

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 Md. Hasanuzzaman Shohag

論 文 題 目

Phosphoproteomic analysis using the WW and FHA domains as biological filters

(WW ドメインおよび FHA ドメインを生物学的フィルターとして用いたリン酸化プロテオミクス解析)

論文審査担当者

主 査

委員

名古屋大学教授

高橋 雅英 

委員

名古屋大学教授

門松 健治 


委員

名古屋大学教授

藤本 豊士 

指導教授

名古屋大学教授

貝 瑞 弘 三 

論文審査の結果の要旨

リン酸化プロテオミクス解析においては、リン酸化蛋白質の分画・濃縮が非常に重要である。我々の研究室では以前に 14-3-3 を用いてリン酸化蛋白質を効率良く分画・濃縮することに成功している。しかしながら 14-3-3 結合モチーフを持たないリン酸化蛋白質も多く、14-3-3 とは異なるリン酸化モチーフに結合する蛋白質ドメインを用いてリン酸化蛋白質を分画・濃縮することを試みた。その結果、Pin1 の WW ドメインと CHEK2 の FHA ドメインを用いることで、HeLa 細胞ライセートから 14-3-3 とは異なるサブセットのリン酸化蛋白質を得ることに成功した。14-3-3 では主に細胞質蛋白質・細胞骨格・膜蛋白質が得られるのに対して、WW ドメインや FHA ドメインでは多くの核蛋白質が得られた。これらのドメインを用いることで、細胞内のリン酸化シグナルを効率良く解析することが可能になると期待される。

本研究に対し、以下の点を議論した。

1. Forskolin 処理でリン酸化が亢進した 99 種の蛋白質 (PKA 基質候補蛋白質) の中で、54 種の蛋白質は CLA 処理でもリン酸化の亢進が認められた。ただし、この 54 種の蛋白質について、検出されたリン酸化部位は必ずしも一致はしていない。
2. 本研究の目的は、通常のショットガンプロテオミクス法では得られにくいシグナル蛋白質・受容体・チャネル・転写因子等の生理的には重要であるが低発現の蛋白質を含む広範なリン酸化蛋白質を効率良く分画・濃縮して解析することである
3. プロテオミクス解析では、量の多いペプチドシグナルは量の少ないペプチドシグナルをマスクするという特徴があり、低含量のペプチドは検出されにくい。リン酸化セリン/トレオニン抗体を用いた場合、ハウスキープング蛋白質等の高発現リン酸化蛋白質が主となると予想されるのに対して、14-3-3、WW ドメイン、FHA ドメインはシグナル蛋白質・受容体・チャネル・転写因子等を主なターゲットとし、相対的にハウスキープング蛋白質は排除されることを見出した。
4. Pin1、CHEK2 は核蛋白質であり、いずれも細胞周期や DNA 損傷シグナルに関わることが報告されていることから、Pin1 や CHEK2 の生理的なターゲットも核蛋白質が多いと推察される。
5. HeLa 細胞を 1% NP-40 を含む緩衝液にて可溶化し、蛋白質を抽出した。GST 融合ベイト蛋白質 (WW, FHA, 14-3-3 ζ , 各 500 pmol) をビーズに固相化した後、細胞ライセートと 1 時間混和した。ビーズを沈降・洗浄後、結合蛋白質をベイト蛋白質と共にグアニジンにて溶出し、質量分析に供した。
6. PKA 基質候補蛋白質である TNKS1BP1 と CHAMP1 については、細胞を Forskolin や PKA 阻害剤で処理後免疫沈降を行い、PKA phospho-motif 抗体にてイムノブロットを行った結果、PKA 依存的にリン酸化されていることが強く示唆された。

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ふさわ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	Md. Hasanuzzaman Shohag
試験担当者	主査 高橋 雅夫 松本 健 藤本 豊 指導教授 貝 瑞 三			
<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"> 1. ホスファターゼ阻害剤CLA/OA処理とアデニル酸シクラーゼ活性化剤 forskolin処理を行ったデータの比較について 2. 本研究の主目的について（多数のリン酸化蛋白質を得ることか、核蛋白質を得ることか？） 3. リン酸化蛋白質濃縮にリン酸化セリン／トレオニン抗体等を用いなかった理由について 4. WWドメインやFHAドメインが核蛋白質に優先的に結合する理由について 5. 実験条件について 6. 得られたスクリーニングデータの検証法について <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>				