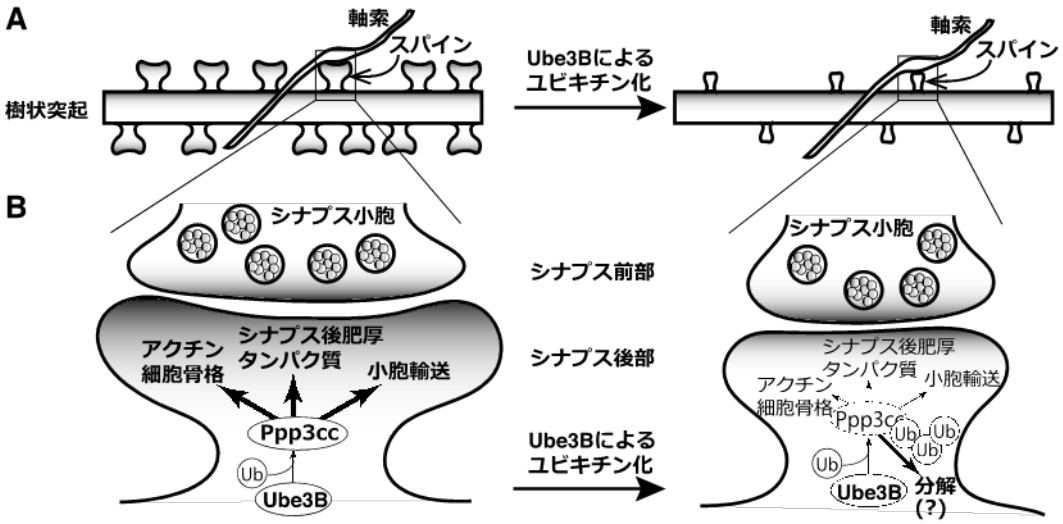
27　カウフマン症候群原因遺伝子*Ube3B*の機能の解明	川辺　浩志

【目的】知的障害は、中枢神経系の発達異常が原因となる疾患で、その有病率は約 1%に達する。知的障害を伴う全身の発達障害の一つに Kaufman oculocerebrofacial syndrome（KOS）があり、ユビキチン化を触媒する E3 リガーゼ遺伝子 *Ube3B* がその原因遺伝子として報告されている。しかしながら、神経細胞での *Ube3B* の機能は不明な点が多い。我々はすでに脳特異的 *Ube3B* 条件付き欠損マウス（*Ube3B*bcKO）を作製した。*Ube3B*bcKO の海馬神経細胞ではシナプス後部が含まれるスパインの数が増加し、スパインヘッドが拡大していた。この結果から、*Ube3B* はスパイン数を減少させてスパインヘッドを縮小させる機能を持つと結論した（下図）。KOS では、スパインを介したシナプス伝達に異常がある可能性が考えられたが、神経細胞での *Ube3B* の機能と KOS の発症機構は十分に明らかになっていない。本研究では、Ube3B を介したユビキチン化によるスパイン形成の制御機構を超解像 STED 顕微鏡によって解明する方法の開発を目的とする。

【方法】本研究が始まる前に、すでに Ube3B の基質としてカルシウム・カルモジュリン依存的セリン／スレオニン脱リン酸化酵素 Calcineurin の触媒サブユニットである Ppp3cc を同定していた。しかしながら、そのユビキチン化の生理学的性状解析は不十分であった。本研究では、超解像 STED 顕微鏡を用いて Ube3B による Ppp3cc のユビキチン化の生理的意義を明らかにするための手法を立ち上げた。

【結果】生化学的に Ube3B が Ppp3cc に対してプロテアソームに認識されるタイプのポリユビキチン鎖（K48 鎖）を融合することが明らかになった。この結果から *Ube3B* bcKO の神経細胞では Ppp3cc が分解されないために、その発現量が増加してスパイン数の増加とスパインヘッドの拡大につながる可能性が考えられた。この可能性を検討するために野生型神経細胞にリコンビナントの Ppp3cc を過剰発現させたところ、*Ube3B*bcKO と同様の表現型を示した。この結果を形態学的に詳細に解析する目的で、超解像 STED 顕微鏡を用いてスパインと細胞骨格を観察する実験系を立ち上げることに成功した。本研究で使った超解像 STED 顕微鏡を応用して、神経細胞内の細胞骨格の形態を観察したところ、すでに報告されているように F-アクチンと微小管の微細形態を観察することができた。さらに脳組織内でも細胞骨格の微細形態を観察することに成功した。今後はこれらの手法を *Ube3B* bcKO の解析に使って Ube3B と Calcineurin の活性がどのように細胞骨格を制御してスパインと樹状突起の形態形成を制御するか解析していきたい。

Ube3B によるスパイン数とスパイン形態の制御機構



27. カウフマン症候群原因遺伝子 *Ube3B* の機能の解明

川辺　浩志

*神戸医療産業都市推進機構 先端医療研究センター 老化機構研究部

Key words：神経細胞発達，ユビキチン，Ube3B，発達障害

緒　言

神経回路は、神経新生、極性形成、移動、神経突起成長、そしてシナプス形成の五段階を経て形成される（図 1）。我々のグループは極性形成と移動がユビキチン化を触媒する E3 リガーゼである Wwp1 と Wwp2 によって制御されることと［1］、神経突起成長が Nedd4-1 によって制御されていることを明らかにした［2，3］。この中で、［2］の論文はドイツ神経科学会の 2010 年度の年間最優秀論文の一つに選ばれた。以上の我々の研究は、神経細胞でのこれらの遺伝子の機能が注目されるきっかけとなった。シナプス形成は正常な脳機能の遂行にもっとも重要な発達段階の一つである。抑制性シナプスが樹状突起の表面のフラットな面に形成されるのに対して、興奮性シナプスは樹状突起から突き出たスパインの上に形成される（図 1）。スパイン形成の際、軸索と樹状突起の接点で細胞接着因子が集積する。引き続いて樹状突起側でスパインが形成され、スパイン内に PSD-95 などの膜裏打ちタンパク質が集積してシナプス後肥厚（PSD）を形成する。スパイン形成とスパインの形態制御は、記憶や学習などの脳機能に非常に重要であり［4］、スパインの形態異常が統合失調症や認知症などの精神疾患の発症に深く関わっていることから［5］、社会的にも重要な研究分野である。スパイン形成に必要なタンパク質の発現量が、分解によってどの様に制御されるかは不明な点が多い。そこで、スパイン形成におけるユビキチン化の役割を研究することにした。知的障害を伴う全身の発達障害である Kaufman oculocerebrofacial syndrome（KOS）の原因遺伝子で E3 リガーゼをコードする遺伝子 *Ube3B* の機能を分子レベルで明らかにした［6］。本研究では、*Ube3B* bcKO を形態学的に深く解析する目的で超解像 STED 顕微鏡を使って発達中の神経細胞の細胞骨格を脳組織内で観察することに成功し［7］、ユビキチン化の神経細胞発達における機能を総説として発表した［8，9］（図 1）。

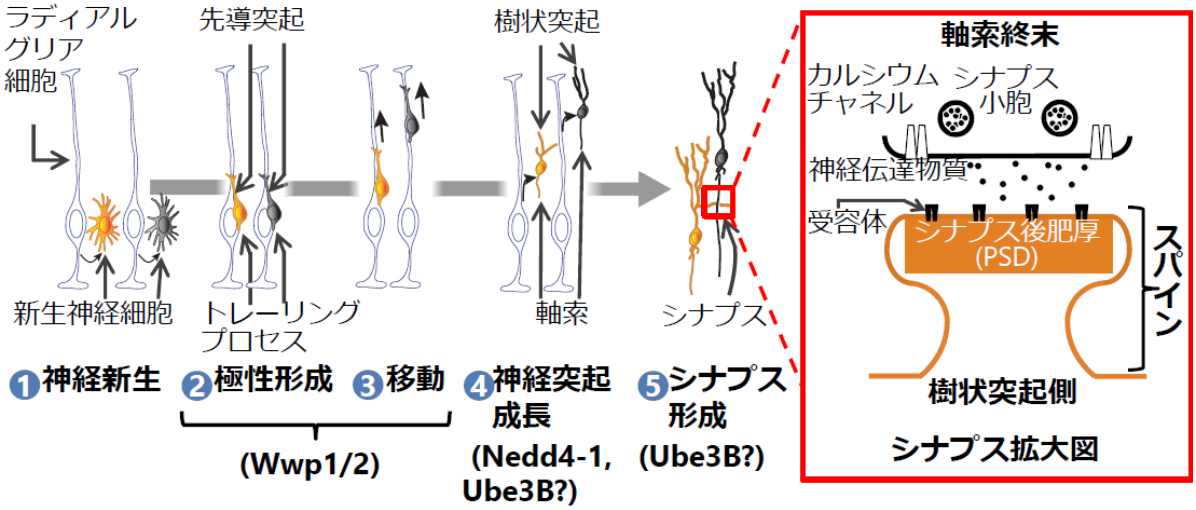


図 1. 神経細胞の発達過程とシナプスの構造
神経細胞は 5 つのステップと経て発達する。1 番目以外のステップで別の E3 リガーゼが個々に固有な役割を果たすことを我々は明らかにしてきた。

*現在の所属：群馬大学 大学院医学系研究科 薬理学分野

方法および結果

Western blotting で Ube3B に対して特異的な抗体を使って細胞内分画法で精製したシナプス後肥厚（PSD）内の Ube3B タンパク質を検出した結果、Ube3B は PSD に極度に濃縮していることが明らかになった。このことから Ube3B が PSD で特異的な基質を認識してユビキチン化していると考えられた。そこで、脳特異的 *Ube3B* 条件付き欠損マウス（*Ube3B*bcKO）から生化学的に精製したシナプス画分で、野生型マウスから調製したシナプス画分と比較して発現量が増加しているタンパク質を質量分析でスクリーニングした。その結果、カルシウム・カルモジュリン依存的セリン／スレオニン脱リン酸化酵素 Calcineurin の触媒サブユニットである Ppp3cc を同定した。そこで、本研究では Ube3B によるユビキチン化を生化学的に性状解析した。その結果、プロテアソームに認識されるユビキチンの 48 番目のリジン残基を介して連結したポリユビキチン鎖（K48 鎖）を Ube3B が合成する活性があることを明らかにした（図 2）。この結果から、*Ube3B*bcKO では Ppp3cc がユビキチン化されず、プロテアソームで分解されないために発現量が上がっていると結論した。

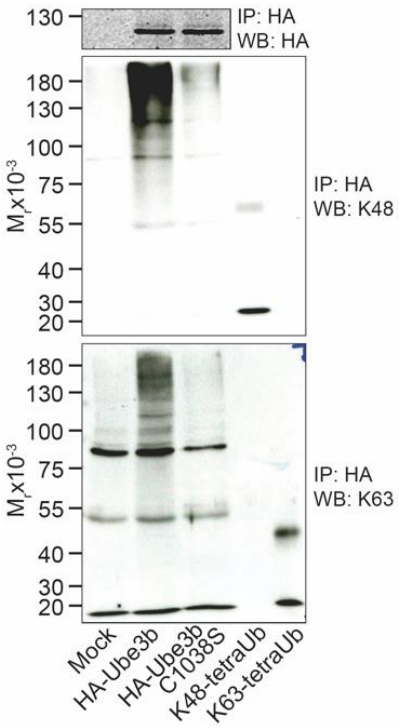


図2. Ube3BによるK48鎖とK63鎖の合成

HEK293FT細胞にHA-タグの融合したUbe3Bと酵素活性がないC1038Sを発現させた。その後、HA抗体でこれらのリコンビナントHA-Ube3Bを免疫沈降して、抗K48鎖抗体（中段）と抗K63鎖抗体（下段）でWestern blottingを行った。その結果、HA-Ube3BがK48鎖と抗K63鎖を合成する活性があることが明らかになった。

超解像 STED 顕微鏡を使って *Ube3B* bcKO を形態学的に解析した結果、*Ube3B* bcKO の神経細胞ではスパイン数が増加してスパインヘッドが拡大していることが明らかになった。*Ube3B* bcKO の神経細胞では樹状突起の分岐が減少していることも明らかになった。スパイン数の増加と樹状突起分岐の減少に関して Ppp3cc の発現量増加が原因になっている可能性が考えられた。この可能性を検討する目的で、野生型マウスの神経細胞に Ppp3cc のリコンビナントタンパク質を過剰発現させたところ、*Ube3B*bcKO とほぼ同じ表現型を示した。これらの機能的実験の結果から、Ube3B による Ppp3cc のユビキチン化はシナプス形成を抑えて樹状突起の分岐進展を促進すると結論した。この研究成果を発

展させるために、超解像 STED 顕微鏡を応用してこのユビキチン化が樹状突起のアクチン細胞骨格をどのように制御するか観察する実験系を立ち上げた。すでに報告されているように、超解像 STED 顕微鏡を使うことで、培養神経細胞の樹状突起に沿って等間隔で F-アクチンと F-アクチン結合タンパク質であるスペクトリンの規則正しい周期的な繰り返し構造が観察された（図 3A）［10 の追試］。さらに、組織内でも類似の構造を観察することに成功した（図 3B）［7］。今後は *Ube3B* bcKO の神経細胞でこれらの周期的な繰り返し構造がどのように変化するか観察する。カルシニューリンの活性が、樹状突起の分岐進展にどのように重要か明らかにする目的でカルシニューリンの活性を薬理学的に阻害して、樹状突起の分岐がどのように変化するか、そして F-アクチンとスペクトリンの規則正しい周期的な繰り返し構造がどのように変化するかも明らかにしていきたい。さらに超解像 STED 顕微鏡を使うことで、培養神経細胞の樹状突起の先端の微小管の微細構造もはっきりと観察できる系が完成した（図 4）。この実験系を応用して、*Ube3B*bcKO マウスから調製した培養神経細胞とリコンビナント Ppp3cc タンパク質を過剰発現した野生型培養神経細胞内の微小管の微細形態も観察していく。

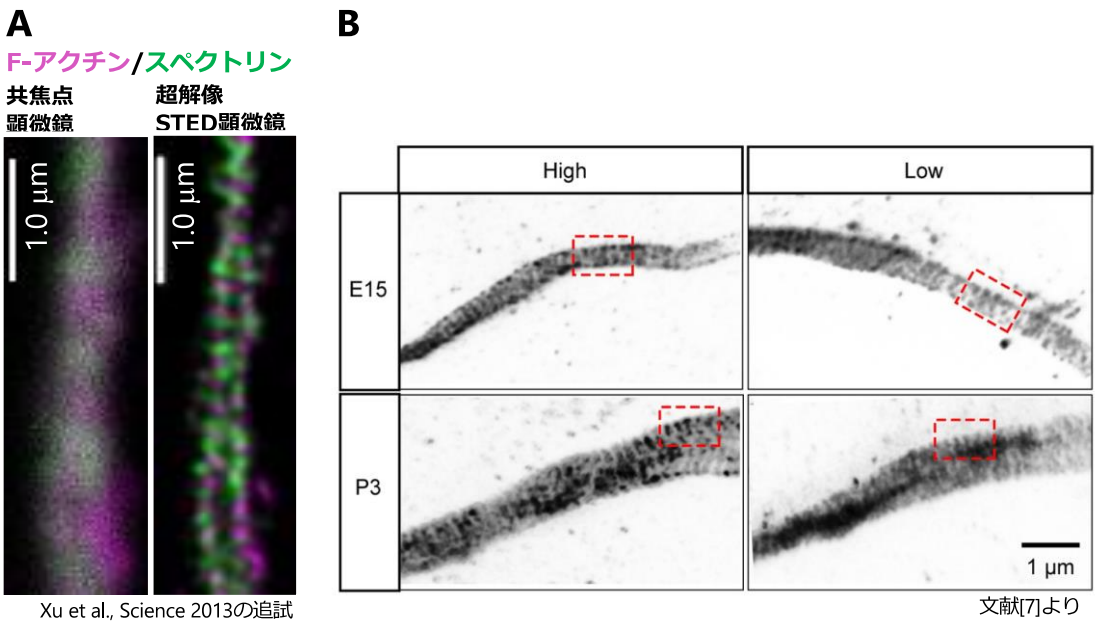


図3. 超解像STED顕微鏡による細胞骨格の観察

A） 初代培養神経細胞を化学固定後、F-アクチンとF-アクチン結合タンパク質であるスペクトリンを染色した。超解像STED顕微鏡を使った場合のみF-アクチンとスペクトリンが周期的構造をとることがわかる。この染色法と顕微鏡を*Ube3B*bcKOマウスの解析に用いる。スケールバー：1μm。

B） 聴覚に重要な蝸牛神経核の高波長認識部位（High）と低波長認識部位（Low）における細胞骨格構成タンパク質であるアンキリンGの観察結果。周期的構造が観察できた。スケールバー：1μm。

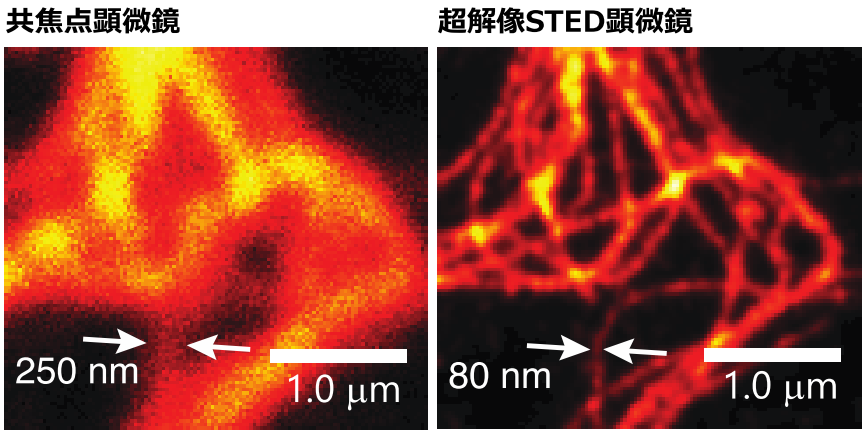


図4. 超解像STED顕微鏡による微小管の観察

初代培養神経細胞を化学固定後、微小管構成タンパク質であるα-Tubulinを染色した。超解像STED顕微鏡を使った場合（右）、一本一本の微小管の構造を分離できる。この染色法と顕微鏡を*Ube3B* bcKOマウスの解析に用いる。スケールバー：1μm。

考　察

本研究の成果からKOSの原因遺伝子である*Ube3B*の神経細胞における機能がさらに明らかになりつつある。この成果は、発達障害の病態の理解に大きく貢献するものであり、今後の小児科領域と精神科領域と基礎医学研究の橋渡し研究のさきがけになると考えられる。また、国内の神経科学研究では超解像顕微鏡技術はあまり取り入れられておらず、今回確立した細胞骨格とシナプスのイメージング法は今後の国内の神経科学研究の発達に大きく貢献すると期待できる。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、ドイツ・ベルリンのシャリテ医科大学細胞生物学・解剖学研究所のMateusz Ambrozkiewicz、Ekaterina Borisova、Theres Schaub、Alina Smorodchenko、A. Ioana Weber、Susanne Mueller、Stephen T. Horan、Marta Rosário、Philipp Boehm-Sturm、そしてVictor Tarabykin、ドイツ・ウルムのウルム大学のRüstem YilmazとGuntram Borck、イスラエル・テルアビブのテルアビブ大学のRachel Straussberg、カタール・ドーハのカタール大学のSami Zaqout、そしてドイツ・ゲッチンゲンのマックスプランク実験医学研究所のManuela Schwark、Silvia Ripamonti、Hong Jun Rhee、Bekir Altas、Lars Piepkorn、Olaf Jahn、Ekrem Dere、Katrin I. Willig、そしてJeongSeop Rheeとの共同研究である。

最後に、助成期間内に群馬大学医学部薬理学講座に着任しましたが、研究室の立ち上げという重要な時期に助成していただいた公益財団法人上原記念生命科学財団と財団関係者の皆様には心より御礼申し上げます。

文　献

1） Ambrozkiewicz MC, Schwark M, Kishimoto-Suga M, Borisova E, Hori K, Salazar-Lázaro A, Rusanova A, Altas B, Piepkorn L, Bessa P, Schaub T, Zhang X, Rabe T, Ripamonti S, Rosário M, Akiyama H, Jahn O, Kobayashi T, Hoshino M, Tarabykin V, Kawabe H. Polarity acquisition in cortical neurons is driven by synergistic action of Sox9-regulated Wwp1 and Wwp2 E3 ubiquitin ligases and intronic miR-140. Neuron. 2018 Dec 5;100(5):1097-1115.e15. Epub 2018 Nov 1. PMID: 30392800 doi: 10.1016/j.neuron.2018.10.008.

2) Kawabe H, Neeb A, Dimova K, Young SM Jr, Takeda M, Katsurabayashi S, Mitkovski M, Malakhova OA, Zhang DE, Umikawa M, Kariya K, Goebbels S, Nave KA, Rosenmund C, Jahn O, Rhee J, Brose N. Neuron. 2010 Feb 11;65(3):358-72. PMID: 20159449 doi: 10.1016/j.neuron.2010.01.007.
3) Hsia HE, Kumar R, Luca R, Takeda M, Courchet J, Nakashima J, Wu S, Goebbels S, An W, Eickholt BJ, Polleux F, Rotin D, Wu H, Rossner MJ, Bagni C, Rhee JS, Brose N, Kawabe H. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014 Sep 9;111(36):13205-10. Epub 2014 Aug 25. PMID: 25157163 doi: 10.1073/pnas.1400737111.
4) Kasai H, Fukuda M, Watanabe S, Hayashi-Takagi A, Noguchi J. Trends Neurosci. 2010 Mar;33(3):121-9. PMID: 20138375 doi: 10.1016/j.tins.2010.01.001.
5) Forrest MP, Parnell E, Penzes P. Nat Rev Neurosci. 2018 Mar 16;19(4):215-234. PMID: 29545546 doi: 10.1038/nrn.2018.16.
6) Ambrozkiewicz MC, Borisova E, Schwark M, Ripamonti S, Schaub T, Smorodchenko A, Weber AI, Rhee HJ, Altas B, Yilmaz R, Mueller S, Piepkorn L, Horan ST, Straussberg R, Zaqout S, Jahn O, Dere E, Rosário M, Boehm-Sturm P, Borck G, Willig KI, Rhee J, Tarabykin V, Kawabe H. Mol Psychiatry. 2020 Apr 6. PMID: 32249816 doi: 10.1038/s41380-020-0714-8.
7) Akter N, Fukaya R, Adachi R, Kawabe H, Kuba H. J Neurosci. 2020 Aug 26;40(35):6709-6721. Epub 2020 Jul 27. PMID: 32719016 doi: 10.1523/JNEUROSCI.3068-19.2020.
8) Ambrozkiewicz MC, Cuthill KJ, Harnett D, Kawabe H, Tarabykin V. Cells. 2020 Nov 10;9(11):2455. PMID: 33182779 doi: 10.3390/cells9112455.
9) Kawabe H, Stegmüller J. Mol Cell Neurosci. 2021 Feb 11;112:103602doi: 10.1016/j.mcn.2021.103602. PMID: 33581237 doi: 10.1016/j.mcn.2021.103602.
10) Xu K, Zhong G, Zhuang X. Science. 2013 Jan 25;339(6118):452-6. Epub 2012 Dec 13. PMID: 23239625 doi: 10.1126/science.1232251.