

学 位 論 文 題 名

Ubiquilin: Interaction with Protein-disulfide isomerase,  
roles in neuronal death and identification  
of the interacting proteins

(ユビキリン：蛋白質ジスルフィドイソメラーゼとの相互作用、  
神経細胞死における役割および結合蛋白質と同定と単離)

学位論文内容の要旨

Neurons are fragile and very sensitive to stress, whereas glial cells participate in tolerance against stress by up-regulation of several stress proteins such as heat-shock proteins and glucose-regulated proteins. We found that protein-disulfide isomerase (PDI) is specifically up-regulated in response to hypoxia/brain ischemia in astrocytes. In addition, the overexpression of this gene into neurons protects against apoptotic cell death induced by hypoxia/brain ischemia. In the present study, we first attempted to isolate the PDI-interacting proteins as protective factors against hypoxia by yeast two-hybrid screening. We report here that PDI interacts with ubiquilin, which contains a ubiquitin-like (UBL) domain at the N-terminus and a ubiquitin-associated (UBA) domain at the C-terminus. In addition, we found that ubiquilin is integral ER-membrane protein with face both UBL and UBA terminus in the cytoplasm of the ER.

Interestingly, ubiquilin is also up-regulated in response to hypoxia in glial cells with a time course similar to that of PDI induction. In hypoxia-treated glial cells, the endogenous ubiquilin and PDI were almost completely co-localized, suggesting that ubiquilin is an endoplasmic reticulum-associated protein. Overexpression of this gene in neuronal cells resulted in significant inhibition of the DNA fragmentation triggered by hypoxia, but not that induced by nitric oxide or staurosporine. Moreover, ubiquilin has the ability to attenuate CHOP induction and

phosphorylation of eIF2 $\alpha$  by hypoxia. These observations suggested that ubiquilin together with PDI have critical functions as regulatory proteins for CHOP-mediated cell death, and therefore up-regulation of these proteins may result in acquisition of tolerance against ischemic stress in glial cells.

Ubiquilin is a PDI-interacting protein in the ER. Ubiquilin-related proteins play critical roles in protein degradation by the ubiquitin-proteasome pathway. It is not completely clear yet how misfolded ER protein is delivered to the 26S proteasome. Ubiquilin seems to be one of these previously unrecognized factors in ER-associated protein degradation system. To address the detailed function of ubiquilin, we screened for proteins that interact with its UBA domain using yeast-two hybrid system. We report here that ubiquilin interacts with ubiquitin and UBA52, which contains ubiquitin domain at N-terminus and ribosomal protein at C-terminus. Furthermore, we found that the overexpression of high levels of ubiquilin resulted in the remarkable accumulation of ubiquitinated proteins in mammalian cells. On the other hand, we elucidated that UBL domain interacts specifically with Rpn3, Rpn10a and Rpn10e, a subunit of the human 26S proteasome. These results suggest that ubiquilin may encode novel regulators that target unfolded protein to 26S proteasome.

In summary, these results suggested that stress-induced ubiquilin together with PDI may contribute to protein folding and degradation via molecular chaperone activity and interaction with the proteasome. In fact, hypoxia/brain ischemia causes accumulation of immature and denatured protein, and consequently the dysfunction of the ER. Thus, up-regulation of ubiquilin, PDI, and other unfolded protein response-inducible proteins such as GRPs by ER stress may result in acquisition of tolerance against stresses by controlling "protein quality."

# 学位論文審査の要旨

主査	教授	野村靖幸
副査	教授	横沢英良
副査	助教授	大熊康修
副査	助教授	川原裕之

## 学位論文題名

### Ubiquilin: Interaction with Protein-disulfide isomerase, roles in neuronal death and identification of the interacting proteins

(ユビキリン：蛋白質ジスルフィドイソメラーゼとの相互作用、  
神経細胞死における役割および結合蛋白質と同定と単離)

申請者は、蛋白質ジスルフィドイソメラーゼ (PDI) と相互作用する蛋白質としてを単離・同定するとともに、PDI および相互作用蛋白質の神経細胞死に対する役割を解明することを目的として研究を行った。

これまでに脳虚血／低酸素ストレス負荷によって、グリア細胞において分子シャペロン (GRP78 や GRP94 など) や PDI が up-regulate し、細胞死 (アポトーシス) に対して保護的に作用することが証明されてきた。申請者は PDI の抗アポトーシス作用を詳細に解明する目的で、まず酵母 2-ハイブリッド法を駆使して相互作用する蛋白質の単離を試みた。スクリーニングの結果、数種の未知蛋白質と既知蛋白質を得ることに成功した。この中、既知蛋白質がユビキリンと完全に一致していた。ユビキリンは 2000 年 11 月にアルツハイマー病発症に関わることが示唆されているプレセニリンと結合する蛋白質として発表されていた。最近、アルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患は異常蛋白質の蓄積によって引き起こされる可能性が指摘されつつある。興味深いことに、脳虚血によっても変性異常蛋白質が蓄積することが知られていることから、これらの観点を踏まえて PDI およびユビキリンの作用メカニズム、とくに細胞死に対する影響を検討した。ユビキリンはその一次構造から N 末端にユビキチン様ドメイン間に 2 カ所の Asn-Pro repeat ドメインを、C 末端にユビキチン作用ドメインを有するタイプ 2 ユビキチン様蛋白質として知られている。申請者はまず PDI の C 末端の推定  $\text{Ca}^{2+}$  結合ドメインとユビキリンの C 末側 Asn-Pro ド

メインを介して相互作用していることを証明した。ノーザンブロット解析から、ユビキリンはすべての臓器で発現が見られるものの、胎児期の脳腎臓、成人の脳、心臓、脾臓においてとくに強く発現していることを示した。また、特異的抗体を作製することにより、ユビキリンは PDI と同様にグリア細胞において、低酸素ストレスに応答してその発現が著しく増加することを見いだした。さらには、免疫組織化学染色を行い、抗ユビキリン抗体による染色像は細胞質に観察され、抗 PDI 抗体を用いたものと完全に一致することから、ユビキリンは少なくとも小胞体内あるいは小胞体に結合した蛋白質である可能性を示した。申請者はこの点についてさらに解析を進め、ユビキリンは N, C 末端が細胞質側に存在する小胞体膜 2 回貫通型蛋白質であることを証明した。したがって、ユビキリンは小胞体内腔に存在する Asn-Pro ドメインを介して PDI の C 末端部分と相互作用していることを明らかにした。酵母におけるユビキリン相同蛋白質として Dsk2 が知られている。Dsk2 はプロテアソームあるいはユビキチンとそれぞれ結合することが知られていた。申請者はユビキリンの C 末端ドメインを bait にした酵母 2-ハイブリッドスクリーニングを行い、ユビキチン様蛋白質 UBA52 を単離した。興味深いことに、ユビキチンもユビキリンの C 末端と結合することを見いだした。さらに、N 末端は 26S プロテアソームサブユニットである Rpn3, Rpn10a および Rpn10e と結合すること示した。これらの知見から、ユビキリンはポリユビキチン化蛋白質と C 末端側で結合し、プロテアソームと N 末端側で結合する、またはリクルートする性質を有することが示唆され、プロテアソーム依存的な蛋白質分解を仲介する役割を担っている可能性を提示した。また、ユビキリンの細胞死に対する影響を調べるために、ヒト神経芽細胞腫を用いて種々解析した。まず、ユビキリン過剰発現細胞では低酸素による DNA 断片化がほぼ完全に抑制されることを明らかにした。ユビキリンは一酸化窒素やスタウロスポリンのようなミトコンドリアを介するアポトーシス刺激には無効であり、小胞体を起源とする細胞死に特異的に作用することを見いだした。この細胞死抑制効果は PDI との共発現によって相加的であることも示した。

以上、申請者は脳虚血/低酸素応答性抗細胞死因子として単離された PDI と結合する蛋白質としてユビキリンを同定することに成功し、その生理的な役割について詳細な解析を行い、とくに小胞体近傍において蛋白質分解に関わるユビキチン-プロテアソーム系と深く関わっていること、小胞体内腔においては PDI と相互作用して抗細胞死効果を相加的に発揮することを見出した。したがって、本論文審査委員会は、これらの結果は脳虚血をはじめとする神経変性疾患発症の解明に対する有益な情報をもたらすことが考えられ、本論文は博士(薬学)の学位を受領するに十分な資質を有するものであると認めた。