OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Isolation of free thiol-containing proteins/peptides from a complex biological sample
Author(s)	Donzeli Pereira, Caroline
Citation	大阪大学, 2014, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/50471
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

Form 3

Abstract of Thesis

Name (Caroline Donzeli Pereira)	
Title	Isolation of free thiol-containing proteins/peptides from a complex biological sample (生体試料中のチオール含有蛋白質・ペプチドの特異的単離)

Abstract of Thesis

Cys has a reactive thiol group that can suffer from various modifications such as oxidation to sulfenic (-SOH), sulfinic ($-SO_2H$), sulfonic acid ($-SO_3H$), etc. This amino acid is the second least abundant amino acid, but it is highly conserved in amino acid sequences among species, and plays important roles for protein functions as active sites, regulatory sites, structure-stabilizing disulfides, cofactor bindings, etc. The importance of Cys has also been shown by the fact that its mutation into other amino acids can frequently trigger dysfunctions of proteins or genetic diseases. Since Cys is typically present in all classes of proteins and peptides and has the unique chemical property of containing a thiol group, a number of methods have been developed for isolating cysteine-containing peptides/proteins. However, only a few methods have been reported for the isolation of cysteine-containing proteins in the literature. In this sense, a aminopropyl resin coupled with a hetero-bifunctional cross-linker [*N*-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio) propionate (SPDP) or [succinimidyl 6-[3'-(2-pyridylthio)- propionamido] hexanoate] (LC-SPDP) allows the proteins and peptides containing free thiols to be specifically captured on the resin and to be recovered by elution with a buffer containing a reducing agent. To evaluate the method, a tryptic digest of bovine serum albumin and an extract from *Carica papaya* latex, which contains the cysteine protease papain, were applied to the system. The method could successfully work with small amounts of a sample, down to low picomoles; in the case of the cysteine protease, the method allowed the separation of the active (unmodified) enzyme from the inactive one (modified form). Moreover, the method has been applied to human plasma to see whether or not the plasma contains free-thiol containing proteins. The eluted fraction predominantly contained transthyretin (TTR), which has a single Cys in its sequence. Despite that this free Cys has been known to display little physiological function, it has been reported to be modified with various low-molecular-weight compounds, such as glutathione, Cys, etc., and the products might be involved with the advent of TTR's amyloidogenic property. TTR has been deeply involved with some physical disorders and can be a useful biomarker for diagnosis of cancer and amyloidosis process. As such, data about the ratio of the free Cys form of TTR to the oxidized ones may correlate with one's physiological state, rationalized to show susceptibility to oxidative stress, or one's propensity to develop some diseases as a disease-specific signature.

様式7

論文審査の結果の要旨及び担当者

(Caroline Donzeli Pereira)		
	(職)	氏　　名
論文審査担当者	主 査　教授	高 尾 敏 文
	副 査　教授	深 瀬 浩 一
	副 査　教授	梶 原 康 宏
	副 査　教授	北 條 裕 信

論文審査の結果の要旨

生体蛋白質中に存在する遊離チオール基（Cys残基）は反応性に富み、通常、生体内で起こる様々な生理的イベントに応じて何らかの修飾を受けていることが多く、それらと生理機能との関連についてこれまで様々な研究がなされてきている。本論文では、酸化ストレスによる遊離チオール基の酸化的修飾に着目し、遊離チオール基を有する蛋白質の量が生体内の酸化ストレスの指標として利用できるのではないかという考えのもと、遊離チオール基含有蛋白質の特異的単離・検出法を開発した。それにより、特定の蛋白質の遊離チオール基の量的変動を調べることができ、生体内で起こる様々な酸化ストレスのモニタリング等に利用可能である。最終的に得た方法は極めて特異性が高く、これまでの手法では困難であった複雑な混合物からのチオール蛋白質の単離、検出に成功している。本法の有効性を示すために行った実験の一つにおいては、遊離チオール基を活性中心にもつ酵素として知られているパパインを粗抽出物からワンステップで単離できることを示している。

また、この方法を血液中に存在するチオール蛋白質のモニタリングに応用した結果、主な蛋白質としてトランスサイレチン（ＴＴＲ）を同定することに成功している。ＴＴＲは遊離チオール基を分子内に有し、その酸化的修飾は様々な病態との関連で調べられている。本論文では、ＴＴＲの遊離チオール基の存在度が生体の酸化ストレス状態を反映しているのではないかという作業仮説のもと、生理的濃度の過酸化水素を用いて血漿を処理し、その後、遊離チオール型のＴＴＲの量変動を調べた。その結果、H_2O_2の濃度依存的に遊離チオール型ＴＴＲは減少することを見出した。この結果はＴＴＲが生体内酸化ストレスの有用なバイオマーカー候補になる可能性を示唆しており、意義のある成果といえる。

よって、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。