

2023年度（第48回）學術研究振興資金 學術研究報告

学 校 名	順 天 堂 大 学	研究所名等	
研 究 課 題	UFM1システムが駆動する小胞体ホメオスターシス:その破綻と遺伝性脳症—UFM1システムの包括的研究—		研 究 分 野 医 学
キ ー ワ ー ド	①UFM1 ②小胞体 ③リボソーム関連品質管理 ④オートファジー ⑤遺伝性小児脳症		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
小 松 雅 明	順 天 堂 大 学 大 学 院 医 学 系 研 究 科	主 任 教 授	研究統括、分子細胞生物学の解析、マウス遺伝学の解析

○研究分担者

[illegible]

UFM1 システムが駆動する小胞体ホメオスタシス：その破綻と 遺伝性脳症－UFM1 システムの包括的研究－

1. 研究の目的

(1) 研究代表者は、ゲノム上に残された最後のユビキチン様修飾系 Ubiquitin-Fold Modifier 1 (UFM1) システムの同定に成功した (EMBO J 2004 など)。UFM1 は、合成直後にシステインプロテアーゼである UFSP1, 2 により C 末端を切断されグリシン残基が露出した成熟型となる。成熟型 UFM1 は、UFM1 特異的 E1 酵素である UBA5 と高エネルギーチオエステル結合を形成し、活性化される。活性化 UFM1 は、UFM1 特異的 E2 酵素である UFC1 に転移され、最終的に小胞体に局在する E3 酵素 UFL1-UFBP1-CDK5RAP3 複合体を介して標的タンパク質に共有結合される (UFM1 化)。UFM1 化は可逆的であり、小胞体に局在する UFSP2 により基質と結合した UFM1 は切断される。UFM1 システムは、原生動物から高等動植物に至るまで真核生物に広く保存されており、その生物学的重要性が示唆されてきた。事実、代表者らはマウス遺伝学的解析により世界に先駆けて UFM1 システムが神経発生・脳形成に不可欠であること (Nat Commun 2011, Am J Hum Genet 2016) や、小児てんかん性脳症患者の遺伝子解析から UFM1、UBA5、UFC1 をコードする遺伝子変異が UFM1 化の減弱を伴った遺伝性小児脳症をきたすこと (Am J Hum Genet 2016, Brain 2019 など) を見出した。最近、小胞体上でリボソームタンパク質 RPL26 が UFM1 化されること、そして RPL26 の UFM1 化が小胞体上で合成がストールした新生ペプチドの分解 (小胞体におけるリボソーム関連品質管理機構: ER-RQC) に関与することが判明した (Walczak et al., PNAS 2019, Wang et al., Cell Res 2019, Cell Rep 2023)。しかし、UFM1 システムが小胞体上の異なる細胞機能を制御するメカニズムはほとんど不明であり、UFM1 システムの異常が関与する遺伝性小児脳症発症機構の解明は全くの手付かず状態である。本研究では、以下の課題に取り組む。

- ①人工知能プログラムAlphaFold2による構造予測を基盤にUFM1化、脱UFM1化の分子メカニズムと小胞体におけるUFM1システムの役割を明らかにする。
- ②作製中あるいは作製済みの遺伝子改変マウスを駆使し、UFM1システムの個体における生理機能を明らかにする。
- ③遺伝性脳症発症を引き起こすUFM1システムの遺伝子変異がUFM1システムのER-RQCに影響を与えるか否かを明らかにする。

2. 研究の計画

(1) 革新的タンパク質構造計算ツール AlphaFold2 (AF2) (Jumper et al., Nature 2021) による複合体予測の結果、UFC1 (E2)、UFL1 (E3 サブユニット)、UFBP1 (E3 サブユニット)、CDK5RAP3 (E3 調整サブユニット)、UFM1 の 5 者複合体の構造が高い信頼性で予測できた。この 5 者複合体予測をもとに、UFM1 E3 酵素反応系の作動原理を明らかにする。

- ①AF2の複合体予測に基づき各UFM1関連タンパク質間の相互作用に重要なアミノ酸に変異を入れた変異体を作製し、免疫沈降法や*in vitro* pull downによる結合実験を行う。
- ②それらの変異が、既存のUFM1の基質RPL26のUFM1化に与える影響を検証するとともにER-RQCにおける意義を調べる。

(2) 個体における UFM1 システムの病態生理的意義を明らかにするため UFM1 関連因子の遺伝子改変マウスを作製し、表現型を解析する。

- ①RPL26のUFM1化される132、134番目のリジンをそれぞれ、あるいは両方をアルギニンに置換したRPL26^{K132R/K132R}、RPL26^{K134R/K134R}、RPL26^{K132R K134R/K132R K134R}ノックインマウスを作製し、表現型を解析する。
- ②タンパク質からの脱UFM1化を担うUFSP2のCREリコンビナーゼ依存的に活性中心変異型に変換するUFSP2 FLE_xマウス作製し、表現型を解析する。

(3) 遺伝性脳症発症を引き起こす遺伝子変異を持つ患者線維芽細胞より iPS 細胞を作製し、神経細胞への分化能およびER-RQCに異常があるか否かを検証する。

- ①UFC1に変異を有する遺伝性脳症患者皮膚より線維芽細胞を採取し、iPS細胞を作製する。
- ②患者由来iPS細胞と健常者由来のiPS細胞の神経細胞への分化能を検証する。
- ③患者由来と健常者由来iPS細胞から神経細胞に分化させ、ER-RQCに差があるか否かを検証する。

3. 研究の成果

(1) UFM1 E3 酵素反応系の作動原理

- ①各種結合変異体を作製し、AF2による構造予測を免疫沈降、pull-downアッセイにより確認した。
- ②UFM1 E3酵素複合体の意義を解明した。つまり、UFM1 E3酵素であるUFL1と小胞体に局在するUFBP1とが安定に複合体を形成すること、その複合体にCDK5RAP3が結合すると小胞体上で翻訳が停止したリボソームのRPL26にUFM1が連結されることを明らかにした。さらに、このUFM1 E3複合体は、UFBP1に含まれるUFM1結合モチーフを介してUFM1が連結されたRPL26に結合すること、このUFIMを介した結合が小胞体における合成途中のタンパク質分解 (ER-RQC) に必要であることを明らかにした (Sci Adv 2023)。

(2) 個体における UFM1 システムの病態生理的意義

- ①RPL26のUFM1化される132、134番目のリジンをそれぞれ、あるいは両方をアルギニンに置換した *RPL26^{K132R/K132R}*、*RPL26^{K134R/K134R}*、*RPL26^{K132R K134R/K132R K134R}* ノックインマウスを作製した。
- ②UFSP2がCREリコンビナーゼ依存的に活性中心変異型に変換する *UFSP2 FLEx*マウスを作製した。

(3) UFM1 システムの遺伝子変異による遺伝性脳症発症機構の解明

- ①UFC1に変異を有する遺伝性脳症患者皮膚より線維芽細胞を採取し、iPS細胞を作製した。

4. 研究の反省・考察

(1) UFM1 E3 酵素反応系の作動原理

- ①AF2による構造予測により UFM1 E3 酵素複合体と小胞体膜タンパク質との結合を高い精度で予測できた。さらに検証を進める。

(2) 個体における UFM1 システムの病態生理的意義

- ①作製した UFM1 関連遺伝子改変マウスの表現型解析を進める。

(3) UFM1システムの遺伝子変異による遺伝性脳症発症機構

- ①作製したUFC1に変異を持つ遺伝性脳症患者由来iPS細胞を用いた表現型解析を進める。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ①該当なし

(2) 口頭発表

- ①小松雅明「UFM1システムによる翻訳品質管理機構」第二回タンパク質シンポジウム
- ②石村 亮輔、伊藤 壮太、Mao Gaoxin、小松 聡子、稲田 利文、野田 展生、小松 雅明「UFM1 E3リガーゼ複合体によるufmylationと翻訳品質管理機構の制御メカニズムの解明」2023年度日本生化学会関東支部例会
- ③石村 亮輔、能代 大輔、植村 武文、和栗 聡、野田 展生、小松 雅明「UFM1システムはCYB5R3のUfmylationを介してER-phagyを制御する」第75回日本細胞生物学会大会

(3) 出版物

- ①Komatsu M*, Inada T*, Noda NN*. The UFM1 system: Working principles, cellular functions, and pathophysiology. Mol Cell. 2024 Jan 4;84(1):156-169.
- ②Ishimura R, Ito S, Mao G, Komatsu-Hirota S, Inada T*, Noda NN*, Komatsu M*. Mechanistic insights into the roles of the UFM1 E3 ligase complex in ufmylation and ribosome-associated protein quality control. Sci Adv. 2023 Aug 18;9(33):eadh3635.