

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 小柳 充
 学位 博士 (農学)
 学位記番号 新大院博 (農) 第 143 号
 学位授与の日付 平成 26 年 3 月 24 日
 学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当
 博士論文名 *A proteomic analysis of Nipponia nippon*
 (トキのプロテオーム解析)

論文審査委員 主査 教授・三ツ井 敏明
 副査 教授・大山 卓爾
 副査 教授・新村 末雄
 副査 教授・山田 宜永
 副査 准教授・伊藤 紀美子

博士論文の要旨

日本に生息していた野生のトキ (*Nipponia nippon*) が 2003 年に絶滅した。現在, 我が国の特別天然記念物であるトキの野生復帰・定着の取り組みが行われている。環境省が設置し新潟県が管理および運営をしている佐渡トキ保護センターにおいて実施されているトキの繁殖プログラムを着実に進めるため, トキの生化学, 分子生物学および生理学の基盤整備が求められている。

本研究においては, 本繁殖プログラムに貢献する目的でゲノム情報が公開されていないトキのプロテオームの解明を試みた。2010 年 3 月 10 日に佐渡トキ保護センターに於いて死亡したトキ個体 (ID#162) の剖検上は組織の変色や損傷は観察されなかった。メストキの剖検個体から 11 組織 (脳, 気管, 肝臓, 心臓, 肺, 腺胃, 筋胃, 小腸, 十二指腸, 卵巣, 頭部筋肉) から可溶性のタンパク質を抽出した。トキの 10 組織から抽出したタンパク質を SDS ポリアクリルアミド電気泳動し, 組織タンパク質の健全性が確認された。トキの 11 組織の可溶性タンパク質の網羅的解析を行うために, それぞれのタンパク質をトリプシン消化し, ナノ液体クロマトグラフィー/質量分析装置に供した。得られたペプチドのマスペクトルのデータを NCBI/*Gallus gallus* のデータベース情報と照合し, トキプロテオームについて 11 組織の合計で 4,253 件の GI No. が得られた。例えば, トキの脳で発現しているタンパク質は, gamma-enolase (GI No.45382393), creatine kinase B-type (GI No.45384340), **V-type proton ATPase subunit B, brain isoform** (GI No. 363742094), amphiphysin (GI NO.56606150), **puromycin-sensitive aminopeptidase** (GI No. 363745438), alpha/beta-synuclein (GI No.45382765)(GI No.45382765), alpha-enolase (GI No. 46048768), **talin-2** (GI No.363737914), **adenylyl cyclase-associated protein** (GI No. 363742430), WD repeat-containing protein 1 (GI No.12230748), **AP-1 complex subunit beta-1** (GI No. 363740107), **V-type proton ATPase subunit C1** (GI No.50731811), **synapsin-2** (GI No. 363738596), ATP-dependent RNA helicase DDX3X (GI No.71895253), drebrin E2 (GI No.410592), drebrin A (GI No.410607), drebrin,

DBN1, drebrin 1(GI No.45382803), Fatty acid-binding protein, brain (GI No.462065)など 707 件の GI No.が得られた。この結果は, *Gallus gallus* のデータベース情報によりトキプロテオームを部分的に解明することが可能であることを示している。得られたプロテオームのデータを読み解くために,具体的にトキの脳から得られたデータで検証した。今回の解析で3種類の drebrin アイソフォーム, drebrin E2(GI No.410592), drebrin A(GI No. 410607), drebrin 1(DBN1, GI No.45382803)が検出された。drebrin A は, 成熟したニワトリの脳特異的に発現することが報告されている。そこで, 150 日齢の成熟ニワトリの組織からのタンパク質をコントロールとしてトキの 10 組織における drebrin の発現を調べた。drebrin 抗体を用いたウェスタンブロッティング解析の結果, トキとニワトリともに drebrin 発現が脳特異的に検出された。胚では2種類のアイソフォームのタンパク質が発現するが, drebrin A は成熟脳特異的に発現するタンパク質である。これは, 単一遺伝子からメッセンジャーRNA レベルでの選択的スプライシングの結果である。本解析で示したトキプロテオームデータセットにおいては選択的スプライシングで生じたアイソフォームを識別できない場合があることを理解したうえでデータを読み取ることが必要であることを示している。

審査結果の要旨

審査委員会を開催し, 論文を査読しての感想, 意見交換を行い, 特記すべき事項として以下の点が挙げられた。

ゲノム情報が公開されていないトキの11組織 (脳, 気管, 肝臓, 心臓, 肺, 腺胃, 筋胃, 小腸, 十二指腸, 卵巣, 頭部筋肉) のプロテオーム解析が試みられた。NCBI/*Gallus gallus* のデータベース情報と照合によりトキプロテオームについて合計で4,253件のGI No.が得られた。drebrin 抗体を用いたウェスタンブロッティング解析の結果, 確かにトキにおいてdrebrin発現が脳特異的に検出された。

本論文は, トキプロテオームを解析した初めての例で, 極めて挑戦的で独創的な研究であり, トキの生化学, 分子生物学および生理学の理解に大きく貢献したと評価した。また, 本論文に記載されている内容の一部はAnimal Science Journal 誌に掲載予定である。よって, 本論文は博士 (農学) の学位論文として十分であると認定した。