

審査の結果の要旨

氏名 立石 敬介

本研究は、有核細胞の基質特異的なタンパク質分解を司るユビキチン-プロテアソーム経路について、その制御機構の基礎的研究である。プロテアソームにより分解される基質は高等動物において多くの生命現象の分野に存在している。今回解析した NEDD8 修飾経路とは、一部の細胞周期因子やシグナル伝達因子などについてそのプロテアソームによる分解を活性化する経路と考えられている。本研究では NEDD8 修飾系を欠損したマウスを作製することにより、その生物学的重要性の解析を試み、以下の結果を得ている。

1. NEDD8 修飾系は NEDD8 という小分子が UBA3/APPBP1、UBC12 という酵素により触媒された結果、いろいろな基質のプロテアソームによる分解を活性化する。今回、マウスの UBA3 遺伝子がクローニングされ、その遺伝子をノックアウトすることにより NEDD8 経路を欠損したマウスが作製された。まず UBA3 遺伝子のエクソン、イントロン構造が明らかにされた。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。そして UBA3 タンパク質はヒトと 99% 同一であった。NEDD8 の結合するシステイン残基は第 6 エクソンにコードされ、そのエクソンを欠損する相同組換え体 ES 細胞が単離された。その ES 細胞からキメラマウス、ヘテロマウスが得られたがホモマウスは得られなかった。

2. マウスの胎仔切片において TUNEL assay を行った結果、胎生 5.5 日の段階で Uba3 ホモ欠損マウスの原始外胚葉は明らかなアポトーシスを呈していた。さらに胎生 6.5 日の切片にて、細胞マーカーである TROMA-1 による染色を行ったところホモ個体は原始内胚葉、原始外外胚葉のみからなり、原始外胚葉はみられなかった。そして胎生 7.5 日胚ではホモ個体と思われる部分は子宮内で完全に吸収されていた。このことからホモマウスは胎生 7.5 日までにアポトーシスを伴って致死であることが示された。

3. 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あとに細胞死に至っていた。この系でも TUNEL assay にて内部細胞塊を中心に異常なアポトーシスの増加が示された。

4. 3.5 日胚の *in vitro* 培養において細胞増殖の異常が示唆されたため BrdU のとりこみの有無が検討された。野生型と異なり Uba3 欠損細胞では、栄養膜細胞由来の細胞群にお

いて BrdU の取り込みがみられなかった。一方、内部細胞塊では取り込みがみられていた。このことから *Uba3* を欠損した栄養膜細胞において S 期進行の異常が示唆された。一般に栄養膜細胞の S 期進行は M 期を経ないで S 期を繰り返す (endoreduplication) ことが知られているが、その endoreduplication に必須な $p57^{kip2}$ の周期的変動が *Uba3* 欠損栄養膜細胞では消失していた。そのことは $p57^{kip2}$ の免疫染色においてその明らかな蓄積が認められることで示されていた。

5. さらに免疫染色による検討から *Uba3* 欠損細胞では cyclinD3 や cyclinE、 β catenin の異常な蓄積がみられ、それらのタンパク質はいずれもプロテアソームによる分解が NEDD8 によって活性化されると考えられるものであった。これらのことは NEDD8 経路の欠損が、プロテアソームによるタンパク質分解の異常を介して細胞周期制御やシグナル伝達の異常をひきおこしている可能性を示唆していた。

以上、本論文はノックアウトマウスの解析から NEDD8 修飾経路が高等動物の発生において必須であることを示した。さらにホモ個体において様々なタンパク質分解の異常が示唆されたことから in vivo でのタンパク質分解における NEDD8 修飾の重要性を示すことができた。生体内での細胞生命現象に対する、基質特異的タンパク質分解の関わりや重要性についてはまだ解明されるべき点が多く、その制御機構も未知な点が多い。本研究はその解明の一つの端緒となるものと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。