

学位論文題名

Functional analysis of TRIM67 - TRIM67 Protein
negatively regulates Ras activity through degradation of
80K-H and induces neuriteogenesis -

(小脳に特異的に発現するTRIM67の機能解析 — TRIM67は80K-Hの
分解を介してRasの活性を抑制し、神経突起様伸長を促進する —)

学位論文内容の要旨

【背景と目的】近年神経変性疾患において、ユビキチン化が注目されており病理評価においてもユビキチン染色の重要性が増している。さらにはユビキチン封入体の構成成分の解析等により筋委縮性側索硬化症等の神経変性疾患の病態解明が進んでいる。また TRIM67 とアミノ酸レベルで相同性の高い TRIM9 はマウスとヒトの大脳皮質に強く発現し、パーキンソン病やレヴィー小体病で発現が低下し、レヴィー小体の構成タンパクの一つであることが報告されている。そのため本研究において、神経疾患に関与している可能性のある TRIM67 を同定しその機能を検討した。

【材料と方法】遺伝子発現データベース (BioGPS) において脳に特異的に発現している TRIM ファミリータンパク質を検索したところ、TRIM67 を見いだした。TRIM67 は TRIM9 とアミノ酸レベルで相同性が高いため、TRIM67 と TRIM9 の相補的 DNA を作製し、さらに酵母ツーハイブリット法にて相互作用するタンパク質を検索した。TRIM67 の変異体、タンパク質及び抗体などを作製し、哺乳類細胞株を使用してウエスタンブロット法、ユビキチン化、免疫染色法及びノックダウン法などの生化学的解析により TRIM67 の分子生物学的機能を解析した。

【結果】TRIM67 は小脳に強く発現していた。TRIM67 と TRIM9 の cDNA を用いて酵母ツーハイブリット法を行い、結合候補タンパク質として PRG-1・PRG-2 と 80K-H を同定した。さらに、哺乳類細胞内で TRIM67 と PRG-1・PRG-2 と 80K-H が結合することを確認した。さらにピトロで TRIM67 と 80K-H が直接結合し、TRIM67 が哺乳類細胞内で 80K-H をユビキチン化し、さらに TRIM67 恒常的発現 N1E115 細胞株と TRIM67 ノックダウン N1E115 細胞株を用いて TRIM67 が 80K-H の分解を促進することを示した。また TRIM67 恒常的発現 N1E115 細胞株では Ras の活性が抑制され、細胞増殖能の低下と神経突起様伸長が促進されていた。さらに 80K-H ノックダウン N1E115 細胞株でも TRIM67 恒常的発現 N1E115 細胞と同様に細胞増殖能の低下と神経突起様伸長の促進を認めた。

【考察】TRIM67 は小脳に強く発現し、80K-H・PRG-1 と複合体を形成する可能性が示された。さらに TRIM67 が 80K-H のユビキチンリガーゼ E3 として機能することでユビキチン化と分解促進に働くと考えられる。80K-H は元来 Ras 活性に関わる複合体形成タンパク質として同定された経緯があるため、TRIM67 過剰発現によりが神経細胞株において small G protein である Ras の

活性化を検討し、TRIM67はRasの活性を抑制することで細胞増殖能の低下と神経突起様伸長を促進することも示した。今回我々は、80K-HのノックダウンによるN1E115細胞の形態的・生物学的変化が、TRIM67もしくはTRIM9の恒常的発現N1E115細胞株での変化と類似していることも示した。これらの結果は、TRIM67が80K-Hを分解し、その結果としてRasの活性を抑制すること示唆する。さらに80K-HはRasの活性に影響を与えるだけでなく、IP3Rに直接結合することで、その機能を減弱することが報告されており、IP3Rノックアウトマウスでは、プルキンエ細胞の形成不全により小脳失調とけいれん発作が起こることが報告されていることから、TRIM67とTRIM9は80K-Hを介してIP3Rの機能も制御している可能性が考えられる。またPRG-1神経突起様伸長に関与することが報告されており、今回の検討では、TRIM67恒常的過剰発現N1E115細胞とTRIM9恒常的過剰発現N1E115細胞株でPRG-1のタンパク質発現量が増加していたことより、TRIM67とTRIM9は何らかの機序でPRG-1の機能を促進している可能性がある。以上よりTRIM9とTRIM67は同様の機能をTRIM9が脳を中心とし、TRIM67が小脳・脳幹・脊髄を中心として果たしている可能性が考えられる。今後は、TRIM9とTRIM67のダブルノックアウトマウスを作製することや、生化学・分子生物学的見地からTRIM9・TRIM67との80K-H・PRG-1・IP3Rへの関与も検討すること、また臨床の見地から原因不明の小脳失調において遺伝子変異等でのTRIM67の関与の検討を行うことで、今後神経発生機能や神経疾患の解明が望まれる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 寶 金 清 博
副 査 教 授 佐々木 秀 直
副 査 教 授 大 場 雄 介
副 査 教 授 畠 山 鎮 次

学位論文題名

Functional analysis of TRIM67 - TRIM67 Protein negatively regulates Ras activity through degradation of 80K-H and induces neuritogenesis -

(小脳に特異的に発現するTRIM67の機能解析 — TRIM67は80K-Hの
分解を介してRasの活性を抑制し、神経突起様伸長を促進する —)

近年、パーキンソン病や筋萎縮性側索硬化症 (ALS) を始めとする神経疾患においてユビキチン化は重要な位置を占めている。ユビキチン化の研究において、その基質特性を担うユビキチンリガーゼ E3 の機能解析が重要とされている。本研究では、ユビキチンリガーゼ E3 の可能性がある TRIM ファミリータンパク質のうち、小脳に特異的に発現している可能性の高い TRIM67 を中心に、その生理的機能を解析した。その結果、TRIM67 は PRG1 や 80K-H と複合体を形成し、さらには 80K-H に対しては直接結合し、ユビキチン化依存性に分解することを分子生物学的解析方法と生化学的解析方法を用いて示した。

学位論文審査では学位申請者発表の後、大場雄介教授より 1) ユビキチンの研究の緒言をさらに学位論文に記載すべきである。2) 抗体作製方法に関する詳細を学位論文に記載すべきである。3) TRIM67 による PRG1 のタンパク質量増加のメカニズムは解明できたか。4) TRIM67 の RING ドメイン欠損変異体安定発現株での活性型 Ras と PRG1 の検討を行ったか。5) Mock という表現は Control に置き換えるべきである。6) 血清における最も重要な神経伸長因子は PDGF (血小板由来増殖因子) であり、LPA (リゾフォスファチジン酸) も血清中に含まれる。N1E115 細胞は血清飢餓により細胞形態の変化を起こしうるため、今回血清飢餓下での検討を行ったか。回答として、発表者は 1)、2)、5) に関して学位論文の訂正と再提出を行うことを述べた。3) に関してはそのメカニズムは不明であり、80K-H ノックダウン細胞株でも明らかな差を示せず今後の検討が必要であることを述べた。4) に関しては、RING ドメイン欠損変異体に関しては活性型 Ras と PRG1 の安定性の評価は行えていないことを述べた。6) に関しては、先行論文における PRG1 の研究においても LPA の有無で検討されていたため、当初での実験を行ったが血清飢餓下では最終的に形態変化に差がでない状況であったことを述べた。また、PRG1 の LPA を介した small G タンパクへのシグナル伝達のメカニズムは先行論文では十分に検討されているとは言えず、今後の知見に注目される点も述べた。畠山鎮次教授より 1) 作製した抗体によって内在性 TRIM67 の認識パターンが異なる理由を生化学的・分子生物学的にどのように考察するか。2)

TRIM67RING ドメイン欠損安定発現株の表現型が TRIM67 野生型安定発現株と陰性対照の中間変化を示した理由をどのように考察するか。3) TRIM67 野生型安定発現株と TRIM9 野生型安定発現株の変化は神経突起様伸長といえるのか。正確な検討にはアクチン・チューブリンなどの細胞骨格関連タンパク質の検討をすべきではないのか。4) 今回の検討では細胞増殖能と形態変化という二つの変化があるがこの点をどのように考察するのか。神経系では、成体となった段階で細胞増殖という機能は考えにくい、そのため胎児脳での検討や初代培養での検討等が重要になってくると思われるのではないかと。5) 神経系の実験はノックアウトマウスの作製が重要となるので今後その検討が必要である。との質問・指摘があった。回答として発表者は1) に関しては、スプライシングやプロモーター領域により TRIM67 の2種類のアイソフォームが細胞内で形成されている可能性と抗体の交叉反応性のため TRIM67 以外のタンパク質を認識している可能性があることを述べた。2) に関しては畠山鎮次教授の助言のもと、TRIM67 タンパク質が2量体を形成している可能性やRING ドメイン以外に機能を呈するドメインがある可能性も考えられることを述べた。3) に関しては、今回の検討が細胞骨格タンパク質の検討において不十分であったことを述べ、IP3R が関与している可能性も含め、今後の検討と知ることを述べた。4) に関しては機能維持といった点よりは細胞増殖能が成体に影響を及ぼす可能性は乏しく、指摘の通り今後 TRIM9 と TRIM67 のダブルノックアウトマウス作製や初代培養での実験を検討していきたいと述べた。寶金清博教授より1) 臨床医としての視点での臨床応用に関してはどうか、2) 小脳における発現部位はどうであったのか。3) TRIM67 は大脳皮質には発現は乏しいとのことであったが、IP3R との関与でてんかん等の関連はどうか、質問があった。回答として、発表者は1) に関しては原因不明の脊髄小脳変性症の家系で TRIM67 遺伝子変異を検討したが、新規変異は認めなかったことを述べた。2) に関しては未公開データであるが、免疫組織染色により TRIM67、PRG1、80K-H とともにプルギンエ細胞に強く発現していることを確認していることを述べた。3) に関しては、TRIM67 は小脳に優位に発現し、TRIM9 が側頭葉に発現していることを述べた。また未公開データであるが、畠山鎮次教授よりも TRIM9 ノックアウトマウスにおいて、その発現部位が認められていることの補足があった。佐々木秀直教授より、1) IP3R は小脳疾患の観点から注目されている重要タンパク質である。その遺伝子異常により発症する小脳失調症があり、その IP3R に関与するならば TRIM67 も原因不明の小脳失調の原因遺伝子である可能性も考えられ、今後のさらなる検討が必要であろう、とのご指摘を頂いた。さらに2) 疾患での PRG1 遺伝子異常等の報告はあるのかといった質問があった。発表者は1) に対して、今後も検討を重ねたい旨を回答し、2) に対して、検索内では PRG1 を責任遺伝子とする神経疾患の報告は認めない旨を回答した。最後に、寶金清博教授より、今後の一層の検討を加えることで研究の発展と創薬を含めた臨床への応用を目指すよう総括があった。さらに大場雄介教授より、細胞内 Ca^{2+} 濃度は測定方法など今後の研究進展の可能性についても助言があった。

この論文は、これまで報告されていなかった TRIM67 タンパクの機能解析を行い、今後の神経疾患の原因解明への手がかりを提示した点で高く評価され、今後一層の研究を継続することが期待される。

審査員一同はこれらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。