

論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

氏 名 中島史恵

論文題目

疾患に関連したタンパク質翻訳後修飾

に関する研究

論文審査担当者

主査	名古屋大学准教授	柴田貴広
委員	名古屋大学教授	小鹿一
委員	名古屋大学教授	松田幹
委員	東京大学教授	内田浩二

はじめに

2003年に完了したヒトゲノム計画によって、タンパク質をコードしている遺伝子の数はヒトの持つタンパク質の数と比べて遥かに少ないことが明らかとなった。実際に、過去数十年間の研究によって、ヒトのプロテオームはヒトゲノムよりもはるかに複雑であることが判明しており、これは単一遺伝子が複数のタンパク質をコードすることに加えて、生合成されたタンパク質が翻訳後修飾を受けることによってその複雑性が高められるためであると考えられている。翻訳後修飾は、タンパク質の活性、コンフォメーション、局在性や安定性を変化させるだけでなく、他のタンパク質や核酸、脂質、補因子などの生体分子との相互作用を調節し、多彩な生命機能を制御する上で非常に重要な役割を果たす化学修飾である。一般的にタンパク質翻訳後修飾は、特定の酵素によって触媒されるが、反応性の高い代謝物とタンパク質中のシステイン残基のような求核的なアミノ酸残基との非酵素的な反応によっても生じる。また、タンパク質中のシステイン残基は、タンパク質の構造や機能の維持を担う重要なアミノ酸残基であることから、システイン残基の翻訳後修飾はタンパク質の活性を維持する上で重要な役割を担っていると考えられる。このように、翻訳後修飾は生体の恒常性を維持する上で非常に重要な役割を果たしている一方で、近年、ある種の翻訳後修飾は生体の状態を反映していることが明らかとなってきた。

そこで、本研究では生体成分の中でも特に血清タンパク質に注目し、血清中に含まれる疾病特異的な修飾タンパク質の探索とその機能性解析を行った。生体内で形成される非酵素的な翻訳後修飾タンパク質として、特に脂質異常症患者血清中で有意に増加するS-ホモシステイン化修飾血清アルブミンによる炎症誘導とプロスタグランジンD₂代謝物修飾血清アルブミンによる炎症誘導に関して以下に概説する。

1. S-ホモシステイン化修飾血清アルブミンによる炎症誘導

1-1 脂質異常症患者特異的な修飾タンパク質の探索

本研究では、様々な疾病に関与すると考えられている脂質異常症患者に着目した。陰イオン交換カラムクロマトグラフィーを用いて修飾タンパク質の探索を行った結果、健常者血清と比較して脂質異常症患者血清中において酸化型血清アルブミン(oxHSA)が有意に増加することが明らかとなった。詳細な解析の結果、oxHSAはタンパク質のチオール基が低分子化合物によって可逆的な修飾を受けていたことから、oxHSAはタンパク質中のシステイン残基のチオール基と低分子チオール化合物がジスルフィド結合を形成したS-チオール化HSAであると同定された。S-チオール化修飾を形成している低分子チオール化合物を同定するため、チオール基特異的に反応する誘導体化試薬を用いてoxHSA由来の低分子チオール化合物を誘導体化し、LC-MS/MSによって低分子チオール化合物の網羅的な解析を行った結果、システインとホモシス

テインが検出された。さらに、脂質異常症患者血清由来の oxHSA を用いて S-チオール化修飾部位を解析した結果、これまで酸化修飾の唯一のターゲットと考えられていた遊離の Cys34 のみならず、分子内ジスルフィド結合を形成しているシステイン残基も S-チオール化修飾を受けていることが確認された。以上の結果から、oxHSA は遊離のシステイン残基だけでなく、分子内ジスルフィド結合を形成しているシステイン残基においても S-システイン化修飾や S-ホモシステイン化修飾を受けていることが明らかとなり、これらの修飾が HSA の機能や活性を変化させ、病気の発症や進展に関与することが予想された。

1-2 S-チオール化血清アルブミンによる炎症誘導

タンパク質のシステイン残基は、分子内ジスルフィド結合を形成することによってタンパク質のコンフォメーションを維持し、その機能や活性の調節に関与することから、S-チオール化修飾は HSA の機能性に影響を与えていると予想された。HSA の 2 つの結合サイト I および II の低分子化合物結合能を評価した結果、S-ホモシステイン化修飾によって HSA のどちらの結合サイトにおいてもその結合能が増加することが明らかとなった。さらに、S-ホモシステイン化修飾は、HSA のタンパク質表面の疎水性領域も増加させることが確認された。

脂質異常症はそれ自体に自覚症状はないが、動脈硬化を促進させ、血管内で炎症が起りやすくなることが知られている。このような背景から、S-ホモシステイン化修飾に伴う HSA の機能性変化が、生体内における炎症応答に関与しているのではないかと予想された。炎症関連分子であるシクロオキシゲナーゼ-2 (COX-2) の発現を指標としてマクロファージ様細胞における修飾タンパク質の炎症誘導活性を評価した結果、HSA は S-ホモシステイン化修飾を受けることによって炎症誘導活性を獲得することが明らかとなった。S-ホモシステイン化修飾 HSA 誘導性の COX-2 発現誘導の詳細なメカニズム解析の結果、S-ホモシステイン化修飾 HSA は上皮成長因子受容体のリン酸化を亢進することにより、その下流シグナルを活性化し、炎症関連分子の発現を誘導していた。

2. プロスタグランジン D₂ 代謝物修飾血清アルブミンによる炎症誘導

脂質は生体において細胞膜の主要な構成成分やエネルギー源として重要な役割を担うだけでなく、脂質メディエーターとして細胞内の情報伝達や生体防御に関与する。脂質メディエーターとはプロスタグランジンやロイコトリエンなどのアラキドン酸代謝物、血小板活性化因子やリン脂質性分子など、生理活性を有する脂質の総称である。プロスタグランジンの一種である 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ₂ (15d-PGJ₂) はアラキドン酸代謝の過程において PGD₂ が非酵素的に変換され生成される。15d-PGJ₂ は核内受容体

PPAR γ の内因性アゴニストであり、そのほかにも抗炎症作用等のユニークな生理活性を有することが知られている。本研究では、これまで抗炎症活性を有すると考えられてきた 15d-PGJ₂ が、細胞培養時に用いる牛血清 (FBS) 存在下においては炎症誘導活性を発揮することを明らかにした。FBS に依存した 15d-PGJ₂ の炎症応答反応を明らかにするため、詳細なメカニズム解析を行った結果、15d-PGJ₂ は FBS 中に含まれる血清アルブミンに対して特異的に結合することによって炎症誘導活性を示すことが判明した。さらに、MALDI-TOF/TOF MS による 15d-PGJ₂ の血清アルブミンへの結合部位の解析の結果、15d-PGJ₂ は 18、67、146 番目に位置するヒスチジン残基において共有結合を形成していることが確認された。

各種阻害剤を用いた 15d-PGJ₂ 修飾血清アルブミン誘導性の COX-2 発現への影響を評価した結果、G タンパク質共役型受容体 (GPCR) の関与が明らかとなった。詳細な検討の結果、15d-PGJ₂ 修飾血清アルブミン誘導性の COX-2 発現には GPCR の下流に存在する cAMP-PKA-CREB 経路が関与していることが示唆された。

以上、本研究は疾病に依存したタンパク質翻訳後修飾として、特に血清アルブミンに対する S-ホモシステイン化修飾および 15d-PGJ₂ 修飾を見出し、その修飾体の機能性を明らかにした。これらの結果は、タンパク質翻訳後修飾の生理的および病理的意義を明らかにする上で重要な知見を提示し、大きな寄与になるものと考えられる。よって、本審査会は、本論文の内容が博士 (農学) の学位論文として十分に価値のあるものと認め、論文審査に合格と判定した。

試験の結果の要旨および担当者

報告番号	※ 第	号	氏名	中島 史恵
試験担当者	主査 柴田貴広、小鹿 一、松田 幹、内田浩二			
<p>(試験の結果の要旨)</p> <p>平成30年2月13日学位審査委員会において、主論文の内容を中心として</p> <p>これに関連する科目の学識および研究能力について試問し審査した結果、</p> <p>合格と判定した。</p>				