で分離後、CBB 染色を行った。**P <0.01、***P <0.001。

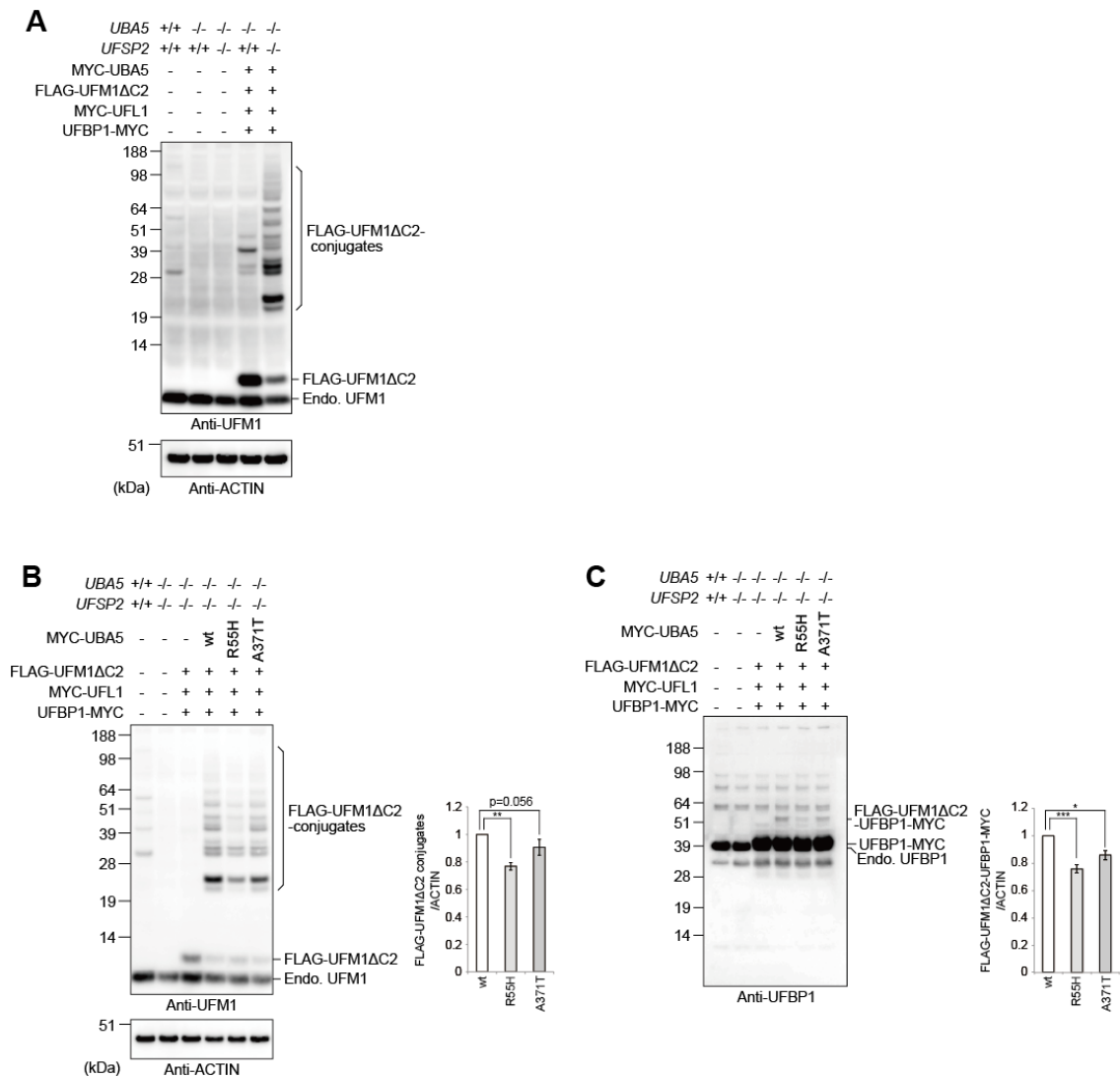


図 6 UBA5 の変異体は UFBP1 への UFM1 化が減少する

(A, B, C) HEK293T *UBA5*KO もしくは *UBA5 UFSP2*DKO に標記の遺伝子をトランスフェクションした。全抽出物は NuPAGE で分離後、標記の抗体を用いてウェスタンブロッティングにより検出した。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ 。

1-4 中枢神経特異的 *Ufm1* 欠損マウスは小頭症を呈する

条件付き *Ufm1* ノックアウトマウス (*Ufm1^{fl}*) を作製した (図 7A-C)。中枢神経特異的に Cre リコンビナーゼを発現する *nestin-Cre* トランスジェニックマウス³⁶ と交配し、中枢神経特異的 *Ufm1* ノックアウトマウスを作製した。胎生期 14.5 日 (E14.5) で帝王切開を行い、胎仔の脳を抗 *Ufm1* 抗体で免疫染色を行った。*Ufm1^{fl};nestin-Cre* マウスの脳の大部分において *Ufm1* が減少していた。*nestin-Cre* を発現しない脈絡集網や髄膜³⁷ では *Ufm1* は残ったままであった (図 8)。E18.5 の胎仔の脳をホモジナイズしウエスタンブロッティングを行うと、フリーの *Ufm1* は減少していた。さらに、*Ufm1^{fl};nestin-Cre* マウス (コントロールマウス) で確認できた *Ufm1*-conjugates が *Ufm1^{fl};nestin-Cre* マウスでは消失した (図 9A)。*Ufm1^{fl};nestin-Cre* マウスは脳の大きさが矢状軸と冠状軸方向共にコントロールマウスに比べ 1 割小さかった (図 9B)。UBA5 に変異を持つ患者と同様に小頭症を伴っており、生後 1 日以内に死亡した (表 1)。組織学的解析を行うと *Ufm1^{fl};nestin-Cre* マウス (*Ufm1* cKO マウス) ではコントロールマウスに比べ、大脳皮質、中脳、視床が小さかった。特に、大脳皮質の後頭部において萎縮がみられた (図 9C)。萎縮が顕著にみられた大脳皮質の後頭部において、*Ufm1* 欠損による細胞死が誘導されているか否かを調べた。アポトーシスのマーカーである抗 Cleaved caspase-3 抗体で染色³⁸ すると *Ufm1* cKO マウスではコントロールマウスに比べ有意に細胞死が誘導されていた (図 7D)。この細胞死は他の領域では誘導されていなかった。続いて、細胞死がどの細胞で誘導されているか調べるために、神経細胞のマーカーである抗 β III-Tubulin 抗体と抗 Cleaved caspase-3 抗体の蛍光免疫二重染色を行うと、これ

らは共局在した（図 9E）。従って、Ufm1 欠損による細胞死は、神経細胞で起きていることが判明した。

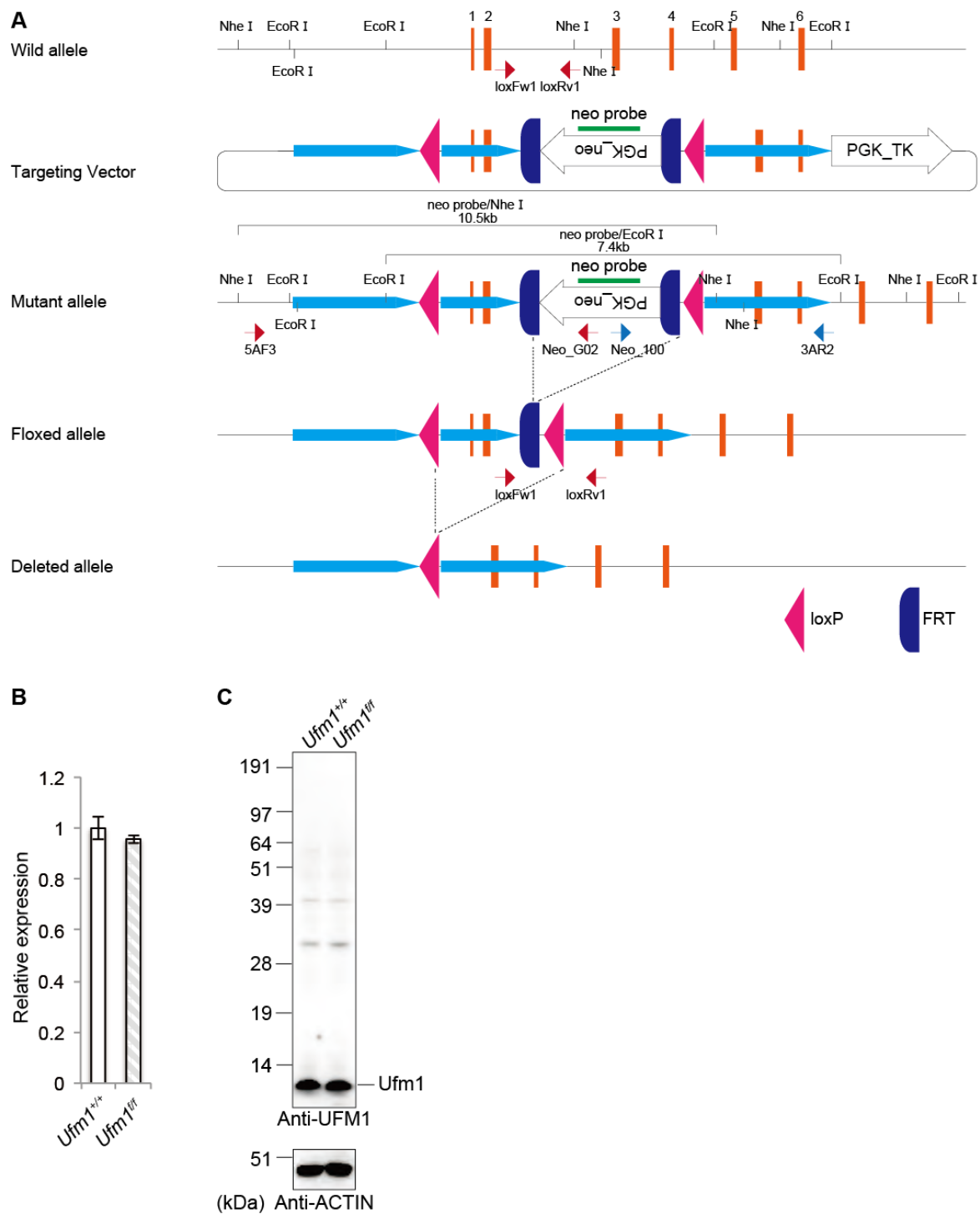


図 7 条件付き *Ufm1* 欠損マウスの作製

(A) ターゲティングベクター。(B) 肝臓から RNA を調整し、cDNA を合成し定量 PCR を行った。Ufm1 の発現レベル。(C) ホモジネートした肝臓は NuPAGE で分離後、抗 Ufm1 抗体を用いてウェスタンブロッティングにより検出した。ACTIN はローディングコントロール。

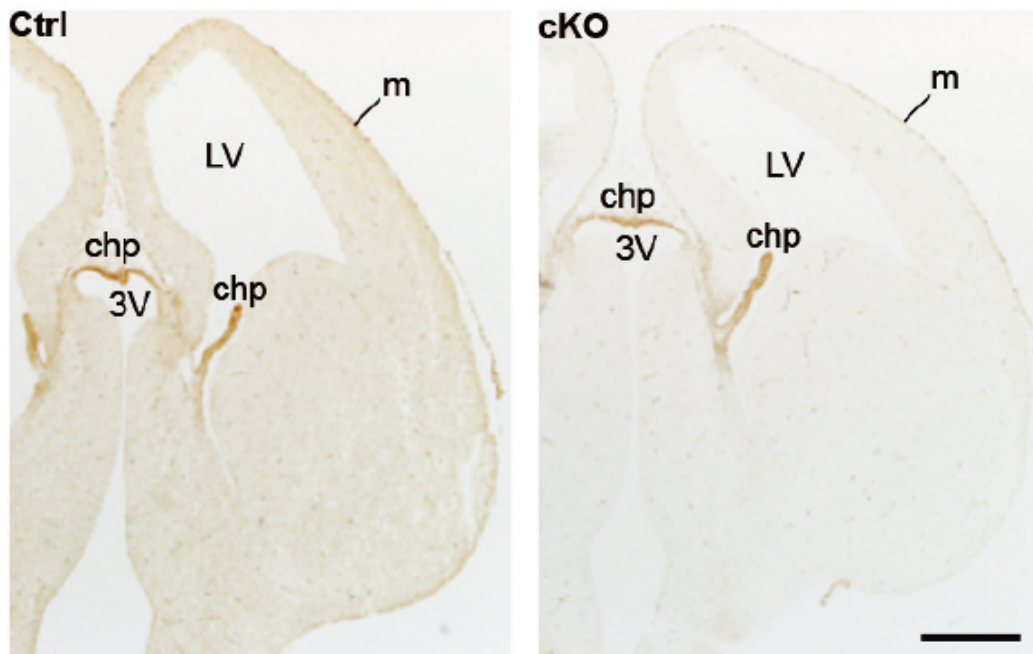


図 8 中枢神経特異的 *Ufm1* ノックアウトマウスを作製

E14.5 のマウス胎仔の脳を抗 *Ufm1* 抗体で染色した。Chp:脈絡集網、m:髄膜、LV:側脳室、3V:第 3 脳室。スケールバー:500 μ m。

	<i>Ufm1^{fl+}</i>	<i>Ufm1^{flf}</i>	<i>Ufm1^{fl+}; nestin-Cre</i>	<i>Ufm1^{flf}; nestin-Cre</i>	
				Alive	Dead
E14.5	2	3	5	2	0
E18.5	10	10	14	9	0
P1	11	8	11	0	9

表 1 *Ufm1^{fl+};nestin-Cre* と *Ufm1^{flf}*を交配した際のジェノタイプ表

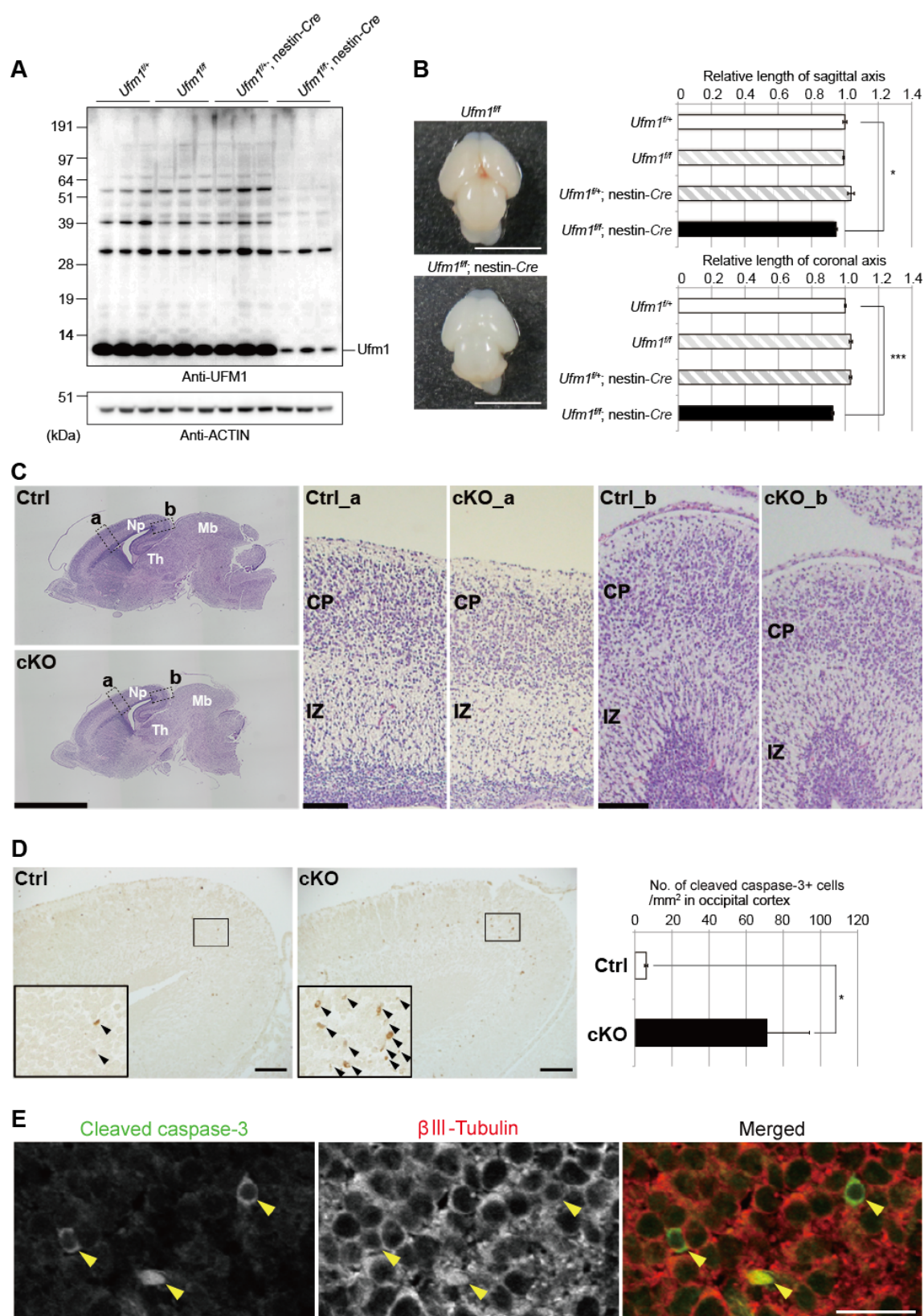


図 9 中枢神経系特異的 *Ufm1* 欠損マウスは小頭症を呈する

(A) E18.5 の胎仔から脳を摘出し、脳をホモジネートした。ホモジネートした脳は NuPAGE で分離後、抗 Ufm1 抗体を用いてウェスタンブロッティングにより検出した。ACTIN はローディングコントロール。(B) E18.5 の胎仔から脳を摘出し、脳の矢状断面軸と冠状断面軸の長さを測定した。cKO マウスではコントロールに比べ有意に脳が小さかった。バー:5mm。*P < 0.05、 ***P < 0.001。(C) E18.5 の胎仔の脳でマイヤー・ヘマトキシリン・エオジン染色 (HE 染色) を行った。スケールバー:2mm と 0.1mm。(D) E18.5 の胎仔の新皮質の後頭部分を抗 cleaved caspase3 抗体で DAB 染色を行った。cleaved caspase3 陽性細胞の数をカウントした。バー:100 μ m。*P < 0.05。(E) 標記の抗体で免疫二重染色を行った。cKO マウスのニューロンでの細胞死が確認できた。スケールバー:500 μ m。

2. 小胞体における UFM1 化

2-1 *UFSP2* 欠損細胞の作製

UFM1 脱酵素である *UFSP2* (ヒトにおける *UFSP1* は触媒中心をもたないために不活性型である) を欠損させると「前駆体 UFM1 の蓄積」と「UFM1 化した基質タンパク質の減少」が起こることが想定される。そこで、CRISPR/Cas9 システムで *UFSP2* を欠損した HEK293T 細胞と HeLa 細胞を作製した。驚くべきことに、これらの細胞では「前駆体 UFM1 の減少」と「UFM1 化した基質タンパク質の蓄積」が起きていた (図 10)。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。

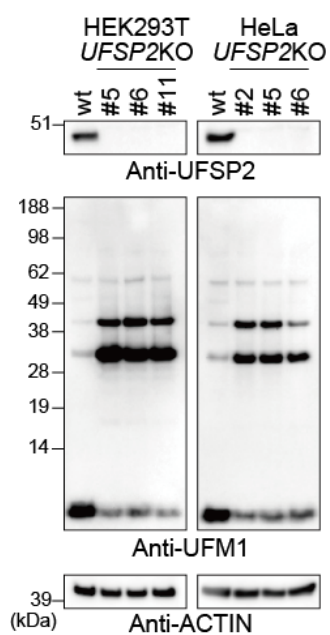


図 10 *UFSP2* 欠損細胞の作製

CRISPR/Cas9 システムで作製した HEK293T *UFSP2*KO 細胞及び HeLa *UFSP2*KO 細胞各 3 クローンずつタンパク質抽出を行った。NuPAGE で分離後、標記の抗体を用いてウェスタンブロッティングにより検出した。ACTIN はローディングコントロール。

2-2 *UFSP2* 欠損細胞で UFL1 による UFM1 化基質形成の影響

UFSP2 欠損細胞において E3 酵素 UFL1、そのアダプタータンパク質 UFBP1 が UFM1 化を促進するかどうか調べた。HEK293T *UFSP2* 欠損細胞および HeLa *UFSP2* 欠損細胞に FLAG-His-UFM1 Δ C2、MYC-UFL1、UFBP1-MYC を強制発現させた。Ni-Agarose を用いて 6 M Urea の変性条件下で FLAG-His-UFM1 を精製すると、*UFSP2* 欠損細胞において UFM1 化が顕著に促進した。この促進は FLAG-His-UFM1 Δ C3 (C 末グリシンを欠損した非活性型)を用いると完全に消失し、それぞれの親株ではみられなかった (図 11A, B)。このことは細胞内でできた UFM1 化基質は *UFSP2* により、即座に切断されていることを意味する。さらに、*UFSP2* の欠損が UFM1 の基質としても知られている UFBP1 の UFM1 化に影響するか否かを調べた。MYC-UFM1 Δ C2 と MYC-UFL1 と UFBP1-FLAG-His を HEK293T *UFSP2* 欠損細胞および HeLa *UFSP2* 欠損細胞に強制発現した。さらに Ni-Agarose を用いて 6 M Urea の変性条件下で UFBP1-FLAG-His を精製した。*UFSP2* 欠損細胞では UFBP1 の UFM1 化が促進された。この UFBP1 の UFM1 化は UFBP1^{K267R} 変異体 (UFM1 化されるリジンをアルギニンへ置換した変異体)⁶ や UFM1 Δ C3 を用いて行うと消失した。また、親株においても UFBP1 の UFM1 化はみられなかった (図 12A, B)。これらのことは *UFSP2* 欠損細胞において UFM1 化基質が容易に検出できることを示す。

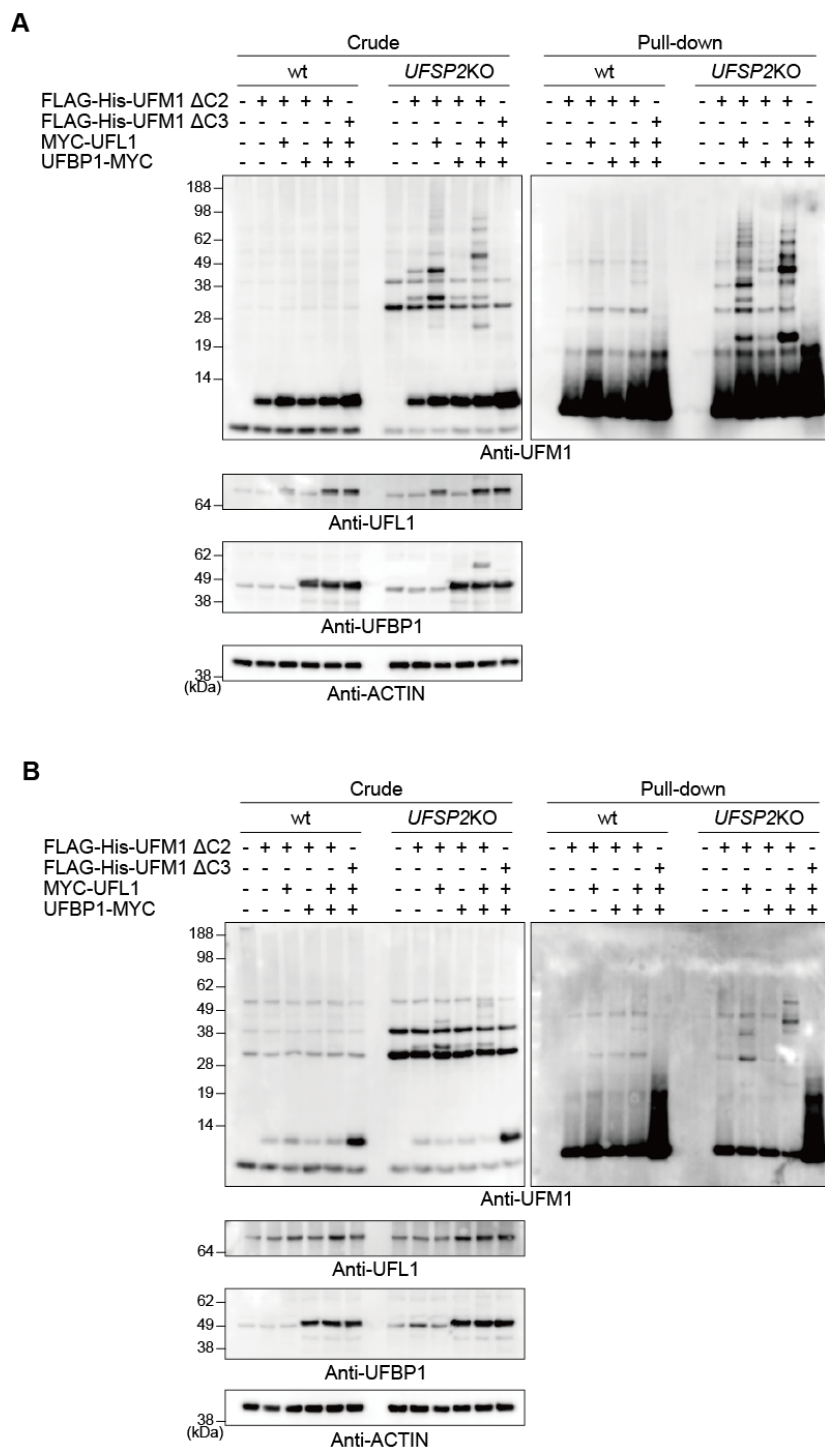


図 11 *UFSP2* 欠損細胞で UFL1 による UFM1 化基質形成の影響

(A) HEK293T 親株と *UFSP2* 欠損細胞に標記の DNA をトランスフェクションした。(B) HeLa 親株と *UFSP2* 欠損細胞に標記の DNA をトランスフェクションした。

抽出液は Ni-Agarose を用いて、変性条件下で精製した。NuPAGE で分離後、標記の抗体を用いてウエスタンブロッティングにより検出した。ACTIN はローディングコントロール。

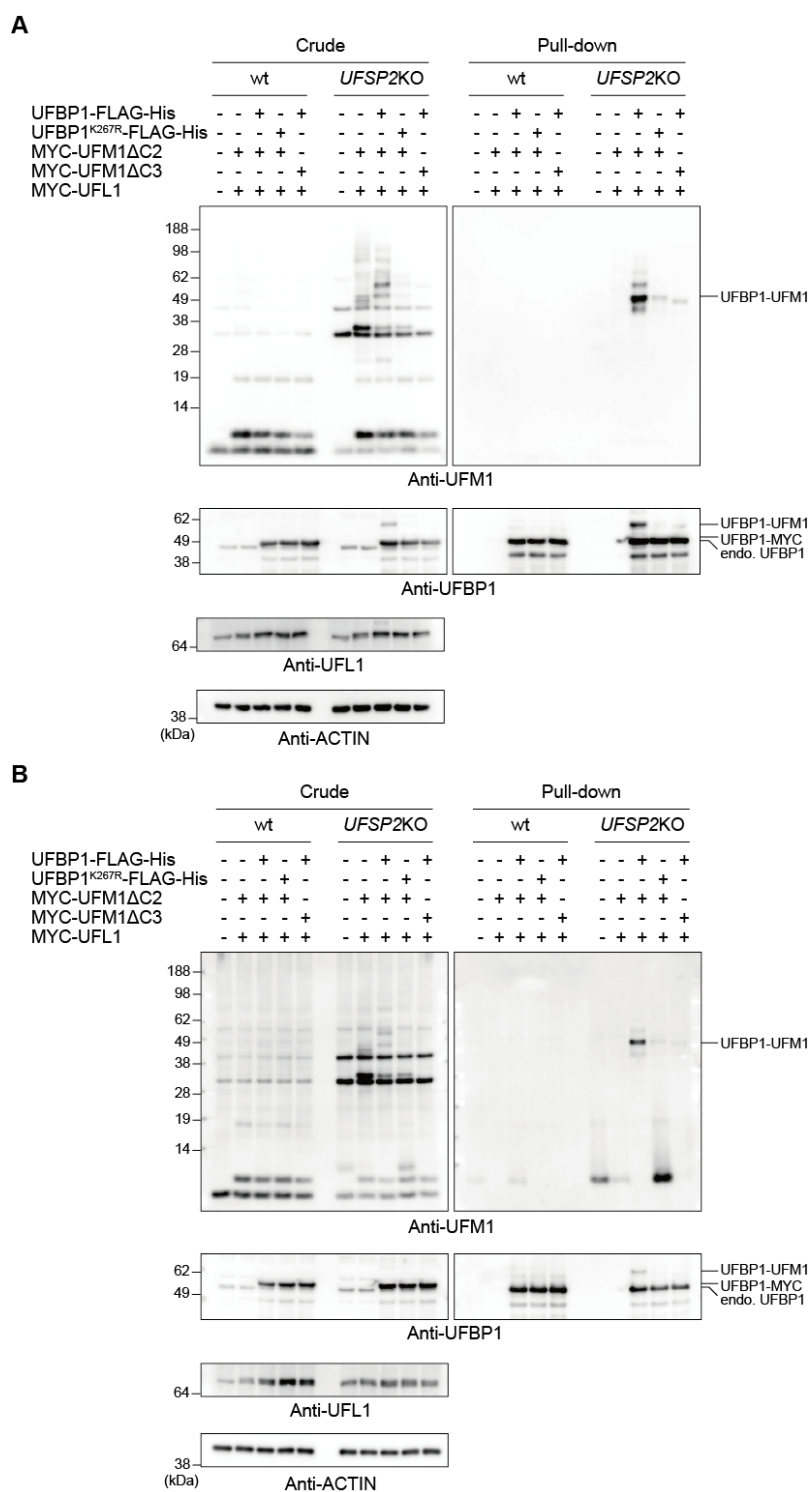


図 12 *UFSP2* 欠損による UFBP1 の UFM1 化の影響

(A) HEK293T 親株と *UFSP2* 欠損細胞に標記の DNA をトランスフェクションした。(B) HeLa 親株と *UFSP2* 欠損細胞に標記の DNA をトランスフェクションした。

抽出液は Ni-Agarose を用いて、変性条件下で精製した。NuPAGE で分離後、標記の抗体を用いてウエスタンブロッティングにより検出した。ACTIN はローディングコントロール。

2-3 HeLa *UFSP2* 欠損細胞における UFM1 の局在

HeLa *UFSP2* 欠損細胞を用いて、UFM1 とその基質の局在を調べた。

mCherry-UFM1 Δ C2 を発現させると細胞全体に拡散していた。

mCherry-UFM1 Δ C2、GFP-UFL1 と UFBP1-FLAG (UFL1 と UFBP1 は小胞体に局在することが知られている⁶⁾) を共発現すると、UFM1 は小胞体上に移行した。mCherry-UFM1 Δ C3 や UFBP1^{K267R} 変異体 (UFM1 化されるリジンがアルギニンへ置換した変異体) を用いるとこの移行は消失した (図 13)。これらの結果は UFBP1 を含む小胞体に局在するタンパク質を UFM1 化することを示唆する。

この結果を生化学的に確認するために FLAG-His-UFM1 Δ C2、MYC-UFL1、UFBP1-MYC を HEK293T *UFSP2* 欠損細胞に共発現させ、ミクロソーム画分を精製した。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 UFBP 1 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。UFBP1^{K267R} 変異体では UFM1 化は抑制され UFM1 Δ C3 を用いると消失した。また、UFBP1 はミクロソーム画分で UFM1 化されていた (図 14)。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。

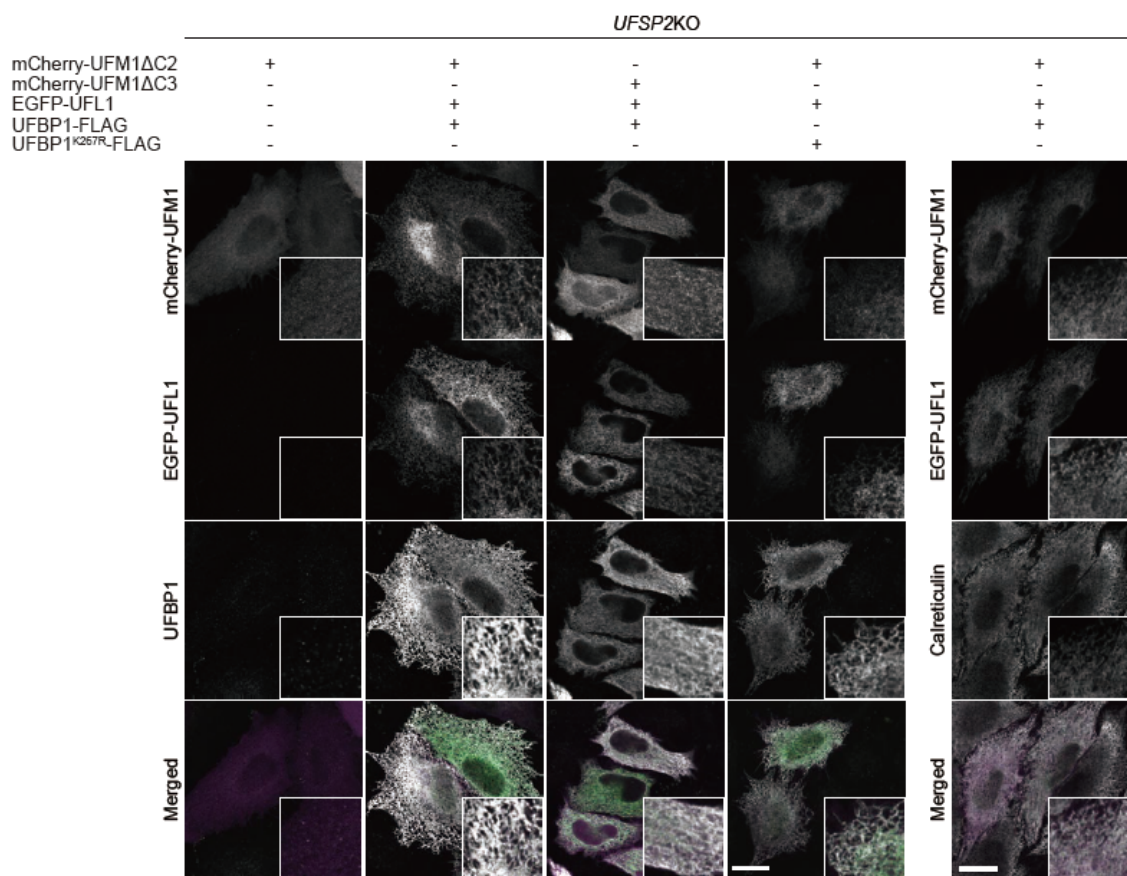


図 13 *UFSP2* 欠損細胞における UFM1 の局在

HeLa *UFSP2* 欠損細胞に標記の DNA を発現させ 24 時間後に固定を行った。スケールバー：20μm。

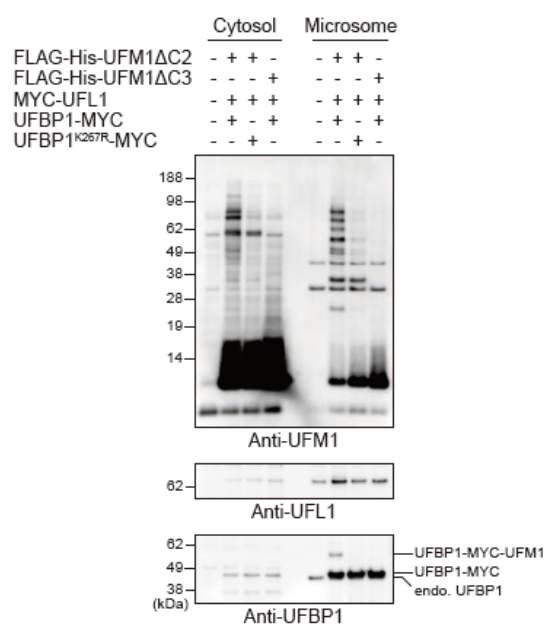


図 14 *UFBP2* 欠損細胞におけるミクロソーム分画

HEK293T 親株と *UFBP2* 欠損細胞に標記の DNA をトランスフェクションした。24 時間後、ミクロソーム画分と細胞質画分を精製した。NuPAGE で分離後、標記の抗体を用いてウェスタンブロッティングにより検出した。

2-4 *UBA5 UFSP2* 二重欠損細胞を用いた *UBA5* 変異体の評価

私たちと Bonneau らのグループが独立して、*UBA5* の複合ヘテロ接合体変異体（ナンセンス変異と p.Ala371Thr の組み合わせ）が遺伝性重度発達障害を引き起こすことを報告した^{39, 40}。私たちは *UBA5*^{A371T} 変異体が UFBP1 の UFM1 化を抑制することを示した。Bonneau らのグループは p.Ala371Thr に加え独立した 2 家系から p.Met57Val、p.Gly168Glu、p.Val260Met、p.Asp389Tyr 変異体を同定した⁴⁰。これらの変異体は E1 活性が低下していた。さらに、Duan らのグループは常染色体劣性小脳失調症患者から *UBA5* の複合ヘテロ接合体変異体（p.Lys310Glu と p.Arg246X）が原因であることを報告した¹⁹。しかしながら、これらの変異体の UFBP1 への UFM1 化の影響は報告されていない。確立した小胞体上での UFM1 化が疾患の原因として同定された 6 種類の *UBA5* のミスセンス変異（図 15A, B）により影響を受けるか否かを検証した。HEK293T *UBA5;UFSP2* の二重欠損細胞に成熟型 UFM1、UFL1 と UFBP1 と共に野生型ないしは *UBA5* 変異体を過剰発現し、ミクロソーム画分における UFM1 化タンパク質と UFBP1 の UFM1 化を調べた。その結果、重度な症状がみられた p.Gly168Glu は活性をほとんど持っていなかった。また、比較的マイルドな症状であった患者がもつ p.Val260Met と p.Asp389Tyr 変異体は共に UFBP1 の UFM1 化の有意な減少が確認され、*UBA5* の活性が僅かに減弱していた。さらに、p.Lys310Glu 変異体も *UBA5* の活性が僅かに減弱していた（図 15C）。

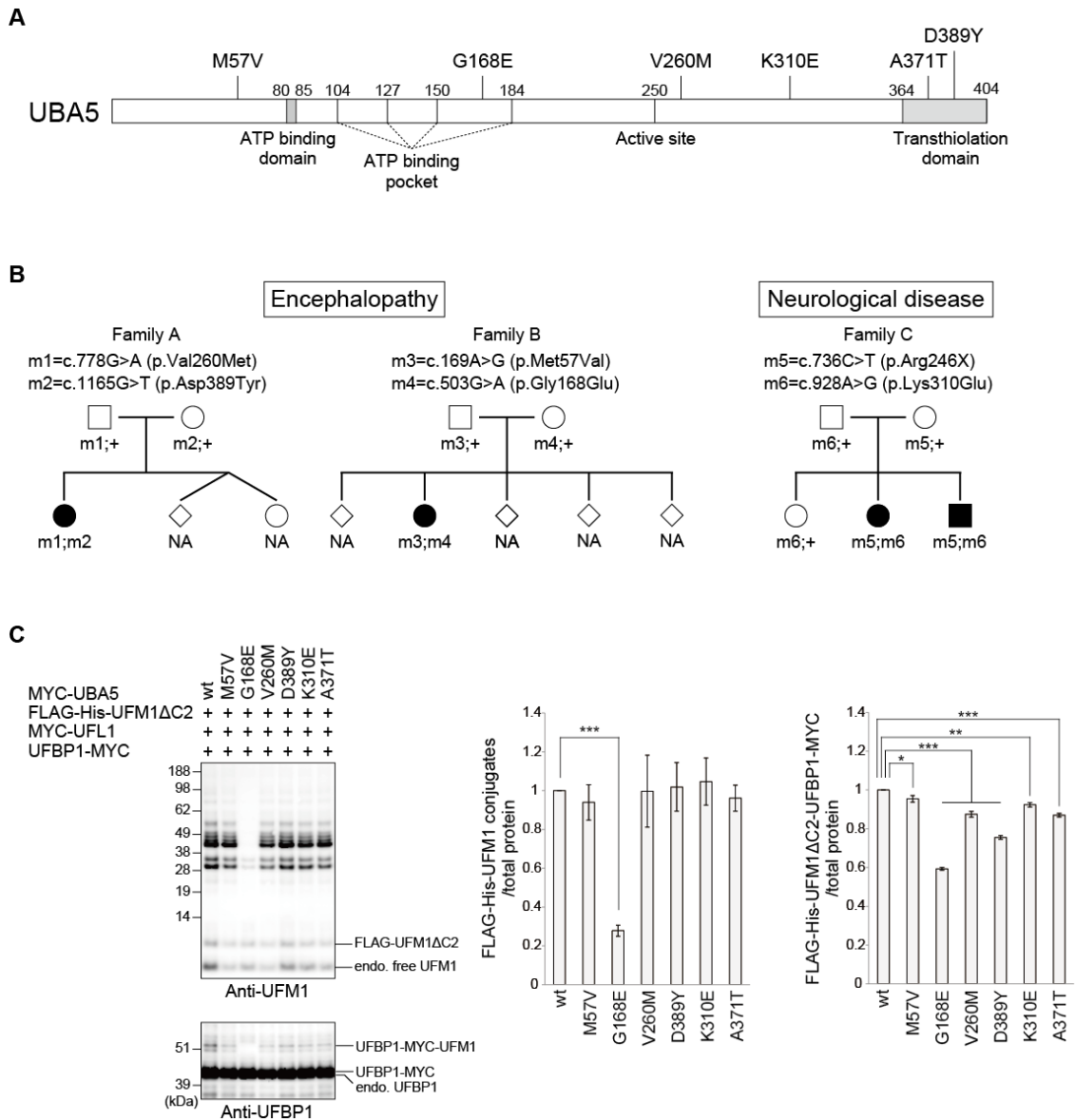


図 15 疾患に関与する UBA5 変異体の検証

(A) *UBA5* 変異体の位置。(B) 遺伝性重度発達障害患者と小児発症神経疾患患者の *UBA5* 変異体の組み合わせ。(C) HEK293T *UBA5* と *UFSP2* の二重欠損細胞に標記の DNA をトランスフェクションし、24 時間後、ミクロソーム画分と細胞質画分を精製した。NuPAGE で分離後、標記の抗体を用いてウエスタンブロッティングにより検出した。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ 。

3.

3-1

単行本として出版する計画があるため公表できない。

図 16

単行本として出版する計画があるため公表できない。

3-2

単行本として出版する計画があるため公表できない。

図 17

単行本として出版する計画があるため公表できない。

第 4 章 考察

本研究では UBA5 の活性が減弱した p.Ala371Thr 変異体と、機能不全変異を含む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ことを明らかにした。試験管内再構成系および患者より採取した線維芽細胞を用いた解析から、複合ヘテロ接合体変異が UBA5 の機能は完全には消失していなかった。9 患者に共通する p.Ala371Thr 変異体は E1 活性が減弱していた。一方で c.164G>A (p.Arg55His 変異体) の影響は顕著であった。しかしながら、この p.Arg55His 変異体はスプライシング異常を引き起こしていると考えられるが、スプライシングが正常に起きたとしても機能が著しく損なわれると予想できる。また、2 つの対立遺伝子が機能不全の場合は *Uba5* 欠損マウス⁸同様に生まれてこないと考えられる。興味深いことに Exome Aggregation Consortium のデータベースを調べてみると p.Ala371Thr 変異体はフィンランド人の 0.46%、ヨーロッパ人の 0.28%がキャリアーであった。これはヨーロッパ人において UBA5 変異による疾患が起こりやすいことを意味する。実際に本研究で同定した変異に加え、他のヨーロッパ人の家系から UBA5 の変異が報告された⁴⁰。また、常染色体劣性小脳失調症患者から UBA5 の複合ヘテロ接合体変異体 (p.Lys310Glu と p.Arg246X) が原因であることを報告された¹⁹。これは UBA5 変異における軽度な表現型であると考えられる。本研究における UBA5 の変異体をもつ患者の症状は主に中枢神経に現れている。*Uba5*、*Ufl1*、*Ufbp1* 全身欠損マウスは重篤な貧血を示し胚性致死である⁸⁻¹⁰。UBA5 の機能を部分的に失った患者は貧血を示さず、部分的な機能で造血は十分であることを示唆している。さらに、UFM1

の脱酵素 UFSP2 の変異により家族生股関節形成異常を引き起こすことが報告された¹⁸。これは UFM1 システムが中枢神経以外においても、重要な役割を担っていると考えられる。中枢神経特異的 *Ufm1* 欠損マウスは重度発達障害患者でみられる小頭症を呈した。この変異マウスは神経細胞死を伴って新生児期で死亡した。これらのことから UFM1 システムが神経発達に寄与し、その異常が重篤な発達障害を引き起こすと考えられる。また、すでに *Uba5* 欠損ヘテロマウス (*UBA5*^{+/−}) を作出済みである。さらに患者変異の一つを持つ *Uba5* ノックインマウス (*Uba5*^{+/A370T}) 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。中枢神経特異的 *Ufm1* 欠損マウスは生後 1 日で死亡するため行動等の解析が困難であった。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。

さらに、本研究で UFM1 システム促進するシステムを構築した。このシステムを用いると以前まで困難であった基質への UFM1 化を評価することでき、実際に患者由来の変異 *UBA5* の僅かな UFM1 化に与える影響をモニターすることもできた。さらに、この UFM1 化を促進する方法を用いることで、これまで検出が困難であった新たな UFM1 基質の同定に有用である。

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、確立した方法で UFM1 化を促進さ

単行本として出版する計画があるため公表できない。

結語

単行本として出版する計画があるため公表できない。

第 5 章 謝辞

本研究は、私が東京大学大学院新領域創成科学研究科後期博士課程在学中に、公益財団法人東京都医学総合研究所田中啓二所長（東京大学客員教授兼任）の指導のもとに行ったものである。この研究を遂行するにあたり、研究の場を与えて下さった田中啓二所長、終止熱心にご指導を頂いた新潟大学の小松雅明教授、形態学解析をして頂いた福島県立医科大学の和栗聡教授、新潟大学の竹林浩秀教授、エキソーム解析をして頂いたヘルシンキ大学の Anna-Elina Lehesjoki 教授、質量分析をして頂いた公益財団法人東京都医学総合研究所反町洋之プロジェクトリーダーをはじめ多くの先生方にこの場をかりて感謝の意を表します。

第 6 章 引用文献

1. Hershko, A. and Ciechanover, A. (1998). The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 67, 425-79.
2. Komander, D. and Rape, M. (2012). The ubiquitin code. *Annu Rev Biochem* 81, 203-29.
3. van der Veen, A.G., and Ploegh, H.L. (2012). Ubiquitin-like proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 81, 323-357.
4. Schulman, B.A., and Wade Harper, J. (2009). Ubiquitin-like protein activation by E1 enzymes: the apex for downstream signalling pathways. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 319-331.
5. Komatsu, M., Chiba, T., Tatsumi, K., Iemura, S., Tanida, I., Okazaki, N., Ueno, T., Kominami, E., Natsume, T., and Tanaka, K. (2004). A novel protein-conjugating system for Ufm1, a ubiquitin-fold modifier. *EMBO J.* 23, 1977-1986.
6. Tatsumi, K., Sou, Y.S., Tada, N., Nakamura, E., Iemura, S., Natsume, T., Kang, S.H., Chung, C.H., Kasahara, M., Kominami, E., et al. (2010). A novel type of E3 ligase for the Ufm1 conjugation system. *J. Biol. Chem.* 285, 5417-5427.
7. Kang, S.H., Kim, G.R., Seong, M., Baek, S.H., Seol, J.H., Bang, O.S., Ova, H., Tatsumi, K., Komatsu, M., Tanaka, K., et al. (2007). Two novel ubiquitin-fold modifier 1 (Ufm1)-specific proteases, UfSP1 and UfSP2. *J. Biol. Chem.* 282, 5256-5262.

8. Tatsumi, K., Yamamoto-Mukai, H., Shimizu, R., Waguri, S., Sou, Y.-S., Sakamoto, A., Taya, C., Shitara, H., Hara, T., Chung, C.H., et al. (2011). The Ufm1-activating enzyme Uba5 is indispensable for erythroid differentiation in mice. *Nat. Commun.* **2**, 181.
9. Zhang, M., Zhu, X., Zhang, Y., Cai, Y., Chen, J., Sivaprakasam, S., Gurav, A., Pi, W., Makala L., Wu, J., Pace, B., Tuan-Lo, D., Ganapathy, V., Singh, N. and Li, H. (2015). RCAD/Ufl1, a Ufm1 E3 ligase, is essential for hematopoietic stem cell function and murine hematopoiesis. *Cell Death Differ.* **12**, 1922-1934
10. Cai, Y., Pi, W., Sivaprakasam, S., Zhu, X., Zhang, M., Chen, J., Makala, L., Lu, C., Wu, J., Teng, Y., et al. (2015). UFBP1, a key component of the Ufm1 conjugation system, is essential for ufmylation-mediated regulation of erythroid development. *PLoS Genet.* **11**, e1005643.
11. Yoo, H.M., Kang, S.H., Kim, J.Y., Lee, J.E., Seong, M.W., Lee, S.W., Ka, S.H., Sou, Y.S., Komatsu, M., Tanaka, K., et al. (2014). Modification of ASC1 by UFM1 is crucial for ERalpha transactivation and breast cancer development. *Mol. Cell* **56**, 261-274.
12. Hertel, P., Daniel, J., Stegehake, D., Vaupel, H., Kailayangiri, S., Gruel, C., Woltersdorf, C., and Liebau, E. (2013). The Ubiquitin-fold modifier 1 (Ufm1) cascade of *Caenorhabditis elegans*. *J. Biol. Chem.* **288**, 10661-10671.

13. Lemaire, K., Moura, R.F., Granvik, M., Igoillo-Esteve, M., Hohmeier, H.E., Hendrickx, N., Newgard, C.B., Waelkens, E., Cnop, M., and Schuit, F. (2011). Ubiquitin fold modifier 1 (UFM1) and its target UFBP1 protect pancreatic beta cells from ER stress-induced apoptosis. *PLoS ONE* 6, e18517.
14. Zhang, Y., Zhang, M., Wu, J., Lei, G., and Li, H. (2012). Transcriptional regulation of the Ufm1 conjugation system in response to disturbance of the endoplasmic reticulum homeostasis and inhibition of vesicle trafficking. *PLoS ONE* 7, e48587.
15. Daniel, J., and Liebau, E. (2014). The Ufm1 cascade. *Cells* 3, 627.
16. DeJesus, R. et al. (2016). Functional CRISPR screening identifies the ufmylation pathway as a regulator of SQSTM1/p62. *Elife* 5
17. Habisov, S. et al. (2016). Structural and Functional Analysis of a Novel Interaction Motif within UFM1-activating Enzyme 5 (UBA5) Required for Binding to Ubiquitin-like Proteins and Ufmylation. *J Biol Chem* 291, 9025-41.
18. Watson, C.M., Crinnion, L.A., Gleghorn, L., Newman, W.G., Ramesar, R., Beighton, P., and Wallis, G.A. (2015). Identification of a mutation in the ubiquitin-fold modifier 1-specific peptidase 2 gene, UFSP2, in an extended South African family with Beukes hip dysplasia. *S. Afr. Med. J.* 105, 558-563.

19. Duan, R., Shi, Y., Yu, L., Zhang, G., Li, J., Lin, Y., Guo, J., Wang, J., Shen, L., Jiang, H., et al. (2016). UBA5 mutations cause a new form of autosomal recessive cerebellar ataxia. *PLoS ONE* *11*, e0149039.
20. Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu X, Jiang W, Marraffini LA, Zhang F. Multiplex. Genome Engineering using CRISPR/Cas Systems *Science*. (2013). Feb 15;339(6121):819-23.
21. McKenna, A., Hanna, M., Banks, E., Sivachenko, A., Cibulskis, K., Kernytsky, A., Garimella, K., Altshuler, D., Gabriel, S., Daly, M., et al. (2010). The Genome Analysis Toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res.* *20*, 1297-1303.
22. Van der Auwera, G.A., Carneiro, M.O., Hartl, C., Poplin, R., del Angel, G., Levy-Moonshine, A., Jordan, T., Shakir, K., Roazen, D., Thibault, J., et al. (2013). From FastQ data to high-confidence variant calls: The Genome Analysis Toolkit Best Practices pipeline. *Curr. Protoc. Bioinform.* *43*, 11.10.11-11.10.33.
23. DePristo, M.A., Banks, E., Poplin, R., Garimella, K.V., Maguire, J.R., Hartl, C., Philippakis, A.A., del Angel, G., Rivas, M.A., Hanna, M., et al. (2011). A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. *Nat. Genet.* *43*, 491-498.

24. Muona, M., Berkovic, S.F., Dibbens, L.M., Oliver, K.L., Maljevic, S., Bayly, M.A., Joensuu, T., Canafoglia, L., Franceschetti, S., Michelucci, R., et al. (2015). A recurrent de novo mutation in KCNC1 causes progressive myoclonus epilepsy. *Nat. Genet.* *47*, 39-46.
25. McLaren, W., Pritchard, B., Rios, D., Chen, Y., Flicek, P., and Cunningham, F. (2010). Deriving the consequences of genomic variants with the Ensembl API and SNP Effect Predictor. *Bioinformatics* *26*, 2069-2070.
26. Ramu, A., Noordam, M.J., Schwartz, R.S., Wuster, A., Hurles, M.E., Cartwright, R.A., and Conrad, D.F. (2013). DeNovoGear: de novo indel and point mutation discovery and phasing. *Nat Meth* *10*, 985-987.
27. Lek, M., Karczewski, K., Minikel, E., Samocha, K., Banks, E., Fennell, T., O'Donnell-Luria, A., Ware, J., Hill, A., Cummings, B., et al. (2015). Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *bioRxiv* doi:10.1101/030338
28. The 1000 Genomes Consortium. (2012). An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature* *491*, 56-65.
29. Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., Durbin, R., and Subgroup, G.P.D.P. (2009). The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* *25*, 2078-2079.

30. Sulonen, A.-M., Ellonen, P., Almusa, H., Lepistö, M., Eldfors, S., Hannula, S., Miettinen, T., Tynismaa, H., Salo, P., Heckman, C., et al. (2011). Comparison of solution-based exome capture methods for next generation sequencing. *Genome Biol.* *12*, R94.
31. Sobreira, N., Schiettecatte, F., Valle, D., and Hamosh, A. (2015). GeneMatcher: a matching tool for connecting investigators with an interest in the same gene. *Hum. Mutat.* *36*, 928-930.
32. Akawi, N., McRae, J., Ansari, M., Balasubramanian, M., Blyth, M., Brady, A.F., Clayton, S., Cole, T., Deshpande, C., Fitzgerald, T.W., et al. (2015). Discovery of four recessive developmental disorders using probabilistic genotype and phenotype matching among 4,125 families. *Nat. Genet.* *47*, 1363-1369.
33. The Deciphering Developmental Disorders Study. (2015). Large-scale discovery of novel genetic causes of developmental disorders. *Nature* *519*, 223-228.
34. Xie, S. (2014). Characterization, crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of the human Uba5 C-terminus-Ufc1 complex. *Acta Crystallograph. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* *70*, 1093-1097.
35. Tronche, F., Kellendonk, C., Kretz, O., Gass, P., Anlag, K., Orban, P.C., Bock, R., Klein, R., and Schutz, G. (1999). Disruption of the

- glucocorticoid receptor gene in the nervous system results in reduced anxiety. *Nat. Genet.* 23, 99-103.
36. Sung, P., Prakash, S., Prakash, L. (1991). Stable ester conjugate between the *Saccharomyces cerevisiae* RAD6 protein and ubiquitin has no biological activity. *J. Mol. Biol.* 221, 745-749.
 37. Blaess, S., Graus-Porta, D., Belvindrah, R., Radakovits, R., Pons, S., Littlewood-Evans, A., Senften, M., Guo, H., Li, Y., Miner, J.H., et al. (2004). β 1-Integrins are critical for cerebellar granule cell precursor proliferation. *J. Neurosci.* 24, 3402-3412.
 38. Horie, M., Watanabe, K., Bepari, A.K., Nashimoto, J., Araki, K., Sano, H., Chiken, S., Nambu, A., Ono, K., Ikenaka, K., et al. (2014). Disruption of actin-binding domain-containing Dystonin protein causes dystonia musculorum in mice. *Eur. J. Neurosci.* 40, 3458-3471.
 39. Muona, M. Ishimura, R., et al. (2016). Biallelic Variants in UBA5 Link Dysfunctional UFM1 Ubiquitin-like Modifier Pathway to Severe Infantile-Onset Encephalopathy. *Am J Hum Genet* 99, 683-94.
 40. Colin, E. et al. (2016). Biallelic Variants in UBA5 Reveal that Disruption of the UFM1 Cascade Can Result in Early-Onset Encephalopathy. *Am J Hum Genet* 99, 695-703.
 41. Percy, M.J., Lappin, T. R. (2008). Recessive congenital methaemoglobinaemia: cytochrome b(5) reductase deficiency. *Br J*

Haematol. 141, 298-303

42. Elahian, F., Sepehrizadeh, Z., Moghimi, B., Mirzaei, SA. (2014). Human cytochrome b5 reductase: structure, function, and potential applications. Crit. Rev. Biotechnol., 34, 134-143.