

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目 Analysis of NEDD8 modification system using *Uba3* deficient mice

和訳 Uba3 欠損マウスを用いた NEDD8 化経路の機能解析

指導教官 小俣政男 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 8 年 4 月入学

医学博士課程

内科学 専攻

氏名 立石 敬介

真核生物における細胞生命現象には、様々な蛋白質の発現量が転写による合成やその特異的な分解によってタイミングよく迅速に変動することが不可欠である場合が多い。そのうち蛋白質毎の特異的な分解を制御する系としてユビキチン-プロテアソーム系は大きな役割を担っている。

ユビキチンは8.6kDの小さな蛋白質で共有結合で基質を修飾するが、その結合は活性化酵素E1、転移酵素E2、連結酵素E3により構成されたカスケード反応により触媒される。基質に結合したユビキチンには別のユビキチンが共有結合し、最終的に多数のユビキチンが鎖状に基質に結合する。このポリユビキチン化基質が26Sプロテアソームによって認識されるとペプチドへと分解される。その基質が細胞周期やアポトーシス、シグナル伝達、抗原提示、ストレス応答、DNA修復など多岐にわたる領域に多数存在していることはこの経路の重要性を裏付けている。このユビキチン化経路における基質の特異性は多種のE3の存在によって維持されているが、中でも複合体としてE3機能をもつ代表としてSCF複合体が知られており、細胞周期のG1-S期移行や様々なシグナル伝達の制御に関わるE3として重要視されている。

NEDD8 はユビキチンと非常に相同性の高い蛋白修飾分子である。また特異的な E1 (APP-BP1 と Uba3 の異型 2 量体)、E2 (Ubc12)によって触媒されて基質に結合する点もユビキチンと非常に類似している。しかしその修飾はユビキチン化が分解のマーカーであ

るのと対照的に、むしろ基質の活性化に寄与することが *in vitro* の実験で明らかとなってきた。そしてその基質こそが SCF 複合体の構成因子である Cullin ファミリー蛋白質であった。つまり NEDD8 が SCF 複合体の活性化を介して様々な細胞生命現象に関わっている可能性が考えられた。

今回 NEDD8 修飾が *in vivo* においてどのような生物学的意義をもつかを調べる目的で特異的な E1 である Uba3 遺伝子の欠損マウスを作成しその表現型の解析を行った。

マウス Uba3 遺伝子は全長 14Kb 以上にわたり 14 個のエクソンから構成されていた。NEDD8 の結合するシステイン残基を欠損した相同組み換え体 ES 細胞を単離し、キメラマウスからヘテロマウスを得た。ヘテロマウスは正常に発育したが、驚くことにホモ個体は着床後の胎生 7.5 日までにアポトーシスを呈し致死であった。また胎児切片においてサイクリン E と D3 の異常発現が認められた。3.5 日胚の *in vitro* 培養においても Uba3 欠損細胞はわずかな増殖の後に細胞死に至った。そして一部の細胞系では S 期進行の異常が認められ、その細胞群ではサイクリン E と p57<sup>KIP2</sup> の異常な発現増加を呈していた。

Uba3 欠損細胞において異常蓄積したサイクリン E、サイクリン D3 と p57<sup>KIP2</sup> は SCF で分解が調節されると考えられていることから、SCF を介した蛋白質分解の異常が疑われた。そこで SCF による分解制御がよく研究されている  $\beta$  カテニンについてもその発現を調べたところ、Uba3 欠損細胞では細胞質から核内にまで明らかな  $\beta$  カテニンの蓄積を認めた。

以上の結果は NEDD8 修飾系が胎生期の個体発生や細胞周期制御に必須であることを示すとともに、それが SCF 複合体を介した蛋白質分解の異常に起因する可能性を示唆していた。NEDD8 経路の細胞周期やシグナル伝達調節における具体的な役割についてはさらなる解析が必要だが、また一方で成体の組織、臓器毎レベルでの機能解析も必要と考えられる。