

学位論文の要約

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

氏名 Ha Seongmin

序論

通常、蛋白質を構成するアミノ酸は全て L 型であり、微生物の細胞壁に存在する D-アミノ酸を除くと蛋白質の中に D-アミノ酸は存在しないと考えられてきた。しかしながら近年、加齢と共に、D-アスパラギン酸 (Asp) が蛋白質中に増加し、蓄積することが明らかとなった。蛋白質の Asp 残基の異性化は Asp 特有のスクシンイミド中間体の形成により生理条件下で容易に起きる反応であり、結果として L- α -Asp、L- β -Asp、D- α -Asp、D- β -Asp の 4 つの異性体を生成する。これらの異性体の比率を測定することは老化のマーカーとして利用できる。また、Asp 残基の異性体は主鎖の延長 (L- β -Asp)、側鎖の反転 (D- α -Asp)、もしくは両方の変化 (D- β -Asp) を引き起こすため、蛋白質の構造や機能に影響する可能性がある。従って、生体内の蛋白質の Asp 残基異性化を調べることは重要である。

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おり、それらの蛋白質と断片ペプチドの種類や濃度は年齢、性別、疾患などによって変化することが知られている。そのため、血液の中でバイオマーカーを探す研究は活発的に行われており、血清の蛋白質やペプチドが様々な疾患の診断に利用できることが報告されている。しかしながらバイオマーカーのほとんどは疾患による特定蛋白質の濃度変化を利用したものであり、蛋白質の翻訳後修飾 (PTM) を利用した研究は少ない。

蛋白質の Asp 残基の異性化は体内で比較的容易に起きるため、血中の蛋白質でも Asp 異性体が生じている可能性は高いと考えられる。血中蛋白質の Asp 残基の異性化を探し、異性化率を測定することは、バイオマーカーの研究につながると同時に老化過程の研究にも新しい手法を提供すると期待できるので、本研究では血液の中の D-アミノ酸を持ったペプチド及び蛋白質の分析を行った。

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

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 (24、46、63 代) 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。

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 (${}^1\text{QGVNDNEEGFFSAR}^{14}$) とそれ由来のペプチド (${}^1\text{QGVNDNEEGFFSA}^{13}$) であることが確認された。Asp の D/L 比は両方のペプチドともに 0.08 であり、年齢による変化はなかった。Fibrinogen の体内の半減期は約 4 日であるため、fibrinopeptide B の Asp の異性化が蛋白質中で起きたとすればその速度は非常に速い。しかし、異性化がペプチドになってから起こった可能性もあり、D-Asp になったことで、酵素による分解速度の低下を反映しているのかもしれない。本研究により、血清の中でも D-Asp 含有ペプチドが存在し、検出できることが明らかとなった。

実験 2. ヒト IgG kappa 鎖の中の Asp 異性体と年齢の関係

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。その重要性のため、IgG の様々な PTM が研究されてきた。特に、IgG の糖鎖は詳しく研究されており、糖鎖の構成が年齢や疾患によって大きく変化することが報告されている。一方で mAb を用いた *in vitro* での加温実験で Asp の異性化、Asn の脱アミド化、Met の酸化、Cys のラセミ化などが簡単に生じることが報告されている。IgG の寿命は他の血清蛋白質に比べると非常に長く、PTM が年齢や疾患によって変化することからヒト血清中の IgG でも Asp の異性化が生じ、年齢によって異性化率が変わる可能性があると考えられた。本研究では IgG の Asp 残基が異性化しているかどうかを分析し、各年齢 (24、37、41、54、67 歳) の血清での結果を比較することで、年齢に応じた IgG 中の Asp 残基の異性化率の変化が生じるかどうかを調べた。

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。両方の異性化率は 24、37、41 歳に比べて 54、67 歳で著しく増加した。IgG の寿命は他の血清蛋白質よりは長い、B-1 細胞で合成され、リソソームによる分解される過程を経ているので、Asp 異性体が蓄積されることは珍しい現象である。現段階では高齢者試料で D-Asp の量が増えた詳しい理由は不明であるが、加齢による B-1 細胞の劣化、酸化ストレスの増加などの血液内環境の変化、加齢による糖鎖の変化などの PTM に起因する構造の変化などが原因であると推測される。本研究で検出した Asp 151 と 170 の異性化は老化による免疫の低下を反映しているのかもしれない。また、前述したように Asp の異性化は蛋白質の構造や機能に影響するので、Asp 異性体の生成が IgG の活性に影響する可能性もある。従って血清蛋白質の Asp 異性体を検出し、蛋白質の機能との相関関係を調べることは、老化過程の研究において新しい方法として利用できると思われる。