

論文の内容の要旨

東京大学大学院農学生命科学研究科獣医学専攻

平成 13 年度博士課程 入学

氏名 : 権 仲基

指導教官名 : 吉川泰弘

論文題目 : Studies on ubiquitin C-terminal hydrolase (UCH) family
during spermatogenesis of mice

ubiquitin C-terminal hydrolase (UCH) ファミリーのマウス精巣に
おける役割と機能の検索)

(要旨)

ユビキチンはあらゆる細胞に存在するタンパク質ということで、英語のubiquitousにちなんで名付けられた。ユビキチンは76アミノ酸からなる酵母からヒトに至るまで非常に良く保存された小タンパク質である。ユビキチン-プロテアソームシステムによるタンパク質分解機構は細胞のタンパク質のレベルをコントロールする重要な役割を果たし、したがって細胞周期制御、DNA修復、signal transduction, cell transformationのような多様な生体反応を規制することが多くの研究を通して分かるようになった。ユビキチンレベルは特定酵素の2つのグループであるユビキチン化酵素 (E1(ユビキチン活性化酵素)、E2(ユビキチン結合酵素)、E3(ユビキチンリガーゼ)) と脱ユビキチン化酵素(DUB)のバランスによって厳密にコントロールされる。またDUBはUCH(ubiquitin-C-terminal hydrolase)型とUBP(ubiquitin-specific protease)型に分類される。脱ユビキチン化酵素(DUB)の一つであるUCHファミリーはユビキチン-プロテアソーム経路においてポリユビキチン遺伝子やリボソームタンパク質との融合遺伝子から生合成されたユビキチン前駆体をプロセッシングして成熟型分子に転換する機能や、ユビキチン化修飾したタンパク質からユビキチンを解離させる作用を持っていることが知られている。

本研究ではUCHファミリー、UCH-L1およびUCH-L3アイソザイムの機能や役割を2つの欠損マウスを用い免疫組織学的・生化学的に検索し、精子形成での2つのUCHアイソザイムの機能が異なったことや新たなUCHファミリーの機能を初めて明らかにした (第1章)。また、明らかにしたUCH-L1の新たな機能をUCH-L1欠損マウス(gad mouse)を用いUCH-L1の加齢による精子過程での与える影響を検索しました (第2章)。第3章ではUCH-L1トランスジェニックマウスを作製、精子過程でのUCH-L1の機能をさらに詳しく検索しました。

(第1章) (A) 現在、哺乳類では4種類のUCHアイソザイム(UCH-L1, 3, 4, 5)が単離されており、主なUCHアイソザイムであるUCH-L1およびUCH-L3アイソザイムは52%のアミノ

酸シーケンスアイデンティティ共有していますがそれらの発現部位は全く異なります。UCH-L1 mRNAは生殖系組織である精巣・卵巣およびニューロン細胞で選択的に表現されますがUCH-L3 mRNAはこれらも含めた多くの組織で強く発現していることが知られている。これらの2つのアイソザイムは精子形成過程で重要な役割を果たすと考えられる。精子形成過程は3つの複雑な、高度に組織されたプロセス、Mitosis(有糸分裂)、Meiosis(減数分裂)、Spermiogenesis(精子形成)に分かれています。UCH-L1に特有の抗体が特に精祖細胞およびセルトリ細胞で発現を見せることから精子形成過程の中でのUCHアイソザイムが機能を果たしていると考えられる。そこでUCH-L1およびUCH-L3の特有シーケンスに対するペプチド抗体を初めて作製し各段階で分離した精細胞や精子形成の初期の過程で各UCHアイソザイムの発現レベルを検索した。この結果UCH-L1およびUCH-L3が精子形成過程で異なった機能を持っていることが明らかになった。2つのUCHアイソザイムは精子形成過程の中で発達の・差別的に表現している。これらの結果は、幹細胞である精祖細胞の有糸分裂の増殖中にはUCH-L1が減数分裂を起こす精母細胞および減数分裂後の精子細胞ではUCH-L3が関与していることが示された。

(B) 2つのUCHアイソザイムは高い相同性にもかかわらず多くの研究で違った機能を見せる。加水分解活性(hydrolase activity)でUCH-L3はUCH-L1より200倍以上の高い活性を持っておりますがUCH-L1が持っていること示唆されているユビキチン化リガーゼ活性はほとんどない。またUCH-L1は癌細胞の増殖に応じて引き起こされることや癌細胞の抗増殖性活性を持っていることが示された。さらにUCH-L1はニューロン中のユビキチンと結合しユビキチンの半減期を延長していることが知られている。またUCH-L3はNedd8(ユビキチンとの高い相同性を持つ)と結合しそのC末端をプロセスすることも知られている。第1章では2つのUCHアイソザイム、UCH-L1およびUCH-L3が精子形成過程に機能的な多様性を示す可能性を見た。そこでUCH-L1欠損マウスとUCH-L3ノックアウトマウスの精巣を用い実験的に停留睾丸症を作製、ストレスに対するUCH-L1およびUCH-L3のin vivoでの機能をさらに検索した。通常なら精巣は腹の温度より陰嚢の中で低く維持されますが実験的に作製した停留睾丸はより高い体温により精細胞のアポトーシスを引き起こされる。しかし、UCH-L1欠損マウス(gad mouse)の精巣はストレスに対して抵抗性を示しユビキチンレベルも減少していた。抗アポトーシスタンパク質(Bcl-2, Bcl-xL)および存続支持タンパク質の両方の発現レベルも著しくより高かった。対照的に、UCH-L3ノックアウトマウスはストレスに対し著明な精巣の萎縮および精細胞のアポトーシスが促進された。特にNedd8およびアポトーシスタンパク質のレベルが上げられた。これらの結果は、UCH-L1およびUCH-L3の両方が精細胞アポトーシスに対し相反的な機能を持っていることを示す。UCH-L1は精細胞アポトーシスに対しアポトーシス促進機能を持ち、UCH-L3は精細胞アポトーシスに対し抗アポトーシス機能を持っていることを示す。さらに、UCH-L1がモノユビキチンと結合することやUCH-L3がNedd8に対し特異性を生体内で持っていることが示された。

(第2章)第1章で明らかになった UCH-L1 のアポトーシス促進機能を UCH-L1 欠損マウ

ス(gad mouse)を用いさらに詳しく検索した。UCH-L1 の欠損による正常な精子形成過程への影響を成熟前・後に分けて検索した。(A) 5週前のマウス精細胞発生時は広範囲のアポトーシスが観察される。この初期の精細胞アポトーシスは主に精祖細胞と精母細胞で行われるし機能的な精子形成にとって重要と考える。抗アポトーシスタンパク Bcl-2 および Bcl-xL を過剰発現されたマウスでは精子形成の初期過程のアポトーシスが減少および正常な精子形成の崩壊が報告された。そこで、UCH-L1 欠損マウスを用い精子形成の初期の過程および精巣上体の精子成熟段階での UCH-L1 とアポトーシスの関連性を検索した。その結果、UCH-L1 欠損マウスの精子形成の初期過程で減数分裂前の精細胞が蓄積およびアポトーシスの減少が見られた。さらに UCH-L1 欠損マウスの精子を調べた結果、精子の生産能力・運動性への変化および奇形な精子の増加が見られた。これらの結果はアポトーシスの大規模な波に対する抵抗が結局精子の品質の変化を及ぼすことを示す。UCH-L1 依存のアポトーシスは正常な精子形成過程にとって非常に重要なことを示している。

(B) 精子形成過程でのアポトーシスは精細管のローカル環境に対して精細胞数をコントロールする重要な役割を果たしている。しなし、アダルトマウスの精細胞アポトーシスの正確なメカニズムはまだ不明である。そこでアダルト UCH-L1 欠損マウスの精巣を用い組織学・免疫組織化学的に加齢による精子形成過程への UCH-L1 の影響を検索した。この結果 25週齢のマウスで精細管の萎縮および増殖する細胞を示す PCNA 陽性細胞の著しい減少が見られた。このことから、幹細胞である精祖細胞の加齢なる増殖の減少から UCH-L1 はアダルトマウス精子形成過程においても重要な機能を果たしていることが示された。

(第3章) 本章では、第1, 2章で示唆した UCH-L1 のアポトーシスレギュレーター機能を確かめるため UCH-L1 を過剰発現するトランスジェニックマウスを作製し精子形成過程を検索した。UCH-L1 欠損マウスを用いた検索ではアポトーシスに対する強い抵抗性が見られた。またこれらの結果は全て UCH-L1 がモノユビキチンと結合してユビキチンのレベルを維持していることも示唆した。本実験で用いた UCH-L1 トランスジェニックマウスの精巣はアポトーシスを引き起こす精母細胞の数の増加により精母細胞のパキテン期段階で精子形成がブロックされ不妊になることを明らかにした。UCH-L1 は減数分裂中の精子形成に影響をあたえ、特に主な精母細胞のアポトーシスを引き起こすと考えられる。さらに超過 UCH-L1 により幹細胞である精祖細胞の増殖および PCNA の分布にも影響を及ぼすことが明らかになった。これらの結果から超過 UCH-L1 はアポトーシスに関与し精子形成過程をブロックして不妊を引き起こすことが示された。

本の研究では、2つの UCH アイソザイム(UCH-L1 および UCH-L3)が精子形成中に異なった相反的な機能を持っていることを示しており、特に UCH-L1 は精子形成过程中ユビキチンシステムを通してアポトーシスレギュレーター機能を果たしていることを明らかにした研究である。