氏名 上地 浩之

本論文は、真核生物の主要な細胞内タンパク質分解経路であるユビキチン・プロテアソーム系を機能修飾する新規因子を同定することを目的とし、キイロショウジョウバエを用いた遺伝学的スクリーニングを実施し、本経路を介して分解されるユビキチン化タンパク質の細胞内動態を制御する新規因子の同定に至ったものである。

細胞内で役割を終えた制御性タンパク質や構造異常を来したタンパク質は、ユビキチン鎖を付加され、それを目印に巨大酵素複合体であるプロテアソームが選択的に分解を行う。本過程では、基質タンパク質にユビキチン鎖を付加する一連の酵素群、ユビキチン化基質をプロテアソームまで輸送するシャトル因子、分解前に基質からユビキチンを除去する脱ユビキチン化酵素、66 のサブユニットから成るプロテアソームを秩序立って形成させるアセンブリーシャペロンなど、多種多様な分子が関与し、本経路によるタンパク質分解を制御していることが知られている。しかし本分解経路が細胞内のどのような分子によりどのように制御されているのか、その全容については未解明な点が残る。本経路が細胞内の様々な生命現象に必須の役割を果たし、その破綻ががんや神経変性疾患などを惹起することを考慮すると、本経路の機能修飾因子を理解することは、基礎的な生命科学の理解のみならず種々の病態の発症機構の理解においても重要な課題である。本経路に関与する新規因子の解析には単細胞真核生物である出芽酵母が汎用されてきた。しかし、ヒトでは分子多様性や臓器特異性など本経路の複雑性が増加していることから、より高等なモデル生物を用いた探索が必要である。そこで本研究では、遺伝学的手法が発達したキイロショウジョウバエを用いて、ユビキチン・プロテアソーム系の新規機能修飾因子の遺伝学的探索を行った。

プロテアソーム関連遺伝子を組織特異的に発現抑制した際にハエ個体に生じる表現型を指標として、これを抑制するような遺伝子を探索する系を構築した。その中で、プロテアソーム機能に関与することが *TXNL1* の発現抑制によりメラニン化が亢進する表現型を見だし、これを指標としてゲノムワイドな *gain-of-function* スクリーニングを実施し、最終的にメラニン化を抑制する遺伝子を同定した。ショウジョウバエを用いてユビキチン・プロテアソーム系と遺伝学的に相互作用する新規因子を探索することは、これまでに報告されていない新規の手法である。

同定された遺伝子は哺乳類にも保存されており、ユビキチン会合 (UBA) ドメインを有することから、ユビキチン・プロテアソーム系への関与が疑われた。そこでまずはヒトオルソログを大腸菌に発現させ精製し GST プルダウンアッセイを行うことで、この分子が UBA ドメイン依存的にユビキチン化タンパク質と相互作用することを確認した。さらにこの分子の相互作用因子を質量分析にて解析したところ、Hsp70 と相互作用することが明らかとなった。これらのことかこの分子を HUIP (*heat shock proteins- and ubiquitin-interacting protein*) と命名した。

HUIP の機能を研究するために、CRISPR 法によりヒト HUIP ノックアウト (KO) 細胞を樹立した。HUIP の KO がユビキチン・プロテアソーム系に影響を与えるのか、KO 細胞内のユビキチン化タンパク質の量を解析してみると、定常時では野生型 (WT) 細胞株と比較してユビキチン化タンパク質の量に差は観察されなかったが、プロテアソーム阻害剤の処理時に KO 細胞で不溶化、凝集化したユビキチン化タンパク質が増加していることを見出した。一方で HUIP を細胞に過剰発現させると、プロテアソーム阻害時に生じるユビキチン陽性の凝集体を持つ細胞数が減少した。この効果は HUIP の UBA ドメインを欠損した変異体では観察されず、また Hsp70 の発現抑制や Hsp70 の阻害剤である VER-155008 の処理によっても観察されなくなった。これらのこ

とから、HUIPはHsp70と協調してユビキチンとの相互作用依存的にユビキチン化タンパク質の凝集化を抑制していることが示唆された。またここまでの観察からHUIPについて2つの機能が推測された。すなわちHUIPがユビキチン化タンパク質の凝集化を抑制しているのか、既に凝集化したものの解きほぐしを促進しているのか、である。後者の可能性について本研究ではTet-Onシステムを用いて検討した。あらかじめプロテアソーム阻害剤を処理し細胞内にユビキチン陽性凝集体を形成させたのちに、阻害剤の除去とHUIPの発現誘導を行い、凝集体の解消がHUIPの誘導で促進されるかを観察したが、HUIP未誘導細胞と比較して顕著な差は観察されなかった。ゆえにHUIPはユビキチン化タンパク質の凝集の解きほぐしではなく形成抑制に寄与しているものと結論付けた。

次にHUIPが凝集化を抑制する具体的な分子について検討した。本研究では筋萎縮性側索硬化症(ALS)の原因遺伝子である変異型TDP-43やSOD1に着目した。これらの変異タンパク質は細胞内でユビキチン陽性の凝集体を形成していることが報告されている。凝集化に寄与するTDP-43のC末端アミノ酸残基(C-TDP-43)や変異型SOD1をHUIP-KO細胞に発現させると、WT細胞と比較して不溶性画分にこれら分子が蓄積することが観察された。また内在のユビキチン化タンパク質と同様に、C-TDP-43の凝集化はHUIP-KO細胞では悪化し、一方でHUIP過剰発現では抑制された。ここでHUIPがこれら基質の分解に寄与するかを検討しており、HUIPの過剰発現により両分子のタンパク質量が減少すること、またシクロヘキシミド追跡実験によりHUIPがHsp70依存的に変異型SOD1の分解を促進することを見出した。細胞内の主要なタンパク質分解経路として、ユビキチン・プロテアソーム系とオートファジー・リソソーム系が存在するが、HUIPの分解促進効果は前者の阻害剤では抑制されたが後者の阻害剤では維持されたままであった。以上から、HUIPがTDP-43とSOD1の凝集化を抑制し、プロテアソームによる分解を促進していると結論付けた。

最後にHUIPの生理的な意義について検討した。HUIPを細胞で発現抑制するとプロテアソーム阻害剤への感受性が増加した。またハエ個体においてハエHUIP(dHUIP)を全身で発現抑制すると致死となり、複眼特異的に発現抑制を行うと複眼の変性と不溶性ユビキチン化タンパク質の蓄積亢進が観察された。これらからHUIPによるユビキチン化タンパク質の凝集抑制は生存に有利に働くものであることが示唆された。またdHUIPとALS原因遺伝子との遺伝学的相互作用について、変異型TDP-43を発現するトランスジェニックショウジョウバエを用いて検討した。変異型TDP-43をハエ複眼特異的に強制発現させると加齢依存的な変性が観察されるが、dHUIPの発現抑制はこれを悪化させ、HUIPの過剰発現は緩和させた。さらにイムノブロットによる解析からHUIPがモノマーのTDP-43や、ALS患者由来の細胞でも観察されるTDP-43によるスミアを減少させていることを見出した。これらよりHUIPが個体においてもTDP-43の凝集化を抑制し分解を促進することで、TDP-43による毒性から個体を保護している可能性を示した。

以上の研究から上地浩之は以下のモデルを提唱している。ユビキチン化タンパク質が凝集体を形成するとプロテアソームによる分解に耐性となり、これらはALS原因因子のように細胞に毒性をもたらす。HUIPはHsp70と協調してこれら凝集傾向にあるユビキチン化タンパク質の凝集化を抑制することで、結果としてプロテアソームによる分解を促進しているというものである。本研究はプロテアソームによるタンパク質分解の新たな分子機構を示しただけでなく、ALSの理解や治療にも貢献しうるものである。

よって本論文は博士(薬科学)の学位請求論文として合格と認められる。