

HECT

型ユビキチンリガーゼに保存されているヒンジループ領域がタンパク質動態およびユビキチン翻訳後修飾に与える影響

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2024-05-15 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 小林, 史典, Kobayashi, Fuminori メールアドレス: 所属: 金沢大学, 金沢大学, 金沢大学
URL	http://hdl.handle.net/2297/00051487

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 International License.



博士論文要旨

HECT型ユビキチンリガーゼに保存されているヒンジループ領域がタンパク質動態 およびユビキチン翻訳後修飾に与える影響

The effect of hinge loop region preserved in HECT-type ubiquitin ligase on protein dynamics and post-translational modification of ubiquitination

金沢大学大学院自然科学研究科

自然システム学専攻

学 籍 番 号 1524062006

氏 名 小林 史典

Abstract

Ubiquitin ligase (E3) is the most important factor selecting target proteins for ubiquitination and determining the poly-ubiquitin chain type on the target proteins. The previous studies led to the hypothesis that large conformational rearrangement via the flexible hinge loop connecting the C-lobe and N-lobe of the HECT domain is essential for ubiquitin transfer by the HECT-type E3s. We here provide the first direct demonstration of the dynamic movement of the C-lobe around the N-lobe of the HECT domain in real time using high-speed atomic force microscopy (HS-AFM). The conformational state of the mutated HECT domain in which the flexibility of the hinge loop is restricted by the substitution of GSRN to PPPP was also revealed. Furthermore, *in vitro* Ubiquitination assay revealed that Ub₂ was formed in both Wild type and mutant, and the flexibility of Hinge loop of HECT domain greatly contributed to Ub₂ formation efficiency. The validity of the Ub₂ chain type specificity using the Ub mutants also demonstrated the importance of the N terminal region of the full length E6AP due to the Ub₂ chain type specificity.

背景・研究目的

ユビキチン (Ub) は、76 アミノ酸からなる真核生物において高度に保存されたタンパク質であり、タンパク質の重要な翻訳後修飾の1つであるユビキチン化(Ub 化)に用いられている。標的タンパク質の Ub 化は、Ub 活性化酵素 (E1)、Ub 結合酵素 (E2)、および Ub リガーゼ (E3) を含む一連の酵素カスケードが、標的タンパク質上の Lys の ε-アミノ基と Ub の C 末端 Gly 残基のカルボキシ基間のイソペプチド結合を形成させることで達成される。

さらに、これらの酵素反応系は、標的タンパク質上に様々な構造のポリ Ub 鎖を形成させる。形成されるポリ Ub 鎖の構造の違いは、Ub 間のイソペプチド結合に Ub 内の 7 つの Lys 残基(K6、K11、K27、K29、K33、K48、K63) または Ub の N 末端 Met 残基(M1)のいずれかが使用されることで生じる。形成された様々な Ub 鎖は、それぞれ異なる細胞内プロセスに関連していることが明らかになっている。例えば、K48-ポリ Ub 鎖は基質をプロテアソームによるタンパク質分解に導き、K63-ポリ Ub 鎖は DNA 修復およびシグナル伝達に関与し、さらに直鎖状ポリ Ub 鎖 (M1 鎖)は NF-κB 活性に関与している。

E3 は、標的基質タンパク質を選択し、基質上に形成する Ub 鎖型を決定する最も重要な因子である。E3 は Ub 化修飾機構の違いによって、HECT 型 E3 と RING 型 E3 に大きく分類される。RING 型 E3 は、E2 から基質タンパク質に直接的に Ub を付加するための足場として機能している。一方、HECT 型 E3 は標的タンパク質に Ub を転移させる前に、Ub の C 末端 Gly 残基のカルボキシ基と HECT 型 E3 内の触媒性 Cys 残基との間にチオエステル結合を形成する。

HECT 型 E3 は、N 末端に基質認識部位を有し、C 末端に HECT ドメインを有している。N 末端領域は多様であり、その N 末端ドメインの構造に基づいて 3 つのグループに分類されている [WW ドメインを含む Nedd4 ファミリー、RDL(RCC1 様 domain)を含む HERC(HECT and RCC1-like domain)ファミリー、その他の HECT 型 E3]。また、C 末端の HECT(homologous of E6AP carboxyl-terminus)ドメインは、Ub とチオエステル結合する触媒性 Cys 残基を含む約 350 アミノ酸からなるドメインとして定義され、すべての HECT 型 E3 に高度に保存されている。「他の」 HECT 型 E3 の一つである E6AP(E6-associated protein)は、発癌性ヒトパピローマウイルス(HPV16/18)に由来する E6 タンパク質と相互作用して、がん抑制因子 p53 を Ub 化し、プロテアソーム分解系へと導く。また、E6AP の機能不全は神経変性疾患であるアンジェルマン症候群に関与することが知られている。

HECT ドメインは、E2 結合部位を含む N-lobe と Ub とチオエステル結合を形成する触媒性 Cys 残基を含む C-lobe からなり、これらの 2 つの lobe は柔軟なヒンジループによって連結されている。現在、構造生物学的解析から E2 から HECT ドメインへの Ub 転移機構を理解すること

に関連した2つの知見が報告されている。1つ目は、3つのHECTドメインの結晶構造を比較すると、E2の触媒性Cys残基とHECTドメインの触媒性Cys間の距離が、それぞれE6AP(L字型)は約4.1 nm、WWP1(逆T字型)は約1.6 nm、Nedd4(触媒構造)は0.8 nm以内であり、E2からUbを受け取れるようにC-lobeが接近している。2つ目は、N-lobeとC-lobeを連結しているヒンジループに、柔軟性を制限するような変異を導入すると、標的タンパク質へのUb転移が消失する。これらの結果から、HECT型E3によるUb転移には、2つのlobeを連結する柔軟性ヒンジループを介した大きな構造的再配置が必須であるという仮説が導かれている。したがって、HECT型E3の動態に関する詳細な結果は、それらの機能メカニズムのより詳細な理解を得るために必要である。しかし、HECT型E3の構造変化のダイナミクスは未だに解明されておらず、N-lobe周辺のC-lobeの大きな動きの直接的な証拠はない。

そこで本研究では、HECT型E3の動的な分子メカニズムを明らかにするために、高速原子間力顕微鏡(HS-AFM)を用いた。HS-AFMは、高い空間的および時間的分解能を持ち、タンパク質の分子形状およびその動的挙動をリアルタイムで同時に観察することができる。また、観察試料として、E6APのHECTドメインを選択した。E6APは、最も一般的なHECT型E3であるとともに、これまでにE6APに関する多くの生物学的情報が報告されていることから、AFM観察の結果を考察するのに役立つと考えた。さらに、GSRNのPPPPへの置換したヒンジループ柔軟性阻害体(E6AP^{HECT}_PPPP)を作製して、HECTドメインの動態及びUb化活性を比較した。これらから、HECT型E3のヒンジループ領域が、タンパク質動態とUb化活性に与える影響を明らかにするのを試みた。

E6AP^{HECT} の高速 AFM 観察と C-lobe の動態の解析

これまでの構造生物学的解析から、HECT 型 E3 による Ub 転移には、Hinge loop の柔軟性による大きな構造的再配置が必要であるという仮説が導かれている。Ub 化における HECT ドメインの動的な分子メカニズムを明らかにするために、HS-AFM を用いて野生型 E6AP の HECT ドメイン (E6AP^{HECT_Wt}) と野生型の GSRN 配列を PPPP で置換したヒンジループ柔軟性阻害変異体 (E6AP^{HECT_PPPP}) の構造およびダイナミクスを観察し、ヒンジループの HECT ドメインの動態に与える影響を評価することを試みた。

基板上に固定された E6AP^{HECT_Wt} の配向を揃えるために、E6AP^{HECT} の N 末端側の His タグと mica 上の Ni との相互作用を利用した。HS-AFM 観察の結果、E6AP^{HECT} の構造と C-lobe の N ロープへの動的な動きをリアルタイムで視覚化できた。C-lobe は結晶構造解析から推測されている動きと同様に、N-lobe の周囲を動いていた。

ここでは、E6AP^{HECT_Wt} と E6AP^{HECT_PPPP} の AFM 画像解析と結晶構造に基づいた AFM シミュレーション解析によって、HECT ドメインの C-lobe が、E2 および Ub の非存在下で N-lobe の E2 結合部位に近い位置に位置して触媒状態の構造をとり、柔軟性ヒンジループの阻害は C-lobe の動きを制限することを示した。さらに、E6AP^{HECT_Wt} の C-lobe の移動距離の解析から HECT ドメインの C-lobe の移動距離が、Ub 転移に必要な距離を十分に満たすことも示した。

HECT 型 E3 による基質の Ub 化は、E2-HECT ドメイン間と HECT ドメイン-基質間の 2 段階で行われる。結晶構造解析から HECT ドメインは、E2~Ub から Ub を受け取る際に、C-lobe が大きく移動することが予測されている。また、HECT ドメインは Ub を受け取った後に、標的タンパク質上のリジン残基の ε-アミノ基に Ub のカルボキシ基が近接できるように C-lobe を移動させることが示されている。よって、HECT ドメインの C-lobe は E2 に接近し Ub を受け取った後に、E2 結合領域の方向から基質方向へ Ub が付加された C-lobe を移動させなければならない。HS-AFM 観察で、Ub が付加された C-lobe の大きな動きを確認できれば、E6AP^{HECT_Wt} と E6AP^{HECT_PPPP} の HS-AFM 観察結果と合わせて、HECT ドメインの Ub 化におけるヒンジループの役割をさらに考察できると考えた。そこで、Ub 化された HECT ドメインを調製・分離することにした。

まず、通常の Ub 化反応溶液から Ni-NTA クロマトグラフィーを利用して HECT~Ub を単離することを試みた。Ni-NTA クロマトグラフィーによる分離の結果、E6AP^{HECT}~Ub を Ub 化反応溶液中から単離することができた。しかし、分離した His-E6AP^{HECT}~Ub の HS-AFM 観察で、N-lobe と C-lobe を識別できる分子は確認できたが、Ub が付加された C-lobe をもつ分子を確認できなかった。E6AP^{HECT} と Ub 間の高エネルギーチオエステル結合は反応性が高いことから、

HS-AFM 観察中に Ub がすばやく解離しているのではないかと考えた。よって、単離した E6AP^{HECT}~Ub の安定性を検証した。安定性の検証の結果、観察温度での長時間のインキュベーションおよび、保存時の凍結融解によって単離した E6AP^{HECT}~Ub が減少していることを確認した。

これらの結果から、E6AP^{HECT}~Ub では、Ub 解離の可能性を完全に排除できないため、E6AP^{HECT}=Ub 複合体を作製することを試みた。HECT=Ub 複合体は、Ub の C 末端グリジン残基をシステイン(Cys)に置換した Ub(G76C)と HECT ドメイン触媒 Cys 間をジスルフィド結合で不可逆的に架橋させた複合体で、HECT ドメインと Ub がチオエステル結合で結合している HECT~Ub 複合体よりも安定性が高い。また、先行研究においても、Nedd4^{HECT}=Ub (HECT ドメイン=Ub 架橋複合体)が作製され、結晶構造解析に使用されている。

しかし、E6AP^{HECT} と Ub(G76C)間の架橋反応で、E6AP^{HECT}=Ub は形成されたが、形成効率が低いためゲル濾過クロマトグラフィーを用いた方法での単離は困難であった。よって、E6AP^{HECT}=Ub を分離するために、さらなる条件検討が必要である。

E6AP^{HECT} のヒンジループの Ub 化活性への影響の検証

HECT ドメインのヒンジループの柔軟性の阻害は、HECT 型 E3 による基質の Ub 化反応を阻害することが明らかにされている。しかし、HECT ドメインを介した E2 から基質への Ub 転移の分子詳細は未だ明らかになっていない。第 2 章の E6AP^{HECT} の HS-AFM 観察で、E6AP^{HECT}_{Wt} の構造およびダイナミクスと E6AP^{HECT}_{PPPP} の構造を観察して比較したところ、ヒンジループの柔軟性の阻害によって、E6AP^{HECT} C-lobe が N-lobe 上の E2 結合部位領域に近くに位置していた。このことから、HECT ドメインのヒンジループの柔軟性が阻害されても、E2 から HECT ドメイン上の触媒 Cys 残基へ Ub を転移できるのではないかと予測した。それを検証するために、E6AP^{HECT}_{Wt} と E6AP^{HECT}_{PPPP} の Ub 化活性を比較することにした。

本章では、最初に、Ub 化反応に必要な E3 HECT ドメインの他に、Ub 化酵素[UBE1(E1)、UbcH7(E2)]、各種 Ub [Ub^{Wt}, Ub^{k-less}, His-Ub^{k-less}, Ub^{K48R}]を大腸菌発現系で発現させ、様々なカラムを用いて精製した。次に、精製した各種タンパク質を用いて Ub 化反応を行って、His-E6AP^{HECT}_{Wt} と His-E6AP^{HECT}_{PPPP} の Ub 化活性を比較した。また、E6AP^{HECT} の N 末端への His タグの導入で、Ub 化活性に影響を与えないかも調べた。その結果、His-E6AP^{HECT}_{Wt} と His-E6AP^{HECT}_{PPPP} の両方で、E2~Ub から Ub が転移し、E6AP^{HECT}~Ub を形成した。さらに、この Ub 化反応で Ub₂ も形成され、His-E6AP^{HECT}_{Wt} よりも His-E6AP^{HECT}_{PPPP} の方が Ub₂ の形成効率が高いことを明らかにした。また、His タグの有無によって Ub₂ の形成に影響しないことも確認した。

現在、Ub₂ の生理学的機能として、直鎖状ポリ Ub 鎖を形成する LUBAC の中心的な触媒因子である HOIP の活性に影響を与えることが報告されているが、Ub₂ の生理学的機能の多くは未だ明らかになっていない。E6AP^{HECT} によって形成された Ub₂ の形成メカニズムや鎖型特異性の詳細を明らかにすることは、Ub 翻訳後修飾系の理解をより深めるためにも有用である。先行研究で、Wang らが Ub₂ の形成機構として、3 つのメカニズムが提案し、生化学的解析から E2 / E3 ヘテロ二量体モデルが最も有望な機構であると示唆している。しかし、Wang らが使用した HECT 型 E3 は WWP1 であり、HECT ドメイン上流の N 末端領域が E6AP とは異なるとともに、ポリ Ub 鎖形成メカニズムも異なると示唆されている。よって、最初に E6AP^{HECT}_{PPPP} による Ub₂ の形成メカニズムを明らかにすることを試みた。

Ub₂ 形成に影響を及ぼす因子を明らかにするために、E2 濃度と His-E6AP^{HECT}_{PPPP} 濃度を変えて Ub 化反応を行った。Ub₂ 形成効率は、各 E2 濃度において大きな違いがみられなかったが、E3 HECT ドメイン濃度に強く依存して増加した。以上のことから、Ub₂ の形成には HECT ドメインが大きく関与している可能性が示唆された。

しかし、本研究の Ub 化反応系では、E2~Ub の再生が常に行われている。そのため、単離した E2~Ub を用いて、Ub 化反応を行った。単離した E2~Ub を HECT ドメインと等量で反応させることで、E2 への Ub の再充填を防ぐことができるほか、E2~Ub のすべての Ub が HECT 上の触媒 Cys に転移することによって、HECT~Ub のみの状況を作り出せると考えた。Ub 化反応の結果、ほとんどの E2~Ub が消失して、HECT~Ub のみになったときから、Ub₂ 形成の大きな増加が見られた。このことから、Ub₂ は HECT~Ub の分子間相互作用によって形成されることを示唆した。次に、Ub₂ の鎖型特異性を明らかにすることを試みた。ポリ Ub 鎖は、Ub 内の 7 つのリジン残基または N 末端メチオニン残基(M1)を介した結合によって形成される。そこで、本研究ではまず、8 種類の Ub 変異体(Ub^{K-less} K6R, K11R, K27R, K29R, K33R, K48R, K63R)を用いて Ub 化反応を行った。この Ub 化反応の結果、どの Ub 変異体を用いても E6AP^{HECT} によって、Ub₂ が形成された。また、Ub の N 末端に His タグを導入することで、M1 を介した結合が阻害されていることが報告されている。そこで、N 末端 M1 を介した結合を検証するために、His-Ub^{K-less} を用いて Ub 化反応を行った。Ub 化反応の結果、E6AP^{HECT} は His-Ub^{K-less} でも Ub₂ を形成する能力を示した。しかし、Ub 変異体の鎖形成結果のみを用いて Ub₂ の結合部位を調べることが困難であった。そこで、質量分析法で Ub 間の結合部位を同定することを試みた。質量分析の結果、トリプシンペプチドの質量スペクトル分析は、野生型および変異型 Ub₂ 鎖が、Lys または Met のアミノ残基を用いて結合されていないことを示唆したが、一致スコアは十分に高くはなかった(データ図示は示していない)。

最後に、HECT 型 E3 リガーゼが、基質タンパク質上に特異的な Ub 鎖を形成するほか、基質タンパク質の非存在下で鎖型特異性を有する遊離 Ub 鎖 (主に Ub₂) を形成することも知られている。HECT 型 E3 の WWP1 は、Nedd4 ファミリーに分類され、基質タンパク質上に K63-ポリ Ub 鎖を形成する。さらに、Ub₂ アッセイにおいて、HECT ドメイン領域のみでも Ub₂ の形成で鎖型特異性を維持している。K48-ポリ Ub 鎖を基質上に形成する E6AP の HECT ドメインは、K48R Ub₂ を形成し、鎖型特異性が見られなかった。E6AP は Nedd4 ファミリーとは異なるポリ Ub 鎖形成のモデルが予測されている。そのため、Ub₂ 形成においても Nedd4 ファミリーとは異なる結果をもたらしたと予測した。全長 E6AP においても Ub₂ を形成し、鎖型特異性が維持されるかを検証した。Ub 化反応の結果、E6AP^{HECT} の Ub₂ 鎖形成速度が全長 E6AP のものよりわずかに速かった。次に、E6AP の Ub₂ 鎖型特異性を調べるために、Ub^{K48R} を用いて Ub₂ 解析を行った。全長 E6AP と Ub^{K48R} を用いた Ub₂ アッセイで、E6AP^{HECT} とは対照的に、Ub^{K48R} の Ub₂ を合成しなかった。このことから、HECT ドメインの C 末端領域が Ub 鎖型特異性を決定するために重要であることが示されているが、本研究では E6AP^{HECT} ドメインの上流の N 末端領域も鎖型特異性の決定に関与していることを示した。

総括

本研究では、これまでに結晶構造解析から予測されている HECT ドメインの N-lobe の周りの C-lobe の動態をリアルタイムで初めて直接実証した。HECT ドメインの C-lobe の動態の可視化は、以前の構造生物学解析との比較を可能にする。

まず、E2 または Ub の非存在下での E6AP HECT ドメインの構造が、E2 から Ub をすばやく受け取ることができる触媒立体配座状態をとる可能性があることを明らかにした。これは、HS-AFM によって観察された E6AP^{HECT_PPPP} の構造が、触媒立体配座状態に類似していることと、Ub を触媒性 Cys 残基に保持する能力を有するという結果から導かれる。さらに、E6AP^{HECT_Wt} の HS-AFM 観察は、C-lobe が 4nm 以上移動する能力を持つとともに、C-lobe が動いている HECT ドメインの構造状態が主に L 字型および逆 T 字型をとることも明らかにした。SMURF2 結晶構造の立体配座状態において、E2 と C ロープとの間の触媒性 Cys 残基の距離は、依然として Ub を転移させるには遠すぎる。HECT ドメインは HECT 型 E3 で高く保存されているため、E6AP の C-lobe の動きを他の HECT 型 E3 の HECT ドメインの動きに対応させることができる。今回、観察された E6AP の C-lobe の移動の最大距離はほぼ 6nm だった。よって、SMURF2 上の C-lobe はこの大きな距離を移動できると予測される。

現在、Ub₂ の生理学的機能として、直鎖状ポリ Ub 鎖を形成する LUBAC の中心的な触媒因子である HOIP の活性に影響を与えることが報告されているが、Ub₂ の生理学的機能の多くは未だ明らかになっていない。したがって、E2 から E3 への Ub 転移機構の包括的な理解を得るために、Ub₂ 鎖の形成機構を調べることは有用である。ヒンジループ柔軟性阻害変異体の HECT ドメイン (E6AP^{HECT_PPPP}) の Ub₂ 合成活性は、野生型 HECT ドメイン (E6AP^{HECT_Wt}) のものよりもはるかに高かった。HS-AFM 観察と Ub 化反応の結果から、Ub および E2 の非存在下で HECT ドメインは触媒立体構造をとっている可能性が高い。そのため、E6AP^{HECT_PPPP} および E6AP^{HECT_Wt} の双方において、E2 から転移してきた Ub と HECT ドメイン間のチオエステル結合形成の効率に有意差がないことが予測される。しかし、E6AP^{HECT_PPPP} の方が E6AP^{HECT_Wt} よりも形成効率が高かった。Ub₂ は HECT ドメイン間で形成されている。よって、ヒンジループの柔軟性の制限が C-lobe の動きを低下させるとともに、HECT ドメイン間の相互作用に影響を与えているかもしれない。HECT 型 E3 の 1 つである KIAA 10 の Ub₂ およびより長いポリ Ub 鎖の形成効率は、E6AP HECT ドメインの形成効率よりもはるかに高いことが知られている。KIAA 10 の C-lobe のダイナミクスを直接視覚化することにより、遊離ポリ Ub 鎖とヒンジループの形成の関係をより詳細に理解できることが期待される。したがって、HECT ドメインのヒンジループの柔軟性と Ub₂ 鎖形成効率との関連は、今後のさらに研究する必要がある。

HECT 型 E3 が、基質タンパク質上に特異的な Ub 鎖を形成するとともに、基質タンパク質の非存在下で鎖型特異性を有する遊離 Ub 鎖 (主に Ub₂) を形成することが知られている。Ub 鎖型特異性の決定には、HECT ドメインの C 末端領域が大きく関与していることが示されているが、本研究の全長 E6AP と HECT ドメインの Ub₂ 形成と鎖型特異性の検証から、E6AP^{HECT} ドメインの上流の N 末端領域も鎖型特異性の決定に関与していることが新たに示された。

まとめると、本研究では HECT ドメイン上のヒンジループの柔軟性が、Ub 転移反応における C-lobe の移動を可能にしているとともに、Ub₂ 鎖の形成にも大きな影響を及ぼすことを示した。また、全長 E6AP の HECT ドメイン上流の N 末端領域も Ub の鎖型特異性に関与することを示した。しかし、Ub 化における Ub 化酵素の動態の詳細の多くは明らかになっていない。今後、HECT 型 E3 の HS-AFM 観察を更に行って、動的な Ub 化機構の詳細を明らかにすることを期待する。

学位論文審査報告書（甲）

1. 学位論文題目（外国語の場合は和訳を付けること。）

HECT型ユビキチンリガーゼに保存されているヒンジループ領域がタンパク質動態およびユビキチン翻訳後修飾に与える影響

2. 論文提出者 (1) 所 属 自然システム学 専攻

(2) 氏 名 小林 史典

3. 審査結果の要旨（600～650字）

タンパク質のユビキチン化は、ユビキチンをユビキチン活性化酵素(E1)、ユビキチン結合酵素 (E2)、ユビキチンリガーゼ(E3) の順に転移させ、最終的に基質タンパク質へ付加するタンパク質翻訳後修飾機構である。本研究では、タンパク質の構造とダイナミクスを同時に観察できる高速原子間力顕微鏡(HS-AFM)を用いて、ユビキチン化反応時の E3の動的分子プロセスの解明に取り組んでいる。高速 AFM 観察の結果、これまで構造生物学的実験データから推測されていた HECT型 E3の C-lobe 領域の構造変化をリアルタイムで検証することに成功している。また、ユビキチン変異体を用いたユビキチン鎖型の分析から、HECT型 E3の1つである E6APの鎖型特異性の保持には、すべての HECT型 E3に広く保存されている C末端側領域だけでなく、N末端側領域も重要な役割を担っていることを実証した。以上の研究内容の一部は、学術専門誌(Biochemical and Biophysical Research Communications)に掲載済みである。本論文は、ユビキチン化の理解に必要な「ユビキチン鎖伸長過程」や「各ユビキチン化関連酵素の集合・解離過程やそれに伴うタンパク質の構造変化」などの動的分子プロセス解明の礎となる研究内容であり、ユビキチン修飾系の研究分野に大きく貢献するとことが期待される。よって、本審査委員会は、本論文は博士(理学)の学位を授与すべき内容であると判断した。

4. 審査結果 (1) 判 定 (いずれかに○印) 合格・ 不合格

(2) 授与学位 博士(理学)