

論文審査の結果の要旨

氏名 小宮 麻希

本論文は、翻訳後修飾タンパク質の一つである Small Ubiquitin-related Modifier (SUMO) によって修飾を受ける哺乳動物由来のタンパク質を、生きた動物細胞を用いて遺伝子からスクリーニングするための技術開発に関する研究結果をまとめたものである。

本論文は全4章からなる。第1章では、SUMOに関する序論として、SUMOの特徴、タンパク質修飾機構、生理機能、および既存の分析法について述べている。SUMOによる修飾(SUMO化)は細胞活動を維持する上で不可欠な修飾反応である。そのため、未知のSUMO化タンパク質を同定することはSUMO化による新たな生体内制御機構の知見を得る上で重要である。SUMO化タンパク質の従来スクリーニング手段として、免疫沈降法や酵母ツーハイブリッド法などの手法が用いられてきた。しかし、これらの手法ではSUMO分解酵素の影響を受けかねない細胞破碎の工程が必要であること、またツーハイブリッド法ではSUMOと標的タンパク質の双方の核内への移行を必要とするなど、低頻度のSUMO化タンパク質を同定することは困難であった。これらの技術的背景を説明した上で、本研究の目的が生細胞を用いて多様な細胞内局在を示す標的タンパク質のSUMO化を検出・同定するスクリーニング技術の開発であることを述べ、その開発意義を説明している。

第2章は、二分割蛍光タンパク質の再構成原理を応用し、またFluorescence-activated cell sorter (FACS)による細胞分取の工程を導入することで、生きた動物細胞を用いて様々な細胞内局在を示すタンパク質のSUMO化を判別・単離する方法について記述している。遺伝子ライブラリーに二分割蛍光タンパク質の遺伝子を連結し、SUMO化タンパク質を発現した細胞が蛍光性を示す新たな検出法の原理検証を行った。実際に本手法を用いてマウス由来のSUMO化タンパク質のスクリーニングを行い、38種類の様々な細胞内局在と機能を示すタンパク質を検出した。その内2種類に関しては既知SUMO化タンパク質であることから、本手法によって実際に遺伝子ライブラリーからSUMO化タンパク質が同定可能であることを実証した。生きた動物細胞内でSUMO化タンパク質を同定する全く新たな原理に基づいたライブラリースクリーニング法であり、新たな技術として今後の波及効果が期待できる成果である。

第3章は、第2章で行ったスクリーニングによって検出されたタンパク質のうち、SUMO化が未報告のタンパク質に対して、免疫沈降法等による従来

学的手法によって、実際に SUMO 化が起きているか解析した結果について記述している。検出された候補タンパク質の SUMO 化の評価を行った結果、「Atac2」と呼ばれるタンパク質において SUMO 化が起きていることが実証された。さらに Atac2 の SUMO 化部位が 408 番目のリジン残基であることを、*in vitro* の生化学実験ならびに動物細胞を用いた実験により明らかとなった。また SUMO 化の有無による細胞内局在への影響について、蛍光顕微鏡を用いた解析結果がまとめられている。これらの結果は、Atac2 の SUMO 化が生理機能の調節に重要であることを示唆しており学術的意義が非常に大きいと判断される。

最終章である第 4 章では、本研究で開発された SUMO 化タンパク質の遺伝子ライブラリースクリーニング手法の学術的意義、既存の分析法に対する利点、今後応用可能な研究対象、および将来的な研究展望について記述されており、研究全体を総括している。

なお、本論文は、伊藤博昭氏、遠藤瑞己氏、比留間大祐氏、服部満氏、斉藤寿仁氏、吉田稔氏との共同研究であるが、論文提出者が主体となって実験を行ったものであり、論文提出者の寄与が十分であると判断した。

したがって、博士（理学）の学位を授与できると認める。