

論文の内容の要旨

論文題目：ユビキチン類似分子 UBL5 の低浸透圧刺激に対する応答機構の解析

氏名：畠中 謙

【序】

ユビキチンは近年におけるタンパク質分解研究の中心的役割を担う分子であり、タンパク質分解を介して生物の様々な高次機能の制御（細胞周期、アポトーシス、代謝調節、シグナル伝達、転写制御、免疫応答）や、外部環境に応答した恒常性の維持（ストレス応答、タンパク質の品質管理等）に必須の役割を担っている。一方、真核生物のゲノムにはユビキチンと構造的に類似した分子、すなわちユビキチン類似タンパク質(UBL)が多数存在する。これらもユビキチンと同様、転写制御やタンパク質分解等、様々な生理的機能に働いていることが明らかになってきている。本研究ではタンパク質ドメイン予測プログラムの一つである pfam database を用いて、ユビキチンと一次配列上の相同性が高い ubiquitin domain を持つ分子群を UBL としてセレラゲノム中から抽出、分類した。更にその中で種間保存性の高い遺伝子として UBL5 (ubiquitin-like 5, 別名 beacon) に着目し、発現が多く見られた視床下部での UBL5 タンパク質動態について詳細な解析を行った。

【方法と結果】

1. UBL5 は視床下部領域において、低浸透圧刺激により減少する

UBL ファミリー全体の進化保存性について検討する為、セラゲノムデータベース、及び NCBI Genbank nr データベースを調べ、ヒト、マウス、ショウジョウバエ、線虫全ての遺伝子の中から UBL ドメインを持つものを検索した。その結果、UBL5 という分子が、線虫以降の種での進化保存性がユビキチン、NEDD8 の次に良い分子として同定され、更に RIKEN FANTOM3 データベースより、UBL5 は脳組織に発現する分子であることが明らかとなった。またイスラエルデブスナネズミ (*Psammomys obesus*) の研究において、太っているスナネズミの方がやせているスナネズミと比較して、視床下部領域における UBL5-mRNA の発現量が高いという報告がある。私は UBL5 の mRNA が視床下部において強く発現していることに注目した。視床下部は摂食中枢の一つであると同時に体液調節の中枢であり、浸透圧制御に重要な役割を担っている。そこで UBL5 が浸透圧刺激により変化する可能性を考え、視床下部を含む脳スライスを作成し、外液の浸透圧環境を変化させてみたところ、UBL5 タンパク質量は低浸透圧刺激により減少した (Fig. 1)。

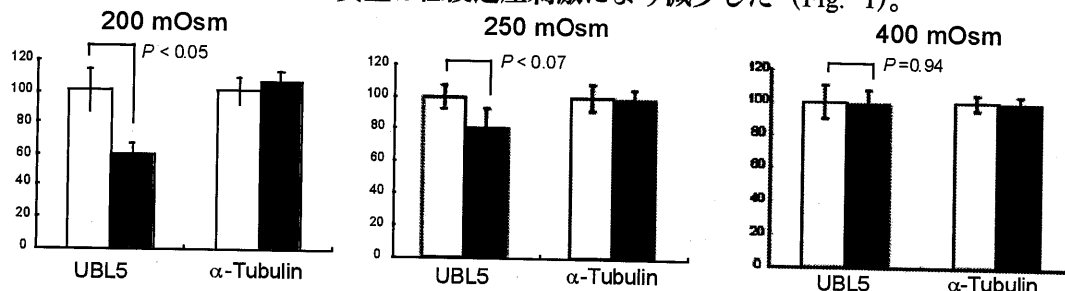


Fig. 1 視床下部スライスにおける低浸透圧刺激依存的減少。白カラム：刺激前 (300 mOsm)。黒カラム：刺激後。

2. 浸透圧依存的 UBL5 の減少は UBL5 に選択的で、かつプロテアソーム依存的である

この低浸透圧刺激による UBL5 減少の機構を詳細に解析するため、NIH-3T3 細胞を用いて解析を進めた。哺乳類の UBL5 は糖尿病関連因子として見つけられたことから、血清の濃度を上げた富栄養状態、血清を抜いた低栄養状態、グルコースを添加した hyper-glucose 状態、高浸透圧状態、および低浸透圧状態の 5 条件について、タンパク質量の変化を調べた。その結果、UBL5 の発現量は低浸透圧刺激でのみ減少し、他の条件の下では変化しなかった (Fig. 2)。また同条件において GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)、 α -Tubulin には顕著な変化が見られないことから、UBL5 の低浸透圧刺激による減少は、全てのタンパク質に対して起こる現象ではないことが分かった。

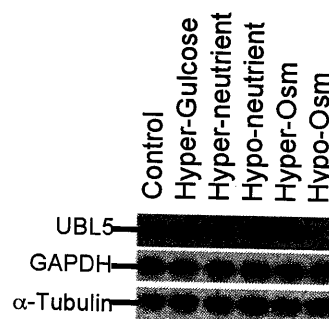


Fig. 2 UBL5 の低浸透圧特異的な減少

GAPDH や α -tubulin は細胞内に多く存在するタンパク質で、比較的安定であることが知られている。もし低浸透圧状況において包括的な翻訳効率、転写効率の減少が起こっている場合、不安定なタンパク質は全て減少する事になる。そのような全体的な変化が起こっている可能性について検討するため、UBL5 の半減期を翻訳阻害剤であるシクロヘキシミド (CHX) を用いて調べた。その結果 UBL5 は、半減期が約 5 時間の比較的分解が早いタンパク質であることが分かった

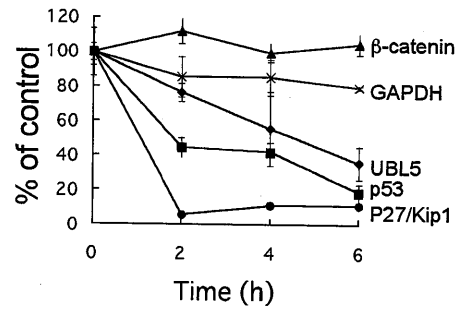


Fig. 3 CHX chaseによるタンパク質安定性の検討

(Fig. 3)。p53 や p27/Kip1 は UBL5 よりも半減期が早いタンパク質であった。

そこで p53 や p27/Kip1 等の短寿命なタンパク質の発現量が低浸透圧条件下で変化するか否かを同様に検討してみたところ、GAPDH や α -tubulin と同様に顕著な変化は見られなかった (Fig. 4)。このことから、低浸透圧条件下において UBL5 選択的なタンパク質減少が起こっていることが明らかになった。また UBL5 転写量にも変化が見られなかったことから、この現象は転写非依存的であることが示された (Fig. 4)。

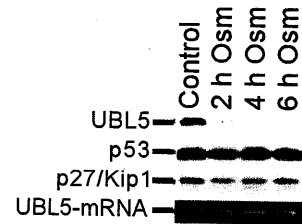


Fig. 4 UBL5 の選択的減少

次に UBL5 の減少に働いている分子経路について検討した。UBL5-mRNA の量には変化がない事から、この UBL5 の減少にはタンパク質分解系の亢進が関与している可能性を考えた。そこでプロテアソーム阻害剤であるラクタシスチン (Lact)、及び MG132 を用いてプロテアソーム系の影響を検討した。その結果、プロテアソーム阻害剤により、低浸透圧依存的な UBL5 の減少が阻害されることが分かった (Fig. 5)。この結果から、プロテアソームによる UBL5 の分解が低浸透圧刺激時に亢進していることが示唆された。

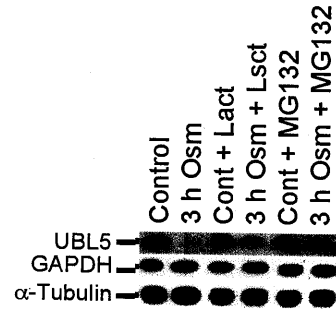


Fig. 5 プロテアソーム阻害剤の影響

3. 低浸透圧刺激にตอบสนองして UBL5 は核外へ排出される

内在性 UBL5 は低浸透圧刺激後、2 時間でほぼ検出不可能なレベルまで減少する。この低浸透圧刺激依存的な UBL5 タンパク質分解の性質を解析するため、NIH-3T3 細胞に N 末 myc タグ-UBL5 を発現させ、細胞内局在を観察した。myc-UBL5 は内在性 UBL5 と同様、低浸透圧刺激により特異的に分解されたため、内在性に近い性質を持つと考えられる。観察の結果、myc-UBL5 は通常状態では細胞内に均等に分布しているが、低浸透圧刺激後 30 分で核内からほぼ

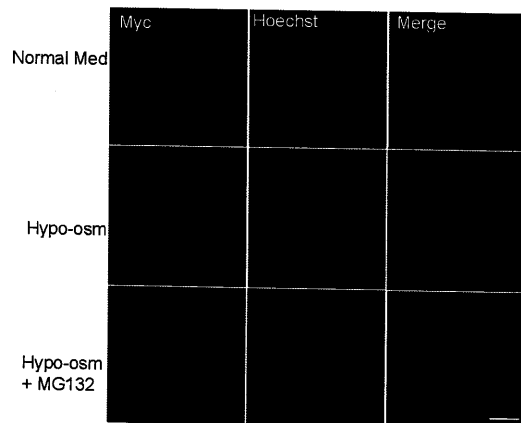


Fig. 6 低浸透圧刺激時の UBL5 核外への排出

消失した (Fig. 6)。この核内からの消失はプロテアソーム阻害剤である MG132 を加え、タンパク質分解を阻害した時にも同様に起こる。すなわち UBL5 は、低浸透圧刺激時に核内から細胞質へ排出され、その後細胞質においてプロテアソーム依存的に分解されることが示唆された。

【まとめと考察】

今回の研究によって、私は 1) UBL5 が低浸透圧に応答して選択的に減少する事、2) その減少はプロテアソーム依存的分解によって起こること、3) プロテアソーム依存的分解に先立ち、UBL5 が核内から排出されることを明らかにした。UBL5 の機能については、近年酵母、線虫を用いた研究によって、核内でのスプライシングの制御、もしくは転写の制御を行っているという報告がなされている。今回の研究は、初めて低浸透圧という外部刺激に応答して、UBL5 の局在が変化する事を示したものであり、細胞の浸透圧応答機構解明に役立つと考えられる。UBL5 を介した浸透圧制御機構を解明する事によって、ひいては尿崩症等の浸透圧制御異常に関わる病気の解明につながる事が期待される。現在までのところ、核内の UBL5 がどのような分子機構を介してターゲットの遺伝子発現を制御しているかは分かっておらず、また UBL5 の直接のターゲット分子も明らかになっていない。今後は UBL5 がどのようなメカニズムによって核からの排出及び分解を受けるのかを明らかにすると同時に、UBL5 のターゲット分子探索、すなわち哺乳類細胞において実際にどの遺伝子の転写、もしくはスプライシング制御に関わっているか、またそれら分子の転写が低浸透圧刺激に対してどのように変化するのかに焦点を当てて研究を進めていきたい。

【参考文献】

Hatanaka K, Ikegami K, Takagi H, Setou M.

Hypo-osmotic shock induces nuclear export and proteasome-dependent decrease of UBL5.

Biochem Biophys Res Commun. 2006 Nov 24;350(3):610-615.

【謝辞】

本研究は三菱化学生命科学研究分子加齢医学研究グループにおいて行われました。瀬藤リーダーをはじめ、関係各位に深く感謝いたします。また前指導教官であります、桐野豊徳島文理大学学長にも大変お世話になりました。この場を借りて深く御礼申し上げます。