



## UBL3 interacts with PolyQ-expanded huntingtin fragments and modifies their intracellular sorting

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2025-05-02 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 大山, 壮歩 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10271/0002000400">http://hdl.handle.net/10271/0002000400</a>

博士（医学）大山 壮歩

論文題目

UBL3 interacts with PolyQ-expanded huntingtin fragments and modifies their intracellular sorting

（UBL3 はポリグルタミン伸長型ハンチンチン断片と相互作用し、その細胞内仕分けを調節する）

論文の内容の要旨

[はじめに]

UBL3 (Ubiquitin-like 3) は、アミノ酸 117 個からなるユビキチン様タンパク質であり、タンパク質の翻訳後修飾において重要な役割を果たし、小型細胞外小胞 (small extracellular vesicles, sEVs) を介したタンパク質の仕分けに関与している。申請者らのこれまでの研究では、UBL3 が不溶性の有害タンパク質と相互作用し、その細胞内輸送を変化させることによって神経変性疾患の病態生理に関与していることを明らかにしてきた。例えば、UBL3 と  $\alpha$ -シヌクレインは相互に作用し、この結合性が抗がん剤であるオシメルチニブによって抑制されることを発見した。また結合性は MGST3 (Microsomal Glutathione S-Transferase 3) によって上昇し、酸化ストレス下で  $\alpha$ -シヌクレインの細胞外輸送が増加することも最近報告した。

本研究においては、ハンチントン病 (HD) における UBL3 の機能的役割の解明を主たる目的とした。HD は、舞踏運動や認知症を主徴とする常染色体顕性遺伝の神経変性疾患である。この疾患の病因は、ハンチンチン (HTT) 遺伝子内におけるシトシン-アデニン-グアニン (CAG) 三塩基反復配列の病的伸長に起因する。この変異型 HTT (mHTT) は、上記 CAG 配列の伸長に対応するポリグルタミン (polyQ) 配列を有しており、これが神経細胞の機能不全ならびに細胞死を惹起する要因となる。他の研究によると、mHTT は多様なタンパク質と相互作用し、それらの細胞内輸送を変化させることは報告されているものの、mHTT と UBL3 の分子間相互作用については未だ十分な解明がなされていない。したがって、本研究では UBL3 が mHTT に与える影響を明らかにすることを目的とした。

[材料ならびに方法]

HD 患者の死後脳を用いて、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色および抗 polyQ 抗体、抗 UBL3 抗体を用いた免疫組織化学染色 (Immunohistochemistry, IHC) を行い、病的組織内の UBL3 の存在や分布を確認した。次に *Gaussia princeps* ベースのスプリットルシフェラーゼ補完アッセイ (*Gaussia princeps*-based split-luciferase complementation assay、Gluc SLCA) および共免疫沈降法 (Co-immunoprecipitation、Co-IP 法) を用いて、UBL3 と mHTT の相互作用を確認した。さらに、細胞溶解液中の HiBiT タグ付きタンパク質を高感度で定量化

するアッセイ (HiBiT Lytic Detection System、HiBiT LDS) を用いて、UBL3 が mHTT の細胞内仕分けに与える影響を評価した。最後に、免疫細胞化学染色 (Immunocytochemistry、ICC) を用いて、これらのタンパク質の細胞内での分布や共局在の有無を検証した。本研究は、浜松医科大学臨床研究倫理委員会の承認を受け実施した (承認番号: 19-268)。

#### [結果]

HE 染色および IHC の結果から、HD 患者死後脳の線条体のニューロンの核内における polyQ の蓄積を確認した。また同細胞質と核内において、複数の UBL3 陽性の封入体が散見された。一方のコントロールでは、全体においてびまん性に染色像がみられた。Gluc SLCA では、細胞培養液において、mHTT と UBL3 または UBL3  $\Delta 5$  を cotransfect したグループにてコントロールと比較して高い発光が得られた。Co-IP 法では mHTT と UBL3 を cotransfect したグループにて強いシグナルが得られた。両方の結果から、UBL3 が mHTT と相互作用することが明らかとなった。また HiBiT LDS の結果から、UBL3 が mHTT の細胞内仕分けに影響を与えることが判明した。さらに ICC の結果から、UBL3 と mHTT が細胞内に共局在することが可視化された。

#### [考察]

これまでの研究では、UBL3 の翻訳後修飾における機能は、その C 末端のシステインモチーフによるものが主だと考えられてきた。しかし、本研究では、UBL3 の C 末端にあるシステインモチーフの欠失変異が、Gluc SLCA において示されるように伸長型 polyQ を含む N 末端 HTT 断片 (mHTT) との相互作用にあまり影響を与えないことがわかった。この理由として、UBL3 と mHTT との相互作用は、システインモチーフによるものとモチーフを含まない少なくとも二つ以上のメカニズムによって媒介されている可能性があり、Gluc SLCA の高い感度により、C 末端システインモチーフの欠失変異を持つ UBL3 が細胞内で mHTT と間接的に相互作用する場合でも、Gluc の発光を検出することができたからと考えられる。

また細胞破碎液から得られた Gluc SLCA の結果では、UBL3 と mHTT はわずかな結合性を持つに留まったが、Co-IP 法では両者は相互作用を示す結果となった。この不一致は、Co-IP 法において NaCl がタンパク質間の相互作用を強化し、その結果として Co-IP 法でより強いシグナルを検出したためと考えられる。

#### [結論]

本研究により、UBL3 が polyQ 伸長型ハンチンチン断片と相互作用することが複数の手法で示された。またこれらが細胞内で共局在し、細胞内の仕分けに影響を与えることを明らかにした。これらの発見は HD の病態生理に新たな知見を提供するとともに、現在根治療法の存在しない HD に対して UBL3 経路が今後、潜在的な治療ターゲットとなり得る可能性を示唆している。