

氏名	菊川 裕介		
学位の種類	博士(生物科学)		
学位記番号	博甲 第 8567 号		
学位授与年月日	平成 30年 3月 23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	Studies on Substrate Recognition Mechanism and Physiological Function of Rpn10, A Subunit of 26S Proteasome (26S プロテアソームサブユニット Rpn10 の基質認識機構と生理機能に関する研究)		
主査	筑波大学准教授	博士(理学)	中野賢太郎
副査	筑波大学教授	学術博士	橋本 哲男
副査	筑波大学教授	博士(理学)	稲垣 祐司
副査	筑波大学教授	博士(医学)	千葉 智樹

論 文 の 要 旨

ユビキチンプロテアソームシステムは、細胞周期の進行や発生段階の遷移に伴い不要になったタンパク質や、様々な要因で生じた変性タンパク質を除去するための、細胞内の主要な品質管理機構である。このシステムでは、分解されるべきタンパク質がポリユビキチン鎖の共有結合により標識され、プロテアソームという巨大分子複合体のプロテアーゼにおいて分解される。しかし、プロテアソームがどのようにポリユビキチン鎖と基質を認識しているかは不明な点が多く残されている。この問題について、本論文で著者は、細胞内のタンパク質分解において中心的な役割を果たす 26S プロテアソームに着目し、ユビキチン鎖と親和性を有することが知られている 26S プロテアソームのサブユニットの 1 つである Rpn10 の基質認識機構と生理機能について研究し、その成果を報告している。

本論文の第 1 章において著者は、Rpn10 のスプライシングバリエーション (アイソフォーム) の存在に着目し、系統が異なる生物において、そのスプライシングの有無と種類について調べた。マウスでは選択的スプライシングで生ずる 5 種類のアイソフォーム (Rpn10a, Rpn10b, Rpn10c, Rpn10d、及び Rpn10e) が存在する。線虫 (線形動物)、ショウジョウバエ (節足動物)、カタユウレイボヤ (原索動物)、メダカ (魚類)、およびアフリカツメガエル (両生類) について、著者が Rpn10 のゲノム配列と構造を解析した結果、少なくとも調べた脊椎動物では、マウスと同様な Rpn10 のアイソフォームが存在することが支持された。同時に著者は、カタユウレイボヤの Rpn10 ではそれらの選択的スプライシング部位が部分的に保存されていたが、線虫やショウジョウバエのものでは、脊椎動物と同様なスプライシング部位を見出すことはできなかった。そのため、著者は、脊椎動物への進化の初期過程において Rpn10 のアイソフォームの多様性が獲得された可能性を提唱した。

第 2 章で著者は、脊椎動物が複数の Rpn10 のアイソフォームをもつ意義を明らかにするため、アフリ

カツメガエルの Rpn10a および Rpn10c を実験材料に用いた研究結果について述べている。まず著者は、Rpn10a は恒常的に発現するアイソフォームであるのに対して、Rpn10c は発生段階で顕著に発現上昇することを見出した。次に著者は、それぞれの Rpn10 アイソフォームを COS7 細胞に、ユビキチン、および種々のユビキチン様 (UBL) タンパク質と共に発現し、免疫沈降法を利用してそれらの相互作用を検討した。その結果、Rpn10c に特異的に結合する UBL タンパク質の Scythe を同定した。さらに著者は、*in vivo* において Scythe が Rpn10c 特異的に 26S プロテアソームと相互作用することを証明した。また著者は、Rpn10c と Scythe の両遺伝子の欠失変異体を作製し、COS7 細胞に強制発現させて共沈降実験を行い、両タンパク質の相互作用ドメインを明らかにした。即ち、Scythe は Rpn10c の C 末端領域の 10c-box に結合し、Rpn10c は Scythe の N 末端領域にある既知の UBL ドメインに加え、さらにそれに続く領域にもみられる UBL ドメインにも結合することを著者は見出した。第 2 章の最後に著者は、アフリカツメガエル胚に様々な Scythe 欠失変異体を発現させた実験を行った。著者は、両方の UBL をもたない Scythe の C 末端領域のみの欠失変異体をコードする mRNA を、2 細胞期の片側の割球に注入した。その結果、オタマジャクシへの発生をほぼ完全に阻害することを発見した。これより著者は、Scythe の 2 箇所の UBL はアフリカツメガエルの発生段階において冗長的に働いている可能性を指摘し、さらに Scythe の UBL ドメインはアフリカツメガエルの正常な胚発生に必要なであることを示した。以上の結果とこれまでに報告されている知見を踏まえて、著者は、Rpn10c と Scythe が相互作用することで、分子シャペロン Hsp70 及び E3 リガーゼ CHIP によって発生過程においてユビキチン化されたタンパク質を、プロテアソーム特異的に効率的に分解するモデルを提唱した。

審 査 の 要 旨

動物の発生段階では、短時間のうちに新たな細胞や組織が作り出されるために、遺伝子発現パターンの劇的な変化と並行して、活発な基質選択性の高いタンパク質分解が要求される。本論文で著者が緻密な実験を重ね、Rpn10c アイソフォーム特異的なユビキチン様タンパク質 Scythe の同定に成功した成果は、生化学、細胞学、発生学などの観点から極めて価値が高い。さらに、脊椎動物の胚発生の正常な進行に必要なプロテアソームの基質認識の新たな分子機構の一翼を、Rpn10 の選択的スプライシングが担っているのを示したことは学術的に大変に興味深い発見である。さらに進化発生学の観点から、生物種と Rpn10 の選択的スプライシングの多様性の関係を見出した本研究成果は特筆に値する。

平成 30 年 1 月 29 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 (生物科学) 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。