

AMCoR

Asahikawa Medical University Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

北海道医学雑誌 (2011.8) 86(4-5):219-223.

ユビキチンC末端水解酵素1型(UCH L1)に相互作用するタンパク質の検
索

滝沢 修一

論著の種類：学位論文

表題：ユビキチンC末端水解酵素1型(UCH L1)に相互作用するタンパク質の検索

著者：滝沢修一

所属機関：旭川医科大学大学院医学研究科 生体情報調節系 情動科学部門（精神医学講座）[主任：千葉茂教授]

現所属機関：医療法人社団 旭川圭泉会病院

原稿総頁数：13頁

図および表の総数：1枚

連絡者氏名宛先・電話番号・FAX番号・電子メールアドレス：

〒078-8208 北海道旭川市東旭川町下兵村252

医療法人社団 旭川圭泉会病院

精神科 滝沢 修一

電話：0166-36-1559（代表）

FAX：0166-36-4193

メールアドレス：takizawa@bg8.so-net.ne.jp

【学位論文】

題名

ユビキチン C 末端水解酵素 1 型 (UCH L1) に相互作用するタンパク質
の検索

短縮題名

UCH L1 に相互作用するタンパク質

著者名

滝沢修一

旭川医科大学大学院医学研究科 生体情報調節系 情動科学部門

[主任：千葉茂教授]

1. 緒言

ユビキチン (Ub) は 76 個のアミノ酸からなる低分子量タンパク質である。Ub は細胞周期制御，細胞成熟，細胞死，シグナル伝達，膜タンパク質制御，シナプスの成長など，細胞の様々な過程において重要な役割を果たしている^{1) 2)}。Ub は基質タンパク質のリジン残基と共有結合を形成し，Ub 自身のリジン残基に Ub が結合した場合はポリ Ub 鎖を形成する。Ub は翻訳後修飾因子としても機能し³⁾，Ub の Lys48 を介して形成されたポリ Ub 鎖により修飾された基質タンパク質は一般的に 26S プロテオソームにおいて分解される¹⁾。一方，単量体 Ub はアミノ酸配列中にライソゾーム内部移行シグナルを持つ。このため単量体

Ubによる修飾は、膜タンパク質の選別シグナルとして機能し、この修飾を受けた基質膜タンパク質はエンドソーム経路やライソゾーム経路により分解される⁴⁾。基質タンパク質へのUbの結合、すなわちUb化の過程はUb活性化酵素(E1)、Ub結合酵素(E2)、Ubリガーゼ(E3)の3群の酵素群により行われる⁵⁾。Ub化は可逆的な反応であり、チオール蛋白質分解酵素である脱Ub化酵素(deubiquitinating enzymes; DUBs)は、UbのC末端のGly76と基質の間で形成されている共有結合を切断する。DUBsの機能としては、Ub前駆体タンパク質から単量体Ubの切り出し、UbのC末端に結合した低分子のトリミングによる利用可能な単量体Ubの再生、ユビキチン鎖伸展の監視、Ub化された基質からのUb修飾解消などが考えられている。DUBsはその基質特異性から、ユビキチンC末端水解酵素(Ub C-terminal hydrolase; UCHs)とユビキチン特異的蛋白分解酵素(Ub-specific protease; UBPs)に分類される。UCHsは*in vitro*においてUbのC末端に結合した低分子や変性したポリペプチドをUbのC末端から切り離す作用を有し、加えてUBPsではポリUb鎖や基質タンパク質などを未変性の状態においてもUbのC末端との間で形成されたイソペプチド結合をも切断する³⁾。

ほ乳類ではUCHsはその局在する細胞・組織により細分類される。UCH L1とUCH L3はともに約220アミノ酸から成る低分子量タンパク質であり、細胞質と核の両方に局在する⁶⁾。UCH L3は全種類の細胞に発現しているが、UCH L1は神経細胞と精巣/卵巣にのみ発現している⁷⁾。UCH L1は脳において最も豊富に存在するタンパク質であり、脳可溶性タンパク質の総量の1~5%を占める⁸⁾。UCH L3はUbと低分子ペプチドの間で形成された共有結合を切断するが、UCH L1は10アミノ酸以上から成る未変性ペプチドをUbのC末端から切り離すことは出来ず、UCH L1はUCH L3に比べ基質特異性が高い⁹⁾。しかし、両者の生化学的性質の差の基盤については不明のままである。UCH L1はアルツハイマー病患者脳のアミロイド斑やパーキンソン病患者脳のリヴィ小体等の細胞内凝集体に存在することから、UCHsと神経変性疾患との関連が注目されていた⁷⁾。興味深いことに、ドイツのパーキンソン病の一家

系において、UCH L1 の 93 番目のアミノ酸の変異（イソロイシン→メチオニン）が報告されている¹⁰⁾。また、薄束核ジストロフィーマウス（gracile axonal dystrophy mouse ; *gad*マウス）において *Uchl1* の部分欠失による null mutant が報告されている¹¹⁾。このように、UCH L1 は神経変性疾患において重要な役割を演じていることが示唆されていた。近年、Yichin Liu らは UCH L1 二量体が E3 活性を有することを報告した¹²⁾。また、我々のグループは UCH L1 が Ub と結合して神経系における Ub レベルの調整に重要な役割を果たしていることを報告した¹³⁾。

UCH L1 の機能をさらに理解するために、UCH L1 と相互作用するタンパク質を検索することは有意義であると考えられた。現在まで、UCH L1 と相互作用するタンパク質として Ub¹³⁾、JAB1 および p27^{Kip1}¹⁴⁾ が報告されているのみである。そこで今回、著者はペプチドマッピングを用い UCH L1 と相互作用するタンパク質を検索したのでここに報告する。

2. 材料と方法

N 末端 6×ヒスチジンタグ付き UCH L1 タンパク質 (6His-UCH L1) の cDNA クローニングおよび大腸菌発現系。

UCH L1 をコードする cDNA 断片は、マウス脳 cDNA ライブラリから PCR 法を用いた増幅により得た。PCR 法には、*Pfu* Turbo DNAPolymerase (Stratagene)、*Sph* I サイトを含むセンスプライマー (5' -ACATGCATGCCAGCTGAAGCCGATGGAGATT-3')、および *Hind* III サイトを含むアンチセンスプライマー (5' -CCCAAGCTTAGCTGCTTTGCAGAGAGC-3') を用いた。得られた PCR 産物を *Sph* I と *Hind* III で切断し、pQE-30 vector (Invitrogen™ life technologies) の *Sph* I-*Hind* III サイトに挿入して得たベクターは、*N* 末端 6×ヒスチジンタグ付き UCH L1 タンパク質 (6His-UCH L1) をコードしており、これを用いて M15 大腸菌株を形質転換した。大腸菌に

発現した 6His-UCH L1 を，Ni-NTA Agarose (Qiagen) を用いたアフィニティー精製の後，Superdex™ 75 pg (Amersham Pharmacia Biotech) を用いてゲル濾過精製した．いずれの精製段階も未変性条件下で行った．ゲル濾過精製後の 6His-UCH L1 タンパク質は，SDS-PAGE 後の CBB 染色でシングルバンドとして認識され，そのバンドは抗 UCH L1 抗体を用いたウエスタンブロッティングにおいてもシングルバンドとして認識された¹³⁾．

アフィニティークロマトグラフィー

全ての操作は，4 °C にて行った．

10 匹分のマウス脳を 25 ml の溶解バッファー (50 mM NaH₂PO₄ / 300 mM NaCl / 10 mM イミダゾール / タンパク質分解酵素阻害剤カクテル，pH 8) 中でホモジェナイズし，Avanti™ J-25 Centrifuge (Beckmann) と JA-12 rotor (Beckmann) を用いて 1000×g，60 分間遠心の後，得られた上清を細胞質分画とした．沈殿は 25mL の核分核抽出バッファー (400mM NaCl / 10% NP-40 / タンパク質分解酵素阻害剤カクテル，pH 8) で再懸濁され，16000×g，15 分間遠心したのち得られた上清を得た．この上清を Superdex™ 75 pg を用いて溶解バッファーにバッファー置換し，これを核分画とした．

1 ml の NHS-activated Sepharose™ 4 FastFlow (Amersham Pharmacia Biotech) に，製品マニュアルに沿って 1 mg の 6His-UCH L1 を結合させ，UCH L1 結合カラムを作成した．容量 5 ml の UCH L1 結合カラムに総タンパク質量 200 mg 相当の細胞質分画もしくは核分画を加え，1 時間のインキュベーションの後，このカラムを 15 ml の洗浄バッファー (50 mM NaH₂PO₄ / 300 mM NaCl / 20 mM イミダゾール，pH 8) で 2 回洗浄し，20 ml の溶出バッファー (50 mM NaH₂PO₄ / 300 mM NaCl / 250 mM イミダゾール) で溶出液を得た．溶出液は Centricon^R Plus-20 (amicon) を用い，4000×g，30 分間で限外濾過濃縮した後，SDS-PAGE で分離した．

SDS-PAGE, ペプチドマッピング, western blotting

SDS-PAGE は 15 %グラジエントゲル (日京テクノス) を用い, 既出の方法¹¹⁾で行われた. SDS-PAGE ののち CBB 染色後, 顕著なバンドを切り出し, trypsin (Sigma) を用いてゲル内消化を行った¹⁵⁾. 消化後のペプチド断片はナノスプレー-QSTAR Pulsar LC/MS/MS システムを用いた飛行時間質量スペクトロメトリー (TOF mass spectrometry) により同定された.

3. 結果

UCH L1 は GAPDH, CNPase, MBP, α 1-tubulin と結合する.

UCH L1 タンパク質と結合し相互作用するタンパク質を明らかにする目的で, 6His-UCH L1 結合カラムを用いたアフィニティクロマトグラフィーの後, ペプチドマッピングを行った (図 1).

細胞質分画 22kDa 付近のバンド①A から DSHTRTTHYGSLPQK, NIVTPRTPPPSQGK, GAYDAQGTLISK および SQHGRTQDENPVVHFFK のペプチド断片が, 細胞質分画 18kDa 付近のバンド①B から DSHTRTTHYGSLPQKSQHGRTQDENPVVHFFKNIVTPRTPPPSQGK, GAYDAQGTLISK および LGGRDSRSGSPMARRA のペプチド断片が, 細胞質分画 17kDa 付近のバンド①C から DSHTRTTHYGSLPQK, NIVTPRTPPPSQGK および SQHGRTQDENPVVHFFK のペプチド断片が得られた. 核分画 22kDa 付近のバンド①D から LGGRDSRSGSPMARR, DSHTRTTHYGSLPQK, NIVTPRTPPPSQGK, GAYDAQGTLISK および SQHGRTQDENPVVHFFK のペプチド断片が, 核分画 18kDa 付近のバンド①E から NIVTPRTPPPSQGK および SQHGRTQDENPVVHFFK のペプチド断片が, 核分画 17 kDa 付近のバンド①F から DSHTRTTHYGSLPQK および NIVTPRTPPPSQGK のペプチド断片が得られた. これら①A~①F は myelin basic protein (MBP) に 100%一致した. 核分画 40kDa 付近のバンド②からは SHTFLPK, STLARLILEK, MVSADAYKIIPGSRADFSEAYK, NQWQLSADDLKK, AGQVFLEELGNHK, ELRHFISGDEPK, LELVSYFGK, AAGAEYYAQQEVVK, LSISALFVTPK, GGSQGEAVGELPRGK および

AIFTGYYGKGPVPIHGSRK のペプチド断片が得られ、これらは 2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNPase)に 100%一致した。核分画 45kDa 付近のバンド③からは FNGTVKAENGLVINGKPITIFQERDPTNIK, RVIIS APSADAPMFVMGVNHEKYDNSLK および QASEGPLK のペプチド断片が得られ、これらは glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)に 100%一致した。核分画 50kDa 付近のバンド④からは TIGGGDDSFNTFFSETGAGK, EDAA NNYARGHYTIGKEIIDLVLDRIK, DVNAAIATIK および VGINYQPPTVPPGGDLAK のペプチド断片が得られ、これらは α 1-tubulinに 100%一致した。

なお、UCH-L1 結合タンパク質として既知の分子ユビキチンが先行報告¹³⁾と同様に UCH-L1 アフィニティークロマトグラフィーで得られることを、抗ユビキチン抗体を用いた western blotting にて確認した(図 1)。また、UCH-L1 タンパク質未結合 NHS-activated Sepharose™ 4 FastFlow カラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーでは、溶出サンプル中に前述のバンド①A, ①B, ①C, ①D, ①E, ①F, ②, ③, ④が認められないことを確認した(図 1)。

現在、我々はこれらの候補タンパク質と UCH L1 の相互作用に関してさらに研究中である。

4. 考察

著者は本論文で UCH L1 が Ub, JAB1 および p27kip1 以外のタンパク質と結合し相互作用する可能性を指摘した。著者の実験結果から MBP, α 1-tubulin, GAPDH, CNPase が候補タンパク質として挙げられた。現時点においてはこれら候補タンパク質と UCH L1 の結合・相互作用に関して、有力な証拠は得られていない。しかし、これら候補タンパク質はいずれも神経変性・髄鞘形成に重要であり、*gad* マウスの病態を考える上でも興味深い。GAPDH は解糖系酵素であるだけでなく、DNA 修復機構に関与するほか、ハンチントン舞踏病の原因遺伝子 *huntingtin*

の遺伝子産物と結合することが知られている。また最近，GAPDH が神経細胞・非神経細胞の細胞死機構に影響を与えることが報告された¹⁶⁾。CNPase と MBP はミエリン構造を形成しているグリア細胞の細胞膜直下に豊富に存在しており，CNPase は MBP をミエリン構造に固定する働きがあると報告されている¹⁷⁾。UCH L1 は神経細胞特異的マーカーであるため，通常，グリア細胞系マーカーである MBP および CNPase と同一細胞内で発現することはない。しかし，座骨神経軸索切断によるワーラー変性下では UCH L1 がシュワン細胞に一過性に発現することが報告されているため¹⁸⁾，特殊な条件下では MBP および CNPase と UCH L1 が同一細胞内で相互作用する可能性は否定しきれない。さらに α 1-tubulin は細胞骨格の微小管構造の主要構成タンパク質であり，プロテアソーム阻害剤の MG132 存在下では UCH L1 を含む凝集体の周囲を取り囲むように α -tubulin が局在することが報告されている¹⁸⁾。これら UCH L1 相互作用候補タンパク質は，UCH L1 が関わる神経細胞における生化学的・細胞学的な過程を研究する上で，興味深い存在であると考えられる。

5. 結語

本研究により，UCH L1 は MBP， α 1-tubulin，GAPDH，CNPase と結合・相互作用をすることが示唆された。

6. 謝辞

本研究のご指導を頂いた国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第四部部長 和田圭司先生，同部 小坂仁先生，同部 王玉来先生，ならびに旭川医科大学医学部精神医学講座教授 千葉茂先生に心から感謝申し上げます。なお，本研究で用いた UCH L1 発現プラスミド，

adeno-UCH L1, および抗 UCH L1 抗体は国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第四部から提供を頂きました。

7. 文献

- 1 Hershko A & Ciechanover A. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 1998; **67**: 425-479.
- 2 DiAntonio A, Haghighi AP, Portman SL, Lee JD, Amaranto AM, Goodman CS. Ubiquitination-dependent mechanisms regulate synaptic growth and function. *Nature* 2001; **412**:449-452.
- 3 Wilkinson KD. Ubiquitination and deubiquitination: targeting of proteins for degradation by the proteasome. *Semin Cell Dev Biol* 2000; **11**:141-148.
- 4 Nakatsu F, Sakuma M, Matsuo Y, Arase H, Yamasaki S, Nakamura N, Saito T, Ohno H. A Di-leucine signal in the ubiquitin moiety. Possible involvement in ubiquitination-mediated endocytosis. *J Biol Chem* 2000; **275**: 26213-26219.
- 5 Attaix D, Combaret L, Pouch MN, Taillandier D. Regulation of proteolysis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2001; **4**: 45-49.
- 6 Fraile B, Martin R, De Miguel MP, Arenas MI, Bethencourt FR, Peinado F, Paniagua R, Santamaria L. Light and electron microscopic immunohistochemical localization of protein gene product 9.5 and ubiquitin immunoreactivities in the human epididymis and vas deferens. *Biol Reprod* 1996; **55**:291-297.
- 7 Lowe J, McDermott H, Landon M, Mayer RJ, Wilkinson KD. Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase (PGP 9.5) is selectively present in ubiquitinated inclusion bodies characteristic of human neurodegenerative diseases. *J Pathol*

- 1990; **161**:153-160.
- 8 Day IN, Thompson RJ. Molecular cloning of cDNA coding for human PGP 9.5 protein. A novel cytoplasmic marker for neurons and neuroendocrine cells. FEBS Lett 1987; **210**:157-160.
- 9 Wilkinson KD, Deshpande S, Larsen CN. Comparisons of neuronal (PGP 9.5) and non-neuronal ubiquitin C-terminal hydrolases. Biochem Soc Trans 1992; **20**: 20:631-637.
- 1 0 Leroy E, Boyer R, Auburger G, Leube B, Ulm G, Mezey E, Harta G, Brownstein MJ, Jonnalagada S, Chernova T, Dehejia A, Lavedan C, Gasser T, Steinbach PJ, Wilkinson KD, Polymeropoulos MH. The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. Nature 1998; **395**:451-452.
- 1 1 Saigoh K, Wang YL, Suh JG, Yamanishi T, Sakai Y, Kiyosawa H, Harada T, Ichihara N, Wakana S, Kikuchi T, Wada K. Intragenic deletion in the gene encoding ubiquitin carboxy-terminal hydrolase in gad mice. Nat Genet 1999; **23**: 47-51.
- 1 2 Liu Y, Fallon L, Lashuel HA, Liu Z, Lansbury PT Jr. The UCH L1 gene encodes two opposing enzymatic activities that affect alpha-synuclein degradation and Parkinson's disease susceptibility. Cell 2002; **111**: 209-218
- 1 3 Osaka H, Wang YL, Takada K, Takizawa S, Setsuie R, Li H, Sato Y, Nishikawa K, Sun YJ, Sakurai M, Harada T, Hara Y, Kimura I, Chiba S, Namikawa K, Kiyama H, Noda M, Aoki S, Wada K. Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 binds to and stabilizes monoubiquitin in neuron. Hum Mol Genet 2003; **12**:1945-1958.
- 1 4 Caballero OL, Resto V, Patturajan M, Meerzaman D, Guo MZ, Engles J, Yochem R, Ratovitski E, Sidransky D, Jen J. Interaction and colocalization of PGP9.5 with JAB1 and p27^{Kip1}. Oncogene 2002; **21**:3003-3010.

- 1 5 Jensen ON, Houthaeve T, Shevchenko A, Cudmore S, Ashford T, Mann M, Griffiths G, Krijnse Locker J. Identification of the major membrane and core proteins of vaccinia virus by two-dimensional electrophoresis. *J Virol* 1996; **70**:7485-7497.
- 1 6 Sawa A, Khan AA, Hester LD, Snyder SH. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: Nuclear translocation participates in neuronal and nonneuronal cell death. *Proc Natl Acad Sci* 1997; **94**:11669-11674.
- 1 7 Yin X, Peterson J, Gravel M, Braun PE, Trapp BD. CNP overexpression induces aberrant oligodendrocyte membranes and inhibits MBP accumulation and myelin compaction. *J Neurosci Res* 1997; **50**:238-247.
- 1 8 Lin WM, Hsieh ST, Huang IT, Griffin JW, Chen WP. Ultrastructural localization and regulation of protein gene product 9.5. *Neuroreport* 1997; **8**:2999-3004.

図表解説

図 1. UCH L1 アフィニティーカラムによるペプチドマッピング.

- (a) マウス脳より得られた細胞質分画および核分画は，UCH L1 結合カラム [UCH L1(+)] と混合された．ネガティブコントロールとして UCH-L1 未結合カラム [UCH L1(-)] を用いられた．イミダゾールにより得られた溶出液は SDS-PAGE により分離され，CBB 染色された．ネガティブコントロール [UCH L1(-)] では認められず，UCH L1 結合カラム [UCH L1(+)] に特異的なバンド①A, ①B, ①C, ①D, ①E, ①F, ②, ③, ④を切り出し，トリプシンでゲル内消化され，LC/MS で分析された．また，溶出液中に既知の UCH L1 結合タンパク質ユビキチン (Ub) が存在することを，抗 Ub 抗体を用いた immunoblot で示した．
- (b) LC/MS の結果．得られたペプチド断片 (グレー) より，バンド①A~①F は myelin basic protein (MBP)，バンド②は 2', 3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNPase)，バンド③ は glyceraldehyde-3-phosphatase dehydrogenase (GAPDH)，バンド④は α 1-tubulin と同定された．

図 1.

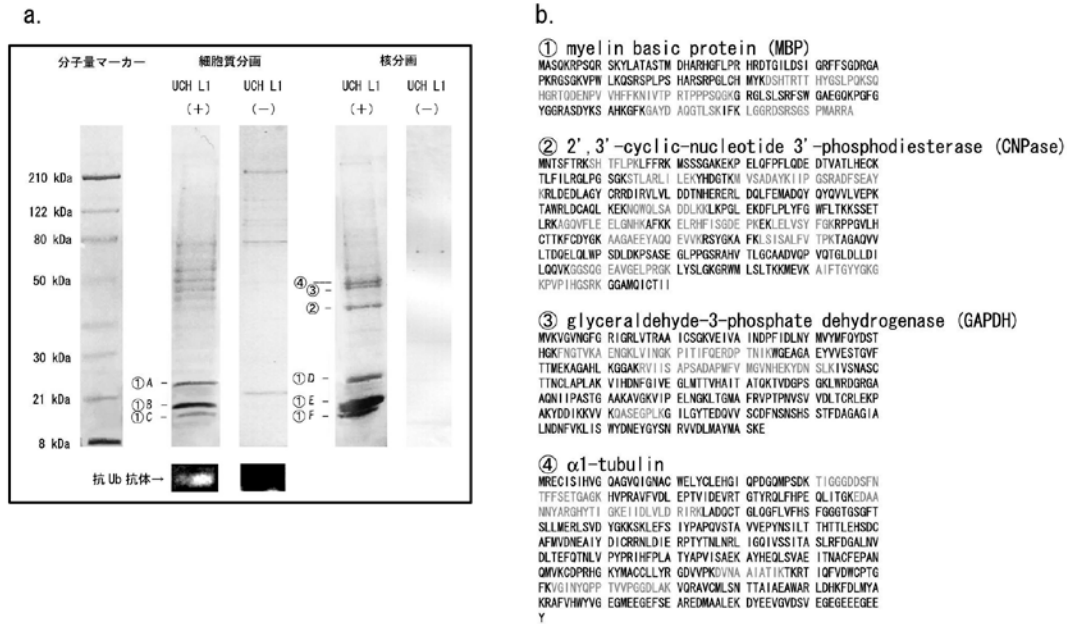


図 1, 滝沢修一