

論文審査の結果の要旨

氏名 石村 亮輔

UFM1 はユビキチンに似た立体構造を有するタンパク質である。UFM1 は前駆体として合成され、システインプロテアーゼ UFSPs により C 末端を切断されグリシンを露出した成熟型となる。成熟型 UFM1 はユビキチン化に類似した反応系、すなわち独自の E1 様酵素 UBA5、E2 様酵素 UFC1、そして E3 様酵素 UFL1-UFBP1 複合体を介して細胞内タンパク質に共有結合する (UFM1 化)。基質タンパク質に結合した UFM1 は UFSPs により切断される。すなわち、UFM1 システムは可逆的な反応系である。他のユビキチン様タンパク質同様に UFM1 化は、多彩な生物学的プロセスを変容させると想定される。実際、UFM1 システムは巨核球-赤血球前駆細胞分化のみならず造血幹細胞維持に必須であることや UFM1 化の異常亢進が乳がんの増殖に寄与することなどが報告されてきた。しかし、UFM1 化の生理的意義、さらにはヒト疾患との関わりは不明のままであった。本論文では、UFM1 化の異常が遺伝性の重度発達障害を引き起こすこと、UFM1 化の促進方法を開発し病態に関与し得る新たな UFM1 基質を明らかにしたものである。本論文は、下記 3 項目の実験結果から構成されている。

1. 「UBA5 の複合ヘテロ接合体変異が遺伝性重度発達障害を引き起こす」

小頭症やてんかんなどを特徴とする原因不明の重度発達障害患者 5 家系 9 患者の遺伝子解析を行った。その結果、UFM1 の E1 様酵素である UBA5 の c.164G>A (p.Arg55His) と c.1111G>A (p.Ala371Thr) ないしはナンセンス変異と c.1111G>A (p.Ala371Thr) の複合ヘテロ接合体変異を同定した。試験管内再構成系および患者より採取した線維芽細胞を用いた解析から、変異 UBA5 は酵素活性が減弱しており、結果的に UFM1 化が障害されていた。さらに、中枢神経系特異的 *Ufm1* ノックアウトマウスを作製、解析した結果、特定の領域の神経細胞死を伴った小頭症を呈し、生後数日以内に死亡することを見出した。これらの結果は、UFM1 システムが神経細胞の発生、生存に重要な役割を担うこと、そして、その異常が遺伝性重度発達障害を引き起こすことを意味している。

2. 「UFM1 化促進方法の確立」

UFM1 の標的タンパク質の未同定が、UFM1 研究の発展を遅らせてきた最大の理由である。この問題を解決するために、UFM1 の脱 UFM1 化酵素 UFSP2 (ヒトの UFSP1 は不活性型である) を欠損した細胞を作製した。驚いたことに、UFSP2 欠損細胞において「前駆体 UFM1 の減少」と「UFM1 化した基質タンパク質の蓄積」が観察された。このことは UFSP2 以外に前駆体 UFM1 の C 末端を切断する未同定の酵素が存在すること、UFSP2 は標的タンパク質から UFM1 を切断する酵素であることを意味する。UFSP2 欠

損細胞に成熟型 UFM1、E3 構成タンパク質である UFL1 と UFBP1 を発現させると、安定に複数の UFM1 化タンパク質を検出することができた。この条件下では、UFM1 化された標的タンパク質はミクロソーム画分に集積しており、蛍光顕微鏡観察でも UFM1 化基質の多くは小胞体上に局在した。これらのことは、小胞体で UFM1 システムが機能することを示唆する。さらに、確立した方法は UFM1 化が安定に検出できることから、患者由来の変異 UBA5 の僅かな UFM1 化に与える影響をモニターすることもできた。

3. 「病態関連 UFM1 標的タンパク質 CYB5R3」

上記 2 に記載した方法を用い UFM1 化を促進させた後、UFM1 化タンパク質を精製し、質量分析を行った。その結果、UFM1 の基質の一つとして CYB5R3 (NADH-Cytochrome b5 reductase 3) を同定した。CYB5R3 の変異体解析から、214 番目のリジン残基に UFM1 が共有結合することを見出した。CYB5R3 は Type II recessive congenital methaemoglobinaemia の原因遺伝子であり、その患者は UBA5 複合ヘテロ接合体変異を持つ重度発達障害患者とよく似た脳症を呈する。CYB5R3 は脂肪酸の不飽和化酵素に電子を供給することで多価不飽和脂肪酸の合成に必須な役割を担う。多価不飽和脂肪酸は胎児の身長、脳の発達に重要であり、CYB5R3 変異による多価不飽和脂肪酸合成不全が病態発症に関与することが示唆される。UBA5 変異による酵素活性の減弱が CYB5R3 の UFM1 化を低下させ、胎児期の多価不飽和脂肪酸合成不全により発達障害が発症することを想定している。

なお、本論文の研究成果は論文提出者が主体となって分析および検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士（医科学）の学位を授与できると認める。

以上 1 9 9 9 字