

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	脱ユビキチン化酵素USP8およびSTAMBPL1の活性制御機構およびその生理的病理的意義の解明
Title(English)	Cis-regulations of USP8 and STAMBPL1 deubiquitinases and their pathophysiological roles
著者(和文)	柿原慧遵
Author(English)	Keijun Kakihara
出典(和文)	学位:博士(理学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第12335号, 授与年月日:2023年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:藤田 尚信,木村 宏,北口 哲也,中村 信大,加藤 明,駒田 雅之
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第12335号, Conferred date:2023/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	審査の要旨
Type(English)	Exam Summary

(博士課程)

論文審査の要旨及び審査員

報告番号	甲第	号	学位申請者氏名	柿原慧遵	
論文審査 審査員		氏名	職名	氏名	職名
	主査	藤田 尚信	准教授	加藤 明	准教授
	審査員	木村 宏	教授	駒田 雅之	教授
		北口 哲也	准教授		
		中村 信大	准教授		

論文審査の要旨 (2000 字程度)

本論文は「*Cis-regulations of USP8 and STAMBPL1 deubiquitinases and their pathophysiological roles*」と題し、脱ユビキチン化酵素の活性制御とその生理病理学的意義を研究したものであり、四章より構成されている。

第一章「General Introduction」では研究背景と目的を説明している。ユビキチン化は、細胞内の多くのタンパク質の分解・細胞内局在・複合体形成・機能を制御し、様々な細胞機能に関与する。ユビキチン化反応は可逆的であり、標的タンパク質からユビキチン分子を取りのぞく反応は脱ユビキチン化酵素 (deubiquitinase, DUB) が触媒する。DUB の活性異常は多くの疾患と関連している。例えば、エンドソームタンパク質の選別輸送に関わる ubiquitin-specific protease 8 (USP8) に体細胞変異が生じて DUB 活性が過剰亢進すると、クッシング病 (CD) の発症につながる。エンドソームで働く別の DUB である STAM-binding protein-like 1 (STAMBPL1) は、複数のがん種で高発現し、がん促進タンパク質として機能する。多くの DUB はマルチドメインタンパク質であるが、活性制御の分子基盤は不明点が多く、USP8 と STAMBPL1 もその例に漏れない。本論文ではこの 2 つの DUB に着目し、その活性制御の分子基盤と生理病理学的意義を解明することを目的とすると述べている。

第二章「Chapter 1 Molecular basis of USP8 autoinhibition by its WW-like domain and the dysregulation in Cushing's disease」では USP8 に関する研究成果を説明している。先行研究により、USP8 内の WW-like ドメインが自己阻害ドメインとして同定されていた。本研究では、*in vitro* プルダウンアッセイにより、この WW-like ドメインが酵素ドメイン (USP ドメイン) と結合することを示した。次に、WW-like ドメインと USP ドメインの相互作用をモニターする新規 1 分子 FRET プローブを構築し、WW-like ドメインとユビキチンが USP ドメインと競合的に結合していることを示した。さらに、インシリコ構造解析により、WW-like ドメインが USP ドメインのユビキチン結合ポケットを塞ぐように結合するモデルを得た。続いて、この章の後半では、CD に関連する USP8 の変異を解析している。多くの変異は USP8 の 14-3-3 結合モチーフに含まれるアミノ酸の置換や欠失を生じ、USP8 から 14-3-3 を解離させ、USP8 の活性を高める。本研究では、開発した FRET プローブを用いた種々の解析から、14-3-3 の解離が WW-like ドメインと USP ドメインの結合を低下させることを示した。一方、別のタイプの CD 関連変異として、WW-like ドメイン内のアミノ酸置換も報告されている。本研究では、この変異も WW-like ドメインと USP ドメインの結合を低下させ、USP8 の活性を上昇させることを示した。他の結果とあわせ、CD に関連した変異はいずれも USP8 の自己阻害を解除する

ことで活性を高めると述べている。

第三章「Chapter 2 Molecular basis of STAMBPL1 autoinhibition by its MIT domain and the role in apoptosis」では STAMBPL1 に関する研究成果を説明している。インシリコ構造解析と変異導入解析から、STAMBPL1 の MIT ドメインが酵素ドメイン (JAMM ドメイン) と結合し、ユビキチン結合部位をブロックしていることを示した。次に、アポトーシス経路が活性化されると、STAMBPL1 がカスパーゼによって切断されることを見いだした。切断により生成される JAMM ドメインのみからなる C 末端断片を Ct-STAMBPL1 と命名し、Ct-STAMBPL1 は MIT ドメインによる制御がないため高い活性をもつこと、全長の STAMBPL1 とは異なり細胞膜に局在することを示した。さらに、Ct-STAMBPL1 を過剰発現するだけでアポトーシスが誘導され、この作用には Ct-STAMBPL1 の脱ユビキチン化活性が必要であることを示した。他の結果とあわせ、STAMBPL1 はカスパーゼによって切断されることで自己阻害が解除され、細胞膜で未知の標的を脱ユビキチン化することによりアポトーシスを促進すると述べている。

第四章「General discussion」では総合討論を行なっている。エンドソームで働く USP8 と STAMBPL1 に自己阻害機構が備わっている生理的意義として、エンドソームタンパク質の適切なタイミングでの輸送を実現するためにこれらの DUB の活性が制御されている可能性がある」と論じている。また、遺伝子変異やカスパーゼによる切断によって自己阻害が解除されると、これらの DUB は通常とは異なる細胞内部位で異なる基質を脱ユビキチン化し、これが CD の発症やアポトーシスの進行につながるという仮説も論じている。最後に、ヒトのゲノムにコードされている約 100 種類の DUB はそれぞれが重要な細胞機能を持ちほとんどが疾患に関与しているが、本研究はこのように重要な DUB ファミリータンパク質の本態解明に大きく貢献すると論じている。

以上を要するに、本論文は DUB の自己阻害の解除が疾患や細胞死につながることを明確に示した初めてのものであり、理学上貢献するところが大きい。よって、本論文は博士 (理学) の学位論文として十分な価値があるものと認められる。