

## 審査の結果の要旨

氏名 畠 中 謙

本研究は哺乳類神経系における ubiquitin 類似 (UBL) タンパク質の役割に注目し、その一つである UBL5 の低浸透圧応答に対する解析について研究を行ったものである。本論文は2部から成っている。第1部では UBL タンパク質ファミリーの進化保存性に関する解析を行い、UBL5 が酵母から存在する進化保存性の高いタンパク質分子であることを見出した。第2部ではその性質について詳細な解析を行い、UBL5 が低浸透圧状態に特異的に応答する分子であることを示し、哺乳類の UBL5 分子が体液浸透圧制御に関わる可能性を示した。

ユビキチン-プロテアソーム系によるタンパク質分解は、タンパク質の種類に選択的であり、多様な生体反応を迅速に順序よく、一過的にかつ一方に決定する合理的な手段として生命科学の様々な領域で中心的な役割を果たしている。一方で、真核生物のゲノムにはユビキチン以外に UBL タンパク質と呼ばれる分子が多数存在する。これらファミリータンパク質にはユビキチンの機能の一部を補完する役割があると考えられる。そこで申請者は、ユビキチン類似分子群がどのような性質を持っているか、特に、神経系においてどのような役割を担っているのか、その一端を明らかにすべく、まずは、その進化保存性に関する解析を行った。酵母、線虫、ショウジョウバエ、マウス、ヒトのゲノムデータベースより、Pfam database を用いて、ubiquitin domain を持つ分子群を UBL として抽出した。また Clustal W により分子遺伝系統樹を作成し、UBL の進化保存性を比較した。それら UBL タンパク質の発現部位について、mRNA の大規模データベースである FANTOM3 データセットを用いて検討した。この結果、申請者は以下のことを明らかにした。1. ヒト UBL ファミリーは 50 のタンパク質からなる。そのうちの 4 種類はユビキチン自身であり、残り 46 は ubiquitin と配列が相同な、UBL ドメインをもつタンパク質である。2. UBL ドメインファミリーは 37 のサブファミリーに分類され、ubiquitin、UBL5、NEDD8 は最も配列保存性の良いサブファミリーとして分類される。3. 神経系に発現する UBL は全体の 61%である。ヒト、マウス、ショウジョウバエ、線虫、酵母の計 5 つのモデ

ル動物について、ubiquitin、UBL5、NEDD8 という 3 つの分子が酵母からヒトまで、非常に高度に保存している遺伝子であった。このように進化保存性が高く、かつ、神経系で発現しているものは、神経系において基本的な役割を担っている可能性がある。

そこで、第 2 部では、UBL5 に絞って神経系における機能解析を進めた。マウス UBL5 は脳組織では視床下部に強く発現している。視床下部は、浸透圧を感知してホルモン分泌を介して体液の浸透圧を調整する浸透圧制御の中枢として知られている。そこで、マウス脳視床下部組織に存在する UBL5 が細胞外浸透圧の変化により制御される可能性を検討した。脳視床下部切片 (coronal section) に対し低浸透圧もしくは高浸透圧処理を行った後、タンパク質を抽出し、ウェスタンブロットにより UBL5 タンパク質の量を調べた。その結果、低浸透圧条件下 (200 mOsm) では等浸透圧条件 (300 mOsm) と比較して UBL5 タンパク質の有意な減少が認められた。一方、高浸透圧条件下 (400 mOsm) においては UBL5 タンパク質の量に変動は見られなかった。この現象をより詳しく解析するため、内在性 UBL5 タンパク質が発現していた NIH3T3 細胞を用いて引き続き実験を進めた。各種栄養状態の異なる培地中で培養した NIH3T3 細胞の UBL5 タンパク質量を調べたが、250 mM グルコース (生体内グルコース濃度 [5 mM] の約 50 倍) の処理では UBL5 タンパク質は変化せず、血清 20% 培地処理 (血清 2 倍濃度)、という高栄養状態によっても UBL5 タンパク質量は変化しなかった。同様に、無血清下で培養を行った場合にも UBL5 タンパク質レベルに変化は無かった。また、NaCl を添加して浸透圧を 2 倍にした培地においても UBL5 タンパク質レベルの顕著な変化は見られなかった。しかしながら、水で希釈した低浸透圧培地 (約 100 mOsm) では視床下部切片の場合と同様に内在性 UBL5 の顕著な減少が見られた。以上の結果は、UBL5 タンパク質はグルコース濃度や血清成分のような細胞外栄養素濃度には影響を受けず、低浸透圧に選択的に応答する事を意味している。また、この減少はプロテアソーム阻害剤により抑えられることから、低浸透圧による UBL5 タンパク質の減少はプロテアソーム依存的であることも明らかとなった。さらに、NIH-3T3 細胞に N 末 myc タグ-UBL5 を発現させて細胞内局在を観察したところ、等浸透圧条件下においては UBL5 タンパク質は細胞全体に局在しているが、低浸透圧処理 30 分後においては UBL5 タンパク質は核外に局在していた。この低浸透圧処理後の局在は、プロテアソーム阻害剤である MG132 によっては抑えられなかった。以上の結果は、低浸透圧刺激に

より核内の UBL5 分解が亢進するのではなく、UBL5 が核外へ放出された後に細胞質で分解される可能性を強く示唆するものであった。UBL5 の酵母ホモログ、および線虫ホモログが核内において遺伝子発現に関与していることを示す論文が相次いで報告されていることを考慮すると、これらの結果は、低浸透圧刺激が UBL5 を介して転写制御を行う可能性を示唆している。

以上のように、学位申請者は UBL5 が低浸透圧刺激に選択的に減少する事、また、その減少は直接浸透圧変化を感知して浸透圧制御を行う神経核の一つである視索上核においても減少することを発見した。低浸透圧に対して選択的に変化する分子は今までほとんど知られていない為、これらの知見は哺乳類の低浸透圧応答機構を解明する手掛りとなることから、生物学的に重要な発見であると考えられる。また将来的には抗利尿ホルモン不適合分泌症候群等の浸透圧制御機構の障害に対しての創薬ターゲットとなる可能性が考えられることから、薬学的にも意味のある研究成果であると思われる。よって、本研究を行った畠中謙は博士（薬学）の学位を受けるに相応しいと判断した。