

京都大学	博士 (工学)	氏名	田中 裕夏
論文題目	Observation of ubiquitin cycle reaction using ^{18}O stable isotope labeling (^{18}O 安定同位体標識を用いたユビキチンサイクル反応の観測)		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>本論文は、^{18}O 安定同位体標識を用いた新規質量分析法により細胞内におけるユビキチンサイクル反応の頻度を定量する手法の確立についてまとめたものであって、全四章、および結論からなっている。</p> <p>第一章は序論であり、前半では本論文で取り扱うユビキチンについて、性質・機能や神経変性疾患などの疾患との関連について記述している。後半では、質量分析装置の構成について述べている。質量分析装置は、試料導入部・イオン源・アナライザー・イオン検出部・データ解析処理部などから構成されている。イオン源やアナライザーは、様々なターゲット種に対して多くの種類が使用されているため、数多くあるイオン源・アナライザーの原理や使用用途を概説している。</p> <p>第二章は、通常では検出不可能なユビキチンサイクル反応を追跡するための新しい質量分析法の確立について述べている。ユビキチンサイクル反応の機能不全は、神経変性疾患の発症に直結すると報告されている。また、ユビキチンサイクル反応は実験的に直接観測された例がない。そのため、本研究では試験管内でユビキチンサイクル反応を観測する手法を新たに構築している。ユビキチンサイクル反応前後では、ユビキチン分子を化学的・物理的に区別することができない。そこで、脱ユビキチン化は加水分解反応であることから、^{18}O 安定同位体標識した水 (H_2^{18}O) を用いることで、元のユビキチンと再利用されたユビキチン分子を識別し、質量分析によりユビキチンサイクル反応を追跡する方法を開発している。この手法を用いることで、ユビキチンサイクル反応の頻度を分子内への ^{18}O 取込量として定量することに成功している。</p> <p>第三章では、細胞内在性ユビキチンのユビキチンサイクル反応を追跡するための最適な実験条件について検討している。第二章で確立したユビキチンサイクル反応の定量法に基づき、^{18}O 標識した培養液でヒト細胞を培養し、細胞内にあるユビキチンのユビキチンサイクル反応の追跡を行っている。しかしながら、細胞内のユビキチンはユビキチンサイクル反応だけでなく、タンパク質生合成によっても ^{18}O 標識されている。そのため、エレクトロポレーション法により安定同位体標識したユビキチンを細胞導入することで、ユビキチンサイクル反応と生合成による ^{18}O 導入を区別しようとしている。しかし、有意な ^{18}O の取り込みを検出できておらず、エレクトロポレーションは細胞にストレスを与えてしまい、ユビキチンサイクル反応の観測に適していない。そこで、^{13}C と ^{15}N で標識したアミノ酸を含んだ培養液で、細胞を一過的に培養した後、^{18}O 標識培養液で培養する手</p>			

京都大学

博士 (工学)

氏名

田中 裕夏

法を考案している。その結果、生合成とユビキチンサイクル反応による ^{18}O 取込を分離して解析することに成功し、細胞内におけるユビキチンサイクル反応による ^{18}O 取込を明らかにしている。

第四章では、第三章で確立した手法を用いて、細胞内在性ユビキチンの時間・環境依存的なユビキチンサイクル反応の定量について述べている。二種類のヒト細胞を用いた時間経過によるユビキチンサイクル反応定量実験では、ユビキチンサイクル反応の頻度と内在性ユビキチンの分解に顕著な差異が検出されている。また、細胞内にはある程度の内在性ユビキチンがストックされており、そのストック量は細胞の種類に依存することを明らかにしている。さらに、一過的な熱ショックや薬剤添加による外部刺激を細胞に与えると、ユビキチンサイクル反応の頻度が大きく変化することを発見している。これらの結果から、細胞種の違いや僅かな細胞外環境の変化を、ユビキチンサイクル反応の定量によって、数値化し特徴づけることに成功している。従って、 ^{18}O 安定同位体標識法を用いた新規手法は、ユビキチンサイクル反応の変化を定量的に追跡できる唯一の実験手順である。

最後に結論において、本論文で得られた成果について要約している。

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、 ^{18}O 安定同位体標識を用いた新規質量分析法によりユビキチンサイクル反応を追跡する手法を確立し、ユビキチンの動的な性質を定量化することについて詳細に検討している。

第一章では、ユビキチンの機能や質量分析装置の構成について記述している。

第二章では、試験管内におけるユビキチンサイクル反応の定量法の確立について述べている。ユビキチンサイクル反応は実験的に直接観測された例がないため、試験管内でユビキチンサイクル反応を観測する手法を新たに構築している。ユビキチンサイクル反応前後では、ユビキチン分子を化学的・物理的に区別することができない。そこで、ユビキチンサイクル反応が脱水反応と加水分解反応の繰り返しであることに着目し、 ^{18}O 安定同位体標識した水を用いることで、ユビキチンサイクル反応の頻度を分子内への ^{18}O 取込量として質量分析で定量することに成功している。

第三章では、細胞内におけるユビキチンサイクル反応の検出法の開発について述べている。第二章で確立した定量法に基づき、 ^{18}O 標識した培養液でヒト細胞を培養し、細胞内にあるユビキチンのユビキチンサイクル反応の追跡を行っている。しかしながら、細胞内のユビキチンはユビキチンサイクル反応だけでなく、タンパク質生合成によっても ^{18}O 標識されることを見出している。そこで、 ^{13}C と ^{15}N で標識したアミノ酸を含んだ培養液で、細胞を一過的に培養した後、 ^{18}O 標識培養液で培養する手法を考案している。その結果、生合成とユビキチンサイクル反応による ^{18}O 取込を分離して解析することに成功し、細胞内におけるユビキチンサイクル反応による ^{18}O 取込を明らかにしている。

第四章では、第三章で開発した手法を用いて、細胞内のユビキチンサイクル反応を定量した結果を記述している。二種類のヒト細胞内ユビキチンサイクル反応を定量したところ、細胞種の違いでユビキチンの再利用とタンパク質分解の程度に顕著な差があることを見出している。さらに、一過的な熱や薬剤添加による外部刺激を細胞に与えると、ユビキチンサイクル反応の頻度が大きく変化することを発見している。これらの結果から、細胞種の違いや僅かな細胞外環境の変化を、ユビキチンサイクル反応の定量によって、数値化し特徴づけることに成功している。

以上、本論文は、 ^{18}O 安定同位体標識を用いた新規質量分析法によりユビキチンサイクル反応を追跡する手法の確立、およびユビキチンの動的な性質の定量化について述べており、学術上、實際上寄与するところが少なくない。よって、本論文は博士（工学）の学位論文として価値あるものと認める。また、令和4年2月21日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行って、申請者が博士後期課程学位取得基準を満たしていることを確認し、合格と認めた。