

第 8 号様式

論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博 士 （ 医 学 ）	氏名	奥 田 浩
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1・2 項該当		
論文題目			
The USP21 short variant (USP21SV) lacking NES, located mostly in the nucleus in vivo, activates transcription by deubiquitylating ubH2A in vitro (USP21 の短い変異体は NES が欠失しており、in vivo では核内に多く存在し、in vitro で ubH2A を脱ユビキチン化することによって転写を活性化する)			
論文審査担当者			
主 査 教 授 浅 野 知 一 郎			
審査委員 教 授 稲 葉 俊 哉			
審査委員 准 教 授 鎌 田 英 明			
〔論文審査の要旨〕			
Ubiquitin specific peptidase 21 (USP21)はユビキチン化ヒストン H2A のイソペプチド結合を加水分解する脱ユビキチン化酵素である。ヒストン H2A (ubH2A) へのユビキチン化は転写抑制に働くことから、USP21 は細胞核内において転写を活性化する役割を有することが推測される。また、USP21 はマウスの肝切除後の肝再生の際に発現が上昇していることが示されており、肝再生を目指した臨床応用の可能性が期待されている。さらに、近年、USP21 は細胞質にも存在しており、生理学的なプロセスに関連した微小管と中心体の支配のもとで役割を果たすことが報告された。従って、USP21 の細胞内局在は、その機能を考察する上で重要である。本研究では、USP21 の新規バリエーションの発見から、その詳細な細胞内局在および機能に関して研究した。			
本研究では USP21 の発現を RT-PCR で検討する過程において、スプライシングバリエーションの存在を示唆する PCR 産物の増幅を見いだした。この産物をサブクローニングし解析したところ、Nuclear Export Signal (NES)が欠失した USP21 short variant (USP21SV) が同定された。そこで、NES を有する USP21 long variant (USP21LV)と USP21SV の細胞内局在の違い、酵素活性の違い、細胞内での働きの違いを明らかにするため in vivo, in vitro の実験を行った。			

まず USP21SV の全長を pET15 プラスミドにサブクローニングし、USP21SV の塩基配列を確認した。USP21SV は、既に報告されている USP21LV と比較してエクソン 2 の一部 (87 アミノ酸) が欠失した splicing variant であり、細胞での局在に影響する Nuclear Export Signal (NES) を欠失することを確認した。

次に USP21LV と USP21SV の *in vitro* におけるユビキチン化ヒストン H2A の脱ユビキチン化酵素活性を比較するため、His-tag を融合させた USP21SV および USP21LV を *E. coli* を用いて発現・精製し、解析した。どちらの variant もヒストン H2A とユビキチンとのイソペプチド結合を加水分解することが出来たが、*in vitro* においては USP21LV がより強い脱ユビキチン化酵素活性を示した。

In vivo における機能や活性を検索するため、EGFP と融合させた USP21SV と USP21LV の cDNA を HeLa 細胞に導入し発現させた。USP21SV と USP21LV の詳細な局在とユビキチン化ヒストン H2A の脱ユビキチン化を免疫蛍光で解析した。USP21SV は核、核膜、細胞質に存在しているが、USP21LV は核と比較して、主に細胞質に存在していることを明らかにした。活性の指標である細胞核内の ubH2A のシグナルは USP21SV と USP21LV を発現させることにより共に減弱した。

USP21SV と USP21LV の酵素活性を *in vivo* で比較するため、293T 細胞に USP21SV と USP21LV をそれぞれ導入し、各蛋白の発現と活性の指標である ubH2A のシグナルを Western blot により解析した。USP21SV と USP21LV は同程度発現しているのにもかかわらず、USP21LV 導入細胞と比較して USP21SV 導入細胞では ubH2A のシグナルがより減少しており、USP21SV の方がより高い脱ユビキチン化酵素活性を有することが示唆された。

すなわち、本研究ではユビキチンとヒストン H2A とのイソペプチド結合加水分解を触媒する脱ユビキチン化酵素である USP21 の NES が欠失した USP21 short variant (USP21SV) を新規に同定した。USP21SV は USP21LV と比較して核内に多く局在し、遺伝子転写制御に関わることが示唆された。USP21SV および USP21LV の局在の違い、酵素活性の違いから、細胞内でのユビキチン化、脱ユビキチン化のネットワークにおいて USP21 は複数の役割をもつことが推測される。

以上の結果から、本論文は USP21 が細胞内でのユビキチン化、脱ユビキチン化でのネットワークにおいて複数の役割を持つことを示唆した点で高く評価される。よって審査委員会委員全員は、本論文が著者に博士（医学）の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。