

Title	Deamidation and Isomerization at Two Asn-Gly Sites in $\beta$ 2-Microglobulin and Its Effect on the Binding of Copper Ions
Author(s)	福田, 正史
Citation	大阪大学, 2012, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/60089">https://hdl.handle.net/11094/60089</a>
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、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

氏名	福 田 正 史
博士の専攻分野の名称	博士 (理学)
学位記番号	第 25694 号
学位授与年月日	平成24年9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	Deamidation and Isomerization at Two Asn-Gly Sites in $\beta$ 2-Microglobulin and Its Effect on the Binding of Copper Ions ( $\beta$ 2- ミクログロブリンの2箇所の Asn-Gly 配列部位における脱アミド化及び異性化とその意義)
論文審査委員	(主査) 教授 高尾 敏文 (副査) 教授 村田 道雄 教授 深瀬 浩一 教授 中谷 和彦

## 論文内容の要旨

蛋白質中のアスパラギン残基はアミノ酸配列や立体構造などの条件により、5員環スクシニミド中間体を經由する脱アミド化を自発的に起こすことが知られている。これは分子本来が持つ化学的性質に基づいた非酵素的分子内反応であり、一般的に Asn-Gly 配列において最も速く反応が進行する。脱アミド化の結果 Asn が Asp へ変換されると、分子全体としての負イオンが増加し、さらに isoAsp への異性化が伴うこともあるため、蛋白質の高次構造が変化して本来有する蛋白質機能に影響が生じる。実際に、この反応による蛋白質機能の低下や消失の例が報告されており、脱アミド化/異性化は蛋白質の劣化や老化の要因の一つであると考えられている。またその一方で、新しい機能の発現例もあるため、蛋白質の分子時計”Molecular Clock”としての役割を担っている可能性も提唱されている。従って、蛋白質の脱アミド化/異性化に対する反応のし易さを検証することは、その蛋白質の機能を理解する上で重要であり、特に Asn-Gly 配列を有する蛋白質においてはその重要性が高いと考えられる。しかしながら、解析の際には、反応性の高さからサンプル調整中や、部位特異的解析に必要な酵素消化中に自発的に同反応が進行するため、正確な解析が困難となる。本論文では、この問題を解消するため、安定同位体である  $^{18}\text{O}$  原子で標識する方法を適用して nanoLC-MS/MS を組み合わせることで、蛋白質の脱アミド化及び異性化し易い部位を特定して定量的に解析する検証法を検討し、確立した。

この方法を用いて、Asn-Gly 配列を有する蛋白質である $\beta$ 2-ミクログロブリン ( $\beta$ 2m) の脱アミド化/異性化のし易さを生理的条件下において検証した結果、Asn-Gly 配列を有する Asn17 と Asn42 の2箇所において脱アミド化が進行し、それらの半減期はそれぞれ 33、347 日であることが明らかとなった。さらに、新たに生じた Asp17 の 45%、Asp42 の 97%が isoAsp に異性化していたことが判明した。

$\beta$ 2m は長期透析患者の合併症である透析アミロイドーシスの原因蛋白質であり、手関節部位に凝集沈着する。その凝集機構の詳細は未だ不明であるが、凝集の初期段階のオリゴマー形成時に開始因子として  $\text{Cu}^{2+}$ イオンが介在している可能性が報告されている。そこで、本研究で明らかとなった Asn17 と Asn42 の2箇所において脱アミド/異性化した $\beta$ 2m と  $\text{Cu}^{2+}$ イオンとの相互作用を nanoESI-MS により検証した結果、 $\text{Cu}^{2+}$ イオンとの結合

能が未変化の $\beta$ 2m よりも増加することが明らかとなった。また、その程度は、 $100^\circ\text{C}$ 5分間で熱変性させた $\beta$ 2m と  $\text{Cu}^{2+}$ イオンとの相互作用に類似していることが判明した。これらのことから、脱アミド化/異性化により $\beta$ 2m の高次構造が変化し、その結果  $\text{Cu}^{2+}$ イオンとの相互作用が増大したと考えられる。透析アミロイドーシスの発症には数年、最短でも18ヶ月を要することが知られており、その理由は明らかとされていないが、本論文の結果は、凝集機構解明のための新たな知見として、脱アミド化/異性化のような半減期の長い反応などにより生じる $\beta$ 2m の構造変化が、アミロイドーシス発症の時間軸に関与しているのではないかと一つの可能性を示した。

## 論文審査の結果の要旨

蛋白質中のアスパラギン残基は、アミノ酸配列や立体構造などにより、5員環スクシニミド中間体を經由する脱アミド化を自発的に起こすことが知られている。脱アミド化の結果AsnがAspへ変換されるが、分子全体としては負イオンが増加するのみならず、isoAspへの異性化を伴うため、蛋白質の高次構造に少なからず影響を与える。実際に、この反応による機能低下や消失の例も報告されており、脱アミド化/異性化は蛋白質の劣化や老化の要因の一つであると考えられている。しかし、反応性の高さからサンプル調製中に自発的に反応が進行するため、これまでその解析は困難であった。本論文では、この問題を解決するため、安定同位体である $^{18}\text{O}$ 原子で脱アミド化部位を特異的に標識する方法を用いて、脱アミド化及び異性化部位を定量的に解析する方法の確立に成功している。

この方法を用いて、 $\beta$ 2-ミクログロブリン ( $\beta$ 2m) の脱アミド化/異性化を生理的条件下 (温度、pH、濃度) において調べ、その結果、Asn17-GlyとAsn42-Glyの2箇所において脱アミド化が特異的に進行し、それらの半減期がそれぞれ33、347日と大きく異なることが初めて明らかとなった。さらに、脱アミド化により生じたAsp17の45%、Asp42の97%がisoAspに異性化することを発見している。

$\beta$ 2mは長期透析患者の合併症である透析アミロイドーシスの原因蛋白質である。その凝集機構の詳細は未だ不明であるが、凝集の初期段階のオリゴマー形成時に開始因子として $\text{Cu}^{2+}$ イオンが介在している可能性が報告されている。本研究では、Asn17とAsn42の2箇所において脱アミド/異性化した $\beta$ 2m と $\text{Cu}^{2+}$ イオンとの相互作用をnanoESI-MSにより検証した結果、 $\text{Cu}^{2+}$ イオンとの結合能が未変化の $\beta$ 2mよりも増加するという重要な知見を得ている。このことから、脱アミド化/異性化により $\beta$ 2mの高次構造が変化し、その結果 $\text{Cu}^{2+}$ イオンとの相互作用が増大したものと考えられる。透析アミロイドーシスの発症には数年、最短でも18ヶ月を要することが知られており、その理由は明らかとなっていないが、本論文の結果は、凝集機構解明のための新たな知見として、脱アミド化/異性化のような半減期の長い反応などにより生じる $\beta$ 2mの構造変化が、アミロイドーシス発症の時間軸に関与しているのではないかとこの可能性を示しており、大変意義のある成果といえる。

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。