

氏名・本籍	岩岡 裕二 (広島県)
学位の種類	博士 (生命システム科学)
学位記番号	博甲 第40号
学位授与の日付	平成30年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 (課程博士)
学位論文題目	アスコルビン酸標的タンパク質の探索を目指した 新規アフィニティーゲルの創製に関する研究
学位論文審査委員	主査 教授 田井 章博 副査 教授 野下 俊朗 教授 齋藤 靖和 准教授 青柳 充

学位論文の要旨

ビタミンCとして知られるアスコルビン酸(AA)は抗壞血病作用、抗酸化作用など多様な生理作用を有する。また、AAを合成できないヒトを含む一部の霊長類は生存する上でAAの日常的な摂取が必要不可欠とされている。一方で、多くのAAの生理作用は実験動物を用いた*in vivo*評価系で明らかになっているにも関わらず、分子レベルでの生理作用メカニズムに関する知見はこれまでにあまりない。これはAAが化学的に非常に不安定であることから、メカニズム解明に有用とされる細胞などの*in vitro*評価系において既知のAAの生理作用を再現することが困難であるためと考えられる。また、AAは生体内において強力な還元剤であるため、AAの生理作用メカニズムにはその還元作用が大きく寄与しているとされてきた。しかし、還元作用が関与すると考えられるAAの生理作用の中にはAAと同等の還元力を有し、AAの立体異性体であるエリスルビン酸や化学構造がAAと異なる還元剤ではAAより低作用もしくはほとんど作用を示さないものもある。更に生体内においてAAによって特異的に還元される酵素やAA特異的な輸送体などのタンパク質の存在が報告されており、AAの生理作用メカニズムは単純な還元作用のみでは説明が困難である。従って、AAを安定化した上で*in vitro*系において生体内でAAを標的とするタンパク質の探索を行うことは分子レベルでのAAの生理作用の解明の一助となりうる事が期待される。

本論文はAAの生理作用メカニズムの解明の手がかりを得るため、化学的に不安定なAAをリガンドとして安定的に支持担体に固定化したアフィニティーゲルを新たに創製し、このゲルを用いて動物組織中よりAAを標的とするタンパク質の探索を行った研究結果をまとめたものである。

第1章の緒言ではAAの有する生理作用とその生理作用メカニズムに関する現状及び本研究の目的を述べた。第2章ではアフィニティーゲルの作製に際して不安定なAAをその化学構造の特徴を残し、かつ安定化して支持担体に固定化するためのAA誘導体の合成、またそれら誘導体を用いたアフィニティーゲルの作製に関して述べた。本研究で作製するアフィニティーゲルにはAAを安定化しつつ支持担体へ固定化し、更にAAの生体内における特徴的な化学構造である解離した3位水酸基、5位水酸基の立体及びエンジオールラクトン構造をタンパク質に認識させるような設計が求められる。そこで、まずタンパク質側からAAの解離した3位水酸基及び5位水酸基の立体を認識させるべく2位水酸基からの固定化を考えた。本研究で使用する支持担体はリガンドの1級アミンに対して選択的に反応し、リガンドを固定化する特徴を有する。そこで、AAの2位を選択的にアミノ化し、支持担体に固定化した(2-AAゲル)。次に、タンパク質側からAAの解離した3位水酸基及びエンジオールラクトン構造を認識させるため、AAの6位水酸基からの固定化を考え、AAの6位を選択的にアミノ化した。2位からの固定化の際、固定化によりリガンドは安定化するが、6位からの固定化の際はAAの安定性に関わる2位水酸基がフリーとなってしまう。そこで、2位水酸基をより立体障害性の低い官能基であるメチル基で修飾し、安定化した上で6位から支持担体へ固定化した(6-AAゲル)。また、作製した2-AAゲル及び6-AAゲルのリガンドの固定化及び固定化リガンドの安定性の確認も行った。第3章では作製した2種のAAゲルを用いて、生体内においてAAが高濃度存在する組織として知られる脳のタンパク質抽出液からAAゲルに特異的に吸着するタンパク質を同定した。雄のICRマウスの脳由来タンパク質抽出液を2種のAAゲルに供し、各ゲルへの吸着タンパク質をnanoLC-MS/MSにより分析した。その結果、2種のAAゲルへ特異的に吸着するタンパク質としてcytochrome c (cyt c)を同定した。第4章ではcyt cに対するAAの特異性を検討した。cyt cは活性中心の鉄イオンの還元状態により、酸化型cyt c (oxd-cyt c)と還元型cyt c (red-cyt c)の2種が存在する。AAゲルに対するこれら2種のcyt cの親和性を検討したところ、oxd-cyt cがより高い親和性を示した。そこでAAと他の還元剤を用いてoxd-cyt cに対する還元速度及び遊離の鉄イオンに対する還元力をそれぞれ比較した。その結果、oxd-cyt cに対する還元速度はAAが最も大きかったが、一方で遊離の鉄イオンに対する還元力はある還元剤を除いて、AAと他の還元剤の間で差はほとんど見られなかった。これらの結果はAAが他の還元剤よりも特異的にoxd-cyt cの構造を認識し、活性中心の鉄イオンを速やかに還元していることを示している。第5章では本研究の総括を行い、今後の展望を述べた。

以上から本研究において作製した2種のAAゲルを用いることで、AAに親和性を示すタンパク質としてcyt cを同定し、特にoxd-cyt cがAAに対して特異的な親和性を示すことを見出した。cyt cはミトコンドリアの電子伝達系においてエネルギー産生に関与するタンパク質である。また最近、ミトコンドリア膜の表面上にAA特異的な輸送体の存在が報告されていることから、本研究の結果はミトコンドリア内に輸送されたAAが電子伝達系においてcyt cの還元に関与している可能性を示す。将来、作製した2種のAAゲルは更なるAAの生理作用メカニズムの解明のための強力なツールになることが期待される。