Osaka University Knowledge Archive

Title	Metal Ion Binding to Cu, Zn-Superoxide Dismutase : Investigation by Electrospray Ionization Mass Spectrometry
Author(s)	山崎, 雄三
Citation	大阪大学, 2008, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/48758
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

【42】

氏　　名	山　崎　雄　三（やま ざき ゆう ぞう）
博士の専攻分野の名称	博　士（理　学）
学　位　記　番　号	第　２１７５７　号
学 位 授 与 年 月 日	平成 20 年３月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第４条第１項該当 理学研究科化学専攻
学　位　論　文　名	Metal Ion Binding to Cu, Zn-Superoxide Dismutase : Investigation by Electrospray Ionization Mass Spectrometry （エレクトロスプレーイオン化質量分析法による Cu、Zn スーパーオキシドジスムターゼの金属イオン結合に関する研究）
論 文 審 査 委 員	（主査） 教　授　高尾　敏文 （副査） 教　授　相本　三郎　　教　授　深瀬　浩一　　教　授　村田　道雄

論　文　内　容　の　要　旨

近年、疾患（ALS）との関係性から注目されている Cu、Zn スーパーオキシドジスムターゼ（SOD）をエレクトロスプレー法（ESI）により測定解析し、従来の分析法では解析できない、各種金属イオンとの結合状態やダイマー形成について詳細に調べた。

第一章では疎水的相互作用と水素結合で形成される SOD ダイマーを ESI で検出する条件を見出した。また金属イオンをすべて取り除いたアポ体を調製し、アポ体自身もダイマーとして検出できることがわかった。このアポ・ダイマーに、カドミウムイオン、コバルトイオン、銅イオンを添加し、ESI で蛋白質－金属イオンの結合状態を観測する妥当性を検証した。MS で得られる分子量は 50 ppm 程度の非常に良い精度であり、蛋白質に対する金属イオンの当モル結合量を算出することができた。また、ダイマーの＋11 価シグナルを MS/MS 測定することにより、金属イオンがダイマーを構成する２つのモノマーに均等に結合していることを調べることができた。

第二章では、第一章で確立した ESI 条件を用いて金属イオンのダイマーに対する結合状態と SOD の酵素活性の関係について調べた。アポ・ダイマーに対して銅イオンを添加した場合、添加量を増やすにつれて金属イオンが１、２、３、４当量モル結合した分子種が検出された。また、銅イオンの増加とともに酵素活性は増加した。この結果は、既に知られている銅イオンが活性に必須である事実と矛盾しない。しかし、２当量モル結合した分子種が活性をもつとする既報とは異なり、４当量モル結合した分子種のシグナル強度と酵素活性の間に良い相関が見られた。つまり、銅イオンは最初に亜鉛サイトに結合し、次に銅サイトに結合していると解釈される。これは亜鉛イオンが構造安定化に重要な役割を持つとされていることから考えると、合理的な挙動と言える。一方、亜鉛イオンは高濃度で、アポ・ダイマーに対して４等量結合することが報告されているが、今回実施した生理的な濃度では、ほぼ２当量モル以上結合することはなかった。また、可能な限りの亜鉛イオンを加えても、既報と同じく酵素活性は見られなかった。亜鉛イオンが２当量モル結合した状態のダイマーの MS/MS を行うことにより、構成モノマーに１個ずつの亜鉛イオンが配位していることが明らかになった。これらの亜鉛イオンは本来の亜鉛サイトに結合していると考えられる。次にアポ・ダイマーに対して亜鉛イオン、銅イオンの両方を加えて SOD ダイマーを再構成する実験を行った。両イオンを同時に添加して再構成した SOD ダイマーは天然のそれに比べやや低い活性を示したのに対して、亜鉛イオンを加え

てから銅イオンを加えて再構成したSODダイマーはほぼ天然ものと同様の活性を示した。2つの再構成SODダイマーを比較すると＋11価のシグナルにおいて、質量が僅差ではあるが違いが認められた。しかし、本測定系での測定誤差50 ppmではこの質量差を議論するには不十分であった。そこで、質量が近い金属イオン結合タンパク質を識別する方法として、安定同位体の亜鉛68、銅63イオンをアポ・ダイマーに導入し、互いの質量差を拡大することを考えた。その結果、＋11価の質量が再構成の方法によって明らかに異なり、同時添加では逐次添加よりも低い値を示すことが明確になった。また、＋11価シグナルの線幅も同時添加の方が広くなっていた。波形分離による解析の結果、逐次添加では本来の亜鉛イオンと銅イオンが結合したダイマー（Cu2Zn2体）が主成分であったが、同時添加ではその他に銅イオンが4当量結合したダイマー（Cu4体）がほぼ1：1で存在することが示された、また10%ほどのCu3Zn1体が存在する可能性も示された。金属結合サイトの結合能がすべて等価とすればCu2Zn2 : Cu3Zn1 : Cu4は1：2：1になるはずである。したがって、金属結合サイトはCu、Znそれぞれに対して協同的に働くと考えられる。また、その場合、Cu3Zn1体はCu2Zn2とCu4のモノマー交換で生成した可能性が示唆された。

第三章ではこのモノマー交換の現象についてさらに詳細に調べた。Cu4体とCu2Zn2体（Holo体）を識別するため、安定同位体の導入により ^{63}Cu4体と ^{65}Cu2^{68}Zn2体を調製し、1：1で混合した。混合直後の＋11価シグナルは、^{63}Cu4体と ^{65}Cu2^{68}Zn2体に由来する2つの頂点をもつブロードなものであったが、37℃で2.5時間経過後、その2つの頂点は消失した。この2.5時間後の波形を解析した結果、当初の ^{63}Cu4体と ^{65}Cu2^{68}Zn2体の他に、^{63}Cu2^{65}Cu1^{68}Zn1対が約10%の存在比で生成していることが分かった。従って、二章で検出されたCu3Zn1体は同様のモノマー交換で生じたと考えられる。次にこのような交換は天然のHoloダイマーでも起きている本質的な現象ではないかと考え、“軽い”Holoダイマーと“重い”Holoダイマーである、^{63}Cu2^{64}Zn2体と ^{65}Cu2^{68}Zn2体を調製し、同様の交換実験を実施した。37℃で18時間経過後、この2つの交換の結果生じたダイマー成分（^{63}Cu^{65}Cu^{64}Zn^{68}Zn体）は約10%であり、60℃で3時間、60℃で6時間経過後はそれぞれ、約30%、約45%であった。このように、従来非常に安定とされてきたSODダイマーについて、構成モノマーが動的であることは興味深く、Cu4体でそれが速くなっていることは、遺伝子変異などによる金属イオン結合能が低下した場合のモノマー解離を促す可能性がある。SODは変異により毒性を有し、その引き金はダイマーからモノマーへの解離と言われている。この観点から、ESI-MSと安定同位体の導入により、金属イオンの結合状態やダイマーからモノマーの解離が観測できたことは意義があると考えられる。

論文審査の結果の要旨

蛋白質のフォールディング研究は、蛋白質の機能構造の解明のみならず、疾患との関連性などにより重要性を増している。一方、ナノエレクトロスプレーイオン化質量分析（Nano-ESI/MS）は、微量蛋白質の分子質量の決定のみならず、蛋白質と多様な物質間の相互作用を含めた高次構造の検出にも利用できることが知られている。申請者は、蛋白質中に多く見られ、また機能発現に重要な金属イオンと蛋白質との相互作用をNano-ESI/MSにより直接観測する方法を確立し、Cu、Znスーパーオキシドジスムターゼ（SOD）に結合しうる様々な金属イオンの同定と金属イオンの結合に伴う構造－活性相関について調べた。その結果、ESIで観測される金属イオンと蛋白質の結合状態はSOD酵素活性と良い相関があることを見出した。特に、銅イオンでは4当量モル結合した分子種が容易に生成するがネイティブ体の80%程度の活性しかないこと、銅イオンの濃度依存的な取り込みと活性測定から銅イオンは最初に亜鉛結合サイトに結合すること、亜鉛イオンは生理的な濃度では2当量モル以上の結合がないこと、そして、亜鉛イオン→銅イオンの順で添加、再構成するとネイティブ体を効率よく生成できること等の新知見を得ている。さらに、ESI-MSと安定同位体の導入により、金属イオンの結合状態や安定なホモダイマー構造をもつSOD分子においてダイマーからモノマーへの解離を観測できたことは意義がある。

以上により、本論文は博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。