

学位論文の要旨

| 学位の種類 | 博 士 | 氏 名 | 滝 沢 修 一 |
|---|-----|-----|---------|
| <p style="text-align: center;">学 位 論 文 題 目</p> <p style="text-align: center;">Ubiquitin carboxy terminal hydrolase 1 (UCH L1) interacts with Ubiquitin and upregulates free Ubiquitin level. (ユビキチンC末端水解酵素1型 (UCH L1) はユビキチンと作用し、 単量体ユビキチン量を正に制御する)</p> <p style="text-align: right;">未 公 表</p> <p style="text-align: center;">研 究 目 的</p> <p>ユビキチン (Ub) は76個のアミノ酸からなる小さな蛋白質であり、自身のC末端と基質蛋白質のリジン残基との間で共有結合を形成し蛋白質翻訳後修飾の修飾因子としてふるまう。ユビキチンC末端水解酵素1型 (UCH L1) は神経系に豊富に存在する蛋白質であり、in vitroではUbのC末端からペプチドや化学物質などの比較的小さい分子を切り離す機能が報告されているが、生物学的な機能に関しては不明であった。ヒトにおいては<u>uchl1</u>の点突然変異と家族性パーキンソン病の関連が報告されており、マウスにおいては<u>uchl1</u>の部分欠失によりgracile axonal dystrophy (<i>gad</i>) を引き起こすことが報告されている。そこで我々は神経細胞におけるUCH L1の生物学的機能解析を試みた。</p> <p style="text-align: center;">材 料 ・ 方 法</p> <p>まず、6×ヒスチジンタグ付きマウスUCH L1蛋白質 (6His UCH L1) を大腸菌に発現させ回収し、ニッケル精製・ゲル濾過精製を行った。次にUCH L1と相互作用している分子を検索する目的でpull down法・affinity chromatography法・免疫共沈法を行った。Pull down法：TBSTバッファーで溶解したマウス脳溶液にNi-NTA Agarose (QIAGEN) と6His UCH L1を加えて1晩インキュベートし、洗浄後、イミダゾール溶液で溶出しサンプルを得た。Affinity chromatography法および免疫共沈法：6His UCH L1結合カラムおよびポリクローナル抗UCH L1抗体結合カラムを作成し、マウス脳溶液をそれぞれに加え1時間インキュベートして洗浄した後、グリシンバッファー (pH3) で溶出しサンプルを得た。続いてこれらサンプルを用いSDS-PAGEおよびpeptide mapping法を行った。SDS-PAGEは15%アクリルアミドゲルを用い、泳動後CBB染色を行った。染色後のゲル上で確認できた顕著なバンドを任意に切り出しトリプシンでゲル内消化した後、QSTAR LC/MS/MSシステムを用いtime of flight mass spectrometryおよびtandem mass spectrometryを施行し、バンド内の蛋白質を同定した。ウエスタンブロット法には抗Ub抗体 (1:400, Sigma)、抗UCH L1抗体 (1:100000, 自作) を用いた。</p> | | | |

更に、細胞内におけるUCH L1の機能を解析する目的で、loxP配列に挟まれたCre recombinaseサイトを持つUCH L1発現アデノウイルスベクター (adeno-UCH L1) を作成した。作成したベクターを胎生13.5日齢の野生型マウス胎児に由来する培養繊維芽細胞 (MEF) に感染させ、Cre recombinaseで誘導後、ウエスタンブロット法および免疫細胞染色を行い共焦点顕微鏡で観察した。また胎生13.5日齢の野生型および*gad*マウス由来培養プルキンエ細胞も免疫細胞染色後観察した。免疫細胞染色は抗UCH L1抗体 (1:50, Ultra Clone) および抗ユビキチン抗体 (1:100, SIGMA) を1次抗体として用い、Cy3結合抗マウスIgG抗体およびFITC結合抗ウサギIgG抗体 (1:500, Jackson Immuno Research) を2次抗体として用いた。また、15週齢の野生型および*gad*マウスの坐骨神経を同様に免疫組織染色し観察した。

成 績

pull down法で得られた7kDa付近のバンドからはpeptide mapping法によりUbの断片が確認され、ウエスタンブロット法でも7kDa付近のバンドが抗Ub抗体で認識された。6His Ubを用いたpull down法で得られたサンプルでは30kDa付近のバンドが抗UCH L1抗体で認識された。Affinity chromatography法および免疫共沈法で得られたサンプルからはpeptide mapping法により、Ub以外にGeneral control of amino-acid synthesis 5 (GCN5), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), 2',3'-cyclic nucleotide 3' phosphodiesterase (CNPase) and myelin basic protein (MBP) の断片が確認された。adeno-UCH L1感染MEFを誘導後、経時的に細胞を回収して抗UCH L1抗体および抗Ub抗体を用いて行ったウエスタンブロット法では、UCH L1の増加に伴い単量体Ubも増加した。同細胞の免疫細胞染色ではUCH L1の発現によりUbの主要な細胞内局在が核から細胞質側に変化し、かつUbとUCH L1の細胞内分布が一致した。野生型マウス由来培養プルキンエ細胞では核・細胞質・樹状突起・軸索ともUbが認められたが、*gad*マウス由来では特に樹状突起・軸索のUbが顕著に減少していた。また、坐骨神経の免疫組織染色では、野生型の場合軸索にUbが認められたが*gad*マウスでは殆ど検出できなかった。

考 案

以上の結果より、UCH L1は単量体Ubと結合し、UCH L1の発現によりUb量が増加することが明らかになった。また、UCH L1がほとんど発現していない*gad*マウスでは主に神経突起のUbが著減していることがわかった。UCH L1が単量体Ubの量を正に制御する機序として、Ubの転写調節・Ubプールからの単量体Ub供給・単量体Ubの分解抑制などが考えられるが、Ub自身がライソゾーム移行認識配列を持ちライソゾームで分解を受けることや、UCH L1はユビキチンC末端水解酵素活性が低く単量体Ubに対する選択性・親和性が高いことから、水解酵素としてより保護蛋白質としてUbの分解抑制的に働いている可能性が高いと考えられる。また、UbおよびUCH L1は共に遅い軸索流に乗って軸索

末端まで移動するため、軸索輸送中のUb保護機能も予想される。*gad*マウスの病変は薄束核および下肢の神経筋接合部の逆行性神経変性であり、これらの部位は後根神経節細胞の神経突起終末であることも興味深い。さらに、GCN5、GAPDH、CNPase、MBPに関してはUCH L1と相互作用している証拠が現時点では不足しているものの、いずれも神経変性に関連のある蛋白質であるため今後の更なる究明が必要である。

結 論

UCH L1は単量体Ub量を正に制御する。

UCH L1は単量体Ubと結合し、細胞内分布も一致する。

UCH L1欠損モデルである*gad*マウスでは神経突起のUb量が著明に減少する。

引 用 文 献

1. Hershko, A. & Ciechanover, A.: The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 425-479 (1998).
2. Saigoh, K. *et al.*: Intragenic deletion in the gene encoding ubiquitin carboxy-terminal hydrolase in *gad* mice. *Nat Genet.* **23**, 47-51 (1999)
3. Wilkinson, K. D. *et al.*: Comparisons of neuronal (PGP 9.5) and non-neuronal ubiquitin C-terminal hydrolases. *Biochem Soc Trans.* **20**, 631-637. (1992)

学位論文の審査結果の要旨

| | | | |
|--|--------|-----|---------|
| 報告番号 | 第 号 | | |
| 学位の種類 | 博士(医学) | 氏 名 | 滝 沢 修 一 |
| 審査委員長 千葉 茂 ㊞ 審査委員 鈴木 裕 ㊞ 審査委員 松原 和夫 ㊞ | | | |
| 学 位 論 文 題 目 Ubiquitin carboxy terminal hydrolase 1 (UCH L1) interacts with Ubiquitin and upregulates free Ubiquitin level. (ユビキチンC末端水解酵素1型(UCH L1)はユビキチンと作用し、 単量体ユビキチン量を正に制御する) | | | |
| 本論文は、神経細胞におけるユビキチンC末端水解酵素1型(UCH L1)の生物学的機能解析を試みた論文である。 実験にはマウス脳を用い、UCH L1と相互作用する蛋白質をプロテオーム解析し、候補蛋白質5種を同定した。更に、候補蛋白質の1つ、ユビキチン(Ub)に注目し、UCH L1とUbの相互作用を培養細胞およびマウス組織を用いて細胞学的・免疫組織学的に検討した。 結果は、以下のとおりである。すなわち、Ub、GCN5、GAPDH、CNPase、myelin basic proteinが候補蛋白質として得られ、そのうちUbにUCH L1との確実な相互作用が認められた。また、UCH-L1を過剰発現させたマウス胎児性繊維芽細胞ではUCH L1の増加に伴いUbも増加しており、UbとUCH L1の細胞内局在も一致していた。野生型マウス由来培養プルキンエ細胞では | | | |

核・細胞質・神経突起のいずれにも Ub が認められたが、UCH L1 の発現が検出感度以下である gracile axonal dystrophy (gad) マウスに由来する培養プルキンエ細胞では神経突起の Ub が著減していた。さらに坐骨神経の免疫組織染色では、野生型マウスの軸索に Ub が認められたが、gad マウスでは殆ど検出できなかった。

本研究で得られた結果は、UCH L1 が Ub と相互作用して、特に神経突起における Ub の量を保持し増加させることを示しており、神経細胞における UCH L1 の機能を新たに提唱するものである。したがって、本研究は、近年注目を集めているユビキチンシステムと神経変性疾患の関連性について、新たな展開を期待させるものと考えられる。

なお、本論文および関連領域について、各審査委員から論文提出者に対して試問が行われた結果、明確かつ十分な回答が得られた。

以上の審査結果より、本論文は博士（医学）の学位に十分に値するものと判断した。