

| | | | |
|---------|--|--------|--------|
| 氏名（本籍） | 木越 悠 | | |
| 学位の種類 | 博 士（ 理 学 ） | | |
| 学位記番号 | 博 甲 第 | 7319 | 号 |
| 学位授与年月日 | 平成 27 年 3 月 25 日 | | |
| 学位授与の要件 | 学位規則第 4 条第 1 項該当 | | |
| 審査研究科 | 生命環境科学研究科 | | |
| 学位論文題目 | The Function and Regulation of KLHL7, a Retinitis Pigmentosa Causative Gene Product (網膜色素変性症責任遺伝子産物KLHL7の機能と制御) | | |
| 主査 | 筑波大学教授 | 博士（医学） | 千葉 智樹 |
| 副査 | 筑波大学教授 | 博士（理学） | 中田 和人 |
| 副査 | 筑波大学准教授 | 博士（農学） | 三浦 謙治 |
| 副査 | 筑波大学教授 | 博士（理学） | 石田 健一郎 |

論 文 の 要 旨

ユビキチンリガーゼは特異的な基質にポリユビキチン鎖を付加し、基質の選択的なタンパク質分解を誘導する。この選択的タンパク質分解は細胞周期進行やシグナル伝達など様々な生命現象の制御に必須である。ユビキチンリガーゼの中でも最も大きなファミリーを形成している Cullin(Cul)型ユビキチンリガーゼ複合体は、足場となる Cul ファミリータンパク質、活性サブユニットの Roc1 と基質認識サブユニットによって構成され、基質認識サブユニットを交換することで、それぞれ特異的な基質をユビキチン化する。一部の BTB タンパク質は基質認識サブユニットとして Cul3 と複合体を形成することが知られる。優性遺伝型網膜色素変性症の原因遺伝子産物として同定された KLHL7 は BTB タンパク質をコードするが、その機能は未解明であった。そこで本研究では、KLHL7 の機能とその病原性変異がもたらす機能異常を明らかにすることを目的とした。さらに KLHL7 の活性制御機構と生理的意義明らかにするために、基質候補と制御因子の探索を行い、*klhl7* 欠損マウスを作製した。

KLHL7 は、Cul3 および Roc1 と複合体を形成し、BTB ドメインを介して二量体を形成した。また、KLHL7-Cul3 複合体は試験管内再構築系においてユビキチンリガーゼ活性を示した。これらのことから KLHL7 は二量体型の KLHL7-Cul3 複合体ユビキチンリガーゼを形成すると考えられた。次に病原性変異の機能異常を調べた。病原性変異は 150 番目のセリン(S150)と 153 番目のアラニン(A153)のアミノ酸のミスセンス変異であり、そのうち A153 は脊椎動物種間だけでなく、他の BTB タンパク質とも高く保存されていた。A153 変異型 KLHL7 は Cul3 と相互作用しなかったが、野生型 KLHL7 とヘテロ二量体を形成することができ、そのヘテロ二量体型の KLHL7-Cul3 複合体はユビキチンリガーゼ活性が抑制された。以上の結果から、KLHL7 は二量体を形成し、Cul3 および Roc1 と複合体を形成することでユビキチンリガーゼとして機能すること、A153 変異体は KLHL7-Cul3 複合体の活性をドミナントネガティブに抑制することが明らかとなり、その特異的基質のユビキチン化不全が網膜色素変性症を引き起こすと考えられた。

次に KLHL7 の基質と制御因子を同定するために、KLHL7 と相互作用する因子の質量分析を行った。その結果、KLHL7 は Cullin ドメインをもつ CACUL1 と相互作用すること、多くのスプライシング関連因子と相互作用することが示唆された。また、KLHL7 の *in vivo* 機能の解析を行うために、Cre/LoxP システムにより *klhl7* 遺伝子のエクソン 2,3,4 を条件的に欠損可能なマウスを作製し、全身性に Cre を発現している Ayu-Cre

マウスと交配することで全身性 *klhl7* 欠損マウスを取得した。また *klhl7* 欠損マウスより *klhl7* 欠損線維芽細胞株を樹立した。

CACUL1 は Cullin ドメインを持つタンパク質であり、一部のがんにおいて高い発現を示すこと、細胞を過酸化水素で処理すると発現上昇すること、アルツハイマー病患者の海馬では発現が低いことなどが報告されていた。しかし、ユビキチン化反応経路における役割など、その機能はわかっていなかった。CACUL1 と KLHL7-Cul3 複合体の相互作用を解析したところ、CACUL1 は KLHL7-Cul3 複合体と相互作用した。また、CACUL1 は Cul3 複合体のユビキチンリガーゼ活性を抑制した。CACUL1 の発現は酸化ストレスによって誘導され、その発現のノックダウンは酸化ストレスに対する細胞生存率を低下させた。以上のことから、CACUL1 は酸化ストレス応答経路に重要であり、ストレス時に KLHL7 のユビキチンリガーゼ活性を負に制御している可能性が考えられた。

KLHL7 相互作用因子には多くの mRNA スプライシング関連因子のほか、アルギニルメチルトランスフェラーゼ PRMT5 と相互作用する一連のタンパク質が得られた。そこで、KLHL7 と PRMT5 の結合を免疫沈降法で検証したところ、KLHL7 は PRMT5 と結合し、そして試験管内再構築系において PRMT5 をユビキチン化した。さらに変異型 KLHL7 は PRMT5 のユビキチン化を抑制することがわかった。以上のことから、PRMT5 は KLHL7 の標的タンパク質であることが判明した。PRMT5 は複数種類のタンパク質をメチル化することで様々な細胞反応経路の制御に関与する。その中でも、Sm タンパク質のメチル化はスプライシング機構の制御に重要であり、*prmt5* 欠損脳ではスプライシング異常を起こすことが知られている。そこで、*klhl7* 欠損マウス線維芽細胞における U1、U2、U4、U5、U6 snRNA の量を測定したところ、*klhl7* 欠損細胞では野生型と比べ、snRNA の量が異常となっており、スプライシング機構に異常のあることが示唆された。次に、mRNA スプライシングを解析したところ、*klhl7* 欠損細胞では *prmt5* 欠損脳と同様に MDM4 mRNA のエクソンスキッピングが検出された。以上のことから、KLHL7 は PRMT5 のユビキチン化を制御し、スプライシング機構の制御に重要であることが明らかとなった。

以上、本学位論文では、KLHL7 がユビキチンリガーゼとして機能すること、その標的基質がメチルトランスフェラーゼ PRMT5 であること、標的基質のユビキチン化は mRNA スプライシングの制御に重要であることを明らかにした。そのため KLHL7 の病原性変異は、PRMT5 のユビキチン化不全や mRNA スプライシング異常を起こし、網膜色素変性症を発症させると考えられた。さらにユビキチンリガーゼ活性を制御する新奇因子 CACUL1 も発見し、それが酸化ストレス応答に重要であることを明らかにした。

審 査 の 要 旨

本学位論文は、機能未知であった網膜色素変性症原因遺伝子産物 KLHL7 の機能を、生化学的、細胞生物学的、構造生物学的、発生工学的に解明したものであり、その成果の基礎生物学的な価値は高い。また、網膜色素変性症の発症機序の理解に貢献するものとしても高く評価される。本論文によって、KLHL7 が RNA スプライシング制御に関わることが示され、またその重要性が遺伝子欠損マウスで実証されたことは特筆に値する。この遺伝子欠損マウスは病態モデルマウスとして有用であり、様々な分子データを得られる点で価値が高い。さらに、本論文において発見された新奇制御因子は酸化ストレス応答に重要であり、Cul 型ユビキチンリガーゼ複合体をこれまで例のないメカニズムで抑制したことの発見の学術的価値は高いと評価できる。

平成27年2月2日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士（理学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。