

氏名(本籍)	たつ 辰 巳 かなこ (滋賀県)		
学位の種類	博 士 (医 学)		
学位記番号	博 甲 第 5476 号		
学位授与年月日	平成 22 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	人間総合科学研究科		
学位論文題目	ユビキチン様修飾システム Ufm1 system の遺伝学的解析		
主 査	筑波大学教授	医学博士	二 宮 治 彦
副 査	筑波大学教授	博士(理学)	入 江 賢 児
副 査	筑波大学准教授	博士(医学)	洪 谷 和 子
副 査	筑波大学助教	博士(理学)	山 下 年 晴

論 文 の 内 容 の 要 旨

(目的)

ユビキチンはユビキチン活性化酵素 (E1)、ユビキチン結合酵素 (E2)、ユビキチンリガーゼ (E3) からなる精巧なシステムを介して、標的タンパク質を修飾する。ユビキチンによる、タンパク質修飾は、プロテアソームによるタンパク質分解、DNA 修復、翻訳調節など多彩な細胞内機能を制御する。近年、構造的にユビキチンに類似した分子群 (Ubiquitin-like-protein : Ubl) が多数同定されている。Ufm1 はその中でも最も新しい Ubl である。Ufm1 はユビキチンと同様に、E1 様酵素 (Uba5)、E2 様酵素 (Ufc1)、E3 様酵素 (Ufl1) の酵素を介してタンパク質を修飾する。この Ufm1 システムに関わる遺伝子群はいずれも酵母には存在せず、植物や後生生物以降に発生してきたことから、多細胞生物が進化的に獲得してきた新しいタンパク質修飾システムであり、高等生物において特異的な役割を担うと考えられる。これまで培養細胞系を用いては明らかにすることができなかった、Ufm1 システムの作用機構と個体における生理的意義の全貌解明を目的とした。

(対象と方法)

Ufm1 には複数の標的タンパク質が存在すると考えられ、それらが細胞内で果たす役割は多岐に渡ると予想される。Ufm1 システムの生体内における機能解明の最大の鍵は標的タンパク質の同定である。そこで、Ufm1 の標的タンパク質の同定を目指し、以下の遺伝子改変マウスを作製・解析した。

1) Uba5 の単純ノックアウトマウス

Ufm1 の E1 様酵素である *Uba5* 欠損マウスを作製し、Ufm1 システムの遮断された Ufm1 システムノックアウトマウスがどのような表現型を示すか、解析を行った。

2) 赤血球特異的 Uba5 レスキューマウス

Uba5 欠損マウスが赤血球分化に異常を来すことが明らかとなった (結果参照) ので、赤血球特異的に *Uba5* を発現するトランスジェニックマウスを作製し、*Uba5* ヘテロマウスと交配させることにより、内因性の *Uba5* は持たず、トランスジェン由来の *Uba5* だけを持つノックアウトレスキューマウスを獲得した (complementation rescue 法)。この方法では、トランスジェン由来の *Uba5* の発現量を自在にコントロールできるため、発現量の違いによる *Uba5* の機能的差異を明らかにすることが可能である。また、ノックアウト

レスキューマウスにより胎生致死を回避できれば、血球系以外の Uba5 の機能を成獣で観察できることになる。

これら Uba5 関連遺伝子改変マウスの解析により、Uba5 の造血システムにおける機能や重要性を個体レベルで解析した。

(結果)

Uba5 ノックアウトマウスは、成長遅延とともに、特に顕著な表現型として肝臓における造血細胞の著しい減少（貧血）を呈した。また胎生 12.5 - 13.5 日で致死となった。胎児肝臓の薄切切片の HE 染色像、および胎児末梢血のライトギムザ染色像から、多核を呈する形態異常赤血球の増加が観察された。このことは羊膜由来の一次造血に異常があることを示唆している。また肝臓切片のグロビン染色においては、 β -および ϵ -グロビン陽性赤血球の両者共に異常赤血球が観察され、一次造血、二次造血どちらも異常があることが示唆された。そこで Ufm1 システムが赤血球造血に重要な役割を担っているのではないかと推測し、より詳細な血液学的解析（フローサイトメトリー解析、コロニーアッセイ）を、胎児肝臓を用いて行なった。その結果、赤芽球コロニー形成能の低下と、CMP（骨髄球系共通前駆細胞）から MEP（巨核球／赤血球系前駆細胞）への分化障害を確認した。つまり赤血球系特異的に分化障害が認められ、二次造血においても異常があることが示された。

次に赤血球の分化に必須の転写因子である GATA-1 の造血制御領域（Gata-1 gene hematopoietic regulatory domain: G1HRD）を用いて、血球特異的 Uba5 トランスジェニックマウスを作製した。G1HRD は GATA-1 の発現を再現するのに十分な領域である。Uba5 の過剰発現による顕著な影響は認められなかった。このマウスと *Uba5* ヘテロマウスとを交配させ、得られた *Uba5*^{+/::Tg^{Uba5} マウスと *Uba5* ヘテロマウスをさらに交配することにより、造血細胞のみで Uba5 を発現する *Uba5*^{-/-::Tg^{Uba5} マウスを作製した。その結果、このマウスは *Uba5* ノックアウトマウスで認められた赤血球造血の異常（赤血球の形態異常、赤芽球コロニー形成能の低下、CMP から MEP への分化障害）がすべて回復し、胎生 15.5 日まで延命した。しかし、胎生致死は回避できなかった。これらの結果から、Ufm1 システムが赤血球分化において必要不可欠であり、赤血球分化以外にも、生死に関わる重要な働きを担っていることが推察された。}}

(考察)

Ufm1 の標的タンパク質の中で、造血に関わるものの候補の 1 つとして、造血関連転写因子を想定しており、転写のオン・オフを Ufm1 による修飾で制御しているのではないかと考えている。また、レスキューマウスにおいて、血球系の異常はすべて正常に回復したが、肝臓サイズが小さいこと（発生遅延）や、ノックアウトマウスの MEF 細胞の増殖が遅いこと等が認められたことから、細胞増殖にかかわる因子の修飾も行っているのではないかと考えている。

赤血球特異的レスキューマウスが胎生致死を克服できなかったことや、Ufm1 システムが植物にも保存されているシステムであり、Ufm1 システムの標的分子群が普遍的に存在することから、血球系以外での役割が存在すると考えられ、複数の標的タンパク質の存在を裏付ける結果となった。これらを解析するため、成獣での解析を目的として、現在コンディショナルノックアウトマウスを作製している。このマウスを利用して、多数存在するであろう Ufm1 の標的タンパク質を同定し、Ufm1 システムの役割の解明に力を注ぎたいと考えている。

審 査 の 結 果 の 要 旨

1. Ufm1 システムが赤血球分化に必須なシステムであることを示した点は高く評価できるが、当初目的とした標的タンパク質の同定には至っていない。

2. Ufm1 システムが生死に関わる、血球分化以外の役割を担っていることを明らかにしているが、依然そのメカニズムは明らかではなく今後の研究の発展を期待する。
3. 学位申請者の学術研究に対する真摯な態度が伺え、本研究は貴重な科学データを提供したと考えられる。よって、著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。