［ 別 紙 ２ ］

# 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

申請者氏名　徐　楊

タンパク質分解は正常な細胞機能を維持する本質的な細胞活性の 1 つである。ユビキチン-プロテアソーム系(UPS)タンパク質分解は、まず 76 個のアミノ酸からなるユビキチンは基質タンパク質に共有結合する。続いて、基質タンパク性はポリユビキチン鎖によって誘導され、26S プロテアソームに認識され分解する。UPS によるタンパク質の分解は細胞内タンパク質分解、細胞周期の制御、転写の制御、ストレス応答およびアポトーシスなどの重要な役割を果たしている。脱ユビキチン酵素（DUB）は、ユビキチン-タンパク質結合を開裂する 60 を超える既知のプロテアーゼの一群である。脱ユビキチン酵素はユビキチンに特異的なプロテアーゼ(UBP)とユビキチン C 末端加水分解酵素(UCH)に大別される。ユビキチン C 末端加水分解酵素 1 型(UCH-L1)は、神経細胞、生殖組織において選択的に発現する UCH の 1 つである。

下垂体は視床下部の脳-下垂体-生殖腺(HPG)軸の中の重要な要素であり、生殖および免疫において重要な役割を果たしている。下垂体の前葉は、主に 5 個のホルモン産生細胞および 1 種類の非ホルモン産生である濾胞星状細胞からなる。脳下垂体前葉での UCH-L1 の発現は観察されているが、詳細な発現パターンおよび下垂体前葉における UCH-L1 の役割は未解明である。本研究では脳下垂体前葉中の UCH-L1 の機能を詳細に検討することを目的とした。

第 1 章

UCH-L1 タンパク質は非ホルモン生産する濾胞星状細胞ではなく、下垂体前葉ホルモン産生細胞において発現していることを見出した。さらに、UCH-L1 の細胞質での発現は gonadotrope 細胞と mammotrope 細胞に限定されていた。下垂体前葉での UCH-L1 の役割を調べるために、野生型および遺伝学に UCH-L1 を欠損する *gad* マウスを使用して、比較分析を行なった。UCH-L1 を欠損する *gad* マウスでは gonadotrope 細胞と mammotrope 細胞の数が明かに減少していた。他のホルモン産生細胞の数に違いはなかった。これらの結果は、UCH-L1 が gonadotrope 細胞と mammotrope 細胞の成熟分化/維持に関連していることを示唆している。

第 2 章

マウスの下垂体前葉は小さく、gonadotrope 細胞は下垂体前葉細胞集団のおよそ 10%しかない。したがって、UCH-LI の役割を調べるために多数の gonadotrope 細胞を準備するのは容易ではない。それで、gonadotrope 細胞における UCH-LI の役割を調べるために gonadotrope 培養細胞株であるαT3-1 細胞および LβT-2 細胞を用いた。まず、２つの培養細胞株に UCH-L1 が発現していることを確認した。アポトーシスは組織での細胞集団を量的恒常性に関与する重要な細胞機構であり、神経細胞や生殖細胞のアポトーシスに UCH-L1 が関与していることが報告されている。それで、マウスの下垂体 gonadotrope 細胞の減少が gonadotrope 細胞のアポトーシスによる可能性があるので、その点について検討した。その結果、UCH-L1 特異的阻害剤 LDN-57444 を処置した LβT-2 細胞にアポトーシスが誘導された。したがって、*gad* マウスの下垂体前葉の gonadotrope 細胞が少ない理由として UCH-L1 の欠損によるアポトーシスの亢進が考えられた。

第３章

近年分子生物学の発展により、遺伝子導入によるタンパク質発現量の一時的上昇あるいは抑制により、当該遺伝子の機能を推定する方法論が良く用いられている。本章では、UCH-L1 タンパク質発現量の一時的上昇あるいは抑制により、gonadotropin 遺伝子の発現が影響を受けるかどうか検討した。UCH-L1 の発現を一時的に上昇させるために、pcDNA 3.1 ベクターを基に UCH-L1 の翻訳領域の塩基配列を導入した発現ベクターを構築した。このベクターを導入した LβT-2 細胞では UCH-L1 の発現が上昇したが、gonatotropin 遺伝子の発現量には変化が無かった。また、LβT-2 細胞に UCH-L1 特異的 siRNA を処置すると UCH-L1 の発現量は約 1/2 まで減少したが、gonadotropin 遺伝子の各サブユニットの mRNA 発現には変化が無かった。これらの結果は、UCH-L1 の発現レベルが LβT-2 細胞の gonadotropin 遺伝子の転写には影響しないことを示唆している。UCH-L1 がマウスの gonadotrope 細胞のホルモン産生において必要であるというのは真実ではないかもしれない。

これらの成果は、マウス下垂体における UCH-L1 の発現を初めて詳細に観察したものであり、また下垂体細胞における UCH-L1 の機能を評価する上でも重要な知見となる。したがって、これらの研究成果は獣医学学術上貢献するところが少なくない。よって、審査委員一同は、本論文が博士（獣医学）の学位論文として価値のあるものと認めた。