

氏名(本籍)	しらかわたくま 白川拓真(福岡県)
学位の種類	博士(生物工学)
学位記番号	博甲第5748号
学位授与年月日	平成23年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審査研究科	生命環境科学研究科
学位論文題目	Studies on Biosynthesis of Free Methylarginines in Cultured Cells (培養細胞における遊離メチルアルギニンの生合成に関する研究)

主査	筑波大学教授	農学博士	深水昭吉
副査	筑波大学教授	農学博士	小林達彦
副査	筑波大学准教授	博士(薬学)	木村圭志
副査	筑波大学講師	博士(学術)	加香孝一郎

論文の内容の要旨

タンパク質の翻訳後修飾の一つである、アルギニン残基のメチル化反応は、アルギニンメチル基転移酵素 (protein arginine methyltransferase: PRMTs) により触媒される化学的に安定な修飾である。一方、遊離型のモノメチルアルギニン、及び非対称性ジメチルアルギニン (asymmetric dimethylarginine: ADMA) は、一酸化窒素合成酵素 (NO synthase: NOS) の内因性阻害剤として作用するが、遊離の L-Arg が直接メチル化されてメチルアルギニン誘導体が生成される反応は知られていない。メチル化アルギニン誘導体は、アルギニンメチル化されたタンパク質が分解を受けることにより生成されると考えられているが、それらを明確にした報告はまだない。そこで、本研究では、タンパク質分解経路を制御することで、培養細胞内メチルアルギニンの生成を変化させることができるのではないかと仮説を立て、その検証を試みた。

細胞内の微量な遊離メチルアルギニンを計測するにあたり、著者は従来の HPLC での検出法を改良し、微量検出が可能な系の確立を目指した。細胞抽出液より固相抽出を行い、塩基性物質を集めた後、アミン誘導体化試薬 AccQ-Fluor™ を用いてメチルアルギニンを含む試料を蛍光誘導体化し、超高速クロマトグラフィーを用いて分析を行った。標品を用いた分析から、互いに異性体の関係にある ADMA と対称性ジメチルアルギニン (symmetric dimethylarginine: SDMA) とを十分に分離し、定量分析に必要な分解能が得られた。さらに、細胞抽出液より、これらの溶出位置に溶出したピークを分取し、MALDI-QIT-TOF-MS による MS/MS/MS における解析を行った結果、これらのピークがそれぞれ対応する標品と同一の構造であることを確認した。

次に、上記の確立した方法を用いて、細胞内のメチルアルギニンの生成機序におけるタンパク質分解による影響を検討した。おもに、タンパク質分解経路と考えられているユビキチンプロテアソーム系、及びオートファジー系について検討を行うこととした。プロテアーゼ阻害剤である MG132 を培地中に添加すると、細胞内の遊離 ADMA 及び SDMA の減少が観察された。また、同様の阻害剤である epoxomicin を添加することにより、細胞内遊離 ADMA 及び SDMA は減少する事が確認された。

さらに、オートファジー阻害剤である chloroquine で処理したところ、同様に細胞内遊離 ADMA の減少が観察された。これらの条件下で、PRMT の遺伝子発現に対する影響を、定量的 PCR 法を用いて検討したと

ころ、殆どの PRMT の遺伝子発現に対する有意な影響は認められなかった。以上の結果から、各阻害剤処理に伴う細胞内の遊離 ADMA は減少する事が確認され、タンパク質分解が遊離メチルアルギニンの生成の制御の重要な要因となっていることを示した。

審 査 の 結 果 の 要 旨

著者が確立したメチルアルギニンの定量法は、血漿中のメチルアルギニンの検出法を改良し、細胞内という小さな容量におけるメチルアルギニンの検出を可能にした。この定量方法を用いることにより、細胞内メチルアルギニンの検出はもとより、他のアミノ酸の細胞内定量にも応用できると考えられる。また、本研究により、タンパク質アルギニンメチル化修飾を受けたタンパク質のタンパク質分解が、遊離メチルアルギニンの生成の大きな因子となっていることを明らかにした。以上のように、遊離メチルアルギニンの生合成における重要な知見を提示したことは評価できるが、これらの現象に関する普遍的な最終結論を得るまでには至っておらず、今後課題も残されている。しかし、研究自体は非常に注意深く行われており、十分な信頼性を有していると判断でき、当該研究分野の発展に十分な貢献をしたと判断できる。

よって、著者は博士（生物工学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。