

論文審査の結果の要旨

論文提出者氏名 後藤 章子

神経軸索変性は、いくつかの慢性的な神経変性疾患や、毒物、虚血、外傷等によって引き起こされる障害によって生じることや、神経変性疾患において神経細胞死に先んじて発生し、時には神経細胞死の原因となることが近年の研究により明らかとなっている。しかし、神経軸索変性の分子メカニズムの詳細はまだ明らかとなっていない。

ubiquitin-carboxy terminal hydrolase L1 (UCH-L1) 遺伝子が欠損した gracile axonal dystrophy (*gad*) マウスは、自然発症型の逆行性神経軸索変性の動物モデルである。UCH-L1 は神経や精巣/卵巣に高発現している、脳の可溶性タンパク質の 1-5%を占めるタンパク質である。また UCH-L1 は、生体内で重要な役割を担う、エネルギー依存的なタンパク質分解系であるユビキチン-プロテアソーム系 (ubiquitin-proteasome system :UPS)の構成酵素である脱ユビキチン化酵素の一種である。脱ユビキチン化酵素は、ユビキチンとその C 末端の小さな付加物との結合を加水分解し、遊離のユビキチンを作り出す作用を有することが *in vitro* の研究により報告されている。加えて、UCH-L1 は神経細胞においてモノユビキチンと結合しその安定化を担うという新たな機能を有することが近年明らかとなり、UCH-L1 欠損の *gad* マウスでは、神経細胞、特に坐骨神経の神経軸索において、モノユビキチン量が低下していることが明らかとなっている。

そこで、本論文提出者は、ユビキチン量が少なくなると UPS の標的タンパク質は十分に分解されないと推測し、モノユビキチンが顕著に低下している *gad* マウスにおいては何かしらのタンパク質が蓄積しているのではないかと、またそれらの分子が逆行性軸索変性の鍵分子となっているのではないかと仮説をたて、本論文において検証を行った。

まず始めに、本論文提出者は、蛍光標識二次元ディファレンスゲル電気泳動解析 (2D-DIGE)システムを用いて、*gad* マウスおよび正常マウスの坐骨神経タンパク質の網羅的発現解析を行った。その結果、*gad* マウスにおいて蓄積する分子として 14-3-3 および glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)を見出した。

続いて、各分子の特異的抗体を用いた免疫組織学的解析により、14-3-3 および GAPDH は坐骨神経の神経軸索内において優位に発現すること、また、GAPDH は *gad* マウスの神経軸

素内において凝集体を形成していることを見出した。神経変性疾患では異常凝集タンパク質の蓄積がその病態の原因であると考えられており、今回、軸索変性を生じる *gad* マウスの神経軸索において GAPDH の凝集体が検出されたことは、GAPDH が *gad* マウスの軸索変性の鍵分子となる可能性を示唆するものと考えられる。

更に、GAPDH に対する特異的抗体を用いた 2D-ウェスタンブロットング結果から、*gad* マウスにおいては GAPDH は何かしらの修飾を受けて増加していることが示唆された。GAPDH は、先行研究からリン酸化やスルホン化等も修飾を受けることが報告されており、近年特に着目されているのはスルホン化 GAPDH の機能についてである。酸化ストレスを受けると GAPDH はスルホン化されること、そしてスルホン化 GAPDH は細胞機能不全／細胞死におけるメディエーター機能を有することが報告されている。そこで、本論文提出者は、免疫組織学的解析により、*gad* マウス坐骨神経におけるスルホン化 GAPDH の発現および局在解析を行った。その結果、*gad* マウスの神経軸索内においてスルホン化 GAPDH が発現上昇していることが明らかとなった。

加えて、一般的酸化ストレスマーカーである 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) 化ペプチドを認識する抗体を用いた免疫組織学的解析により、*gad* マウスにおいて HNE 化ペプチドが顕著に増加しており、GAPDH と共に局在していることも明らかとなった。GAPDH 凝集体とスルホン化 GAPDH は、いずれも酸化ストレス負荷時に形成される細胞機能不全／細胞死におけるメディエーター分子とされるものである。今回 *gad* マウスにおいていずれもが増加しており、また、*gad* マウスにおいて酸化ストレスが亢進していることも明らかとなったことから、*gad* マウスの軸索変性の原因には、酸化ストレスおよび GAPDH の機能変化が関与する可能性が示唆された。

以上をまとめると、本研究において、軸索変性モデルである *gad* マウスの神経軸索において、GAPDH の顕著な増加とその凝集体が検出されることが明らかとなった。そして、免疫組織学的解析により、酸化ストレス負荷時に形成される細胞機能不全／細胞死のメディエーターとされている GAPDH のスルホン化修飾物が、*gad* マウス神経軸索において増加していることも明らかとなった。加えて、一般的酸化ストレスマーカーである HNE 化ペプチドが *gad* マウス神経軸索内で顕著に増加していることが明らかとなり、*gad* マウスにおいて酸化ストレスが亢進している可能性が示唆された。これらの結果から、*gad* マウスでは酸化ストレスが亢進し、細胞機能不全／細胞死メディエーターであるスルホン化 GAPDH や GAPDH 凝集体が神経軸索内に形成され、それらが *gad* マウスの軸索変性の発症原因の一端を担っている可能性が考えられる。軸索変性の発症メカニズムの詳細は明らかとなっておらず、その有効な治

療法もない現状において、本研究結果は、軸索変性の分子メカニズム解明の一端を担う有意義な結果である。

したがって、本審査委員会は博士(学術)の学位を授与するに相応しいものと認定した。