

( 続紙 1 )

京都大学	博士 ( 理学 )	氏名	Ha Seongmin
論文題目	血中の D-アミノ酸含有ペプチド及び蛋白質の分析に関する研究		
( 論文内容の要旨 )			
<p>蛋白質を構成するアミノ酸は通常全てL-アミノ酸であるが、近年、白内障などの原因蛋白質中にアスパラギン酸 (Asp) 残基の異性体が検出されている。また、血液は様々な細胞から分泌された膨大な種類の蛋白質とその断片ペプチドを含んでいる。申請者はヒト血液中のD-アミノ酸含有ペプチド及び蛋白質に着目し、研究を行った。実験1ではヒト血清中のD-アミノ酸含有ペプチドの検出と同定に関する研究を行い、実験2ではヒトIgG kappa鎖の中のAsp異性体の検出及び年齢との相関関係について研究を行った。</p>			
実験1 血液中のD-アミノ酸含有ペプチドの探索及び同定			
<p>体内の酵素はL-アミノ酸で構成されている蛋白質を認識するため、D-アミノ酸を含んだ蛋白質は完全に分解されない可能性がある。従って、本研究では年齢の異なる血液試料を使用し、ヒト血清中にD-アミノ酸含有ペプチドがあるかどうかを調べた。本研究ではヒト血清 (24、46、63代) から蛋白質を除去した後、ペプチドを逆相クロマトグラフィー (RP-HPLC) で分離し、ジアステレオマー法及び液体クロマトグラフ-質量分析装置 (LC-MS) を用いた異性体分析法を用いてペプチドの中にAsp異性体が存在するかどうかを調べた。その結果、ヒト血清中にD-Asp を含んだ二つのペプチドの検出に成功した。LC-MS/MSを用いて同定した結果、両方のペプチドはFibrinogen beta chainのN末端に存在するfibrinopeptide B (<math>^1\text{QGVNDNEEGFFSAR}^{14}</math>) とそれ由来のペプチド (<math>^1\text{QGVNDNEEGFFSA}^{13}</math>) であることが確認された。AspのD/L比は両法のペプチドともに0.08であり、年齢による変化はなかった。この結果より、ヒト血清の中にD-Asp含有ペプチドが存在し、検出可能であることが初めて明らかとなった。</p>			
実験2 ヒトIgG kappa鎖の中のAsp異性体と年齢の関係			
<p>IgGは糖蛋白質の一種で、生体内での免疫機能を担っている重要な蛋白質である。また、単クローン抗体 (mAb) として利用されるので、臨床でも価値の高い蛋白質である。そのため、翻訳後修飾に関する研究も詳しくされており、<i>in vivo</i>では糖鎖の構造と年齢、疾患の関係が調べられており、<i>in vitro</i>では生理条件下での加温によりAspの異性化、Asnの脱アミド化などが容易に起きることが検出されている。本研究ではヒトIgGの中にAsp異性体が存在するかどうかを分析し、年齢との相関関係について調べた。年齢別 (24、37、41、54、67歳) の健常人ヒト血清からIgGを精製した。light chainを分離し、トリプシン処理後、各ペプチドの異性体分析を行った。さらに、合成ペプチドを用いてAsp異性化によるIgGの構造変化を予測した。その結果、IgG kappa鎖のAsp 151とAsp 170が異性化していることが明らかとなった。両残基ともに、54、67歳で異性化率が著しく増加した。Asp 170に4つの異性体 (L<math>\alpha</math>-、L<math>\beta</math>-、D<math>\alpha</math>-、D<math>\beta</math>-Asp) を導入した4種のペプチドを円偏光二色性測定で構造を調べた結果、通常のL<math>\alpha</math>-Aspを導入したペプチドが<math>\beta</math>-turn構造を有していることに対して、L<math>\beta</math>-、D<math>\alpha</math>-、D<math>\beta</math>-Aspを導入したペプチドでは構造を失い、ランダムコイルになることが明らかとなり、加齢によるIgG中のAsp異性体形成が蛋白質機能を低下させる可能性があることを示した。</p>			

(続紙 2 )

(論文審査の結果の要旨)

加齢性疾患の原因タンパク質のなかにL体以外の異性化したアスパラギン酸残基が散見されることがたびたび報告されている。その生成機構として、加齢性疾患の原因タンパク質には代謝的に不活発であるものが多いため、長期にわたって酸化ストレスに曝された結果、化学的(非酵素的)にAsp残基の異性化が生じたものと考えられている。実際に白内障の原因タンパク質であるクリスタリン(眼の水晶体を構成するタンパク質)では、罹患者や高齢者において非常に高い割合で異性化したAsp残基が発見されており、また歯の象牙質を構成するタンパク質中でも加齢と共にAsp残基の異性化が相関して進行するため、異性化Aspを指標とした不明遺体の年齢推定法が法医学分野において採用されている。

一方、今回の学位審査に提出された論文でHa氏は、ヒト血中における特定のタンパク質(Fibrinogen beta鎖に由来するペプチドおよびIgG kappa鎖)においても異性化Aspが存在することを発見し、その存在割合等を非常に丁寧に調べて報告している。提供された血液はいずれも健常者に由来するものであるが、IgG kappa鎖における異性化率は、50代・60代の試料において著しく高かったという。年齢との有意差を得るためには大規模な統計学的調査が必要となるが、一般に血中タンパク質の寿命は長くても1ヶ月程度であることから、これまで考えられてきた異性化機構とは異なる様式でAsp残基が異性化した可能性がある。すなわち、Asp残基の異性化は長期にわたる酸化ストレスに曝露された受動的な結果であるとされていたが、この結果は積極的にAsp残基を異性化する生理的な仕組みの存在を示唆している。哺乳類ではカモノハシを除いてタンパク質中のアミノ酸残基を異性化させる酵素は見つかっていないことも考慮すると、Ha氏の研究成果はヒトにおける異性化Aspの生成機構の理解に一石を投じるものである。

よって、本論文は博士(理学)の学位論文として価値あるものと認める。また、令和2年1月14日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。なお、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

要旨公表可能日： 令和2年 6月 25日以降