

# 博士学位論文

内容の要旨及び審査結果の要旨

第53号

2024年3月

京都産業大学

は し が き

本号は、学位規則（昭和28年4月1日文部省令第9号）第8条の規定による公表を目的とし、令和6年3月16日17日に本学において博士の学位を授与した者の論文内容の要旨及び論文審査結果の要旨を収録したものである。

学位番号に付した甲は学位規則第4条第1項によるもの（いわゆる課程博士）であり、乙は同条第2項によるもの（いわゆる論文博士）である。

---

---

# 目 次

---

---

## 課程博士

1. 坂野 健自	[博士 (経済学)]	1
2. 繆 蕾	[博士 (経済学)]	6
3. 宇田 有輝	[博士 (経済学)]	9
4. 宇賀神 希	[博士 (生命科学)]	15
5. 吉良 彰人	[博士 (生命科学)]	18

氏名（本籍）	宇賀神 希（埼玉県）
学位の種類	博士（生命科学）
学位記番号	甲生 第8号
学位授与年月日	令和6年3月17日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
論文題目	Establishment of a ribosome purification system in zebrafish embryos and analysis of ribosome ubiquitination during zebrafish development
論文審査委員	主 査 三嶋 雄一郎 教授
	副 査 中村 暢宏 教授
	〃 千葉 志信 教授

## 論文内容の要旨

近年、翻訳装置であるリボソームが細胞内環境やシグナルに応じて多様な調節を受けることにより、タンパク質合成の質的・量的な制御が成されていることが注目されている。中でもリボソームを構成するタンパク質のユビキチン化修飾は、翻訳中のリボソームの異常に応答して導入され、異常を解消するための品質管理機構の引き金となる重要な修飾である。しかし、多細胞生物の多様な細胞環境における翻訳異常の時空間的な分布や、その品質管理機構の必要性については不明な点が多く残されている。その原因の1つに、多細胞動物個体からリボソームを迅速かつ効率よく精製・取得することが困難であることが挙げられる。

上記の課題に取り組むために、本論文の第1章では、小型淡水熱帯魚ゼブラフィッシュの胚からリボソームを簡便かつ迅速に精製する実験系の構築を目指した。まず、リボソーム大サブユニットの構成タンパク質であるRp136のC末端にFLAGタグ配列が付加されたタンパク質をゼブラフィッシュ一過的に発現させ、FLAGタグ抗体を用いたアフィニティ精製により、80Sリボソームが精製できることを確認した。その後、ゲノム編集により内在の*rp136*遺伝子座を改変し、C末端にFLAGが付加されたRp136を発現する組換えゼブラフィッシュ系統を樹立した。この系統を用いることで、様々な発生段階のゼブラフィッシュ胚から再現性よくリボソームを精製することが可能となった。

本論文の第2章では、第1章で樹立した*rp136*-FLAG系統を使用し、ゼブラフィッシュの個体発生過程におけるリボソームのユビキチン化状態の変遷を詳細に解析した。そのために、精製し

たりボソームをユビキチン抗体によるウエスタンブロットで解析し、リボソームのユビキチン化状態を解析する手法を考案した。この方法を用いることで、出芽酵母や哺乳類培養細胞で報告されている翻訳阻害剤によるリボソームのユビキチン化状態の亢進が、ゼブラフィッシュ胚でも起こることを確認した。その上で、翻訳阻害剤によるリボソームユビキチン化と類似のシグナルが正常なゼブラフィッシュ胚発生過程において検出でき、かつ発生段階によって変動することを明らかにした。さらに、翻訳中に衝突したリボソームのユビキチン化に関わるE3ユビキチンリガーゼであるZnf598を欠いたゼブラフィッシュ変異系統ではこの変動が減弱していることを確認し、質量分析によってリボソーム小サブユニットの構成因子であるRps10の138番目と139番目のリジン残基をZnf598によるユビキチン化標的部位として同定した。このユビキチン化部位は出芽酵母や哺乳類培養細胞を用いた先行研究で報告されている部位と一致していた。この部位の重要性を確認するため、Rps10のユビキチン化部位のアミノ酸置換変異系統をゲノム編集により作成した。この変異系統の初期胚ではRps10のユビキチン化のみならず、リボソームのユビキチン化が減少していた。以上の結果より、Znf598によるRps10の138番目と139番目のリジン残基のユビキチン化が、発生過程における動的なユビキチン化状態の形成に中心的な役割を果たすことが示された。

## 論文審査結果の要旨

本学位論文は、小型淡水魚ゼブラフィッシュにおけるリボソームの簡便な精製法の確立と、ゼブラフィッシュの胚発生過程におけるリボソームのユビキチン化状態の解析について報告したものである。

リボソームは遺伝情報にもとづいてタンパク質を合成する重要な装置であり、多数のタンパク質および数本のRNA分子からなる巨大分子複合体である。リボソームの機能を調節し、翻訳の正常性を維持することは、細胞レベルから個体レベルにおける複雑な生命現象を成立させるために必須である。近年の分子レベルの研究からは、翻訳中に停滞あるいは停止したリボソームがその原因に応じて特異的かつ多様なユビキチン化修飾を受けること、およびリボソームのユビキチン化状態に応じて作用する品質管理機構が存在することが明らかとなってきた。一方で、リボソームのユビキチン化がいつどこでどの程度起こっており、その破綻がいかなる影響をもたらすのかについて、個体レベルで明らかにした研究は限られており、リボソーム品質管理の生理的な意義の解明が必要とされている。

多細胞生物個体においてリボソームの修飾状態を解析するためには、リボソームの迅速かつ効率のよい精製方法が必要である。本論文の第1章では、さまざまな発生段階のゼブラフィッシュ胚からリボソームをアフィニティ精製するために、難易度の高いゲノム編集により*rp136*遺伝子座を改変し、C末端にFLAGタグが付加されたRp136を発現する組換えゼブラフィッシュ系統を樹立している。ゼブラフィッシュにおいて内在のリボソームタンパク質遺伝子にタグを付加した初めての例であり、この系統を用いることで初期胚からリボソームを簡便かつ高効率に精製できることから、非常に有用な技術を開発したと評価できる。

本論文の第2章では、第1章で確立したゼブラフィッシュ胚からのリボソーム精製法を利用し、発生過程のリボソームのユビキチン化状態を解析した。リボソームのユビキチン化の程度が発生ステージによって変動すること、その際にZnf598によるRps10のユビキチン化が中心的な役割を果たすことを、遺伝学と質量分析を組み合わせて明らかにしている。出芽酵母や哺乳類培養細胞の先行研究と比較し、個体レベルにおいても同様のリボソームのユビキチン化機構が重要であることを示唆する結果であり、その動的な変動が脊椎動物の胚発生過程に起こっていることを明らかにした最初の報告である。

主査及び2名の副査の論文調査において、本研究は、これまで分子レベルでの研究がほとんど進められていなかった脊椎動物の個体発生過程におけるリボソームのユビキチン化について、その解析が可能となる実験系を構築し、生化学と遺伝学を組み合わせることで、その分子メカニズムの一端を明らかにしたという点において、学術的な意義があることが認められた。また、研究課題の新規性、作業仮説の設定の仕方、実験方法の妥当性、結果の解釈や考察などについて大きな問題はないと判断された。本学位論文に係る学術論文は、RNA誌に受理・発表されており、博士の学位要件は満たしていることが確認された (Ugajin et al., RNA 2023, 29(12):1910-1927, doi: 10.1261/rna.079633.123)。

以上の議論を踏まえ、調査委員会は、本論文は博士学位論文としてふさわしいものであると結論した。