

審査の結果の要旨

氏名 土屋 光

ユビキチンによるタンパク質の翻訳後修飾は、タンパク質分解のみならず、シグナル伝達や、タンパク質の細胞内輸送など広汎な生命機能を制御することが明らかとなってきた。ユビキチン修飾にはモノユビキチン化と 8 種類の異なる構造のポリユビキチン鎖（異なるリジン残基を介して連結した K6 鎖、K11 鎖、K27 鎖、K29 鎖、K33 鎖、K48 鎖、K63 鎖及び、N 末端のメチオニンを介して連結した M1 鎖）が存在する。さらに近年では、異なる種類のユビキチン鎖が連結した混合鎖や、一つのユビキチンに複数のユビキチン鎖が付加した分岐鎖など複雑なユビキチン鎖も細胞内に存在することが示唆されている。多種多様な構造のユビキチン修飾が使い分けられることでユビキチン修飾は多彩な機能を発揮すると考えられており、K48 鎖はプロテアソームによるタンパク質分解シグナルとして機能し、K63 鎖はタンパク質輸送、シグナル伝達や DNA 修復等に関与することが知られている。しかしながら、その他のユビキチン鎖や混合鎖、分岐鎖の機能は明確ではない。その理由の一つとして、ユビキチン修飾は一過的であるため微量なユビキチン鎖を細胞抽出液から直接定量することが依然として困難であることが挙げられる。近年、ポリユビキチン鎖の種類を識別するもっとも有効かつ高感度な手法として質量分析計 (MS) を用いた解析が注目されている。本研究では、細胞内におけるユビキチン鎖の使い分け、すなわち多種多様なユビキチンシグナルの全体像を解明することを目的として、まず高分解能 MS を用いたユビキチン鎖の高感度絶対定量法を確立した。さらにユビキチン修飾のデコーダー分子であるユビキチン結合タンパク質群のユビキチン鎖選択性を網羅的に解析した。

第 1 章では、高分解能質量分析計 QqOrbitrap 型 MS によるターゲットプロテオミクスの新手法 Parallel Reaction Monitoring (PRM) 法を用いることで複雑試料中からユビキチン鎖を絶対定量する方法の開発を目指した (Ub-PRM 法)。機器を最適化することで全ての種類のユビキチン鎖を少なくとも 100 amol から定量可能であることを明らかにした。ユビキチン依存性タンパク質分解系のモデル基質 Ub-P-βgal (Ubiquitin-Pro-βgal) のユビキチン化を解析することにより本手法の有効性を検討した。その結果、野生株において、Ub-P-βgal は K29 鎖及び K48 鎖が 1 : 5 の比で結合した混合型のユビキチン化修飾を受けることが明らかとなった。以上より本手法は複雑なユビキチンシステムを解析するために有効な定量法で

あると考えられる。

第2章では前章で確立した Ub-PRM 法を用いてユビキチンシグナルのデコーダー分子とされているユビキチン結合タンパク質のユビキチン鎖選択性を網羅的に解析した。出芽酵母の主要な 14 種類のユビキチン結合タンパク質 14 種類について、細胞内で相互作用するユビキチン鎖の絶対定量を行ったところ、プロテアソーム分解に関与する Rad23 及び Dsk2、ユビキチン化基質の仕分けに関与する Cdc48/p97 のコファクター Ufd1 及び Npl4 は他のユビキチン結合タンパク質より著しく強くユビキチン鎖と結合することが明らかとなった。また、これらユビキチン結合タンパク質は K48 鎖に対して高い選択性を示した (90%以上)。対照的にタンパク質輸送に関与する一連のユビキチン結合タンパク質は K63 鎖に対して選択性を示したが (40~70%)、K48 鎖にも結合していることが明らかとなった。詳細な解析の結果、エンドサイトーシスに関与する Ent2 は細胞膜上で Rsp5 が基質に付加した K63 鎖を認識していること、MVBs 輸送に関与する Vps27 はエンドソーム上で K63 鎖及び K48 鎖の両方を認識していることが明らかとなった。

以上述べたように本研究ではユビキチン鎖の超高感度絶対定量法 Ub-PRM 法を確立した。これにより、解析が困難であった内在性の発現レベルでのユビキチン鎖の解析が可能となった。さらに本手法を用いてユビキチン結合タンパク質のユビキチン鎖選択性について網羅的に解析した。その結果、細胞内には K48 鎖が大量に存在し、Rad23 や Cdc48 がこれをプロテアソームに運ぶことが明らかとなった。一方、K63 鎖はタンパク質輸送に関与することが明確となった。近年、ユビキチン修飾系の破綻ががんや神経変性疾患等の様々な疾患と密接に関与していることが明らかとなってきている。本研究により開発した新規手法を応用することにより、生命現象の解明及び病態解明につながることを期待される。これらの研究成果は、学術上応用上寄与するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。