

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 小山 傑

---

論文中のデータに関しては、非常に興味深いものであるとの高い評価であった。しかし、本論文に記載するに至らなかったデータも多々あるため、データの量に関しては、やや物足りないものであった。審査中に挙げられた指摘は以下のような内容である。

・論文に記載されているデータ量が少ないが、この内容以外にも実験を行ってネガティブなデータがあるのか？

・MuRF1の相互作用分子としてSERCA1とM-CKを同定し、M-CKに関して解析を行っているが、SERCA1についてはどのような結果を得たのか？

・培養細胞の系においてMG132処理を行った時にMuRF1依存的に転写調節因子GMEB1がUb化されるのが観察されることから、MuRF1がGMEB1をUb化を介して分解制御していると考えている。このこと自体には問題はないが、MuRF1がGMEB1の分解制御を介して転写制御に関与していると述べるにはもう少し様々な実験を行った方が良いのではないか？例えば、MuRF1とGMEB1を共発現させGMEB1の転写調節能の変化については調べたりしなかったのか？

・MuRF1がM-CK、GMEB1、HIBADHをUb化し分解制御することを培養細胞の系で見出しているが、生体内で実際にこの反応が起こっていることは確認していないのか？例えば、骨格筋サンプルを用いてこれらの分子に対するウエスタン解析は行っていないのか？

・生体内のM-CKの量をCK活性の量を指標に求めており、その結果からMuRF1がM-CKを生体内でも分解制御していると判断しているが、活性を指標に量を求めることが正しいのか？MuRF1がM-CKと結合することで活性を阻害するなどの機構がないことは確かめなくて良いのか？

・実験の最初の段階としてMuRF1の相互作用分子を骨格筋抽出液に対してGST-MuRF1をbaitとしたpull-down法により同定している。このような手法を用いたために、骨格筋の中でも量的に多いSERCA1やM-CKが優先的に同定されたとも考えられるが、そのことについてはどう考えるか？他のアプローチ方法はないのか？

・MuRF1をノックアウトしたマウスを用いているが、MuRF1がM-CKと相互作用するのであれば、MuRF1が無いことで心筋におけるM-CKに影響が出て、心臓に何らかの異常が観られ

たりはしていないのか？

・ MuRF2 は免疫沈降の結果では M-CK と結合しないが、Ub 化は行うという結果に関する記述が分かりにくかった。総合討論では、他の研究グループの結果(MuRF1 は細胞内に少量存在している酸化型の M-CK とのみ結合し、大部分を占めている還元型 M-CK とは結合しない)を踏まえて、MuRF ファミリーと M-CK の結合が弱いためにこのような一見矛盾する結果が得られたと考えていることが分かるが、結果の章などのもっと早い段階で他の研究グループの結果を引用した方が分かりやすいのではないか。

・ 培養細胞を用いた Ub 化の実験は MG132 処理などをしっかりと行っているが、しかし、これらの結果を踏まえた更なる解析は行えたはず

・ MuRF1 が多くの基質を有し、更にそれら基質の間に共通の配列や構造が存在していないことを踏まえ、MuRF1 の基質認識について面白い考察を行っているが(MuRF1 は、変性状態とまでは言わなくても、比較的構造の緩んでいる部分を認識して結合している)、このことを実験的に確かめるにはどのようなアプローチ法があるか？

これらの指摘に対し、申請者は、本論文では MuRF1 の Ub 活性に関する解析結果のみを記載しているが、それ以外の観点の解析(MuRF1 と骨格筋特異的カルパイン p94 やコネクチンのキナーゼドメインとの相互作用。あるいは、MuRF1 の SUMO 化修飾による機能制御)にも力を入れており、それらは論文に記載するような結果を得られなかったことを述べた。そして、MuRF1 の SERCA1、M-CK、GMEB1、HIBADH に対する解析は不足していることを認めた上で、そうなった背景(利用可能な抗体が存在しない、あるいは M-CK の活性と量は相関があると一般に受け入れられている)について述べた。また、pull-down 法以外の手段としては二次元電気泳動法や iTRAQ 法などによるプロテオーム解析手法を挙げた。MuRF1 の基質認識の仮説を検証する実験法としては、基質に点変異を導入させ構造を緩めさせて検証を行うなどの考えを述べた。しかし、この実験手法については、MuRF1 が構造の緩んだ領域の中のある法則性を認識している場合、点変異導入がその法則にそぐわなければならないという難しさも指摘した。

以上のような質疑応答も含め判断すると、データ量の少なさという点はあるものの、本論文は、若干の誤字はあるが文脈の乱れ等は見受けられずきちんと構成の練られたものであり、学位論文として十分な質を備えたものであると高い評価であった。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。