

氏名	わたなべ やすあき 渡辺 靖章
学位の種類	博士(医学)
学位授与年月日	2020年9月25日
学位授与の条件	学位規則第4条第1項
研究科専攻	東北大学大学院医学系研究科(博士課程)医科学専攻
学位論文題目	SKP1-CUL1-F-box (SCF) 型ユビキチンリガーゼによる筋萎縮性側索硬化症関連タンパク質の量的制御機構
論文審査委員	主査 教授 青木 正志 教授 中山 啓子 教授 堂浦 克美

論文内容要旨

学籍番号: B6MD5164

氏名: 渡辺 靖章

本文:

【背景】ユビキチン・プロテアソーム系は細胞内のタンパク質恒常性を保つことで神経細胞の機能維持に必須の役割を果たしており、代表的なユビキチンリガーゼである SKP1-CUL1-F-box (SCF) 複合体は近年、パーキンソン病やポリグルタミン病といった神経変性疾患の病態形成に関わるという報告が相次いでいる。運動ニューロン特異的な難治性変性疾患である筋萎縮性側索硬化症 (Amyotrophic Lateral Sclerosis: ALS) は約 1 割が家族性に発症することが知られ、2016 年に関連遺伝子として C21ORF2 (Chromosome 21 Open Reading Frame 2) と NEK1 (Never in mitosis gene a-related kinase 1) が報告された。C21ORF2 は主に機能未知のロイシンリッチリピートから成るタンパク質であり、NEK1 はセリン・スレオニンリン酸化酵素として細胞周期制御や DNA 損傷修復等の生理学的プロセスに関わる。両者は織毛病においても変異が報告されており、同一の経路で機能していると考えられる。既報のプロテオミクス解析により C21ORF が SCF 複合体の構成タンパク質と結合することが判明し、SCF 複合体が ALS 病態にも関与する可能性が示唆されている。

【目的】SCF 複合体による C21ORF2 の分解機構を解析し、C21ORF2 のタンパク質量の変動が NEK1 の細胞内動態へ与える影響を明らかにすることを通して、C21ORF2 変異が病原性を獲得する機序と、ALS 病態の主座である運動神経の表現型へ及ぼす効果を検証する。

【方法】培養細胞 (HEK293T, mIMCD3, SH-SY5Y) および試験管内 (in vitro) での実験系にて各タンパク質間の相互作用の解析を行った。表現系解析においては C21orf2 変異を導入したマウス ES 細胞から転写因子 (Neurogenin2, Islet1, Lhx3) の発現により分化誘導した運動ニューロンの総神経突起長を指標とした。

【結果】FBXO3 を基質受容体タンパク質とする SCFFBXO3 複合体が実際に C21ORF2 野生型タンパク質をユビキチン・プロテアソーム分解に導くこと、この C21ORF2 の分解機構は NEK1 による C21ORF2 のリン酸化によって抑制されることを明らかにした。興味深いことに、ALS 関連 C21ORF2 変異型タンパク質は FBXO3 に結合せず分解されないこと、この差異は NEK1 による C21ORF2 のリン酸化の受けやすさの違いから生じることを見出した。また、NEK1 の安定性は C21ORF2 に依存しており、FBXO3 欠損細胞では C21ORF2 のみならず NEK1 の蓄積もみられた。C21orf2 変異を導入したマウス ES 細胞では C21orf2 と Nek1 タンパク質の過剰な安定化がみられ、分化誘導した運動ニューロンでは神経突起の伸長不全がみられた。

【考察・結論】C21ORF2 は SCFFBXO3 複合体によるユビキチン化と NEK1 によるリン酸化によ

(書式 1 2)

ってタンパク質安定性が制御される。C21ORF2 は NEK1 を安定化するため、SCFFBXO3 複合体は C21ORF2 のみならず、NEK1 も間接的に抑制していると考えられた。C21ORF2 変異型タンパク質は NEK1 により過剰にリン酸化されることで分解を受けず安定化しており、NEK1 の蓄積と運動ニューロンの異常を引き起こす。これらの知見は SCFFBXO3 複合体による C21ORF2 の量的制御機構の破綻が ALS 病態を誘導することを示唆しており、C21ORF2 変異 ALS では C21ORF2 と NEK1 両タンパク質の蓄積が運動ニューロン死の一因となっている可能性がある。

審査結果の要旨

博士論文題目 SKP1-CUL1-F-box (SCF) 型ユビキチンリガーゼによる筋萎縮性側索硬化症関連タンパク質の量的制御機構

所属専攻・分野名 医科学 専攻 神経内科学 分野
学籍番号 B6MD5164 氏名 渡辺 靖章

【背景】ユビキチン・プロテアソーム系は細胞内のタンパク質恒常性を保つことで神経細胞の機能維持に必須の役割を果たしており、代表的なユビキチンリガーゼである SKP1-CUL1-F-box (SCF) 複合体は近年、パーキンソン病やポリグルタミン病といった神経変性疾患の病態形成に関わるという報告が相次いでいる。筋萎縮性側索硬化症 (Amyotrophic Lateral Sclerosis: ALS) は約 1 割が家族性に発症することが知られ、2016 年に関連遺伝子として *C21ORF2* と *NEK1* が報告された。*C21ORF2* は主に機能未知のロイシンリッチリピートから成るタンパク質であり、*NEK1* はセリン・スレオニンリン酸化酵素として細胞周期制御や DNA 損傷修復等の生理学的プロセスに関わる。両者は織毛病においても変異が報告されており、同一の経路で機能していると考えられる。

【目的】 SCF 複合体による *C21ORF2* の分解機構を解析し、*C21ORF2* のタンパク質量の変動が *NEK1* の細胞内動態へ与える影響を明らかにすることを通して、*C21ORF2* 変異が病原性を獲得する機序と、ALS 病態の主座である運動神経の表現型へ及ぼす効果を検証する。

【方法】培養細胞 (HEK293T, mIMCD3, SH-SY5Y) および試験管内での実験系にて各タンパク質間の相互作用の解析を行った。表現系解析においては *C21orf2* 変異を導入したマウス ES 細胞から転写因子 (*Neurogenin2*, *Islet1*, *Lhx3*) の発現により分化誘導した運動ニューロンの総神経突起長を指標とした。

【結果】FBXO3 を基質受容体タンパク質とする SCF^{FBXO3} 複合体が実際に *C21ORF2* 野生型タンパク質をユビキチン・プロテアソーム分解に導くこと、この *C21ORF2* の分解機構は *NEK1* による *C21ORF2* のリン酸化によって抑制されることを明らかにした。興味深いことに、ALS 関連 *C21ORF2* 変異型タンパク質は FBXO3 に結合せず分解されないこと、この差異は *NEK1* による *C21ORF2* のリン酸化の受けやすさの違いから生じることを見出した。また、*NEK1* の安定性は *C21ORF2* に依存しており、FBXO3 欠損細胞では *C21ORF2* のみならず *NEK1* の蓄積もみられた。*C21orf2* 変異を導入したマウス ES 細胞では *C21orf2* と *Nek1* タンパク質の

過剰な安定化がみられ、分化誘導した運動ニューロンでは神経突起の伸長不全がみられた。

【考察・結論】 C21ORF2 は SCF^{FBX03} 複合体によるユビキチン化と NEK1 によるリン酸化によってタンパク質安定性が制御される。C21ORF2 は NEK1 を安定化するため、SCF^{FBX03} 複合体は C21ORF2 のみならず、NEK1 も間接的に抑制していると考えられた。C21ORF2 変異型タンパク質は NEK1 により過剰にリン酸化されることで分解を受けず安定化しており、NEK1 の蓄積と運動ニューロンの異常を引き起こす。これらの知見は SCF^{FBX03} 複合体による C21ORF2 の量的制御機構の破綻が ALS 病態を誘導することを示唆しており、C21ORF2 変異 ALS では C21ORF2 と NEK1 両タンパク質の蓄積が運動ニューロン死の一因となっている可能性を明らかにした。

よって、本論文は博士（医学）の学位論文として合格と認める。