

## 論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※ 甲	第	号
------	-----	---	---

氏 名 濱口 知成

論 文 題 目

*In vivo* Screening for Substrates of Protein Kinase A  
using a Combination of Proteomic Approaches  
and Pharmacological Modulation of Kinase Activity

(薬理的キナーゼ活性調節とプロテオミクス技術を  
組み合わせたプロテインキナーゼAの  
*in vivo*基質スクリーニング)

論文審査担当者

名古屋大学教授

主 査 委 員

高橋 雅英 

名古屋大学教授

委 員

阿部 健治 


名古屋大学教授

委 員

山岡 一 

名古屋大学教授

指導教授

貝 淵 弘 

## 論文審査の結果の要旨

今回、PKAのリン酸化モチーフ抗体を用いた免疫沈降実験と質量分析を組み合わせた解析より既知の基質のみならず、新規基質候補およびリン酸化部位を数多く同定出来ることが示された。得られた基質候補の半数以上はこれまで報告がなかった。得られた基質候補のうち、PKAによるRho-kinaseのリン酸化を検証したところ、*in vitro*でも*in vivo*においてもリン酸化されることを確認し、PKAがRho-kinaseの機能を調節している可能性が示された

本研究に対し、以下の点を議論した。

1. TiO<sub>2</sub>カラムによるリン酸化ペプチドを濃縮した後の解析の場合、使わない解析と比べてリン酸化部位を同定できる利点がある。TiO<sub>2</sub>カラムを使わない解析する理由は、PKAシグナルを強めることで、リン酸化タンパク量が増加するとモチーフ抗体による免疫沈降量も増えるので、免疫沈降量が増加したタンパク質も基質候補としてピックアップしました解析も有効であると考えからである。この方法で、仮にリン酸化ペプチドがtrypsinによるmiscleavage等の理由で検出困難であっても、別箇所のペプチドでリン酸化タンパクを検出できる可能性がある。
2. リン酸化ペプチドの配列のアライメントはPKAのモチーフに相同するものが多かった。検出したペプチドの内、66個はPKAのモチーフに相同し、21個は相同しないものであった。
3. PKA以外のキナーゼに対するリン酸化モチーフ抗体で免疫沈降実験を行えば同一の方法で検出が可能と考える。
4. PKAによってRho-kinaseのSerine1379がリン酸化される。これはPH domain近傍であり、Rho-kinaseが膜結合に必要とされる場所である。免疫染色の結果から、リン酸化によってRho-kinaseは細胞質に有意に局在していた。そのため、PKAによるリン酸化がRho-kinaseの活性を阻害することが考えられる。

本研究は、キナーゼに対する基質を網羅的に検索する方法を確立するうえで、重要な知見を提供した。また、PKAによるRho-kinase活性の阻害効果の知見も提示した。

以上の理由により、本研究は博士（医学）の学位を授与するに相応しい価値を有するものと評価した。

## 試験の結果の要旨および担当者

報告番号	※甲第	号	氏名	濱口 知成
試験担当者	主査	高橋 雅英	副査	阿部 健一
	指導教授	貝 瑞 弘		吉川 鋼一
<p>(試験の結果の要旨)</p> <p>主論文についてその内容を詳細に検討し、次の問題について試験を実施した。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. TiO<sub>2</sub>カラムを使った解析と使わない解析の各々の意義について</li> <li>2. 同定したリン酸化ペプチド配列のアライメントについて</li> <li>3. Anti-phospho-PKA substrate抗体以外の抗体を用いた質量分析の可否</li> <li>4. PKAによるRho-kinaseのリン酸化の生理機能について</li> </ol> <p>以上の試験の結果、本人は深い学識と判断力ならびに考察力を有するとともに、神経情報薬理学／分子薬理学一般における知識も十分具備していることを認め、学位審査委員合議の上、合格と判断した。</p>				