

# 論文内容要旨

論文題目

一過性前脳虚血により誘導されるユビキチン化たんぱく質の解析

指導（紹介）教授： 川前 金幸  
氏 名 : 岩渕 雅洋

## 【内容要旨】

ユビキチン化は、たんぱく質の分解や DNA 損傷の修復など細胞のさまざまな重要過程を調節するたんぱく質翻訳後修飾の1つである。これまでの研究により、一過性脳虚血後にユビキチン化たんぱく質が界面活性剤である TritonX-100 不溶性画分内に蓄積されることが報告されている。これは、ユビキチン化たんぱく質の立体構造が変化し不溶性となるために起こると考えられている。この過程により、虚血後の神経細胞死が誘発されるが、Triton 不溶性画分内のユビキチン化たんぱく質の詳細な解析は未だ報告されていない。

本研究では一過性脳虚血後の Triton 不溶性画分内のユビキチン化たんぱく質を同定するために、プロテオミクス解析を行った。マウスに対して 10 分間の前脳虚血と 4 時間の再還流を行った後、海馬のホモジネートから Triton 不溶性画分を分離した。トリプシン処理の後、ユビキチン化されたペプチドを免疫沈降し、質量分析を行った。




一過性脳虚血後にはユビキチン化たんぱく質の増加が認められた。とりわけ、Triton 不溶性画分内のユビキチン化たんぱく質の増加が著明であった。これらのたんぱく質は、リシン 48 のポリユビキチン化を豊富に含むことから、ユビキチン・プロテアソーム系で分解されるものと考えられた。質量分析の結果、1 箇所以上のユビキチン化を受けるたんぱく質が 520 種類同定され、その中で 66 種類のたんぱく質は 10 箇所以上のユビキチン化部位を含むことが明らかとなった。一過性脳虚血後の Triton 不溶性画分のユビキチン化たんぱく質において、272 種類のたんぱく質がコントロール群と比較して 5 倍以上の増加を示していた。これらのたんぱく質には、虚血後に障害されるたんぱく翻訳やシナプス可塑性、また神経情報伝達関連分子が含まれていた。さらに、ユビキチン化部位のアミノ酸配列を詳細に検討することにより、一過性脳虚血後のユビキチン化に関わるアミノ酸配列モチーフを同定した。

これまで、ユビキチン化たんぱく質の解析は高いバックグラウンドが原因となり詳細な解析が妨げられてきたが、本研究ではトリプシン処理と免疫沈降法を組み合わせた質量分析を用いることにより、一過性脳虚血により誘導されるユビキチン化たんぱく質の包括的解析に初めて成功した。本研究で同定されたユビキチン化たんぱく質をさらに詳細に解析することにより、虚血後の神経細胞障害の原因の解明と有効な治療法の開発が進展すると思われる。

山形大学大学院医学系研究科長 殿

## 学位論文審査結果報告書

申請者氏名: 岩渕 雅洋  
論文 題目: 一過性前脳虚血により誘導されるユビキチン化たんぱく質の解析

審査 委員: 主査 後藤 薫   
副査 川前 金幸   
副査 藤井 順逸 

審査終了日:平成27年 8 月 17 日

## 論文 審査 結果 要 旨

ユビキチン化は様々な細胞機能を司る重要なたんぱく質翻訳後修飾機構の1つである。これまで、一過性脳虚血後に TrionX-100 不溶性画分内にユビキチン化たんぱく質が蓄積されることが報告されているが、質量分析におけるバックグラウンドの高さが障害となり、それらの詳細な解析は未だなされていない。本研究において岩渕雅洋氏は、トリプシン処理の後にユビキチン化ペプチドを免疫沈降し質量分析を行うという方法を用いて、一過性脳虚血後のユビキチン化たんぱく質のプロテオミクス解析を行った。マウスを用いて10分間の前脳虚血と4時間の再還流を行った後に Trion 含有溶解バッファーで海馬を懸濁した。その不溶性画分を用いて質量分析を施行し、以下の結果を得た。

- 1) 一過性脳虚血後には Trion 不溶性画分のユビキチン化たんぱく質の顕著な増加が認められた。
- 2) これらのユビキチン化たんぱく質は、リシン 48 のポリユビキチン化を豊富に含有することから、ユビキチン・プロテアソーム系で分解されると考えられた。
- 3) 質量分析の結果、520 種類のたんぱく質が 1 箇所以上のユビキチン化を受け、そのうちの 66 種類には 10 箇所以上のユビキチン化部位が含まれることが判明した。
- 4) これらのユビキチン化たんぱく質のうち、272 種類のたんぱく質がコントロール群と比較して5倍以上の増加を示していた。
- 5) 同定されたユビキチン化たんぱく質には、たんぱく翻訳、シナプス可塑性、また神経情報伝達関連分子が数多く含まれていた。
- 6) ユビキチン化部位のアミノ酸配列を詳細に検討することにより、一過性脳虚血後のユビキチン化に関わるアミノ酸配列モチーフを同定した。

本研究は、トリプシン処理と免疫沈降法を組み合わせた質量分析を用いることにより、これまで詳細な解析が困難であったユビキチン化たんぱく質の解析が可能となることを報告した。これらの解析方法は将来的に、虚血後の神経細胞障害の原因解明と有効な治療法の開発に寄与すると考えられる。よって学位審査委員会は本研究が博士(医学)の授与に値するものと判定した。