

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (医 学) 氏名 矢口 裕章

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 -)

【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萎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。さらにビトロで 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はなく、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、また臨床的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。