

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

県立広島大学大学院
総合学術研究科
生命システム科学専攻

博士論文

平成30年3月

(2018年)

岩岡 裕二

目次

第1章 序論.....	1
第2章 AA類似体を固定化したアフィニティーゲルの作製と評価.....	9
第1節 緒言.....	9
第2節 実験方法.....	10
2-1.試薬、使用機器及び一般測定法など.....	10
2-2.アフィニティーゲルへ固定化するAA誘導体の合成.....	11
2-3.AA誘導体を用いたAA-ゲルの作製.....	15
2-4.モデル化合物を用いたAA-ゲルのリガンドの固定化及び安定性の確認.....	15
2-5.アスコルビン酸オキシダーゼを用いたAA-ゲルの親和性の評価.....	16
2-6.アスコルビン酸オキシダーゼを用いたAA-ゲルの再利用性の評価.....	17
第3節 結果及び考察.....	18
3-1.AA-ゲルの設計.....	18
3-2.アフィニティーゲルへ固定化するAA誘導体の合成.....	19
3-3.AA誘導体を用いたAA-ゲルの作製.....	23
3-4.AA-ゲルのモデル化合物の合成.....	24
3-5.AA-ゲルのリガンドの固定化及び安定性の確認.....	26
3-6.アスコルビン酸オキシダーゼを用いたAA-ゲルの親和性の評価.....	29
3-7.アスコルビン酸オキシダーゼを用いたAA-ゲルの再利用性の評価.....	31
第4節 本章の結論.....	32
第3章 AA-ゲルを用いたマウス組織中のAA標的タンパク質の探索と同定.....	33
第1節 緒言.....	33
第2節 実験方法.....	34
2-1.試薬、使用機器及び一般測定法など.....	34
2-2.マウス組織のホモジネート及び血清サンプルの調製.....	35
2-3.AA-ゲルを用いたマウス組織ホモジネートのアフィニティー精製と SDS-PAGE分析.....	35
2-4.NanoLC-MS/MS分析用のサンプル調製.....	36
2-5.マウス脳のアフィニティー精製サンプルのnanoLC-MS/MS分析.....	37

第3節 結果及び考察.....	39
3-1. AA-ゲルを用いたマウス組織ホモジネート及び血清のアフィニティー精製と SDS-PAGE分析.....	39
3-2.マウス脳のアフィニティー精製サンプルのnanoLC-MS/MS分析.....	39
第4節 本章の結論.....	41
第4章 シトクロムcとAAの関連性.....	42
第1節 緒言.....	42
第2節 実験方法.....	43
2-1.試薬、使用機器及び一般測定法など.....	43
2-2.還元型シトクロムc (red-cyt c)の調製.....	44
2-3.Oxd-cyt c及びred-cyt cのアフィニティークロマトグラフィー.....	44
2-4.AA及びAA誘導体添加によるoxd-cyt cのAA-ゲルに対する親和性の影響.....	45
2-5.ヒト由来oxd-cyt cとAAのドッキングシミュレーション.....	45
2-6.Oxd-cyt cに対するAAと他の還元剤の還元速度の比較.....	46
2-7.Ferric reducing antioxidant power (FRAP) assayによるAAとその他還元剤の 還元力の比較.....	46
第3節 結果及び考察.....	47
3-1.Oxd-cyt c及びred-cyt cのアフィニティークロマトグラフィー.....	47
3-2.AA及びAA誘導体添加によるoxd-cyt cのAA-ゲルに対する親和性の影響.....	50
3-3.ヒト由来oxd-cyt cとAAのドッキングシミュレーション.....	52
3-4. AAと他の還元剤を用いたoxd-cyt c及びFRAP assayに対する還元性の比較.....	53
第4節 本章の結論.....	56
第5章 結論.....	59
参考文献.....	63
論文目録.....	71
謝辞.....	72

第1章 序論

第1節 アスコルビン酸とその歴史

水溶性ビタミンの一種、ビタミンCとして知られるL-ascorbic acid (AA, 1)は生合成が不可能なヒトを含む一部の生物にとって日々の摂取が必要不可欠な物質である(Fig. 1-1)。AAの生理作用は抗壊血病作用(Hirst and Zilva, 1933)、抗酸化作用(Carr and Frei, 1999)、免疫賦活作用(Carr and Maggini, 2017)など多種多様である。また、厚生労働省の定めた日本人のビタミン類の1日の摂取推奨量において16~48歳の男女のAA摂取量は1日あたり100 mgであり、他のビタミン類と比較しても多量の摂取が推奨されている(Table 1-1, 2015年版日本人の食事摂取基準)。AAの欠乏症である壊血病は皮下出血、歯茎の炎症、関節痛などの症状が発症して最終的に死に至る病である。一説によると、壊血病は紀元前1500年以上前から存在する人類最古の病とも言われている(村田, 1999)。また、AAが特に歴史上で大きく影響を与えた時期は、Vasco da Gamaらが活躍した15世紀末からの大航海時代であった。当時、壊血病はその治療法が不明瞭であり、多くの船員がこの病によって命を落としたことから、海賊以上に恐れられていた。1753年にスコットランドの海軍軍医であるJ. Lindは船員を対象とした疫学的な調査から、壊血病に対する治療にはオレンジなどの新鮮な果物や野菜の摂

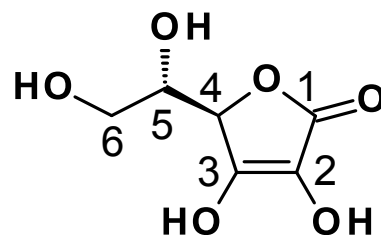


Figure 1-1. Chemical structure of L-ascorbic acid (1).

Table 1-1. 16~48歳の日本人の1日のビタミン摂取の推奨量

	男性	女性
ビタミンA	850~ 900 µg RAE	650~ 700 µg RAE
ビタミンB ₁	1.4 mg	1.1 mg
ビタミンB ₂	1.6 mg	1.2 mg
ビタミンC	100 mg	100 mg
ビタミンD	5.5 µg	5.5 µg
ビタミンE	6.5 mg	6.0 mg
ビタミンK	150 µg	150 µg

取が有効的であることを提唱した(Bartholomew, 2002)。しかし、この時点では壊血病に明確に効果のある因子は特定されず、その後、20世紀までAAに関する研究はほとんど進展しなかった。停滞したAAの研究に転機をもたらしたのはA. Holstによる発見である。HolstはモルモットがAAを体内で合成できないため、壊血病モデルとして利用可能である事を見出した。この発見により、動物を用いてAAの作用を調べることが可能となった。その後、1920年にJ. Drummondがオレンジの果汁において還元性のある抗壊血病因子を発見し(Willimott, 1928)、ビタミンCと命名した。1927年にA. Szent-Györgyiはウシの副腎からヘキサースに類似した強力な還元性物質を結晶状で単離し、ヘキサロン酸と命名した (Svirbely and Szent-Györgyi, 1932)。1932年にC. G. Kingがレモン果汁から単離した結晶はSzent-Györgyiが単離したものと同一であり、同時期にSzent-Györgyiはヘキサロン酸がモルモットに対して抗壊血病作用を示すことを報告した。これらの研究により、ヘキサロン酸はビタミンCである事が明らかになり、抗壊血病(anti-scurvy)の酸(acid)より ascorbic acid と命名された。その後、AAの化学構造の決定は1933年にW. H. Haworthにより、また全合成は同年にT. Reichsteinにより行われた。AAの研究に関わった研究者のうち、Szent-Györgyiはノーベル医学生理学賞、Haworthはノーベル化学賞をそれぞれ1973年に受賞している。

第2節 アスコルビン酸と生理作用メカニズム

1節で述べたように、AAは歴史的に著名な低分子化合物であるが、その作用点や生理作用メカニズムは想像以上に未解明な点が多い。AAの作用点や生理作用メカニズムが未解明な原因の一つとしてAAの不安定性が挙げられる。AAは熱や光などに対して非常に不安定な性質を有し、*in vitro*系において速やかに酸化されて活性を失う。しかし、生体内において酸化されたAAは還元酵素により再生され、血中や組織中においてAA濃度は維持されているため、*in vitro*系における速やかなAAの酸化は生体内におけるAAの状態を反映しているとは言い難い。このようなAAの不安定さから、ヒトやマウスの*in vivo*

系で明らかとなっているAAの生理作用をメカニズム解明に有効な*in vitro*系で再現することが困難である。また、これまでにAAの不安定な性質を改善すべく、AAの不安定さの原因となる2位もしくは3位水酸基に着目して誘導体化することで、安定化した種々の安定型AA誘導体が報告されている(Yamamoto *et al.*, 1990; Nomura *et al.*, 1979; Kato *et al.*, 1988)。安定型AA誘導体の一種である2-O- α -D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid (AA-2G, Fig. 1-2a)はAAの2位水酸基に α -グルコースが結合した誘導体である。AA-2Gの安定性はAAよりも遥かに向上しており、かつ生体内で酵素的代謝を受け、AAを遊離する性質を有する(Yamamoto *et al.*, 1990)。このような性質から、AA-2Gを*in vitro*の評価系に応用することがAA自身の生理活性評価に有効な場合がある。Mitsuzumiらはマウス脾細胞培養系に対してAA-2Gを使用し、AAのIgM抗体産生の増強作用を明らかにしている(Mitsuzumi *et al.*, 1998)。マウス脾細胞を用いた抗体産生の評価系は5日間の細胞培養が必要であるため、培養期間中、一定レベルでAA濃度を維持する必要がある。そのため、AAの培地中への単回添加では速やかに酸化され、増強作用を示さず、12時間おき計10回の添加が必要とする(Fig.1-2b)。一方で、代謝によりAAを持続的に培地中へ遊離可能なAA-2Gは単回添加のみで抗体産生を増強する。また、IchiyamaらはAA-2Gを使用して、マウス

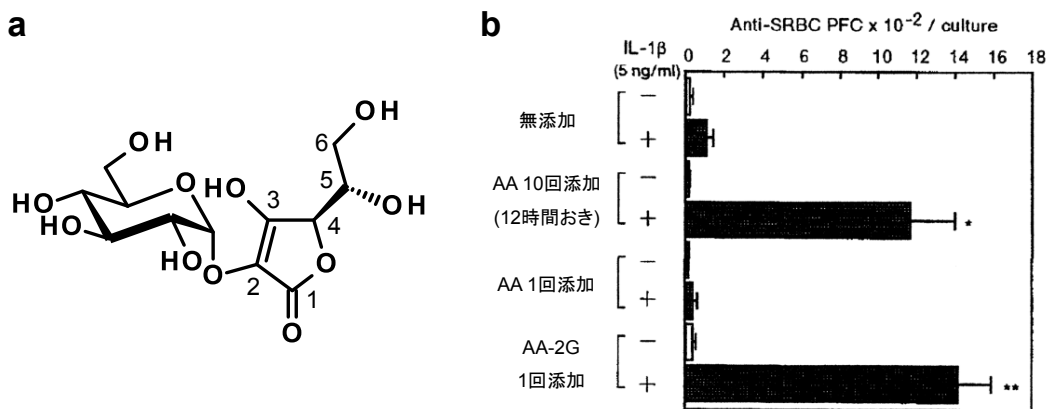


Figure 1-2. (a) Chemical structure of 2-O- α -D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid (AA-2G) and (b) effect of AA and AA-2G on antibody production in the presence of IL-1 β (modification of a part of figure by Mitsuzumi *et al.*, 1998).

由来のB細胞培養系でAAがIL-4及びIL-5を介したIgM抗体産生を増強することを明らかにしている(Ichihama *et al.*, 2009)。以上の報告はAA-2Gを*in vitro*系におけるAAの有用な供給源として使用することがAA自身の生理作用メカニズムの解明に繋がることを示唆している。このように、AAの作用メカニズムを明らかにするためには、AAの代わりに安定化なAA誘導体を*in vitro*の評価系に使用することが必要な有効な場合もある。

また、AAは高い還元性を有することから、抗酸化作用を示す分子として知られている。抗酸化作用は紫外線、喫煙、ストレスなどの外的要因により過剰に誘発され、疾病や老化に関与するとされる活性酸素種(reactive oxygen species, ROS)やフリーラジカルを消去する作用であり、AA以外の抗酸化作用を示す物質としてはquercetinなどのポリフェノール類(Pulido *et al.*, 2000)や還元型グルタチオン (Mar'i *et al.*, 2009)などが著名である。水溶性分子であるAAは細胞質に存在するため、生体膜の脂質過酸化反応をビタミンEが抑制した際に、酸化されたビタミンEを再生すると言われている(Niki *et al.*, 1984; Scarpa *et al.*, 1984)。また、AAはヒト血清中において酸化ストレス誘導剤である2,2'-Azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride (AAPH)により生じる脂質ヒドロペルオキシドをビタミンEなどの他の血中の抗酸化物質よりも速やかに消去する(Frei *et al.*, 1988) (Fig. 1-3)。このように、AAは生体内において高効率的に作用する有用な抗酸化物質であることが知られており、これまでに明らかとなっているAAの生理作用メカニズムの大部分に抗酸化作用が寄与していると考えられている。しかしながら、AAの生理作用の中には抗酸化作用では説明が困難なAAの特徴的な化学構造に特異的な生理作用も存在する。

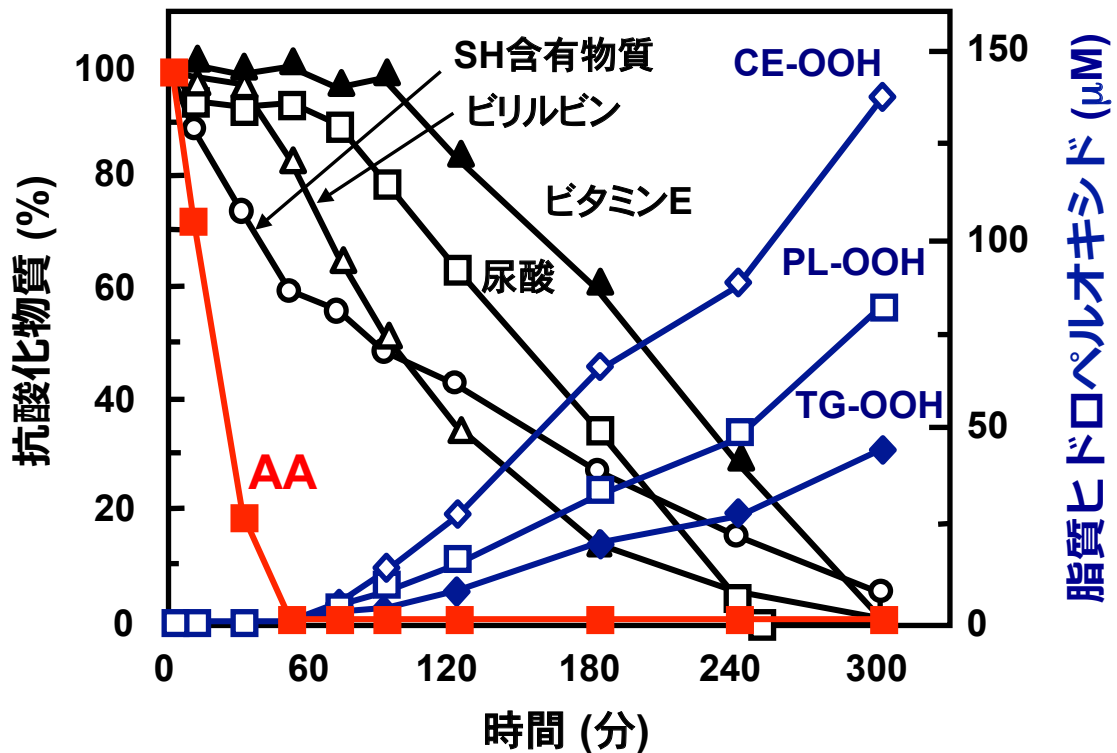


Figure 1-3. Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human plasma exposed to the water-soluble radical initiator AAPH. (modification of a part of figure by Frei *et al.*, 1988)

AAの特徴的な化学構造に特異的な生理作用の一つに抗壊血病作用がある。AAの欠乏症である壊血病は結合組織におけるコラーゲン形成の不全により発症する。AAはコラーゲンの形成に必須なプロリンの水酸化を触媒する酵素である prolyl hydroxylase (PHase)の補因子として働くことが知られている。この際、AAはプロリンの水酸化を行うことで、酸化されたPHaseの活性中心の Fe^{3+} を Fe^{2+} に還元し、コラーゲンの合成を促進する(Tschank *et al.*, 1994)。PHaseにより水酸化されたプロリンはコラーゲンの三重らせん構造の安定化に寄与する。また、AAの特徴的な化学構造の一つであるエンジオールラクトン構造を持たない還元剤ではPHaseの反応を促進しないが、AAと同様にエンジオールラクトン構造を有する、AAの5位立体異性体であるD-erythorbic acid (EA, Fig. 1-5)

はAAと同等にPHaseの反応を促進する(Kurata *et al.*, 1973)。AAやEAが有するエンジオールラクトン構造は炭素-炭素二重結合を介して隣接した2位及び3位水酸基からなるエンジオール基を含む五員環ラクトン構造であり、この構造の平面性によりAAやEAはPHaseの活性中心のFeイオンへ近接しやすいとされる。このことはPHaseの活性化において、AAのエンジオールラクトン構造が重要であることを示す。

一方で、PHaseに対する反応においてEAのコラーゲン合成促進作用はAAと同等であるにも関わらず、モルモットを用いた*in vivo*系でのEAの抗壊血病作用はAAの約1/20である(Goldman *et al.*, 1981)。また、トリ臍細胞を用いた*in vitro*系でのEAのコラーゲン合成促進作用はAAの約1/4である(Kipp *et al.*, 1990)。このようなEAの低活性はいずれもPHaseが存在する細胞内へのEAの輸送量がAAよりも低いことが原因される。細胞内へのAAの特異的輸送体として、Naイオンに依存して能動輸送を行う、ナトリウム依存性ビタミンC輸送体(SVCT)が報告されている(Tsukaguchi *et al.*, 1999; Savini *et al.*, 2008)。SVCTは体内での分布やAAに対する親和性の異なる2つのアイソフォーム(SVCT1及びSVCT2)が存在し、小腸、腎臓、肝臓に主に分布するSVCT1へのEAの親和性はAAの約25%程度であることが明らかとなっている。これらの報告から、コラーゲン合成の場である細胞内へのAAの輸送にはAAの5位の水酸基の立体配置が重要であることが示唆される。すなわち、AAが生体内で抗壊血病作用を示すためには細胞内への輸送においてAAのS配置の5位水酸基(Fig. 1-5a)、細胞内へ輸送された後のPHaseの活性中心の鉄イオンの還元においてAAのエンジオールラクトン構造が重要であることを示唆している(Fig. 1-5b)。また、多種多様なAAの生理作用を考慮すれば、SVCT、PHaseのようなAAの特徴的な化学構造を特異的に認識し、生理作用に関与するAA標的タンパク質は他にも存在する可能性が高い。従って、*in vitro*系でAAの標的タンパク質を探索、同定することは未知なるAAの作用点や作用メカニズム解明に繋がるものと考えられる。

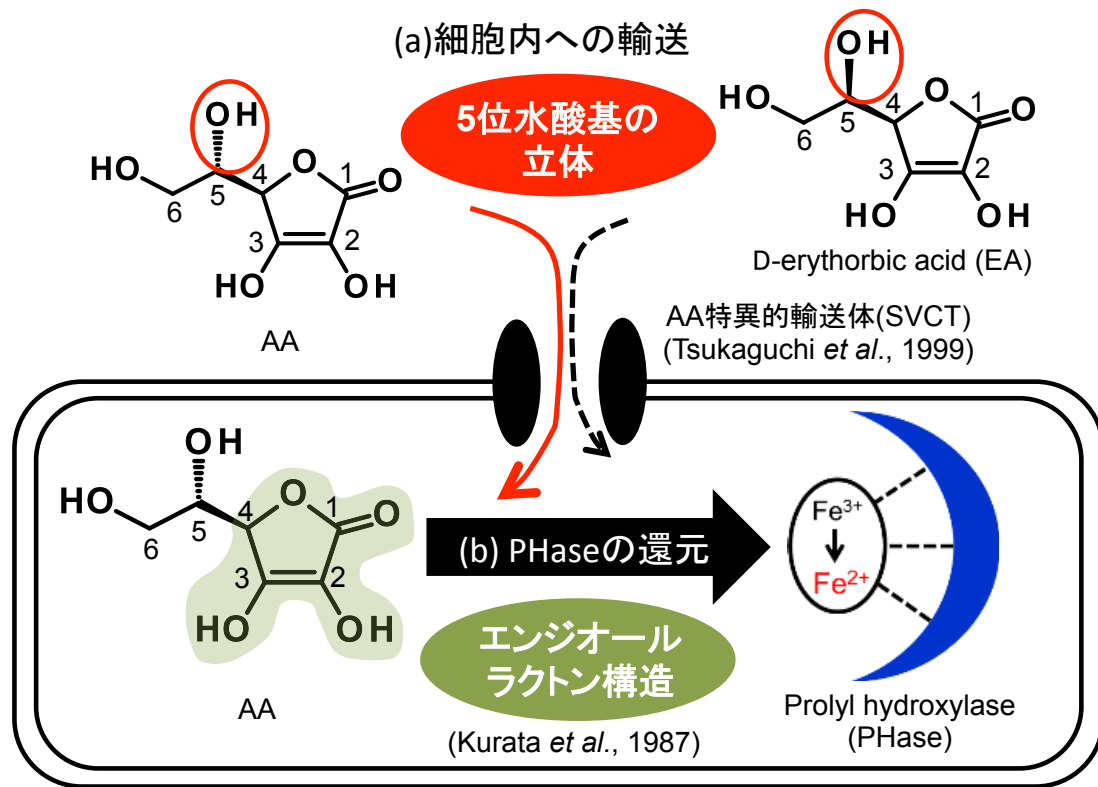


Figure 1-4. Collagen synthesis by L-ascorbic acid (AA).
 (a) Incorporation of AA into cell. (b) Reduction of PHase by AA.

第3節 本研究の目的と構成

AA標的タンパク質を*in vitro*系で探索する上で最も考慮すべき点は「どのようにして不安定なAAを安定化し、*in vitro*系で扱うか」という点である。この点を考慮し、本研究ではAA標的タンパク質の探索手法として生物化学的手法の一種である「アフィニティークロマトグラフィー」を選択した。アフィニティークロマトグラフィーは、スペーサー分子を介して、アガロースなどの担体に抗体などのタンパク質及び低分子化合物をリガンドとして固定化したアフィニティゲルを用いて、固定化したリガンドに親和性を示すタンパク質をタンパク質の混合液から特異的に精製する手法である(Fig. 1-5)。この手法により、これまでに抗がん剤であるmethotrexate (Uga *et al.*, 2006)や生理

活性物質であるepigallocatechin gallate (Ermakova *et al.*, 2005)などの標的タンパク質が同定されている。しかし、不安定であるためか、これまでにAAをリガンドとして固定化したアフィニティーゲルの前例はない。そこで、本研究の目的として、AAを安定化し、かつAAの特徴的な化学構造を維持した状態でリガンドとして固定化したアフィニティーゲル(AA-ゲル)を新たに作製し、作製したAA-ゲルを用いてAA標的タンパク質の同定を行う。また、同定したタンパク質に対するAAの親和性を検討する。

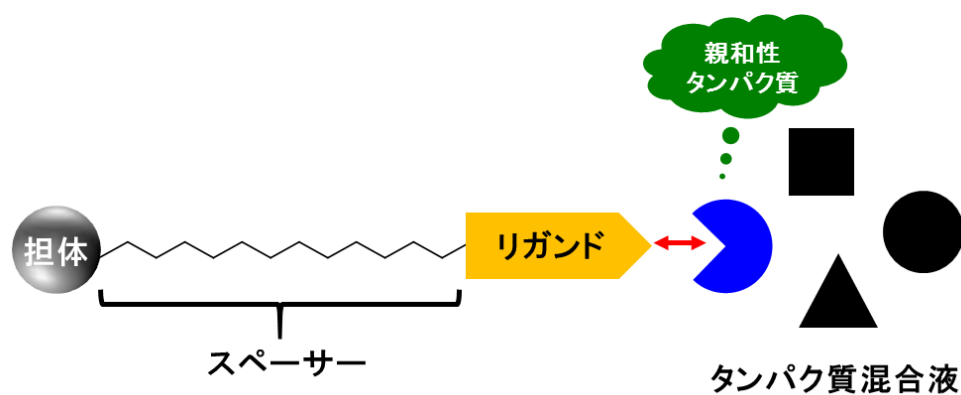


Figure 1-5. Protein purification by using an affinity gel.

本論文は全5章で構成されており、第1章では序論としてAAの歴史や生理作用メカニズムを交えた研究背景を展開し、本研究の目的を述べる。第2章ではAAの化学構造を維持し、かつ安定な状態でAAを固定化したAA-ゲルを作製するためにAAの誘導体を合成し、AAの固定化位置が異なる2種のAA-ゲルを作製する。また、AA-ゲルのリガンドの固定化及び安定性を確認する。さらにAA-ゲルの親和性と再利用性をAAに特異的に反応する既知のタンパク質を用いて確認する。第3章ではマウスの組織より抽出したタンパク質溶液に含まれるAA標的タンパク質の候補を探索、同定する。第4章では同定したAA標的タンパク質候補とAAの関係を調べるため、AA-ゲルに対する同定タンパク質の親和性などの検討を行う。第5章では本論文の総括を述べる。

第2章 AA類似体を固定化したアフィニティーゲルの作製と評価

第1節 緒言

序論においてAAが抗壞血病作用を発揮するためには、AAのS配置の5位水酸基及びエンジオールラクトン構造が重要であることを述べた。また、AAの3位水酸基は生理条件下で解離しており、この構造はカテコールアミンの生合成に関与する酵素との親和性に影響すると

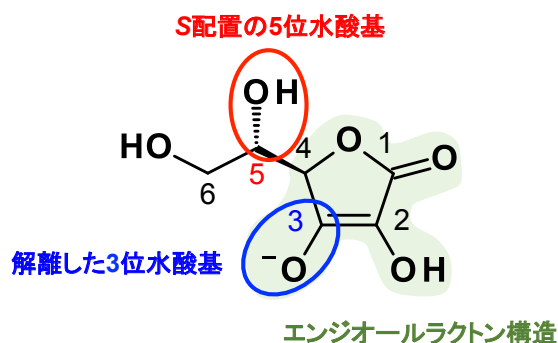


Figure 2-1. Unique structure of AA

される(Wimalasena *et al.*, 1994)。これらを踏まえると、AAの標的タンパク質を探索する上で、S配置の5位水酸基、エンジオールラクトン構造及び生理条件下で解離した3位水酸基の3つのAAの特徴的な化学構造をタンパク質に認識させる必要があると考えた(Fig. 2-1)。従って、これらAAの特徴的な化学構造をタンパク質から認識させるため、AAの2位及び6位水酸基からAAを固定化した2種類のアフィニティーゲル(AA-ゲル)を設計した(Fig. 2-2)。また、不安定なAAをアフィニティーゲルへ固定化すると同時に、安定化させる必要がある。本章ではその特徴的な化学構造を維持した状態でAAを2位及び6位水酸基からアフィニティーゲルに固定化したAA-ゲルを作製するため、まず、AAを出発物質として2種類の誘導体を合成した。次に、合成したAA誘導体を固定化することにより、2種類のAA-ゲルを作製し、作製したAA-ゲルのリガンドの固定化を確認するため、AA-ゲルのUVスペクトル測定を行った。また、AA-ゲルの水溶液における安定性を評価するため、各AA-ゲルのモデル化合物を合成し、緩衝液中での安定性試験を行った。更に、AA-ゲルの親和性と再利用性をAAの化学構造を特異的に認識して酸化するアスコルビン酸オキシダーゼ(AO)をモデルタンパク質として用い、評価した。

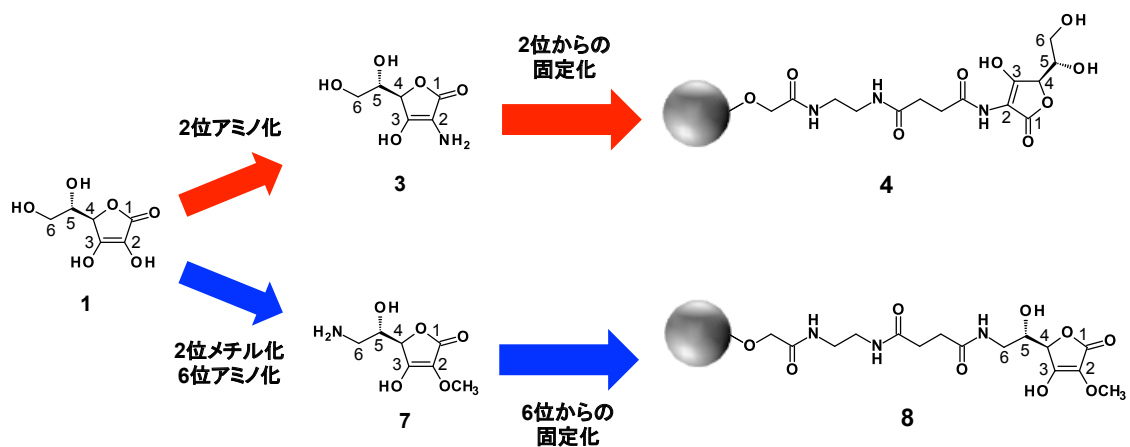


Figure 2-2. Synthetic strategy of AA-gel to identify AA-targeted proteins.

第 2 節 実験方法

2-1. 試薬、使用機器及び一般測定法など

L-Ascorbic acid (AA)、メタノール(MeOH)、酢酸エチル(EtOAc)、エタノール(EtOH)、*N,N*-ジメチルホルムアミド(DMF)、炭酸カリウム(K₂CO₃)、ジメチルスルホキシド(DMSO)、アジ化ナトリウム(NaN₃)、無水酢酸((CH₃CO)₂O)、ピリジン、カボチャ由来アスコルビン酸オキシダーゼ(AO)、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、glycerol及びメルカプトエタノールは和光純薬株式会社(大阪)より購入した。*p*-ベンゾキノン はLKT Laboratories (USA)より購入した。フェニルヒドラジン塩酸塩、クロロメチルメチルエーテル(MOMCl)、ヨードメタン(MeI)、30%(w/w)臭化水素酢酸溶液(ca. 5.1 mol/l, HBr)及び5%パラジウム炭素(wetted with ca. 55% water, Pd-C)は東京化成工業株式会社(東京)より購入した。テトラヒドロフラン(THF)、硫酸ナトリウム(Na₂SO₄)、炭酸ナトリウム(Na₂CO₃)、炭酸水素ナトリウム(NaHCO₃)、ブロモフェノールブルー(BPB)及びシルベスタステイン ワンはナカライテスク株式会社(京都)より購入した。Affigel-10、エコノパックカラム及びポリプレップカラムはBio-Rad (USA)より購

入した。Vivaspin 500 (MWCO 5000 Da)はSartorius (Germany)より購入した。12.5% e-PAGELはアトー株式会社(東京)より購入した。合成した全ての化合物の¹H-NMR(600 MHz)及び¹³C-NMR (150 MHz)の測定はVarian NMR system 600 MHzを使用した。また、HRMS測定にはBruker Daltonics MicrOTOF II instrumentもしくはWaters SYNAPT G2を使用し、イオン化はエレクトロスプレー(ESI)法にて行った。

2-2. アフィニティーゲルへ固定化するAA誘導体の合成

Synthesis of 2-phenylhydrazono-dehydroascorbic acid (2).

2はKurataらの方法を一部改変した方法により合成した(Kurata *et al.*, 1973)。L-Ascorbic acid (AA; **1**, 30.00 g, 170.3 mmol)と

-ベンゾキノン(18.42 g, 170.4 mmol)を25% MeOH(750 ml)中で混合し、室温で30分間攪拌した。攪拌後、反応液をジエチルエーテル(2 x 700 ml)で洗浄し、続けてフェニルヒドラジン塩酸塩(24.91 g, 172.3 mmol)を加え、50°Cで30分間攪拌した。反応液を一晩4°Cで静置し、析出した沈殿物を濾取して水洗後、減圧下で乾燥した。得られた固体をEtOAc/MeOH混液で再結晶し、**2** (12.28 g, 27.3%)を得た。¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD): δ 7.67 (m, 2H), 7.52 (m, 2H), 7.36 (m, 1H), 4.96 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H), 4.15 (m, 1H), 3.72 (m, 2H); ¹³C-NMR (150 MHz, CD₃OD): δ 193.9, 192.6, 167.5, 140.7, 129.4, 127.3, 120.7, 116.8, 83.6, 80.7, 70.6, 61.5; HRMS (*m/z*): [M-H]⁻ calcd. For C₁₂H₁₁N₂O₅, 263.0673; found, 263.0674.

Synthesis of 2-amino-2-deoxy-L-ascorbic acid (3).

3はKurataらの方法を一部改変した方法により合成した(Kurata *et al.*, 1973)。**2** (12.28 g, 46.47 mmol)を70% EtOH (250 ml)中に混合し、Pd-C (123.0 mg)を加え、室温、水素雰囲気下で4時間攪拌した。4時間後、反応液を濾過して濾液を濃縮後、EtOH/窒素置換したH₂O混液に懸濁し、氷上で30分静置した。析出した沈殿物を濾

取し、減圧下で乾燥し、**3** (5.46 g, 70.4%)を得た。¹H-NMR (600 MHz, D₂O): δ 4.64 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 4.06 (dt, *J* = 1.8, 7.2 Hz, 1H), 3.75 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H); ¹³C-NMR (150 MHz, D₂OD): δ 184.0, 175.9, 88.3, 81.3, 70.7, 63.3; HRMS (*m/z*): [M-H]⁻ calcd. for C₆H₈NO₅, 174.0408; found, 174.0415.

Synthesis of 2-*O*-methyl-L-ascorbic acid (**5**).

5はKatoらの方法を一部改変した方法により合成した(Kato *et al.*, 1988)。すりつぶした**1** (35.60 g, 202.1 mmol)をアセトン(405 ml)中に懸濁し、塩化アセチル(3.1 ml, 43.8 mmol)を加え、40°Cで2時間攪拌した。反応により析出した沈殿物を濾取し、ヘキサン/アセトン(8:2)混液で洗浄し、乾燥した。乾燥後の固体をDMF (25.0 ml)/THF (76.0 ml)混液に懸濁し、すりつぶしたK₂CO₃(17.78 g, 128.6 mmol)、MOMCl (9.7 ml, 128.9 mmol)を加え、室温で3時間攪拌した。反応液をH₂O (120 ml)で希釈し、濃HClで中和し、EtOAc (250 ml)にて反応生成物を抽出した。EtOAc層はH₂O (100 ml)で2回洗浄し、Na₂SO₄を加え、一晚脱水した。脱水したEtOAc層を濾過し、濾液の濃縮により得られたオイル状の濃縮残渣をDMSO (41.0ml)/THF (38.0 ml)混液に混和し、すりつぶしたK₂CO₃(6.04 g, 43.7 mmol)、MeI (3.0 ml, 48.2 mmol)を加え、60°Cで1.5時間攪拌した。反応液をH₂O (100 ml)で希釈し、濃HClで中和し、EtOAc (200 ml)にて反応生成物を抽出した。EtOAc層をH₂O (100 ml)で2回洗浄し、Na₂SO₄を加え、一晚脱水した。脱水したEtOAc層を濾過し、濾液の濃縮により得られたオイル状の濃縮残渣をEtOH (30.0 ml)/2 M HCl水溶液(9.8 ml)混液に混和し、還流下、80°Cで1時間攪拌した。反応液を濃縮し、得られた濃縮残渣をDiaion HP20 (H₂O/ギ酸(99.5:0.5, v/v))、Wakogel C-200 (EtOAc/MeOH/ギ酸(90:9.5:0.5, v/v/v))で精製し、更にEtOAc/EtOH混液で再結晶し、**5** (465.3 mg, 1.2%)を得た。¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD): δ 4.88 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 3.95 (dt, *J* = 1.8, 6.6 Hz, 1H), 3.71 (d, *J* = 6.6 Hz, 2H); ¹³C-NMR (150 MHz, CD₃OD): δ 172.8, 161.2, 123.2, 76.8, 70.5, 63.4, 60.2; HRMS (*m/z*): [M-H]⁻ calcd. for C₇H₉O₆, 189.0405; found, 189.0393.

Synthesis of 6-bromo-6-deoxy-2-O-methyl-L-ascorbic acid (6).

6はBockらの方法を参考に合成した(Bock *et al.*, 1979)。出発原料に用いた誘導体5は最終精製を行わずに上記の合成法に従って合成した。1 (60.00 g, 340.7 mmol)より合成した5 (7.89 g)をCH₃COOH (10.8 ml)に溶解し、HBr (16.3 ml, ca. 83.1 mmol)を加え、30°Cで19時間攪拌した。反応液を濃縮し、EtOH (18.0 ml)/2 M HCl水溶液 (18.0 ml)混液を加え、60°Cで2時間攪拌した。反応液を濃縮し、EtOAc (400 ml)に溶解し、EtOAc溶液をH₂O (200 ml)で洗浄した。EtOAc層にNa₂SO₄を加え、一晚脱水した。脱水したEtOAc層を濾過し、濾液の濃縮により得られたオイル状の濃縮残渣をWakogel C-200 (トルエン/アセトン/ギ酸 (80:19.5:0.5, v/v/v))で精製、濃縮し、減圧乾燥により6 (4.65 g, 5.3%, 1からの収率)を得た。¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD): δ 5.00 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 4.11 (ddd, *J* = 1.8, 6.6, 7.2 Hz, 1H), 3.80 (s, 3H), 3.63 (dd, *J* = 7.2, 10.2 Hz, 1H), 3.55 (dd, *J* = 6.6, 13.2 Hz, 1H); ¹³C-NMR (150 MHz, CD₃OD): δ 172.3, 160.7, 123.3, 77.1, 70.3, 60.2, 33.1; HRMS (*m/z*): [M-H]⁻ calcd. for C₇H₈BrO₅, 250.9561; found, 250.9571.

Synthesis of 6-amino-6-deoxy-2-O-methyl-L-ascorbic acid (7).

7はAndrewsらの方法を一部改変した方法により合成した(Andrews *et al.*, 1984)。6 (4.55 g, 18.0 mmol)、NaN₃ (1.76 g, 27.1 mmol)及びNa₂CO₃ (3.82 g, 36.0 mmol)をH₂O (73.0 ml)に溶解し、室温で14時間攪拌した。反応を停止するため、濃HClを加えpHを約4に調整した。反応停止後の反応液をそのままDiaion HP20 (H₂O, 20%, 40%, 60% MeOH水溶液(いずれも0.5%ギ酸を含む))で精製し、目的化合物の溶出画分を濃縮乾固した。得られた濃縮物をH₂O (49.0 ml)に溶解し、Pd-C (123.0 mg)を加え、室温、水素雰囲気下で4時間攪拌した。反応液を濾過し、濾液を活性炭(H₂O/ギ酸 (99.5:0.5, v/v))で精製した。目的化合物の溶出画分を濃縮乾固し、加熱したMeOHで洗浄、減圧乾燥により7 (1.58 g, 46.4%)を得た。¹H-NMR (600 MHz, D₂O): δ 4.49 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 4.24 (ddd, *J* = 1.8, 9.0, 9.6 Hz, 1H), 3.68 (s, 3H), 3.37 (dd, *J* = 9.6, 13.2

Hz, 1H), 3.25 (dd, $J = 9.0, 13.2$ Hz, 1H); ^{13}C -NMR (150 MHz, D_2O): δ 177.0 (x 2), 118.6, 79.1, 65.8, 60.1, 42.1; HRMS (m/z): $[\text{M}-\text{H}]^-$ calcd. for $\text{C}_7\text{H}_{10}\text{NO}_5$, 188.0564; found, 188.0567.

Synthesis of 2-acetylamino-2-deoxy-L-ascorbic acid (9).

3 (0.30 g, 1.71 mmol)をピロリジン(54.0 ml)/ H_2O (6.0 ml)に溶解し、無水酢酸(0.33 ml, 3.49 mmol)を加え、室温で30分攪拌した。反応液を濃縮し、Diaion HP20 (H_2O , 10% MeOH水溶液(いずれも0.5%ギ酸を含む))で精製した。目的化合物の溶出画分を濃縮乾固し、EtOHで再結晶し、**9** (194.5 mg, 52.4%)を得た。 ^1H -NMR (600 MHz, CD_3OD): δ 4.99 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H), 3.99 (ddd, $J = 1.8, 6.0, 7.2$ Hz, 1H), 3.72 (dd, $J = 6.0, 10.8$ Hz, 1H), 3.70 (dd, $J = 7.2, 10.8$ Hz, 1H), 2.17 (s, 3H); ^{13}C -NMR (150 MHz, CD_3OD): δ 172.6, 169.7, 161.5, 101.3, 76.7, 69.1, 62.0, 20.4; HRMS (m/z): $[\text{M}-\text{H}]^-$ calcd. for $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{NO}_6$, 216.0514; found, 216.0510.

Synthesis of 6-acetylamino-6-deoxy-2-O-methyl-L-ascorbic acid (10).

7 (0.30 g, 1.59 mmol)をピロリジン(54.0 ml)/ H_2O (6.0 ml)に溶解し、無水酢酸(0.24 ml, 2.54 mmol)を加え、室温で1時間攪拌した。反応液を濃縮乾固し、MeOHで再結晶し、**10** (242.5 mg, 66.0%)を得た。 ^1H -NMR (600 MHz, CD_3OD): δ 4.75 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H), 4.03 (ddd, $J = 1.8, 5.4, 7.2$ Hz, 1H), 3.75 (s, 1H), 3.48 (dd, $J = 5.4, 13.8$ Hz, 1H), 3.41 (dd, $J = 7.8, 13.8$ Hz, 1H), 2.02 (s, 3H); ^{13}C -NMR (150 MHz, CD_3OD): δ 172.5, 171.1, 159.3, 121.8, 76.3, 67.2, 58.7, 42.0, 21.1; HRMS (m/z): $[\text{M}-\text{H}]^-$ calcd. for $\text{C}_9\text{H}_{12}\text{NO}_6$, 230.0670; found, 230.0668.

2-3. AA誘導体を用いたAA-ゲルの作製

Affigel-10を10 mlずつ3つのエコノパックカラムに充填し、それぞれ氷冷した10 mM acetate buffer (pH 4.5)を3 bed (3 x 10 ml)通液した。アフィニティーゲルへの固定化に使用するリガンド溶液として1M NaHCO₃水溶液(10 ml)に溶解したAA誘導体**3** (522.1 mg, 3.0 mmol)溶液及びAA誘導体**7** (281.0 mg, 1.5 mmol)溶液をそれぞれ調製し、またcontrolゲルのリガンド溶液として1Mエタノールアミン水溶液(pH 8.3)を調製した。各溶液をAffigel-10に供し、FINEPCR (Korea)のシーソシェイカー(compact rocker, CR 300)により室温で2時間振とうした。各リガンド溶液を排出した後、未反応の活性化基をブロッキングするため、各ゲルに10 mlの1Mエタノールアミン水溶液(pH 8.3)を供し、更に室温で1時間振とうした。ブロッキング後、各ゲルに結合buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 100 mM NaCl) を5 bed (5 x 10 ml)以上通液し、平衡化を行った。これら一連の操作により得られた、AAの2位から固定化したAA-ゲル**4** (AA誘導体**3**を固定化)、AAの6位から固定化したAA-ゲル**8** (AA誘導体**7**を固定化)及びエタノールアミンを固定化したcontrolゲルをUVスペクトルの測定に使用した。各ゲルは使用直前まで4°C、0.02% (w/v) NaN₃を含む結合buffer中で保存した。

2-4. モデル化合物を用いたAA-ゲルのリガンドの固定化及び安定性の確認

項目2-3で作製したAA-ゲル**4**及び**8**とcontrolゲルの一部をそれぞれ懸濁採取し、1 mlのスペクトル測定buffer (結合buffer /glycerol (1:1, v/v))中においてUVスペクトルを測定した。この時、同時にスタンダードとして1 mlのスペクトル測定buffer中において、AA誘導体**9**及び**10** (終濃度50 µM)のUVスペクトルも測定した。測定は株式会社日立ハイテックノロジーズ(東京)のU-1900 spectrophotometer を用いて波長200~400 nmの幅で行った。また、固定化リガンドの安定性評価を行うため、AA、AA誘導体**9**及び**10**をそれぞれ100

mM sodium phosphate buffer (pH 7.4)に溶解し、1 mMの溶液を調整した。各1 mMの溶液を室温で24時間静置し、3、6、12、24時間後に50 μ lずつサンプリングし、分析直前まで-30°Cで冷凍保存した。各保存サンプルはアセトニトリル:50 mM酢酸アンモニウム(8:2)混液で用事希釈してHPLC分析を行い、得られたArea値に対し、スタンダードのArea値を100%とした時の残存率を算出した。HPLC分析は株式会社日立ハイテクノロジーズのL-2130 pump、L-2420 UV-Vis detector、L-2300 column oven、D-2500 chromatato-integratorから構成されたシステムを使用し、分析カラムにはジーエルサイエンス株式会社(東京)のInertsil amide (4.6 mm i.d. x 150 mm, 5 μ m)を使用した。分析条件は溶離液にアセトニトリル:50 mM酢酸アンモニウム(8:2)混液、流速0.7 ml/min、検出波長260 nm、カラム温度40°C、注入量10 μ lとした。

2-5. アスコルビン酸オキシダーゼ(AO)を用いたAA-ゲルの親和性の評価

本実験の操作は電気泳動を除き、すべて4°Cで行った。作製したAA-ゲル4及び8とcontrolゲルを1.0 mlずつポリプレップカラムに充填し、結合buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 100 mM NaCl) を3 bed (3 x 1.0 ml)以上通液し、平衡化を行った。平衡化後、0.1 mM及び1.0 mM AA誘導体5溶液を添加もしくは無添加の結合bufferで調製した600 μ g/mlのAO溶液を50 μ lずつ各ゲルに添加した(タンパク量各30 μ g)。添加後、結合bufferを3 bed (3 x 1.0 ml)通液し、非吸着タンパク質を洗浄した。次に、吸着したタンパク質を溶出させるため、0.1 mM AA誘導体5溶液を2 bed (2 x 1.0 ml)通液後、続けて1.0 mM AA誘導体5溶液を2 bed (2 x 1.0 ml)通液した。各AA誘導体5溶液の画分はVivaspin 500を用いた限外濾過により、2.0 mlを25 μ lまで濃縮した(80倍濃縮)。結合bufferの洗浄画分及び濃縮した各AA誘導体5溶液の画分をSDS sample buffer (62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2% (w/v) SDS, 10% (v/v) glycerol, 6% (v/v)メルカプトエタノール, 0.8% (w/v) BPB)で2倍希釈し、100°C、5分加熱後、12.5% e-PAGELにてポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)を行った。

泳動後、シルベストステイン ワンにより銀染色し、タンパク質のバンドを確認した。

2-6. アスコルビン酸オキシダーゼ(AO)を用いたAA-ゲルの 再利用性の評価

本実験の操作は電気泳動を除き、すべて4°Cで行った。作製したAA-ゲル4及び8とcontrolゲルを1.0 mlずつポリプレップカラムに充填し、結合buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 100 mM NaCl) を3 bed (3 x 1.0 ml)以上通液し、平衡化を行った。平衡化後、結合bufferで調製した600 µg/mlのAO溶液を50 µlずつ各ゲルに添加した(タンパク量各30 µg)。添加後、結合bufferを3 bed (3 x 1.0 ml)通液し、非吸着タンパク質を洗浄した。次に、吸着したタンパク質を溶出させるため、0.1 mM AA誘導体5溶液を2 bed (2 x 1.0 ml)通液後、続けて1.0 mM AA誘導体5溶液を2 bed (2 x 1.0 ml)通液した。各AA誘導体5画分はVivaspin 500を用いた限外濾過により、2.0 mlを25 µlまで濃縮した(80倍濃縮)。結合bufferの洗浄画分及び濃縮した各AA誘導体5画分をSDS sample buffer (62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2% (w/v) SDS, 10% (v/v) glycerol, 6% (v/v)メルカプトエタノール, 0.8% (w/v) BPB)で2倍希釈し、100°C、5分加熱後、12.5% e-PAGELにてポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)を行った。泳動後、シルベストステイン ワンにより銀染色し、タンパク質のバンドを確認した。実験後、結合buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 100 mM NaCl) を3 bed (3 x 1.0 ml)以上通液し、再平衡化を行った後、同様の実験を更に2回繰り返した(計3回)。

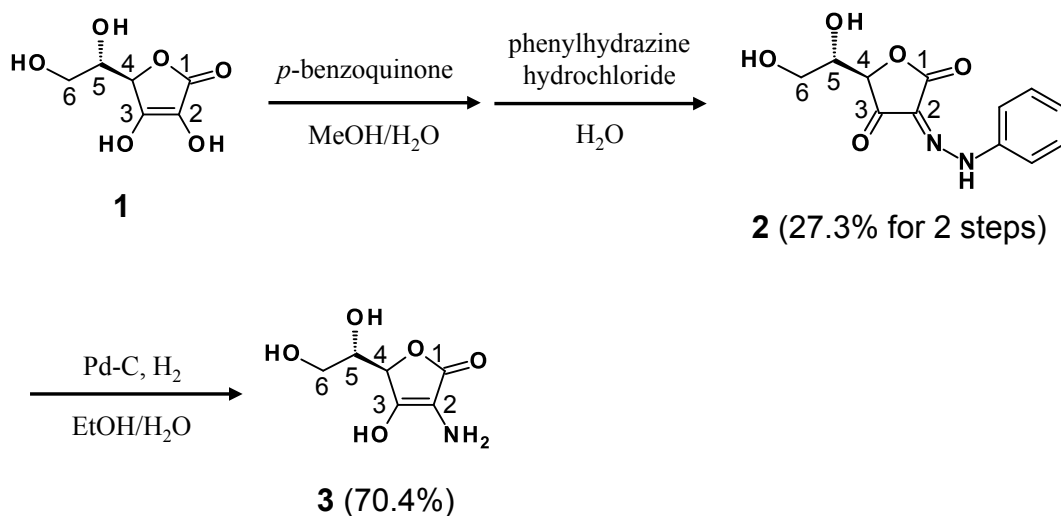
第3節 結果及び考察

3-1. AA-ゲルの設計

AAの特徴的な化学構造として、S配置の5位水酸基、エンジオールラクトン構造及び解離した3位水酸基が考えられる(Fig. 2-1)。まず、S配置の5位水酸基及び解離した3位水酸基をタンパク質から認識させるため、AAの2位からのアフィニティーゲルへの固定化が必要であると考えた。この際、AAの分子内には複数の水酸基が存在する。そこで、選択的にAAの2位からの固定化を行うべく、AAの2位水酸基をアミノ化した誘導体(AA誘導体**3**)を合成し、アミド結合を介してアフィニティーゲルに固定化することで、AAの2位から固定化したアフィニティーゲル(AA-ゲル**4**)の作製を試みた(Fig. 2-2, 赤矢印)。AAの2位水酸基は自身の不安定さの原因となるが、AAの2位よりアフィニティーゲルへの固定化を行うことで、固定化したAAの安定性が向上すると考えた。次に、AAの解離した3位水酸基を含むエンジオールラクトン構造をタンパク質から認識させるため、AAの6位からアフィニティーゲルへの固定化を考えた。しかし、AAの6位からの固定化の場合、2位からの固定化と異なり、AAの不安定さの原因となる2位水酸基はフリーとなり、固定化したAAが不安定となることが考えられた。そこで、AAの2位水酸基を比較的立体障害性の低いメチル基で修飾した後、6位水酸基をアミノ化した誘導体(AA誘導体**7**)を合成し、2位の場合と同様にアミド結合でアフィニティーゲルに固定化することで、6位からAAを固定化したアフィニティーゲル(AA-ゲル**8**)の作製を試みた(Fig. 2-2, 青矢印)。次項ではAA-ゲルの作製に使用する2種のAA誘導体の合成に関して詳細を述べる。

3-2. アフィニティーゲルへ固定化するAA誘導体の合成

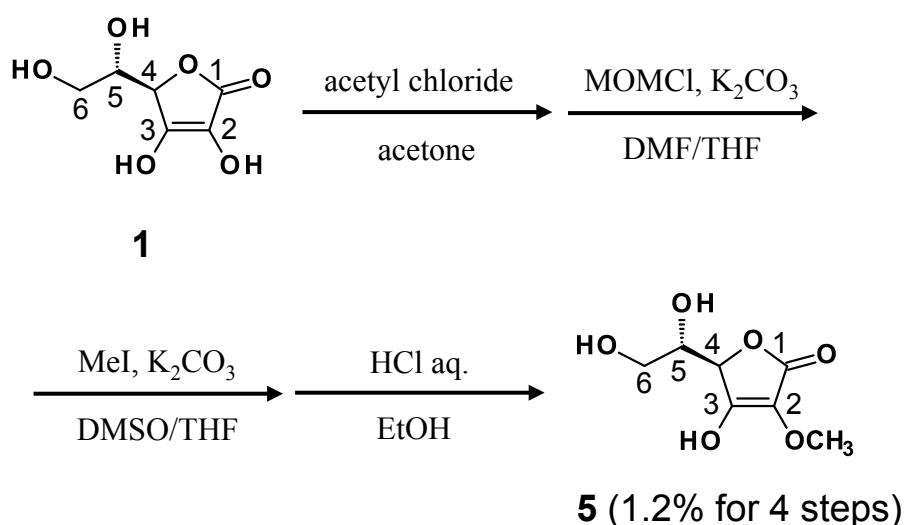
AA誘導体の固定化には市販のアフィニティーゲルである Affigel-10を用いた。Affigel-10は親水性のアガロースを担体とした汎用性の高いアフィニティーゲルであり (Rehm and Lazdunski, 1988; Kimura *et al*, 2009)、1級アミノ基を有するリガンドの選択的な固定化が可能である。この性質を利用し、AAの2位及び6位水酸基を選択的にアミノ化し、アミド結合を介したアフィニティーゲルへの位置選択的な固定化を試みる。そこで、AAの2位からアフィニティーゲルへ固定化したAA-ゲル**4**を作製するため、まず、AAの2位水酸基をアミノ化した誘導体であるAA誘導体**3**を合成した(Scheme 2-1)。AA誘導体**3**は以前、Kurataら(1973)により合成されているため、その方法を一部改変して行った。まず、AA誘導体**3**の合成前駆体である酸化型AAの2位フェニルヒドラジン化体(AA誘導体**2**)を合成した。AAと酸化剤である*p*-ベンゾキノン₂を25%MeOH中に混合し、室温で30分間攪拌し、AAを酸化した。30分攪拌後、反応液にジエチルエーテルを加え、*p*-ベンゾキノン₂を分液により除去し、酸化されたAAが含まれる水層にフェニルヒドラジン塩酸塩(24.91 g, 172.3 mmol)を加え、50°Cで30分間攪拌し、酸化型AAの2位をフェニルヒドラジン化した。反応液を一晩4°Cで静置し、析出した沈殿物を濾取して水洗後、減圧下で乾燥した。乾燥により得られた固体をEtOAc/MeOH混液で再結晶し、AA誘導体**2**を収率27.3% (2工程収率)で得た。次に、得られたAA誘導体**2**を70% EtOH中に混合し、Pd-C (123.0 mg)を加え、室温、水素雰囲気下で4時間還元した。反応液を濾過し、濾液を濃縮後、直ちにEtOH/窒素置換したH₂O混液に懸濁し、氷上で30分静置した。析出した沈殿物を濾取し、減圧下で乾燥し、AA誘導体**3**を収率70.4%で得た。



Scheme 2-1. Synthesis of AA derivative 3

次に、AAの6位からアフィニティーゲルへ固定化したAA-ゲル4を作製するため、AAの2位水酸基のメチル化に続き、6位水酸基をアミノ化したAA誘導体7の合成を行った (Scheme 2-2)。まず、AAの2位水酸基をメチル化した。AAの2位メチル化体であるAA誘導体5は以前、Katoら(1988)により合成が行われているため、その方法を一部改変して行った。すりつぶしたAAをアセトン中に懸濁し、触媒として塩化アセチルを加え、40°Cで2時間攪拌を行い、AAの5位及び6位の水酸基をイソプロピリデン基で保護した。この反応により析出した沈殿物を濾取し、ヘキサン/アセトン(8:2, v/v)混液で洗浄し、乾燥した。乾燥後の固体をDMF/THF混液に懸濁し、すりつぶした K_2CO_3 、MOMClを加え、室温で3時間攪拌し、AAの3位をMOM基で保護した。反応液を H_2O で希釈した後、濃HClで中和し、EtOAcにて反応生成物を抽出した。EtOAc層を H_2O で洗浄し、 Na_2SO_4 を加え、一晩脱水した。脱水したEtOAc層を濾過し、濾液の濃縮により得られたオイル状の濃縮残渣をDMSO/THF混液に混和し、すりつぶした K_2CO_3 、MeIを加え、60°Cで1.5時間攪拌し、AAの2位水酸基をメチル化した。反応液を H_2O で希釈し、濃HClで中和し、EtOAcにて反応生成物を抽出した。EtOAc層を H_2O で洗浄し、 Na_2SO_4 を加え、一晩脱水した。脱水したEtOAc層を濾過し、濾液の濃縮により得られたオイル

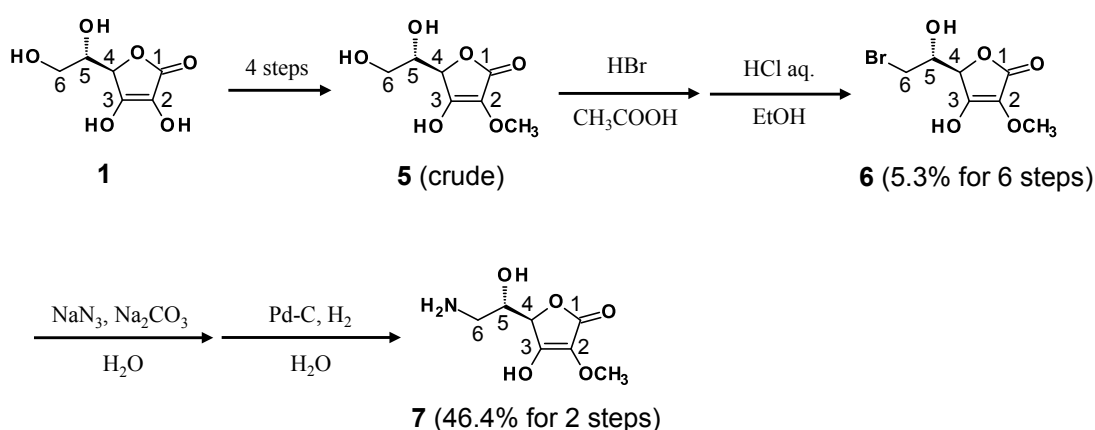
状の濃縮残渣をEtOH/2 M HCl水溶液の混液に混和し、還流下、80°Cで1時間攪拌して、イソプロピリデン基、MOM基を脱保護した。反応液をDiaion HP20 (H₂O/ギ酸(99.5:0.5, v/v))、Wakogel-C-200 (EtOAc/ギ酸(99.5:0.5, v/v)及びEtOAc/MeOH/ギ酸(90:9.5:0.5, v/v/v))で精製した。精製後、EtOAc/EtOH混液で再結晶し、AA誘導体**5**を収率1.2%で得た(4工程収率)。本工程で得られたAA誘導体**5**は次章以降の実験に使用した。



Scheme 2-2. Synthesis of AA derivative **5**

最終精製のみを行わずにScheme 2-2と同様の工程を経て別途合成したAA誘導体**5**の6位のブロモ化を行った(AA誘導体**6**) (Scheme 2-3)。AAの6位のブロモ化はBockら(1979)の方法を参考に行った。合成した未精製のAA誘導体**5**を酢酸に溶解し、HBrを加え、30°Cで19時間攪拌し、6位のブロモ化を行った。ブロモ化の際、同時にAA誘導体**5**の5位水酸基がアセチル化されたと考えられる副産物の生成がTLCにより確認された(data not shown)。そこで、収率の向上を目指し、反応液を濃縮した後、EtOH/2M HCl水溶液の混液を加え、60°Cで2時間攪拌し、5位のアセチル基を加水分解した。反応液の濃縮を行った後、未反応のAA誘導体**5**などを除去す

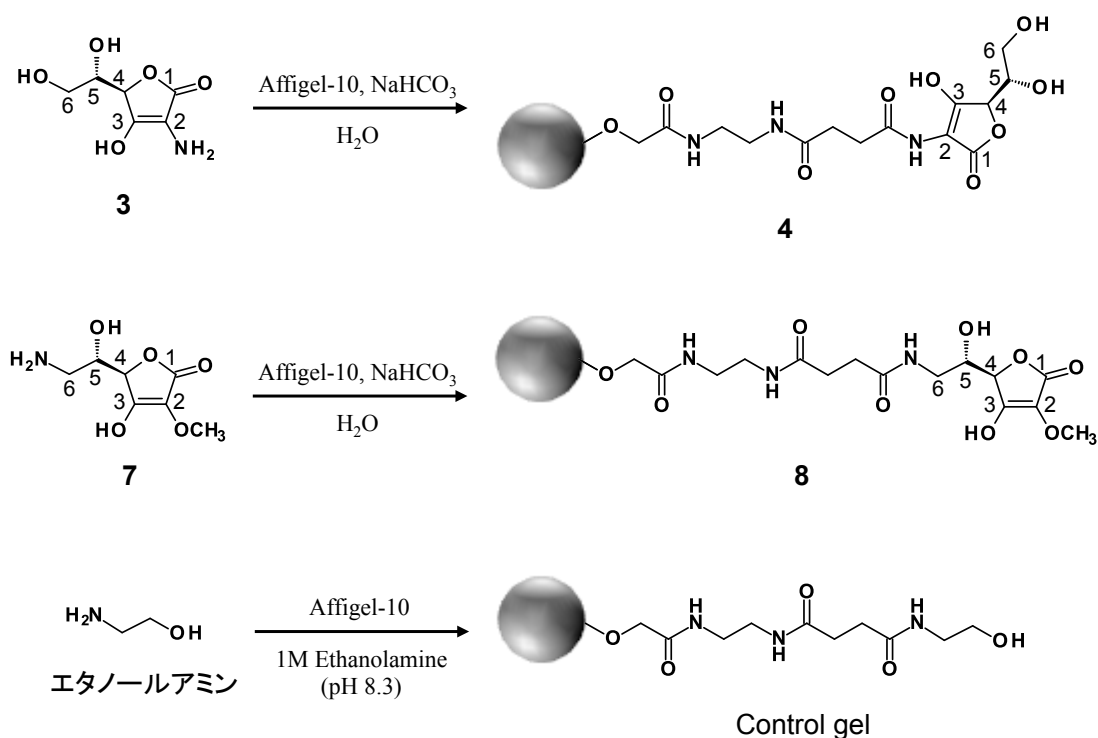
るため、EtOAcに溶解し、H₂Oで分液した。分液後、回収したEtOAc層にNa₂SO₄を加え、一晚脱水した。脱水したEtOAc層を濾過し、濾液の濃縮により得られたオイル状の濃縮残渣をWakogel C-200 (トルエン/アセトン/ギ酸 (80:19.5:0.5, v/v/v))で精製、濃縮し、減圧乾燥によりAA誘導体**6**を収率5.3%で得た(6工程収率)。次に、得られたAA誘導体**6**のアミノ化を行った(Scheme 2-3)。AAの6位ブロモ化体を出発物質としたAAの6位アミノ化体の合成はAndrews(1984)により合成が行われているため、その方法を一部改変して行った。合成したAA誘導体**6**、NaN₃及びNa₂CO₃をH₂Oに溶解し、室温で14時間攪拌し、まず、AA誘導体**6**の6位をアジド化した。14時間後、反応を停止させるため、濃HClを加えpHを約4に調整した。反応停止後の反応液をそのままDiaion HP20 (H₂O, 20%, 40%, 60% MeOH水溶液(いずれも0.5%ギ酸を含む))で精製し、目的化合物の溶出画分を濃縮乾固した。得られた濃縮物をH₂Oに溶解し、Pd-C (123.0 mg)を加え、室温、水素雰囲気下で4時間攪拌し、6位のアジド基をアミノ基に還元した。反応液を濾過し、濾液を活性炭(H₂O/ギ酸(99.5:0.5, v/v))で精製した。目的化合物の溶出画分を濃縮乾固し、加熱したMeOHで洗浄、減圧乾燥によりAA誘導体**7**を収率46.4%で得た(2工程収率)。



Scheme 2-3. Synthesis of AA derivative 7

3-3. AA誘導体を用いたAA-ゲルの作製

前項より合成したAA誘導体**3**及び**7**を用いて、AA-ゲルの作製を行った。またこの際、ネガティブコントロールとしてエタノールアミンを固定化したアフィニティーゲル(controlゲル)も作製した(Scheme 2-4)。まず、10 mlのAffigel-10を3本のエコノパックカラムにそれぞれ充填した。次に、充填したAffigel-10に対し、それぞれ氷冷した10 mM acetate buffer (pH 4.5)を3 bed (3 x 10 ml)通液し、ゲル表面のNHS基を活性化した。通液後、直ぐに、1M NaHCO₃水溶液に溶解したAA誘導体**3**及び**7**溶液、また1Mエタノールアミン水溶液(pH 8.3)をAffigel-10に供し、シーソーシェイカー(compact rocker, CR 300)により室温で2時間振とうし、ゲル表面へのリガンドの固定化を行った。効率的なりガンドの固定化を行うため、Affigel-10表面のNHS基1モルに対して、AA誘導体**3**を30モル当量、AA誘導体**7**を15モル当量と過剰量供した。この時、AA誘導体**3**はゲルへの固定化により安定化すると考えられるが、固定化前のAA誘導体**3**自身は不安定であり、本固定化条件では酸化してしまう。そこで、酸化によるAA誘導体**3**の減少を考慮して、安定なAA誘導体**7**よりも2倍量多くのAA誘導体**3**をAffigel-10に供した。固定化反応後、各リガンド溶液を排出し、未反応のNHS基をブロッキングするため、各ゲルに10 mlの1Mエタノールアミン水溶液(pH 8.3)を供し、更に室温で1時間振とうした。ブロッキング後、各ゲルに結合buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 100 mM NaCl)を5 bed (5 x 10 ml)以上通液し、平衡化した。これら一連の操作により、AA-ゲル**4** (AA誘導体**3**を固定化)、AA-ゲル**8** (AA誘導体**7**を固定化)及びcontrolゲル(エタノールアミンを固定化)の3種類のゲルを得た。

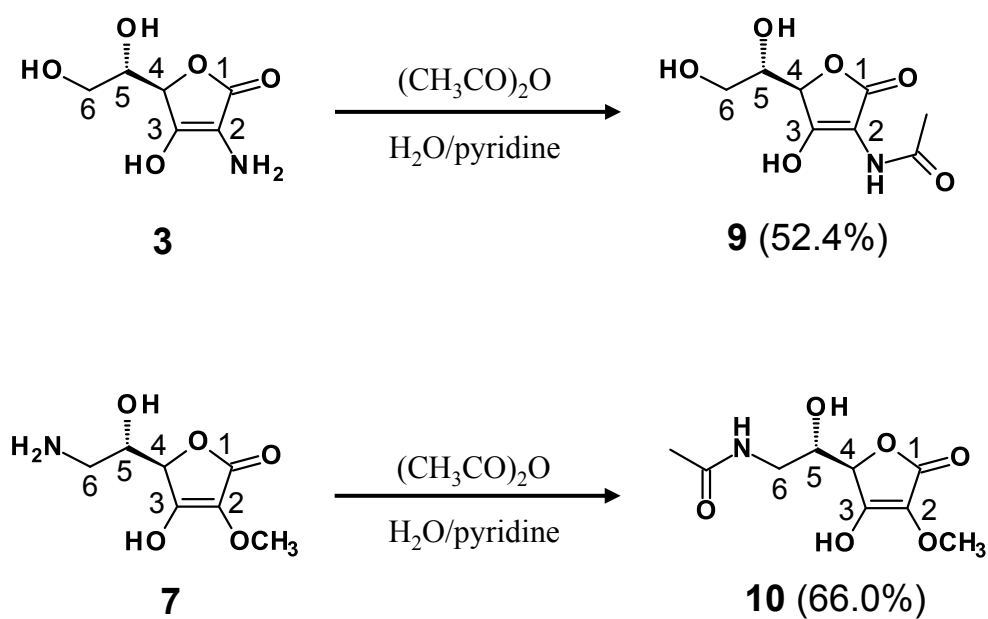


Scheme 2-4. Preparation of AA-gel 4 and 8 and control gel.

3-4. AA-ゲルのモデル化合物の合成

前項においてAA誘導体3及び7をリガンドとしてアフィニティーゲルに固定化し、AA-ゲル4及び8を作製した。次に、これらAA-ゲルのリガンドの固定化や安定性の確認を行う必要があると考えた。本項目ではリガンドの固定化と安定性の確認を行うべく、2種のAA-ゲルのモデル化合物の合成を行った(Scheme 2-5)。AA-ゲル4においてAA誘導体3は2位よりアミド結合を介して、アフィニティーゲルに固定化されている。従って、AA誘導体3の2位のアミノ基をアセチル化したAA誘導体9をAA-ゲル4のモデル化合物とした。また、このアセチル化反応における反応溶媒としてピリジンの使用を考えたが、AA誘導体3は高極性化合物であり、ピリジン単独では溶解しない。そこで、まずAA誘導体3をH₂Oに溶解した後、ピリジンを加え、更にアシルドナーとして無水酢酸を加えて室温で30分反応させた。反応後、未反応のAA誘導体3やピリジンなどを除去するため、

Diaion HP20 (H₂O, 10% MeOH水溶液(いずれも0.5%ギ酸を含む))で精製した。精製後、EtOHで再結晶し、AA誘導体**9**を収率52.4%で得た。また、AA-ゲル**8**のモデル化合物であるAA誘導体**10**の合成を行った。AA-ゲル**8**においてAA誘導体**7**は6位よりアミド結合を介して、アフィニティーゲルに固定化されている。従って、AA誘導体**7**の6位のアミノ基をアセチル化したAA誘導体**10**をAA-ゲル**8**のモデル化合物とした。AA誘導体**10**の合成はAA誘導体**9**の場合と同様に、AA誘導体**7**をH₂Oに溶解した後、ピリジンを加え、更にアシルドナーとして無水酢酸を加えて室温で1時間反応させた。反応後、反応液を濃縮乾固し、MeOHで再結晶し、AA誘導体**10**を収率66.0%で得た。



Scheme 2-5. Synthesis of AA derivative **9** and **10**

3-5. AA-ゲルのリガンドの固定化及び安定性の確認

作製したAA-ゲル**4**及び**8**及びcontrolゲルの各ゲルの一部を懸濁採取し、1 mlのスペクトル測定buffer (結合buffer/glycerol (1:1))中に加え、懸濁状態で直ちにUVスペクトル測定を行った。この時、同時にスタンダードとして1 mlのスペクトル測定buffer溶液中におけるAA誘導体**9**及び**10** (各終濃度50 μ M)のUVスペクトルも測定した。AA誘導体**9**及び**10**は各AA-ゲルにおけるスパーサーとリガンドの結合様式と同様のアミド結合によりそれぞれ2位または6位にアセチル基を導入した可溶性の誘導体であるため、各AA-ゲルのモデル化合物として適当であると考えた。UVスペクトル測定の結果、AA-ゲル**4** (λ_{max} : 254.0 nm)とAA誘導体**9** (λ_{max} : 251.0 nm)、また、AA-ゲル**8** (λ_{max} : 265.0 nm)とAA誘導体**10** (λ_{max} : 261.5 nm)のUVスペクトルはそれぞれ極大吸収波長の値とスペクトルパターンがほとんど一致していた(Fig. 2-3)。一方でcontrolゲルは各AA-ゲルとは全く異なるスペクトルパターンを示した。また、各AA-ゲルはそれぞれのモデル化合物と異なり、前述の特徴的な極大吸収波長とは異なる波長範囲においてもわずかにUV吸収が確認された。このようなUV吸収はcontrolゲルにおいても確認されたことから、モデル化合物には見られない、AA-ゲルに特有のUV吸収は固定化したリガンド特有のものではなく、固定化に使用した元のアフィニティーゲルに由来することが明らかとなった。以上の結果から、アフィニティーゲルへの各AA誘導体の固定化を確認した。

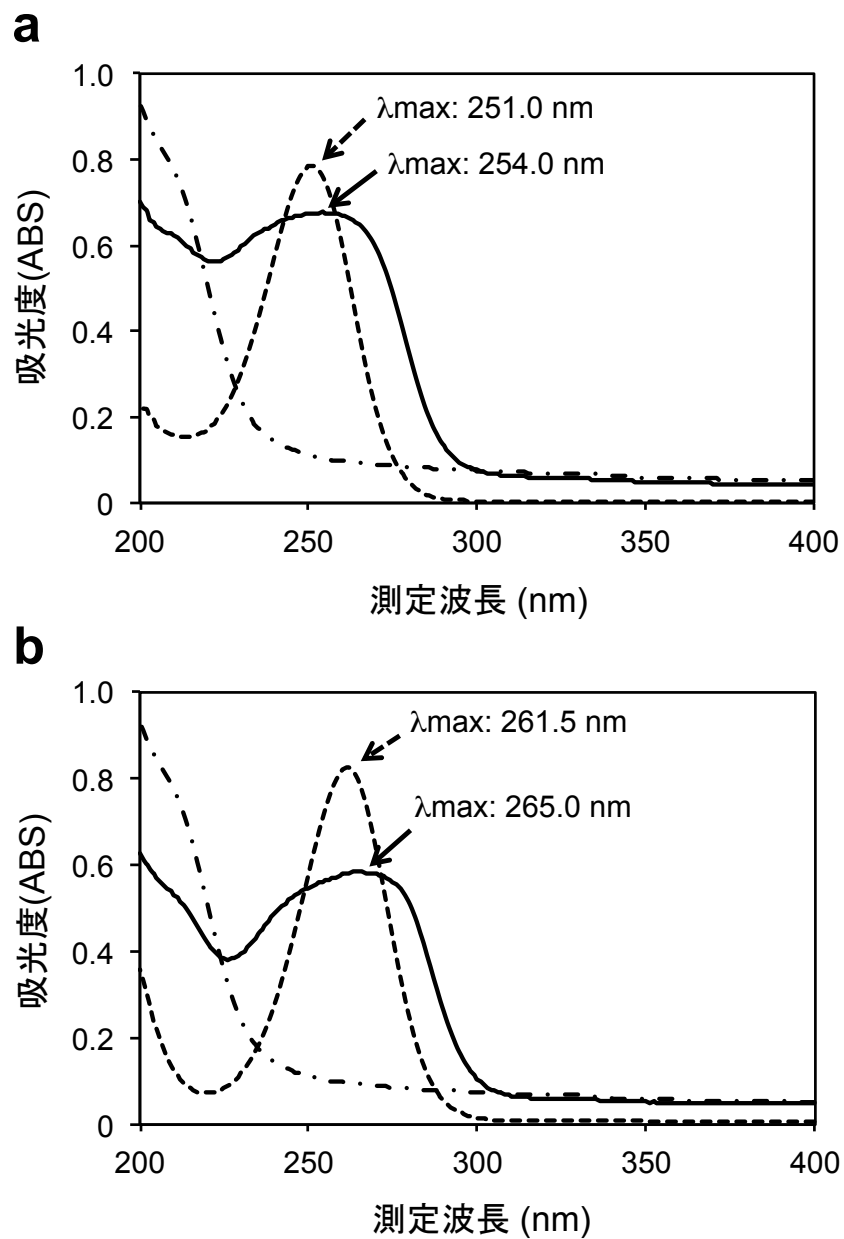


Figure 2-3. Comparison of UV spectra of AA-gel **4** with AA derivative **9** and control gel or AA-gel **8** with AA derivative **10** and control gel in binding buffer/glycerol (1:1, v/v). (a) AA-gel **4** (solid line), 50 μM AA derivative **9** (dotted line) and control gel (dot-dashed line). (b) AA-gel **8** (solid line), 50 μM AA derivative **10** (dotted line) and control gel (dot-dashed line).

また、固定化したリガンドの安定性の評価を行った。しかし、AA-ゲルは難溶性であり、HPLCを使用した固定化リガンドの残存率の算出が困難である。従って、各AA-ゲルの可溶性のモデル化合物であるAA誘導体**9**及び**10**の安定性を評価することで、間接的にAA-ゲルの固定化リガンドの安定性を評価した。安定性試験の条件は次章以降で行うタンパク質の精製条件など同様のpH 7.4の条件下において行った。まず、AAとAA誘導体**9**及び**10**をそれぞれ100 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4)に溶解し、1 mMの溶液を調整した。各1 mMの溶液を24時間後まで経時的にサンプリングし、HPLCにて各化合物のピーク面積を求め、用事調整(0時間後)の各誘導体のピーク面積を100%として、残存率を算出した。その結果、AA誘導体**9**及び**10**は安定性試験開始から24時間後まで溶液中に残存していた(Fig. 2-4)。一方でAAは試験開始より速やかに減少し、24時間後にはほとんど残存していなかった。この結果から、AA-ゲルのリガンドとしてAA誘導体が安定的にアフィニティーゲルへ固定化されていることが示唆された。

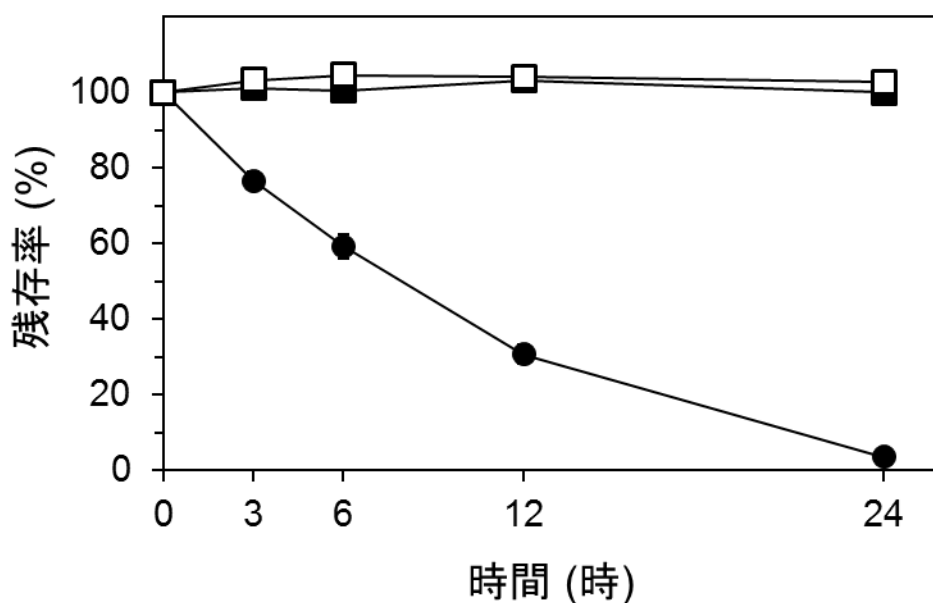


Figure 2-4. Stability of AA and AA derivatives **9** and **10** in aqueous solution. AA (closed circle), and AA derivative **9** (open square) and **10** (closed square) were each dissolved in 100 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4) to give 1 mM solutions. The solutions were stored at room temperature for 24 h. Each value is the mean \pm SD of three-independent experiments.

3-6. アスコルビン酸オキシダーゼ(AO)を用いたAA-ゲルの親和性の評価

AOはAA及びAA類似体を特異的に酸化する酵素として知られる。本研究では作製したAA-ゲル4及び8とcontrolゲルを用いて、まず、カボチャ由来のAOのアフィニティークロマトグラフィーを行い、得られた溶出画分をSDS-PAGEに供し、バンドの濃さをゲル間で比較することで、その親和性を検討した。その結果、AA-ゲル8に対してAA-ゲル4及びcontrolゲルよりもAOのバンドが濃く検出され、多く吸着していることが示された(Fig. 2-5、赤矢印)。また、あらかじめAA誘導体5を競合剤として添加し、各ゲルに対するAOの吸着性を検討した。本来、競合剤としてAAを使用すべきであるが、AOはAAを速やかに酸化してしまう。そのため、AAの代わりにAOにより酸化されないAA誘導体5を競合剤として使用した。その結果、AO溶液に対してあらかじめ0.1 mMのAA誘導体5を添加した場合、各ゲル間でAOのバンドの濃さに差は見られなかったが、10倍濃度の1.0 mMのAA誘導体5を添加した場合、AA-ゲル8に吸着するAOのバンドが薄くなった(Fig. 2-5、青矢印)。また一方で、AA-ゲル4及びcontrolゲルに吸着するAOのバンドの濃さは変化しなかった。これらの結果から、AA-ゲル4及びcontrolゲルへのAOの吸着は非特異的であり、AOはAA-ゲル8に対して特異的な親和性を示すことが明らかとなった。AOはAA及びAA類似体のエンジオールラクトン構造を認識し、酸化する。従って、AAのエンジオールラクトン構造を認識するタンパク質の探索を目指して設計したAA-ゲル8に対し、AOが特異的に親和性を示す本結果はAOのAAに対する認識の特異性と一致している。以上から、AAの化学構造を認識するタンパク質の探索において、本研究で作製したAA-ゲルに固定化されたAA誘導体をタンパク質がAAとして認識することが示唆された。

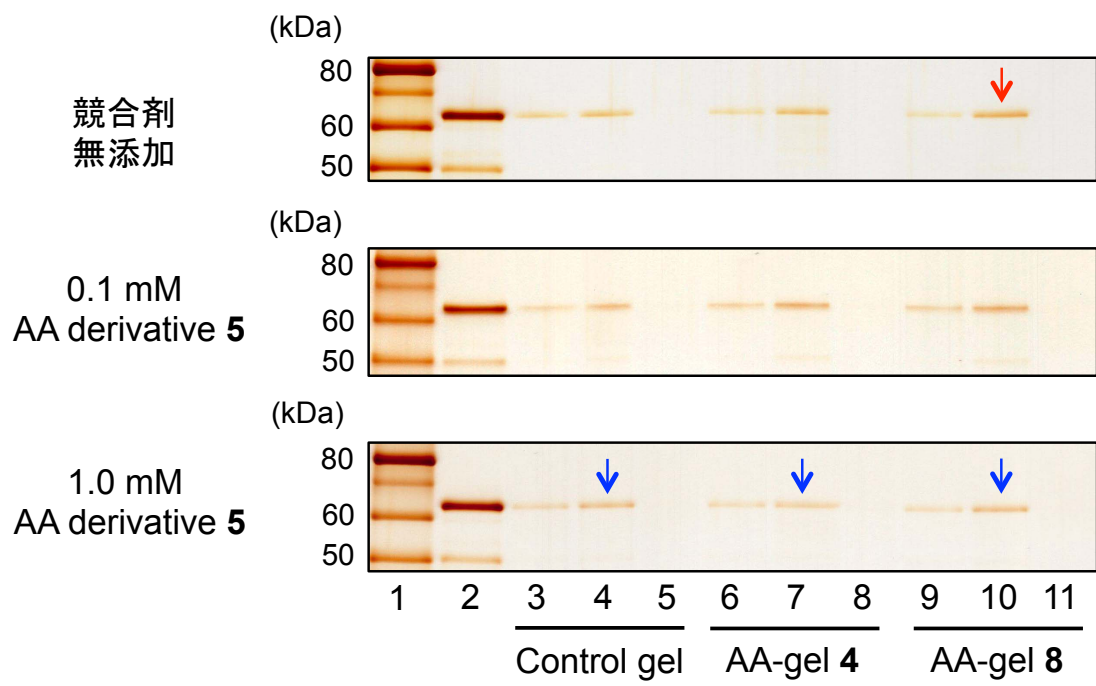


Figure 2-5. Specificity of AA-gel for ascorbate oxidase (AO). Affinity chromatography of AO for AA-affinity gels **4** and **8** and control gel were carried out without or with 0.1 mM and 1.0 mM AA derivative **5** as a competitor. Lane 1, molecular weight marker; lane 2, AO standard; lanes 3, 6, and 9, wash fractions; lanes 4, 7 and 10, 0.1 mM AA derivative **5** elution fractions; lanes 5, 8 and 11, 1.0 mM AA derivative **5** elution fractions.

3-7. アスコルビン酸オキシダーゼ(AO)を用いたAA-ゲルの 再利用性の評価

前項においてAA-ゲル4及び8に対するカボチャ由来のAOの親和性を検討したところ、AA-ゲル8に対して特異的な親和性を示すことが明らかとなった。そこで、AOのAA-ゲル4及び8とcontrolゲルに対する吸着性を3回の独立した実験を行って再現性を確認することで、AA-ゲルの再利用性の評価を行った。その結果、AA-ゲル8に対してAA-ゲル4及びcontrolゲルよりもAOが高い親和性を示し、また、同様の結果は3回の独立した実験を通して再現性良く得られた(Fig. 2-6)。この結果から、AA-ゲル4及び8は少なくとも3回の実験において再利用可能であることが明らかとなった。

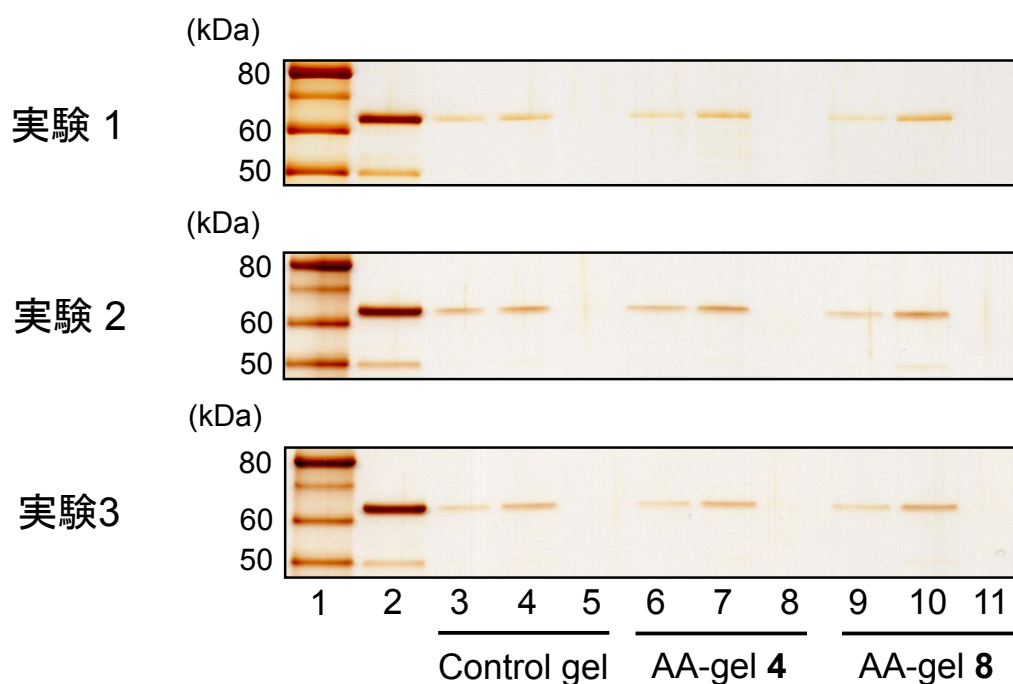


Figure 2-6. Recyclability of AA-gel for ascorbate oxidase (AO). Affinity chromatography of AO for AA-affinity gels 4 and 8 and control gel were carried out without or with 0.1 mM and 1.0 mM AA derivative 5 as a competitor. Lane 1, molecular weight marker; lane 2, AO standard; lanes 3, 6, and 9, wash fractions; lanes 4, 7 and 10, 0.1 mM AA derivative 5 elution fractions; lanes 5, 8 and 11, 1.0 mM AA derivative 5 elution fractions.

第4節 本章の結論

本章では多種多様な生理作用を有するAAの作用メカニズムの解明への手がかりを得るため、AA標的タンパク質を探索する新たなツールとして、不安定なAAを2位もしくは6位より安定的にアフィニティーゲルに固定化したAA-ゲルの作製を新たに試みた。作製した2種類のAA-ゲルのUVスペクトル測定及び各AA-ゲルのモデル化合物の水溶液中での安定性試験により、合成した2種類のAA誘導体が安定的にアフィニティーゲルに対して固定化されていることを確認した。次にエンジオールラクトン構造を認識してAAやAA類似体を酸化するアスコルビン酸オキシダーゼ(AO)をモデルタンパク質として用い、2種のAA-ゲルへの親和性及び再利用性を評価した。その結果、タンパク質からAAのエンジオールラクトン構造の認識を目指して作製したAA-ゲル**8**に対してAOは特異的な親和性を示し、この結果はAOのAAに対する構造認識性と一致した。また、AOがAA-ゲル**8**に対して特異的な親和性を示す結果は3回の独立した繰り返し実験によっても再現良く得られたことから、作製したAA-ゲルは少なくとも3回の実験を通じて再利用可能であることが明らかとなった。以上より、AAを安定な状態でアフィニティーゲルへ固定化し、かつ固定化したリガンドをタンパク質がAAとして認識しうる2種類のAA-ゲルの作製に成功した。次章では本章で作製した2種のAA-ゲルを用いた、AA標的タンパク質の探索と同定に関して述べる。

第3章 AA-ゲルを用いたマウス組織中のAA標的タンパク質の探索と同定

第1節 緒言

AAと関連深い生体組織として脳、肝臓、腎臓、精巣、脾臓、また、血清が挙げられる。脳は副腎を除く他の組織よりもAAを高濃度含有する組織であり(Harrison and May, 2009)、また、AAが脳の神経細胞の代謝系に関与していること(Castro *et al.*, 2009)、肝臓は哺乳類においてAAを生合成する組織であること(Grollman and Lehninger, 1957)、腎臓は内分泌機能を持つ組織であり、AAが内分泌に関与すると言われていること、精巣においてAAが欠乏する事により精子発生が異常になること(Yazama *et al.*, 2006)、脾臓は多くの免疫細胞を有し、AAは免疫に関与することが言われていること(Wu *et al.*, 2000)、血清ではAAが血液中で一定濃度維持されていることなどの理由から、これら生体組織や血清とAAは関連深いとされる。また、これらの組織においてAA特異的輸送体であるSVCTが発現している(Tsukaguchi *et al.*, 1999)。以上を踏まえると、上記の組織と血清に含まれるタンパク質からAAを標的とするタンパク質を探索、同定することによりAAの作用点や生理作用メカニズムに関する手がかりを得る可能性が高い。本章では第2章において作製した2種類のAA-ゲルを用いて、上記のマウス組織のホモジネートおよび血清中より、AA-ゲルに親和性を示すタンパク質の探索と同定を試みた。

第2節 実験方法

2-1. 試薬、使用機器及び一般測定法など

AA-ゲル**4**及び**8**とcontrolゲル及びAA誘導体**5**は第2章で合成したものをを用いた。ICRマウス(雄、9週齢)は日本エスエルシー(静岡)より購入した。イソフルラン、トリクロロ酢酸(TCA)、炭酸水素アンモニウム(NH_4HCO_3)、尿素、tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride (TCEP) ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、glycerol及びメルカプトエタノールは和光純薬株式会社(大阪)より購入した。ジチオスレイトール(DTT)、フッ化フェニルメチルスルホニル(PMSF)、ウシ血清アルブミン(fraction V, pH 5.2, BSA) 及びプロモフェノールブルー(BPB)及びシルベストステイン ワンはナカライテスク株式会社(京都)より購入した。Vivaspin 500 (MWCO 5000 Da)はSartorius (Germany)より購入した。Sequencing grade modified trypsin (Trypsin)はPromega (USA)より購入した。ヨードアセトアミド(Bio Ultra grade, IAA)はSigma-Aldrich (USA)より購入した。バイオ・ラッドプロテインアッセイはBio-Rad (USA)より購入した。GL-tip SDBはジーエルサイエンス(東京)より購入した。12.5% e-PAGELはアトー株式会社(東京)より購入した。タンパク質のホモジネートの調製にはIKA Labortechnik (Germany)のUltra-Turrax T25 basic disperserを使用した。

2-2. マウス組織のホモジネート及び血清サンプルの調製

32匹のICRマウス(雄、9週齢)をエサと水を自由摂取させて1週間飼育し、馴化させ(10週齢)、24時間絶食後、イソフルラン麻酔下、心臓採血により全血を採取した。採取した血液を37°Cで2時間インキュベートした後、遠心(2,000 g, 4°C, 15分)により得られた遠心上清を血清として回収した。得られた血清は個体差を無視するため、等量ずつ混合した。血液を採取後、脳、肝臓、腎臓、精巣、脾臓を摘出し、各組織の重量を測定した。測定した組織の重量に対し、10倍容量の抽出buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 100 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 1 mM DTT, 1 mM PMSF)を加え、氷上でUltra-Turrax T25 basic disperserを用いてホモジネートした。血清は全液量に対し、10倍希釈になるように抽出bufferを加えた。各組織のホモジネート後、不溶成分を除去するため、遠心(12,000 g, 4°C, 30分)し、遠心上清を回収した。回収した遠心上清と希釈した血清を透析buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 100 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂)中にて4°Cで終夜透析を行い、内在性のAAなどを除去した。透析後、バイオ・ラッドプロテインアッセイを用いて、各組織のホモジネート及び血清のタンパク濃度をBSAより作製した検量線から定量した。タンパク質定量後、全ての調製液を使用直前まで-80 °Cで冷凍保存した。これらの調製液を使用直前に解凍し、組織ホモジネートは遠心(12,000 g, 4°C, 30分)を行い、遠心上清をアフィニティー精製用サンプルとして使用した。また、血清サンプルは遠心を行わずにそのまま使用した。なお、本項の動物実験はすべて県立広島大学動物実験委員会の承認を得て行った(承認番号:14SA001)。

2-3. AA-ゲルを用いたマウス組織ホモジネートの アフィニティー精製とSDS-PAGE分析

本実験の操作はすべて4 °Cで行った。作製したAA-ゲル4及び8とcontrolゲルを2.0 ml

ずつポリプレップカラムに充填し、結合buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 100 mM NaCl) を3 bed (3 x 1.0 ml)以上通液し、平衡化を行った。平衡化後、項目2-2で調製したマウスの組織ホモジネート及び血清サンプルを各ゲルに対して、タンパク質量が10 mgになるよう添加した。添加後、シーソーシェイカー(compact rocker, CR 300)を用いて、14時間振とうし、各ゲルにタンパク質を吸着させた。14時間後、ホモジネート及び血清をカラムから排出、結合bufferを3 bed (3 x 1.0 ml)通液して非吸着タンパク質を洗浄した。次に、吸着したタンパク質を各ゲルより溶出させるため、0.1 mM AA誘導体5溶液を2 bed (2 x 2.0 ml)通液後、続けて1.0 mM AA誘導体5溶液を2 bed (2 x 2.0 ml)通液した。各AA誘導体5画分はVivaspin 500を用いた限外濾過により、4.0 mlを25 μ lまで濃縮した(160倍濃縮)。結合bufferの洗浄画分及び濃縮した各AA誘導体5画分をSDS sample buffer (62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2% (w/v) SDS, 10% (v/v) glycerol, 6% (v/v)メルカプトエタノール, 0.002% (w/v) BPB)で2倍希釈し、100°C、5分加熱後、12.5% e-PAGELにレーンごとに10 μ lずつアプライし、SDS-PAGEを行った。泳動後、シルベストステイン ワンにより銀染色し、タンパク質のバンドを確認した。

2-4. NanoLC-MS/MS分析用のサンプル調製

マウス組織の内、脳のホモジネートを項目2-3の方法に従って、別途アフィニティー精製して得られた25 μ lの0.1 mMのAA誘導体5画分の160倍濃縮液に対し、2% (w/v) SDS水溶液を25 μ l加え希釈し、全量50 μ lの内、40 μ lを別のチューブに移した。移した希釈液に対して460 μ lのH₂O及び100 μ lの100% (w/v) TCA水溶液を加え、氷中で1時間静置する事により溶液中のタンパク質を沈殿させた。1時間後、遠心(13,000 g, 4°C, 4分)し、遠心上清を除去した。タンパク質の沈殿に対して、1 mlのアセトンを追加して更に遠心(13,000 g, 4°C, 4分)し、上清を除去する事で沈殿したタンパク質を洗浄した。タンパク質のアセトンによる洗浄は同様の操作でもう一度繰り返した。アセトン洗浄後のタンパク質の沈殿に対して50 mM NH₄HCO₃水溶液で調製した8 M尿素溶

液を50 μ l加え、沈殿を再溶解させた。再溶解後のタンパク質溶液に対して50 mM NH_4HCO_3 水溶液で調製した50 mM TCEP溶液を5.5 μ l加え(終濃度5 mM)、室温で30分、タンパク質の還元を行った。還元処理後、50 mM NH_4HCO_3 水溶液で調製した100 mM IAA溶液を6.2 μ l加え(終濃度10 mM)、室温、遮光下で30分、タンパク質のアルキル化を行った。アルキル化処理後、各タンパク溶液を450 μ lの50 mM NH_4HCO_3 水溶液で希釈し、1 μ g/mlのTrypsinを加えて37°Cで18時間、タンパク質のTrypsin消化を行った。タンパク質のTrypsin消化により生成したペプチド溶液に含まれる塩はGL-tip SDBを用いて除去した。塩を除去したペプチド溶液を遠心濃縮により乾燥させた後、アセトニトリル: H_2O :ギ酸 (5:94.5:0.5, v/v/v)混液で再溶解させたものをnanoLC-MS/MS用のサンプル溶液とした。

2-5. マウス脳のアフィニティー精製サンプルの nanoLC-MS/MS分析

項目2-4で調製した脳のアフィニティー精製サンプルを下記の分析条件に従って分析した。また、分析システム、カラム、解析プログラムはすべてWaters (USA)のものを使用した。UPLCシステムにはnanoACQUITY UPLCシステムを使用し、トラップカラムにはC18 Trap Column (180 μ m i.d. x 20 mm, 5 μ m)、分析カラムにはHSS-T3 nanoAcquity analytical column (75 μ m i.d. x 150 mm, 1.8 μ m)を使用した。ペプチドの分離はグラジエント溶出により行い、溶離液Aに H_2O /ギ酸(99.9:0.1, v/v)混液、溶離液Bにアセトニトリル/ギ酸(99.9:0.1, v/v)混液を用いて以下のプログラムで溶出した、0~1分(溶離液B:1.0%)、1~100分(溶離液B:1.0~45%)、100~101分(溶離液B:45~90%)、101~110分(溶離液B:90%)、111~112分(溶離液B:90~1.0%)、112~130分(溶離液B:1.0%)。また、流速0.3 μ l/min、カラム温度35°C、注入量2 μ lとした。分離ペプチドのMS測定にはWaters SYNAPT G2を使用し、イオン化はエレクトロスプレー法、イオンの分析は四重極飛行時間質量分析にて行った。MSスペクトルの測定モードはポジ

ティブイオンモード、スキャン質量範囲は m/z 50~2,000、またスペクトルデータはデータ非依存性解析により取得した。取得したスペクトルデータの解析はProgenesis QI for Proteomicsを用い、UniProt Knowledgebase (UniProtKB; <http://www.uniprot.org/>)よりタンパク質を検索した。

第3節 結果及び考察

3-1. AA-ゲルを用いたマウス組織ホモジネート及び血清のアフィニティー精製とSDS-PAGE分析

本実験では、AAゲル4及び8とcontrolゲルに対し、マウスの組織ホモジネート及び血清を添加し、各ゲル間での吸着タンパク質の差をSDS-PAGEにより比較した。また、各ゲルに吸着したタンパク質の溶出にはAAに特異的な親和性を示すタンパク質の選択的な溶出を狙い、AAの2位をメチル化した安定なAA誘導体であるAA誘導体5を用いた競合溶出を試みた。SDS-PAGEの結果、0.1 mMのAA誘導体5溶液を供した画分において各ゲルともタンパク質のバンドが確認されたが、バンドのパターンに差は見られなかった(data not shown)。また、1.0 mMのAA誘導体5溶液を供した画分ではタンパク質のバンドを確認することは出来なかった。

3-2. マウス脳のアフィニティー精製サンプルのnanoLC-MS/MS分析

項目3-1の結果からSDS-PAGE後の銀染色では各ゲル間における吸着タンパク質の差を確認することが出来なかった。しかし、銀染色では検出不可能なレベルの微量タンパク質に着目して解析を行えば、各ゲル間でのわずかなタンパク質の吸着量の差を見いだせる可能性があると考えた。そこで、銀染色よりも高感度でタンパク質の比較解析を行うため、溶出させたタンパク質を溶液内でトリプシン消化したサンプルを用いて、nanoLC-MS/MSによるショットガンプロテオミクス解析を行った。また、本実験はマウスの組織の内、脳にしぼって解析を行った。脳を選択した理由として、脳は副腎を除く他のどの組織よりも高濃度のAAが存在するなど、本研究で使用している生体試料の中では特にAAと関連深い組織であると考えたためである。項目3-1と同様の方法で脳のホ

モジネートをそれぞれAA-ゲル4及び8とcontrolゲルに供し、0.1 mMのAA誘導体5溶液でタンパク質を溶出した画分をnanoLC-MS/MSで分析した。得られたMSスペクトルをProgenesis QI for Proteomicsを用いて、比較解析を行い、UniProtKBデータベースからタンパク質の検索を行った。解析の結果、controlゲルよりもAA-ゲル4及び8に多く吸着したタンパク質として、シトクロムc (cyt c)を検出した(Fig. 3-1)。この時、controlゲルよりもAA-ゲル4は2.8倍、AA-ゲル8は1.7倍それぞれ多く検出され、この結果は再現性良く得られた。Cyt c以外にも2種のAA-ゲルにcontrolゲルよりも多く吸着するタンパク質は検出されたが、いずれも再現良い結果を得ることができなかった(data not shown)。

GDVEKGKKIF VQKCAQCHTV EKGKHK**TGP NLHGLFGRKT** 40
GQAAGFSYTD ANKNK**GITWG EDTLMEYLEN PKKYIPGTM** 80
IFAGIKKKGE RADLIAYLKK ATNE 104

Figure 3-1. Identification of mouse cytochrome c by nanoLC-MS/MS. The peptides obtained by trypsin digestion are indicated in red.

第4節 本章の結論

本章では2章で作製した2種類のAA-ゲルを使用して、AAと関連深い組織と考えられる脳、肝臓、腎臓、精巣、脾臓のホモジネート及び血清中よりAAを標的とするタンパク質の探索を行った。0.1 mMのAA誘導体5溶液の画分をSDS-PAGE後の銀染色により、タンパク質のバンドを確認したところ、いずれの組織ホモジネートおよび血清においても2種類のAA-ゲルとcontrolゲルの間で吸着タンパク質の差は確認出来なかった。そこで、特にAAの組織内濃度が高い脳に着目し、より高感度で微量のタンパク質の比較解析が可能なnanoLC-MS/MSによるショットガンプロテオミクス解析を行った。その結果、2種類のAA-ゲルに対して、controlゲルよりも多く吸着したタンパク質として、cyt cを検出し、この結果は再現性良く得られた。次章は同定したcyt cに対するAAの親和性などに関して検討した結果を述べる。

第4章 シトクロムcとAAの関連性

第1節 緒言

第3章よりマウスの脳からAA-ゲルに対して親和性を示すタンパク質としてシトクロムc (cyt c)を同定した。分子量約12,000の低分子量タンパク質であるcyt cは細胞内においてエネルギー産生を行う細胞小器官であるミトコンドリアに存在する。Cyt cはミトコンドリア内膜に弱く結合しており、エネルギー産生系の一つであるミトコンドリア内膜の電子伝達系において、複合体IIIから複合体IVに電子の授受への関与する(Sarewicz and Osyczka, 2015)。また、cyt cは細胞死の一種であるアポトーシスのシグナルとして働き、アポトーシス関連酵素であるカスパーゼなどを活性化することも知られている(Cai *et al.*, 1998)。Cyt cの構造上の特徴として、活性中心に2つのシステイン残基に結合したヘムcを有し、ヘムcに配位したFeイオンの酸化還元状態により、酸化型cyt c (oxd-cyt c、 Fe^{3+})と還元型cyt c (red-cyt c、 Fe^{2+})の2種が存在する(Bowman and Bren, 2008)。これら2種のcyt cは電子伝達系における電子の授受と密接に関係する。まず、複合体IIIよりoxd-cyt cが電子を受け取ることで、red-cyt cへと還元され、次にこのred-cyt cがミトコンドリア内膜上を移動して、複合体IVへ電子を渡す。この一連の電子の流れにより、電子伝達系を活性化し、細胞内におけるエネルギー産生を促す。また、ミトコンドリアにおいてAAはエネルギー産生の際に過剰に発生した活性酸素種(ROS)からの酸化ストレスを軽減する報告がある(Sagun *et al.*, 2005; Mandl *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2010)。しかし、AAのミトコンドリアへの関与は未だ不明な点が多い。そこで、酸化還元状態の異なる2種のcyt cとAAの関係に着目することで、新たにcyt cに対するAAの関与が明らかになる可能性がある。本章ではcyt cとAAの関係を明らかにするため、AA-ゲルを用いて、AAの2種のcyt cに対する親和性の検討などを行った。

第2節 実験方法

2-1. 試薬、使用機器及び一般測定法など

AA-ゲル4及び8とcontrolゲルは第2章で作製したものを使用した。6-deoxy-6-amino-L-ascorbic acid (6-Amino-AA)はAndrewsらの方法を一部改変した方法により合成した(Andrews *et al.*, 1984)。AA、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、glycerol、メルカプトエタノール及び還元型グルタチオン(GSH)は和光純薬株式会社(大阪)より購入した。ウシ心筋由来cyt c及び6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox)はSigma-Aldrich (USA)より購入した。PD-10カラムはGE Healthcare (USA)より購入した。ジチオスレイトール(DTT)、ブロモフェノールブルー(BPB)及びシルベスタステインワンはナカライテスク株式会社(京都)より購入した。バイオ・ラッドプロテインアッセイ及びポリプレップカラムはBio-Rad (USA)より購入した。Vivaspin 500 (MWCO 5000 Da)はSartorius (Germany)より購入した。12.5% e-PAGELはアトー株式会社(東京)より購入した。2,4,6-Tris(2-pyridyl)-1,3,5, triazine (TPTZ)は株式会社同人化学研究所(熊本)より購入した。Iron(III)chloride hexahydrate ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)は関東化学株式会社(東京)より購入した。ヒト由来oxd-cyt cとAAのドッキングシミュレーションはChemical Computing Group (Canada)のMOE 2016.08により実行した。UVスペクトルや吸光度の測定は株式会社日立ハイテクノロジーズ(東京)のU-1900 spectrophotometer を用いて行った。

2-2. 還元型シトクロムc (red-cyt c)の調製

購入したウシ心筋由来cyt cは酸化型cyt c (oxd-cyt c)である。そこで、ウシ心筋由来のred-cyt cを調製するため、まず、80 μ lの10 mg/mlウシ心筋由来oxd-cyt c水溶液に対して、結合buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 100 mM NaCl)に溶解し、調製した2 mM DTT溶液を80 μ l加え(終濃度1 mM)、室温で還元した。Red-cyt cに特徴的な極大吸収波長である550 nmにおける吸光度を経時的に測定したところ、1.5時間後には吸光度がプラトーに達したため、この時点還元を終了点とみなした。次に、cyt cの溶液中に残存したDTTを除去するため、結合bufferで平衡化したPD-10カラムに対し、還元したcyt c溶液の全液量の内80 μ lを供し、精製を行った。Red-cyt c特有の赤色を示す画分を回収し、U-1900 spectrophotometer を用いて波長200~700 nmの幅でスペクトルの測定を行うことで、red-cyt cの極大吸収波長である550 nmの波長における吸収を持つことを確認した。また、精製後のred-cyt cのタンパク濃度はバイオ・ラッドプロテインアッセイを用いて、濃度の異なるoxd-cyt c溶液より作製した検量線から定量した。Red-cyt cの調製は項目2-3の実験の直前に行った。

2-3. Oxd-cyt c及びred-cyt cのアフィニティークロマトグラフィー

本実験の操作はすべて4°Cで行った。AA-ゲル4及び8とcontrolゲルを1.0 mlずつポリプレップカラムに充填し、結合buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 100 mM NaCl) を3 bed (3 x 1.0 ml)以上通液し、平衡化を行った。平衡化後、結合bufferで調製した400 μ g/mlのoxd-cyt c溶液及び項目2-2で調製したred-cyt c溶液を各々50 μ lずつ各ゲルに添加した(タンパク質の量は各20 μ g)。添加後、結合bufferを3 bed (3 x 1.0 ml)通液し、非吸着タンパク質を洗浄した。次に吸着したタンパク質を溶出させるため、0.1 mM AA誘導体5溶液を2 bed (2 x 1.0 ml)通液後、続けて1.0 mM AA誘導体5溶液を2 bed (2 x 1.0 ml)通液した。各AA誘導体5画分はVivaspin 500を用いた限外濾過により、2.0 mlを25 μ lまで濃縮した(80倍濃

縮)。結合bufferの洗浄画分及び濃縮した各AA誘導体5画分をSDS sample buffer (62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2% (w/v) SDS, 10% (v/v) glycerol, 6% (v/v)メルカプトエタノール, 0.002% (w/v) BPB)で2倍希釈し、100°C、5分加熱後、12.5% e-PAGELにてポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)を行った。泳動後、シルベラストステインワンにより銀染色し、タンパク質のバンドを確認した。

2-4. AA及びAA誘導体添加によるoxd-cyt cのAA-ゲルに対する

親和性の影響

本実験の操作はすべて4°Cで行った。作製したAA-ゲル4及び8とcontrolゲルを1.0 mlずつポリプレップカラムに充填し、結合buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 100 mM NaCl)を3 bed (3 x 1.0 ml)以上通液し、平衡化を行った。平衡化後、0.1 mM及び1.0 mM AA誘導体5溶液を添加もしくは無添加の結合bufferで調製した400 µg/mlのoxd-cyt c溶液を50 µlずつ各ゲルに添加した(タンパク量各20 µg)。添加後、結合bufferを3 bed (3 x 1.0 ml)通液し、非吸着タンパク質を洗浄した。次に吸着したタンパク質を溶出させるため、0.1 mM AA誘導体5溶液を2 bed (2 x 1.0 ml)通液後、続けて1.0 mM AA誘導体5溶液を2 bed (2 x 1.0 ml)通液した。各AA誘導体5画分はVivaspin 500を用いた限外濾過により、2.0 mlを25 µlまで濃縮した(80倍濃縮)。結合bufferの洗浄画分及び濃縮した各AA誘導体5画分をSDS sample buffer (62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2% (w/v) SDS, 10% (v/v) glycerol, 6% (v/v)メルカプトエタノール, 0.002% (w/v) BPB)で2倍希釈し、100°C、5分加熱後、12.5% e-PAGELにてポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)を行った。泳動後、シルベラストステインワンにより銀染色し、タンパク質のバンドを確認した。

2-5. ヒト由来oxd-cyt cとAAのドッキングシミュレーション

ドッキングシミュレーションは統合計算化学システムであるMOE 2016.08により行

った。Protein Data Bank (PDB)のデータベースより検索したヒト由来oxd-cyt c (PDB accession code: 2N9J)とAAのシミュレーションを行い、エネルギーが最小となるAAのコンホメーションを決定した。

2-6. Oxd-cyt cに対するAAと他の還元剤の還元速度の比較

1.0 mg/mlのウシ心筋由来oxd-cyt溶液を結合buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 100 mM NaCl)で調製した。次に還元剤溶液として各600 μ MのAA、6-Amino-AA、Trolox、DTT、GSH溶液を結合bufferで調製した。200 μ lの1.0 mg/mlのウシ心筋由来oxd-cyt溶液(終濃度200 μ g/ml)と800 μ lの62.5 μ Mの各還元剤溶液(終濃度50 μ M)を混合し、室温、180秒間反応させた。反応開始から終了まで10秒ごとにU-1900 spectrophotometer を用いてoxd-cyt cに特徴的な極大吸収波長である550 nmにおいて、吸光度の変化をモニターした。

2-7. Ferric reducing antioxidant power (FRAP) assayによるAAとその他還元剤の還元力の比較

FRAP assayはBenzieらの方法に従って行った(Benzie *et al.*, 1996)。FRAP試薬は40 mlの300 mM citrate buffer (pH 3.6)、4.0 mlの10 mM TPTZ溶液(31.2 mgのTPTZを10 mlの40 mM HCl水溶液に溶解し、調製)、4.0 mlの20 mM FeCl₃ · 6H₂O溶液(54.1 mgのFeCl₃ · 6H₂Oを10 mlのH₂Oに溶解し、調製)を混合し、調製した。AA、6-Amino-AA、Trolox、DTT、GSHをH₂Oで溶解し、600 μ Mの各還元剤溶液を調製した。2.9 mlのFRAP試薬と0.1 mlの600 μ Mの各還元剤溶液(還元剤の終濃度20 μ M)を混合し、室温、遮光下で30分静置して反応させた。30分後、U-1900 spectrophotometer を用いて593 nmにおける吸光度を測定した。

第3節 結果及び考察

3-1. Oxd-cyt c及びred-cyt cのアフィニティークロマトグラフィー

Cyt cは活性中心の鉄イオンの酸化還元状態によってoxd-cyt cとred-cyt cの2種類が存在する。そこで、2種のAA-ゲルを用いて、oxd-cyt c及びred-cyt cのアフィニティークロマトグラフィーを行い、両cyt cのAA-ゲルに対する親和性を比較した。本実験ではアフィニティークロマトグラフィーにウシ心筋由来のcyt cを用いているが、容易に購入可能であることがその理由である。また、cyt cは異種間でのアミノ酸配列の保存性が非常に高いタンパク質であり、マウス、ウシ、ヒト間におけるそのアミノ酸配列の相同性は非常に高い(Fig. 4-1)。従って、ウシ心筋由来のcyt cをモデルとして実験に使用しても問題ないと考えた。

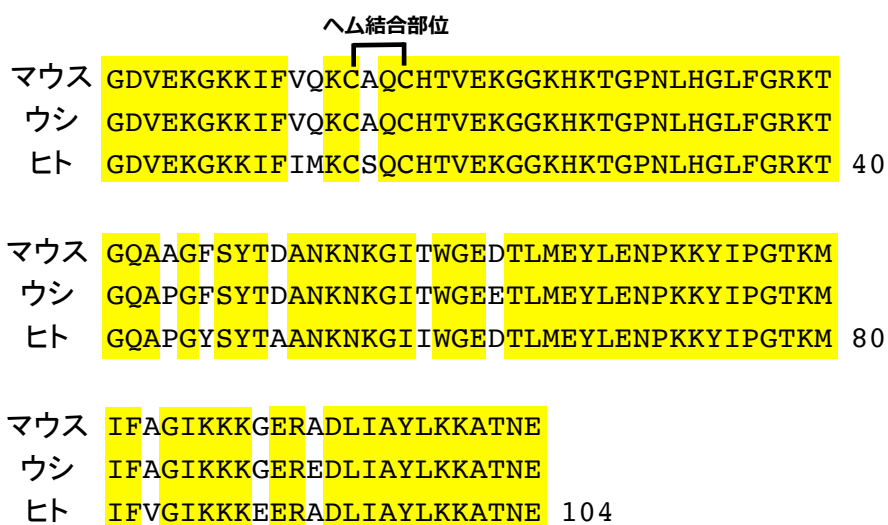


Figure 4-1. Homology of cytochrome c (cyt c) among various species. Amino acid sequence alignment of cyt c between mouse (UniprotKB accession number P62897), bovine (UniprotKB accession number P62894) and human (UniprotKB accession number P99999). The conserved amino acid residues are highlighted in yellow.

Oxd-cyt cのアフィニティークロマトグラフィーを行った結果、AA-ゲル4及び8を用いた場合、0.1 mM AA誘導体5の画分においてoxd-cyt cのバンドが検出されたことから溶出が確認されたが、controlゲルでは溶出を確認することはできなかった(Fig. 4-2a)。また、洗浄画分において、AA-ゲル4及び8ではcontrolゲルよりもoxd-cyt cの溶出が遅れていた。一方で、red-cyt cのアフィニティークロマトグラフィーを行った結果、いずれのゲルを用いた場合においても、0.1 mM及び1.0 mMのAA誘導体5の画分でred-cyt cの溶出を確認することはできなかった(Fig. 4-2b)。また、洗浄画分において、AA-ゲル4及び8ではcontrolゲルよりもred-cyt cの溶出が遅れていた。これらの結果から、AA-ゲル4及び8に対して、red-cyt cよりもoxd-cyt cの方が高い親和性を示すことが明らかとなった。また、cyt cはoxd-cyt cとred-cyt cの間でわずかに立体構造が異なることが言われている(Banci *et al.*, 1997; Imai *et al.*, 2016) (Fig. 4-3)。驚くべきことに、本研究で作製した2種のAA-ゲルは活性中心の鉄イオンの還元状態によりわずかに異なる2種のcyt cの立体構造の差異を認識し、oxd-cyt cに対して特異的な親和性を示すことが示唆された。しかし、本結果はAA-ゲルに固定化したAA誘導体に対するoxd-cyt cの特異的な親和性を示したものであり、AA分子に対するoxd-cyt cの親和性を必ずしも示したものではない。従って、次項ではoxd-cyt cに対してAAが特異的な親和性を示すことを明らかにするため、AA及びAA類似体を競合剤として添加した場合の2種のAA-ゲルに対するoxd-cyt cの親和性の影響を検討した。

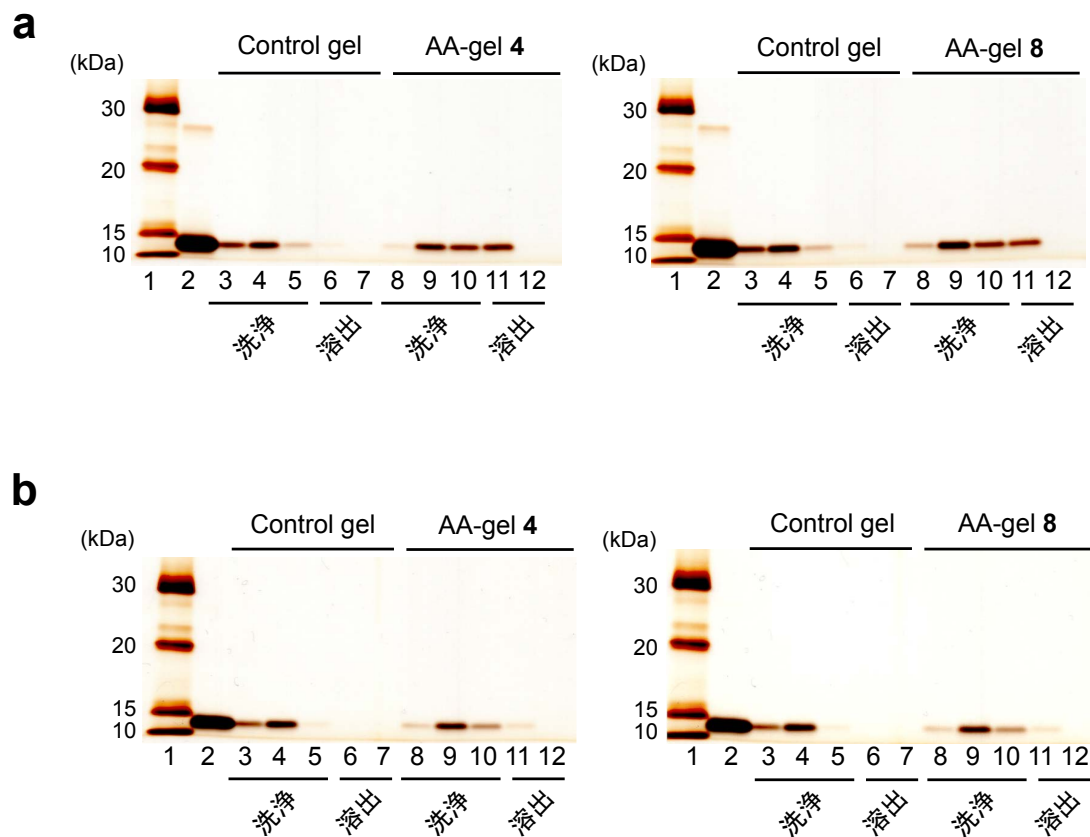
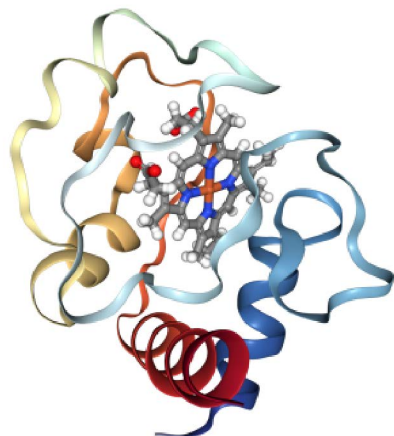
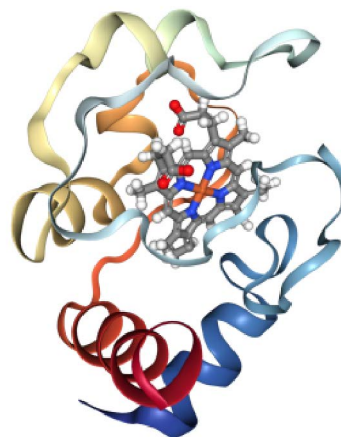


Figure 4-2. Affinity chromatography of oxd-cyt c (a) and red-cyt c (b) with AA-affinity gels 4 and 8 and the control gel. Lane 1, molecular weight marker; lane 2, oxd-cyt c or red-cyt c standard; lanes 3-5 and 8-10, wash fractions; lanes 6 and 11, 0.1 mM AA derivative 5 elution fractions; lanes 7 and 12, 1.0 mM AA derivative 5 elution fractions.



ヒト由来酸化型cyt c (oxd-cyt c)



ヒト由来還元型cyt c (red-cyt c)

Figure 4-3. Solution structure of human oxd-cyt c (PDB accession code 2N9J) and human red-cyt c (PDB accession code 2N9I).

3-2. AA及びAA誘導体添加による oxd-cyt cのAA-ゲルに対する親和性の影響

作製した2種のAA-ゲルはリガンドとしてAA誘導体を固定化しており、AA自身の構造とはわずかに異なる。従って、前項より明らかとなった、oxd-cyt cの2種のAA-ゲルに対する特異的な親和性は必ずしもAAに対するoxd-cyt cの特異的な親和性を示すものではない。そこで、oxd-cyt c溶液にあらかじめAAもしくはその誘導体であるAA誘導体5を競合剤として添加し、アフィニティークロマトグラフィーを行うことで、oxd-cyt cの2種のAA-ゲルに対する親和性の影響を検討した。その結果、AA-ゲル4及び8において、AA及びAA誘導体5を競合剤として添加したいずれの場合でも0.1 mMのAA誘導体5の画分で溶出したoxd-cyt cのバンドは薄くなった(Fig. 4-4a and b, lanes 5, 9 and 13)。一方で、controlゲルにおいて、いずれの競合剤を添加しても、無添加の場合とバンドパターンに差がみられなかった(Fig. 4-4c, lanes 5, 9 and 13)。すなわち、この結果はリガンドとして固定化したAA誘導体よりもAAやAA誘導体5の構造を認識してoxd-cyt cが親和性を示し

たため、AA-ゲルに対するoxd-cyt cの親和性が低下したことを示す。これらの結果から、oxd-cyt cはAAに対して特異的な親和性を示す可能性が示唆された。更に、この結果を支持するため、次項ではAAとヒト由来oxd-cyt cのドッキングシミュレーションを実施した。

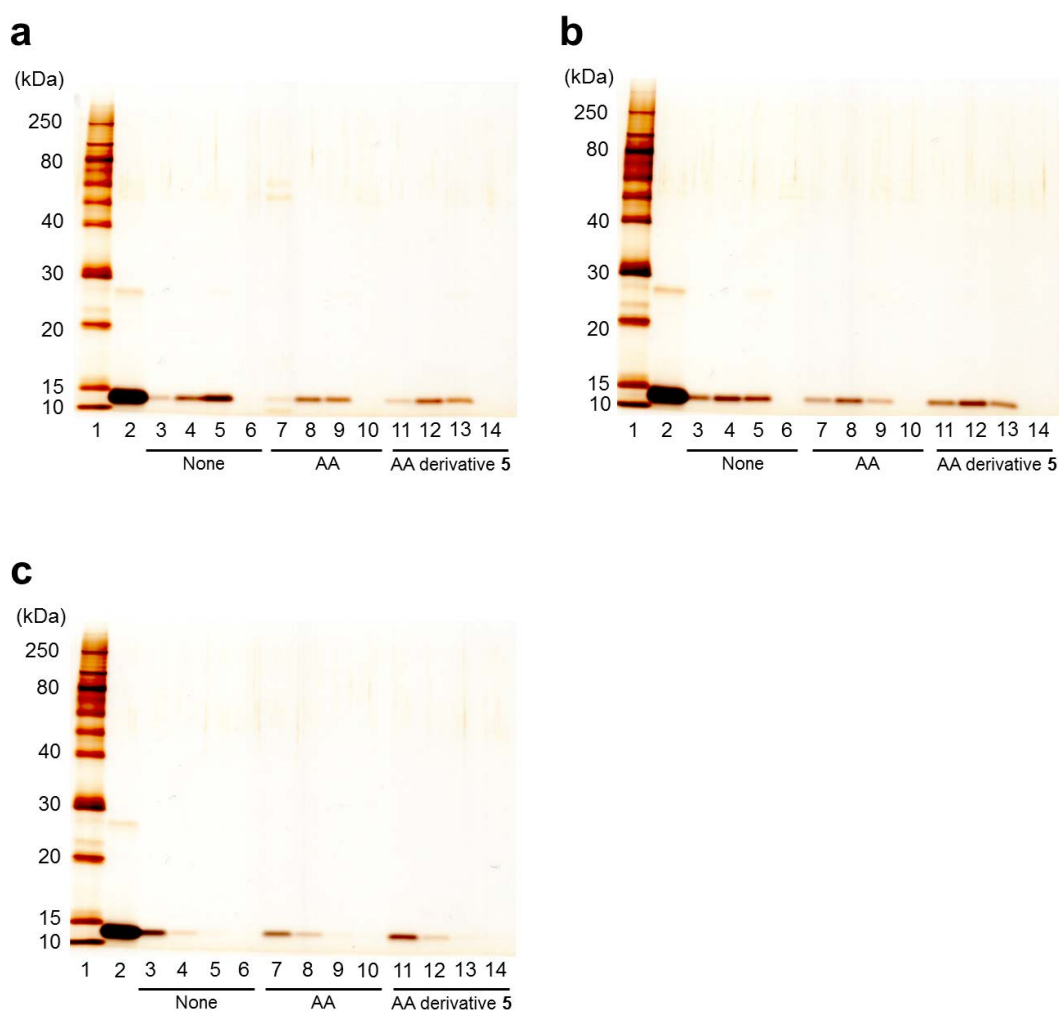


Figure 4-4. Competitive inhibition assay of oxd-cyt c without or with AA and AA derivative 5 for AA-gel 4 (a), AA-gel 8 (b) and control gel (c). Lane 1, molecular weight marker; lane 2, oxd-cyt c standard; lanes 3, 7, and 11, wash fractions (No. 1); lanes 4, 8 and 12, wash fractions (No. 3); lanes 5, 9 and 13, 0.1 mM AA derivative 5 elution fractions; lanes 6, 10 and 14, 1.0 mM AA derivative 5 elution fractions.

3-3. ヒト由来oxd-cyt cとAAのドッキングシミュレーション

項目3-1及び3-2の結果から、oxd-cyt cはAAに対して特異的な親和性を示す可能性が示唆された。そこで、この結果を支持するため、MOE 2016.08によるヒト由来oxd-cyt c (PDB accession code 2N9J)とAAのドッキングシミュレーションを実施した。その結果、AAはヒト由来oxd-cyt cのLys22、His26、Arg38と水素結合を形成し(Fig. 4-5a)、タンパク質の表面に結合する可能性が示唆された(Fig. 4-5b)。また、AAとヒト由来oxd-cyt cの結合に関与しているこれら3つのアミノ酸残基はマウス、ウシにおいても保存されている(Fig.4-1)。以上の結果はoxd-cyt cがAAに対して特異的な親和性を示す結果を支持している。

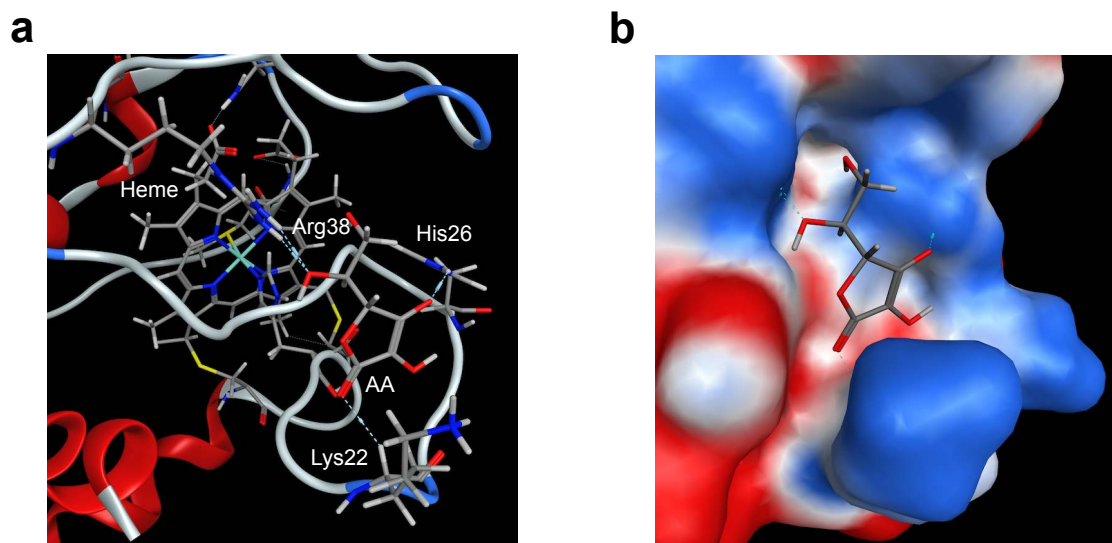


Figure 4-5. Docking models of AA to oxd-cyt c. (a) AA (stick representation), oxd-cyt c (ribbon and stick representation), (b) AA (stick representation), oxd-cyt c (surface representation).

3-4. AAと他の還元剤を用いたoxd-cyt c及び遊離のFe³⁺に対する

還元性の比較

これまでの結果から、oxd-cyt cはAAに対して特異的な親和性を示す可能性が示唆された。また、これまでにAAを含む種々の還元剤がoxd-cyt cの活性中心に配位したFe³⁺を還元することは知られているが(Williams and Yandell, 1985; Akesue *et al.*, 2017)、異なる種類の還元剤間における還元効率の比較は行われていない。従って、oxd-cyt cに対するAAの特異的な親和性とoxd-cyt cに対するAAの還元性の関係を明らかにするため、AAとその他の還元剤のoxd-cyt cに対する還元速度を測定し、比較した。本実験ではAAと化学構造が類似した還元剤としてAAの6位水酸基をアミノ基で置換した6-Amino-AA、また、AAと化学構造が大きく異なる還元剤として水溶性のビタミンE類似体であるTrolox、タンパク質などの還元利用されるDTT、生体内の還元剤としても知られるGSHをそれぞれ使用し、AAとその還元性を比較した(Fig. 4-6)。Oxd-cyt cに対する還元速度を比較したところ、その還元速度はAA>6-Amino-AA>>Trolox、DTT、GSHの順になった(Fig. 4-7a)。6-Amino-AAはAAと同じエンジオールラクトン構造を有し、還元力はほぼ同等であると考えられたが、AAよりも低い還元速度を示した。これは、本評価系のpHが中性であることにより、6-Amino-AAの6位アミノ基が正電荷を帯びていることがoxd-cyt cに対する6-Amino-AAの親和性に影響を与えているものと考えられる。

次に、cyt cに配位したFe³⁺とは無関係な遊離のFe³⁺に対する還元力を比較するためにFRAP assayを行った。FRAP assayは遊離のFe³⁺の還元力を測定する方法の一つであり、食品中に含まれる抗酸化物質の還元力の測定などに使用されている(Benzie *et al.*, 1996)。FRAP assayの結果から、GSH以外の還元剤はGSHよりも高い還元力を示し、その還元力はほぼ同等であった(Fig. 4-7b)。以上の結果から、AAのoxd-cyt cに対する効率的な還元は単純な遊離のFe³⁺に対する還元力でなく、oxd-cyt cに対するAAの特異的な親和性が影響することが示唆された。

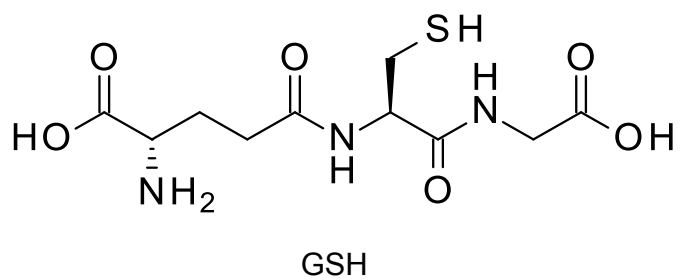
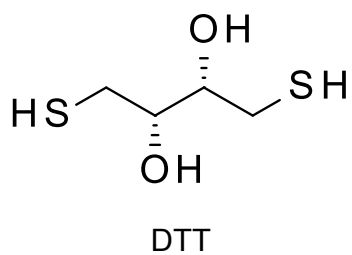
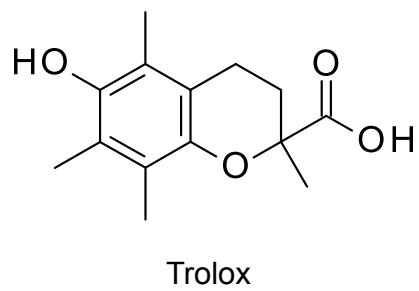
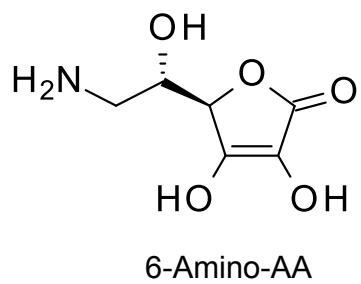


Figure 4-6. Chemical structure of reducing agents used in oxd-cyt c reduction assay and FRAP assay.

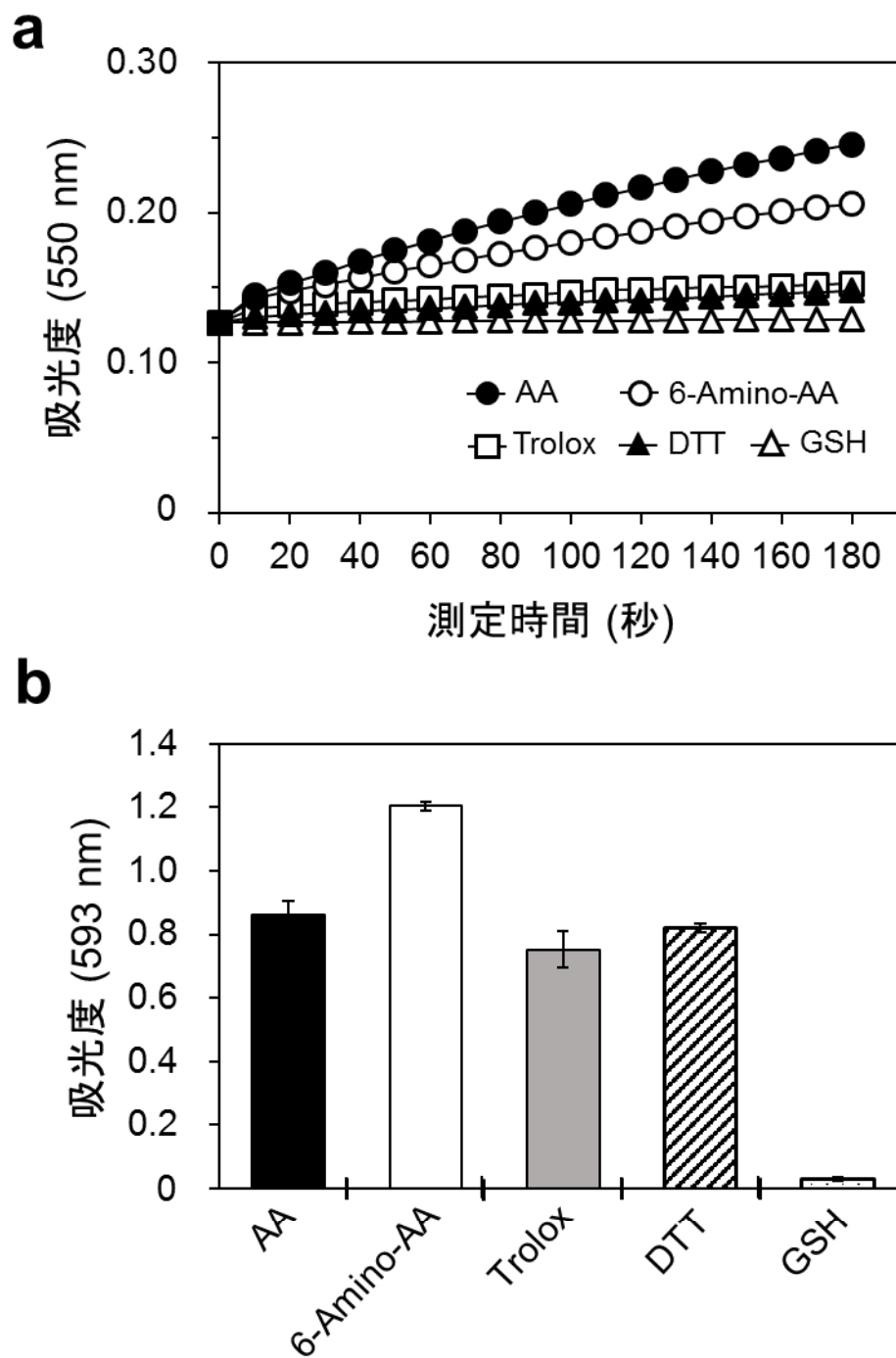


Figure 4-7. Reduction specificity of AA for oxd-cyt c. (a) FRAP assay of AA and other reducing agents. (b) Reduction rates of AA and other reducing agents for oxd-cyt c. Each value is the mean \pm SD of three independent experiments.

第4節 本章の結論

本章では第3章より同定したcyt cに対するAAの親和性に関する検討を行った。Cyt cは活性中心のFeイオンの酸化還元状態によって、oxd-cyt c (Fe^{3+})とred-cyt c (Fe^{2+})の2種が存在する。まず、2種のAA-ゲルを用いてoxd-cyt c及びred-cyt cのアフィニティークロマトグラフィーを行い、その親和性を検討した。その結果、oxd-cyt cに対して2種のAA-ゲルは特異的な親和性を示すことが明らかとなった。また、AA及びAA類体5を競合阻害剤として用いた、2種のAA-ゲルに対するoxd-cyt cの親和性の結果及びAAとヒト由来oxd-cyt cのドッキングシミュレーションの結果からoxd-cyt cはAAに対して特異的な親和性を示すことが示唆された。また、AAはoxd-cyt cに配位する Fe^{3+} を還元することが知られている。そこで、oxd-cyt cに対するAAの親和性はAAのoxd-cyt cに対する還元性に影響を与えるか検討するため、AAとその他の還元剤を用いて、oxd-cyt cに対する還元速度の測定とFRAP assayを行い、その結果を還元剤間で比較した。その結果、FRAP assayによる遊離の Fe^{3+} に対する還元性はGSHを除いてほぼ同等であったが、oxd-cyt cに対する還元速度はAAが最も大きかった。これらの結果からAAのoxd-cyt cの活性中心の Fe^{3+} の効率的な還元には単なるAAの還元力でなく、oxd-cyt cに対するAAの特異的な親和性が関与していることが示唆された。

これまでに、AAの抗酸化作用によるミトコンドリア内においてエネルギー産生により過剰に発生したROSなどの消去がAAのミトコンドリア内における機能であると報告されている(Fig. 4-8a)。まず、AAの酸化体であるdehydro-L-ascorbic acid (DHA)がミトコンドリア表面に発現しているグルコーストランスポーター(GLUT)を介してミトコンドリアに輸送される。その後、輸送されたDHAは還元酵素によりAAへと還元され、ROSなどの消去に関与する(Sagun *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2010; Mandl *et al.*, 2009)。しかしながら、AAのミトコンドリアへの関与は未だ不明な部分が多い。近年、ミトコンドリア表面にAA特異的輸送体であるSVCTが発現していることが報告されており(Muñoz-Montesino *et al.*, 2014)、このことはAAがミトコンドリア内において、抗酸化

作用以外の機能を示す可能性を示唆している。本章の結果から、著者は抗酸化作用以外の新たなAAのミトコンドリア内での機能として、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複合体IIIから複合体IVへ電子を渡すことで酸化されたred-cyt cを還元して再生することにより、細胞内のエネルギー産生の効率化に寄与しているのではないかと考える(Fig. 4-8b)。また、cyt cのアミノ酸配列は生物種間で非常に高度に保存されており、このことは多くの生物にとってcyt cが重要なタンパク質であることを示唆している(Zaidi *et al.*, 2014)。今後、AAとcyt cの関係を更に研究することにより、ミトコンドリア内での未知のAAの生理作用、また多くの生物種におけるAAの重要性を紐解くことが可能かもしれない。

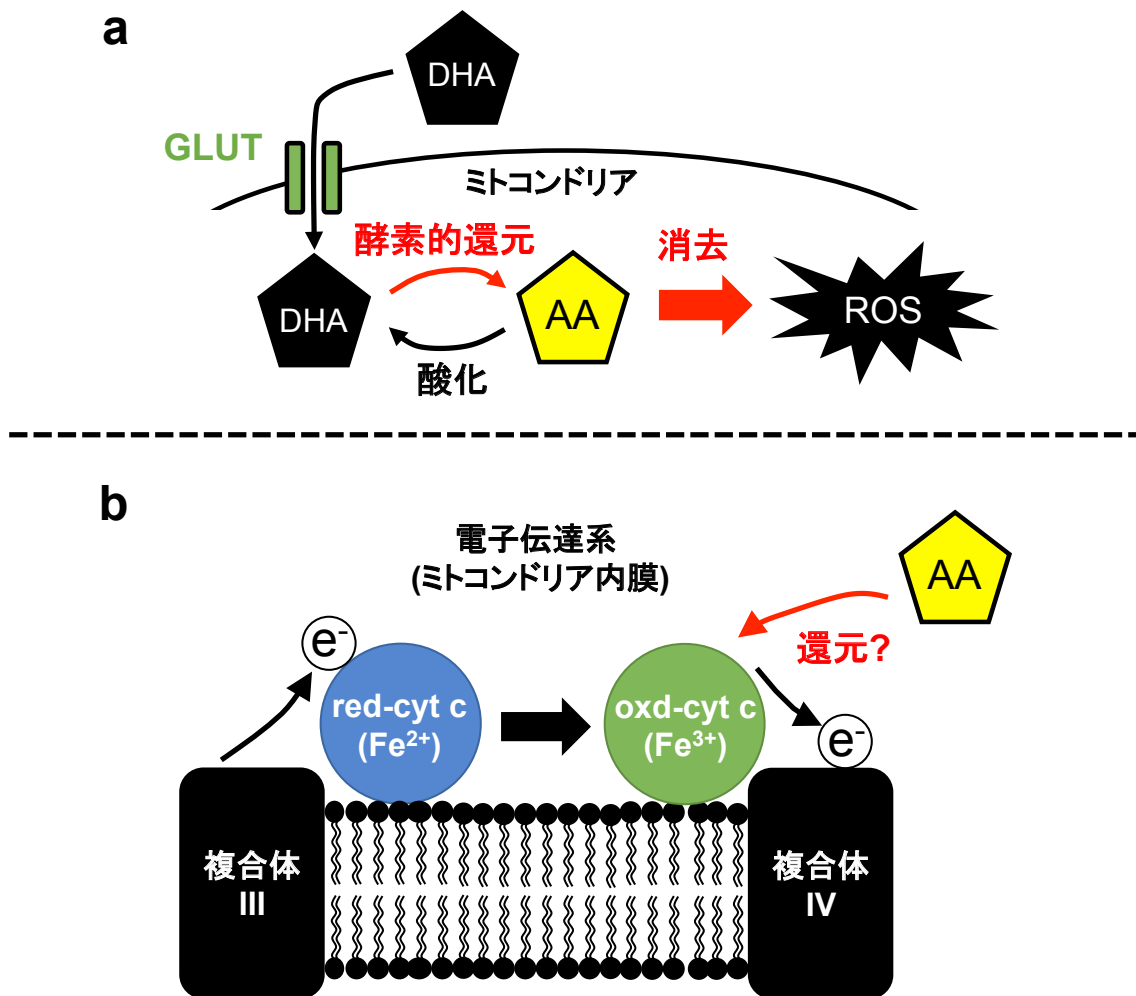


Figure 4-8. Functions of AA in mitochondria. (a) Antioxidant function of AA in mitochondria. (b) non-antioxidant function of AA in mitochondrial electron transfer chain.

第5章 結論

水溶性ビタミンの一種、ビタミンCとして知られるL-ascorbic acid (AA)は生合成が不可能なヒトを含む一部の生物にとって日々の摂取が必要不可欠な物質であり、その生理作用は抗壊血病作用、抗酸化作用、免疫賦活作用など多種多様である。しかしながら、意外にもAAの生理作用の作用点や作用メカニズムは未解明な部分が多い。その理由として、AAは熱や光などに対して非常に不安定な性質を有することが考えられる。不安定なAAは*in vitro*系では速やかに酸化されて活性を失うため、ヒトやマウスの*in vivo*系で明らかとなっているAAの生理作用をメカニズム解明に有効な*in vitro*系で再現することが困難である。従って、このようなAAの欠点を改善すべく、数種類のAAの安定型誘導体が開発されている。安定型AA誘導体の一つである2-O- α -D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid (AA-2G)はAAよりも安定であり、かつ代謝によりAAを遊離する性質を有する。このような性質からAA-2Gを使用することで、AAの生理作用メカニズムが明らかとなる場合もある。従って、安定型AA誘導体は*in vitro*系における、AAの生理作用のメカニズムの解明に有効な場合もある。また、AAの生理作用の一つである抗壊血病作用は生体内のコラーゲン合成を促進することにより示す作用である。この作用において、AAはAA特異的輸送体であるSVCTを介した細胞内への輸送の後、コラーゲン合成に関与するprolyl-hydroxylase (PHase)の活性中心の還元を行う必要がある。この際、SVCTを介した細胞内へのAAの輸送にはS配置の5位水酸基、輸送されたAAのPHaseの還元にはエンジオールラクトン構造が重要となる。この事実からAAの抗壊血病作用はSVCT、PHaseというAA標的タンパク質が関与していることを示し、多種多様なAAの生理作用を考慮すれば、その他にもAA標的タンパク質が存在する可能性は高い。また、このようなAA標的タンパク質を探索、同定することにより、未知なるAAの作用点、作用メカニズムの手がかりを得る可能性が高い。従って、本研究ではAAのような低分子化合物の標的タンパク質を探索する生化学的手法の一つであるアフィ

ニティークロマトグラフィーに着目した。この手法では低分子化合物をリガンドとして固定化したアフィニティーゲルを用いて、リガンドと親和性を示すタンパク質の精製が可能である。しかし、不安定な分子であるためか、AAをリガンドとして固定化したアフィニティーゲル(AA-ゲル)はこれまでに報告されていない。従って、本研究ではAAの生理作用メカニズム解明の手がかりを得るため、AAをリガンドとして固定化したAA-ゲルを作製し、このゲルを用いてAA標的タンパク質の探索、同定を行った。また、同定したタンパク質とAAの親和性などについても検討した。

第2章ではAAの固定化位置が異なる2種のAA-ゲルの設計、作製を行った。次に、作製したAA-ゲルのリガンドの固定化及び安定性の確認、またモデルタンパク質を用いた親和性や再利用性の評価を行った。AAの特徴的な化学構造としてAAのS配置の5位水酸基、エンジオールラクトン構造、生理条件下で解離した3位水酸基があり、これらの特徴的な化学構造をタンパク質から認識させる必要がある。また、不安定なAAをアフィニティーゲルへの固定化と同時に安定化する必要もある。これらを考慮した場合、AAの2位もしくは6位よりアフィニティーゲルに固定化することが望ましいと考えた。そこで、AAのアフィニティーゲルへの固定化を行うべく、まずAAを出発物質として、AAの2位アミノ化した誘導体(AA誘導体**3**)とAAの2位をメチル化し、6位をアミノ化した誘導体(AA誘導体**7**)を合成した。次に、これらAA誘導体**3**及び**7**をアミド結合により、アフィニティーゲルに固定化し、AAの2位から固定化したアフィニティーゲル(AA-ゲル**4**)及びAAの6位から固定化したアフィニティーゲル(AA-ゲル**8**)を作製した。作製したAA-ゲルの固定化及び安定性を確認するため、AA-ゲル**4**及び**8**のモデル化合物をそれぞれ合成した。その結果、合成したモデル化合物とAA-ゲル**4**及び**8**のUVスペクトルパターンがほぼ一致したことから、リガンドの固定化を確認した。また、モデル化合物の水溶液中の安定性試験の結果より、作製したAA-ゲルに固定化されたリガンドは安定であることが示唆された。更に、AAやAA類似体を特異的に酸化する酵素であるアスコルビン酸オキシダーゼ(AO)を用いて、AA-ゲル**4**及び**8**に対する親和性を検討したところ、AA-ゲル**8**に特異的な親和性を示した上、この結果はAOの性質と一致する結果となった。また、

この結果は3回の繰り返し実験を通じて同様の結果が得られた。以上より、作製した2種のAA-ゲルはAA標的タンパク質の探索に利用可能であり、少なくとも3回は再利用可能であることが明らかとなった。

第3章では第2章で作製、評価した2種類のAA-ゲルを用いて、マウスの組織中からAA標的タンパク質を探索した。タンパク質の探索を行うマウスの組織はAAと関連する可能性のある、脳、肝臓、腎臓、精巣、脾臓及び血清とした。10週齢の雄性マウスより摘出した各組織のホモジネートをカラムに充填したAA-ゲルに供し、吸着タンパク質を溶出した。吸着タンパク質をSDS-PAGE、銀染色により確認したが、AA-ゲルに特異的に吸着するタンパク質を見出すことができなかった。そこで、AA濃度が高い組織である脳に着目して、銀染色よりも微量のタンパク質を比較解析が可能なnanoLC-MS/MSによるショットガンプロテオミクスで解析した。その結果、脳よりAA-ゲルに親和性を示すタンパク質として、シトクロム c (cyt c) を検出した。

第4章では第3章で同定したcyt cに対するAAの親和性と機能性の検討を行った。Cyt cは活性中心の鉄イオンの酸化還元状態により酸化型cyt c (oxd-cyt c、 Fe^{3+})及び還元型cyt c (red-cyt c、 Fe^{2+})の2種類がある。そこで、2種のAA-ゲルに対するウシ心筋由来のoxd-cyt c及びred-cyt cの親和性を検討したところ、oxd-cyt cに対して2種のAA-ゲルが特異的な親和性を示すことが明らかとなった。また、oxd-cyt cは酸化型と還元型でわずかに立体構造が異なることが報告されている。驚くべきことに本研究で作製した2種のAA-ゲルは還元状態の違いによるわずかな立体構造の差を認識していることが示唆された。一方で、2種のAA-ゲルに対するoxd-cyt cの特異的な親和性は必ずしもAAに対するoxd-cyt cの親和性を示すものではない。そこで、AAに対するoxd-cyt cの親和性を検討するため、AA及びAAの2位メチル化誘導体(AA誘導体**5**)を競合剤として添加した時の2種のAA-ゲルに対するoxd-cyt cの親和性を検討した。また、AAとヒト由来oxd-cyt cのドッキングシミュレーションも実施した。AA及びAA誘導体**5**を競合剤として添加した結果、2種のAA-ゲルに対するoxd-cyt cの親和性は低下した。またAAとヒト由来oxd-cyt cのドッキングシミュレーションの結果、oxd-cyt cの表面上でLys22、His26、Arg38と水素結合している

可能性が示された。これらの結果から、AAに対してoxd-cyt cは特異的な親和性を示すことが示唆された。また、oxd-cyt cに対して、AAを含む種々の還元剤が還元することは知られているが、その還元効率の比較はこれまでに行われていない。そこで、oxd-cyt cに対するAAの特異的な親和性と還元性の関係を明らかにするため、AAとその他還元剤(6-Amino-AA、Trolox、DTT及びGSH)を用いて、oxd-cyt cの活性中心のFe³⁺に対する還元速度を比較した。その結果、AAは他の還元剤よりも高い還元速度を示した。また、FRAP assayによりoxd-cyt cに配位していない遊離のFe³⁺に対するAAとその還元剤の還元力を比較した。その結果、GSHを除くほとんどの還元剤がAAとほぼ同等の還元力を示した。これらの結果からAAのoxd-cyt cに対する効率的な還元は単なるFe³⁺に対する還元力でなく、oxd-cyt cに対するAAの特異的な親和性が関与していることが示唆された。

本研究より、AAの未知の作用点、作用メカニズムの解明の手がかりを得るべく、AAの標的タンパク質を探索するツールとして新たに2種のAA-ゲルを作製した。作製した2種のAA-ゲルを使用することでマウス脳よりAAの標的タンパク質候補としてcyt cを同定し、また、AAはoxd-cyt cを他の還元剤よりも効率的に還元することが明らかとなった。Cyt cはミトコンドリアでエネルギー産生に関与する。従って、本研究の結果からAAがミトコンドリア内でoxd-cyt cを還元し、エネルギー産生に影響を与えている可能性が示唆された。将来的に本研究で作製した2種のAA-ゲルを用いて、細胞などの様々な生体試料からAAの標的タンパク質を探索、同定することで、更なるAAの生理作用メカニズムの解明に繋がることを期待している。

参考文献

Andrews, G. C., 5,6-Anhydro-L-ascorbic acid. A reactive intermediate for the formation of 6-substituted derivatives of L-ascorbic acid, *Carbohydr Res.*, **134**, 321-326 (1984).

Akesue, T., Kawakubo, H., Hayashida, T., Tsutsui, M., Miyao, K., Fukuda, K., Nakamura, R., Takahashi, T., Wada, N., Takeuchi, H. and Kitagawa, Y., Downregulation of cytochrome *c* oxidase 1 induced radioresistance in esophageal squamous cell carcinoma, *Oncol. Lett.*, **14**, 4220-4224 (2017).

Bock, K., Lundt, I. and Pedersen, C., The preparation of some bromodeoxy- and deoxy-hexoses from bromodeoxyaldonic acids, *Carbohydr Res.*, **68**, 313-319 (1979).

Benzie, I. F. F. and Strain, J. J., The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay, *Anal. Biochem.*, **239**, 70-76 (1996).

Banci, L., Bertini, I., Gray, H. B., Luchinat, C., Redding, T., Rosato, A. and Turano, P., Solution structure of oxidized horse heart cytochrome *c*, *Biochemistry*, **36**, 9867-9877 (1997).

Bartholomew, M., James Lind’s Treatise of the Scurvy (1753), *Postgrad. Med. J.*, **78**, 695-696 (2002).

Bowman, S. E. J. and Bren, K. L., The chemistry and biochemistry of Heme *c*: Functional bases for covalent Attachment, *Nat. Prod. Rep.*, **25**, 1118-1130 (2008).

Cai, J., Yang, J. and Jones, D. P., Mitochondrial control of apoptosis: the role of cytochrome *c*, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1366**, 139-149 (1998).

Carr, A. C. and Frei, B., Toward a new recommended dietary allowance for vitamin C based on antioxidant and health effects in humans, *Am. J. Clin. Nutr.*, **69**, 1086-1107 (1999).

Castro, M. A., Beltrán, F. A., Brauchi, S. and Concha, I. I., A metabolic switch in brain: glucose and lactate metabolism modulation by ascorbic acid, *J. Neurochem.*, **110**, 423-440 (2009).

Carr, A. C. and Maggini, S., Vitamin C and immune function, *nutrients*, **9**, 121 (2017).

Ermakova, S., Choi, B. Y., Choi, H. S., Kang, B. S., Bode, A. M. and Dong, Z., The intermediate filament protein vimentin is a new target for epigallocatechin gallate, *J. Biol. Chem.*, **280**, 16882-16890 (2005).

Frei, B., Stocker, R. and Ames, B. N., Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 9748-9752 (1988).

Fiorani, M., Azzolini, C., Cerioni, L., Scotti, M., Guidarelli, A., Ciacci, C. and Cantoni, O., The mitochondrial transporter of ascorbic acid functions with high affinity in the presence of low millimolar concentrations of sodium and in the absence of calcium and magnesium, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1848**, 1393-1401 (2015).

Grollman, A. P. and Lehninger, A. L., Enzymic synthesis of L-ascorbic acid in different animal species, *Arch. Biochem. Biophys.*, **69**, 458-467 (1957).

Goldman, H. M., Gould, B. S. and Munro, H. N., The antiscorbutic action of L-ascorbic acid and D-isoascorbic acid (erythorbic acid) in the guinea pig, *Am. J. Clin. Nutr.*, **34**, 24-33 (1981).

Hirst, E. L. and Zilva, S. S., Ascorbic acid as antiscorbutic factor, *Biochem. J.*, **27**, 1271-1278 (1933).

Harrison, F. E. and May, J. M., Vitamin C function in the brain: vital role of the ascorbate transporter SVCT2, *Free Radic. Biol. Med.*, **46**, 719-730 (2009).

Ichiyama, K., Mitsuzumi, H., Zhong, M., Tai, A. and Tsuchioka, A., S. Kawai, I. Yamamoto and E. Gohda, Promotion of IL-4- and IL-5-dependent differentiation of anti-mu-primed B cells by ascorbic acid 2-glucoside. *Immunol. Lett.*, **122**, 219-226 (2009).

Imai, M., Saio, T., Kumeta, H., Uchida, T., Inagaki, F. and Ishimori, K., Investigation of the redox-dependent modulation of structure and dynamics in human cytochrome c, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **469**, 978-984 (2016).

Kurata, T., Fujimaki, M. and Sakurai, Y., Red pigment produced by the oxidation of L-scorbamic acid, *J. Agric. Food Chem.*, **21**, 676-680 (1973).

Kurata, T., Yu, R. and Arakawa, N., Some aspects of the role of ascorbic acid in proline hydroxylation, *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 2299-2301 (1987).

Kato, K., Terao, S., Shimamoto, N. and Hirata, M., Studies on scavengers of active oxygen species. 1. Synthesis and biological activity of 2-O-alkylascorbic acids, *J. Med. Chem.*, **31**, 793-798 (1988).

Kimura, Y., Yamatsugu, K., Kanai, M., Echigo, N., Kuzuhara, T., Shibasaki, M. Design and synthesis of immobilized Tamiflu analog on resin for affinity chromatography, *Tetrahedron Lett.*, **50**, 3205-3208 (2009).

Kipp, D. E. and Schwarz, R. I., Effectiveness of isoascorbate versus ascorbate as an inducer of collagen synthesis in primary avian tendon cells, *J. Nutr.*, **120**, 185-189 (1990).

Lee, Y. C., Huang, H. Y., Chang, C. J., Cheng, C. H. and Chen, Y. T., Mitochondrial GLUT10 facilitates dehydroascorbic acid import and protects cells against oxidative stress: mechanistic insight into arterial tortuosity syndrome, *Hum. Mol. Genet.*, **19**, 3721-3733 (2010).

Mitsuzumi, H., Kusamiya, M., Kurimoto, T. and Yamamoto, I., Requirement of cytokines for augmentation of the antigen-specific antibody responses by ascorbate in cultured murine T-Cell-depleted splenocytes, *Jpn. J. Pharmacol.*, **78**, 169-179 (1998).

Mandl, J., Szarka, A. and Bánhegyi, G., Vitamin C: update on physiology and pharmacology, *Br. J. Pharmacol.*, **157**, 1097-1110 (2009, a).

Mari', M., Morales, A., Colell, A., Garcí'a-Ruiz, C. and Ferná'ndez-Checa, J. C., Mitochondrial glutathione, a key survival antioxidant, *Antioxid. Redox. Sign.*, **11**, 2685-2700 (2009, b).

Muñoz-Montesino, C., Roa, F. J., Peña, E., González, M., Sotomayor, K., Inostroza, E., Muñoz, C. A., González, I., Maldonado, M., Soliz, C., Reyes, A. M., Vera, J. C. and Rivas, C. I., Mitochondrial ascorbic acid transport is mediated by a low-affinity form of the sodium-coupled ascorbic acid transporter-2, *Free Radic. Biol. Med.*, **70**, 241-254 (2014).

Nomura, H., Ishiguro, T. and Morimoto, S., Studies on L-ascorbic acid derivatives. II. L-Ascorbic acid 3-phosphate and 3-pyrophosphate, *Chem. Pharm. Bull.*, **17**, 381-386 (1969).

Niki, E., Saito, T., Kawakami, A. and Kamiya, Y., Inhibition of oxidation of methyl linoleate in solution by Vitamin E and Vitamin C, *J. Biol. Chem.*, **259**, 4177-4182 (1984).

Pulido, R., Bravo, L. and Saura-Calixto, F., Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay, *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 3396-3402 (2000).

Rehm, H. and Lazdunski, M., Purification and subunit structure of a putative K⁺-channel protein identified by its binding properties for dendrotoxin I, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 4919-4923 (1988).

Svirbely, J. L. and Szent-Györgyi, A., The chemical nature of vitamin C, *Biochem. J.*, **26**, 865-870 (1932).

Scarpa, M., Rigo, A., Maiorino, M., Ursini, F. and Gregolin, C., Formation of alpha-tocopherol radical and recycling of alpha-tocopherol by ascorbate during peroxidation of phosphatidylcholine liposomes. An electron paramagnetic resonance study, *Biochim. Biophys. Acta*, **801**, 215-219 (1984).

Sagun, K. C., Carcano, J. M. and Golde, D. W., Vitamin C enters mitochondria via facilitative glucose transporter 1 (Glut1) and confers mitochondrial protection against oxidative injury, *FASEB J.*, **19**, 1657-1667 (2005).

Savini, I., Rossi, A., Pierro, C., Avigliano, L. and Catani, M. V., SVCT1 and SVCT2: key proteins for vitamin C uptake, *Amino Acids*, **34**, 347-355 (2008).

Sarewicz, M. and Osyczka, A., Electronic connection between the quinone and cytochrome *c* redox pools and its role in regulation of mitochondrial electron transport and redox signaling, *Physiol. Rev.*, **95**, 219-243 (2015).

Tschank, G., Sanders, J., Baringhaus, K. H., Dallacker, F., Kivirikko, K. I. and Günzler, V., Structural requirements for the utilization of ascorbate analogues in the prolyl 4-hydroxylase reaction, *Biochem. J.*, **300**, 75-79 (1994).

Tsukaguchi, H., Tokui, T., Mackenzie, B., Berger, U. V., Chen, X. Z., Wang, Y., Brubaker, R. F. and Hediger, M. A., A family of mammalian Na⁺-dependent L-ascorbic acid transporters, *Nature*, **399**, 70-75 (1999).

Uga, H., Chikanori, K., Ohta, A., Tsuboi, Y., Tanaka, H., Hatakeyama, M., Yamaguchi, Y., Takahashi, T., Kizaki, M. and Handa, H., A new mechanism of methotrexate action revealed by target screening with affinity beads, *Mol. Pharmacol.*, **70**, 1832-1839 (2006).

Willimott, S. G., The vitamins of orange juice, *Biochem. J.*, **22**, 67-76 (1928).

Williams, N. H. and Yandell, J. K., Reduction of oxidized cytochrome c by ascorbate ion, *Biochim. Biophys. Acta*, **810**, 274-277 (1985).

Wimalasena, K., Dharmasena, S. and Wimalasena, D. S., Ascorbate based novel high affinity alternate reductants and competitive inhibitors of dopamine β -monooxygenase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **200**, 113-119 (1994).

Wu, C. C., Dorairajan, T. and Lin, T. L., Effect of ascorbic acid supplementation on the immune response of chickens vaccinated and challenged with infectious bursal disease virus, *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **74**, 145-152 (2000).

Yamamoto, I., Muto, N., Nagata, E., Nakamura, T. and Suzuki, Y., Formation of a stable L-ascorbic acid α -glucoside by mammalian α -glucosidase-catalyzed transglucosylation, *Biochim. Biophys. Acta*, **1035**, 44-50 (1990).

Yazama, F., Furuta, K., Fujimoto, M., Sonoda, T., Shigetomi, H., Horiuchi, T., Yamada, Nagao, M. and Maeda, N., Abnormal spermatogenesis in mice unable to synthesize ascorbic acid, *Anat. Sci. Int.*, **81**, 115-125 (2006).

Zaidi, S., Hassan, M. I., Islam, A. and Ahmad, F., The role of key residues in structure, function, and stability of cytochrome-c *Cell. Mol. Life Sci.*, **71**, 229-255 (2014).

日本人の食事摂取基準(2015年版), 厚生労働省(2014).

村田 晃, ビタミンCの発見と新展開, *Vitamins (Japan)*, **73**, 95-98 (1999).

論文目録

主参考論文

Y. Iwaoka, K. Nishino, T. Ishikawa, H. Ito, Y. Sawa and A. Tai, Affinity resins as new tools for identifying target proteins of ascorbic acid, *Analyst*, **143**, 874-882 (2018).

副参考論文

(1)A. Tai, Y. Iwaoka, T. Mori and H. Ito, Protease-catalyzed monoacylation of 2-*O*- α -D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid in three solvent systems, *Biosci. Biotechnol. and Biochem.*, **74**, 1969-1971 (2010).

(2)A. Tai, Y. Iwaoka and H. Ito, Regioselective monoacylation of 2-*O*- α -D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid by a polymer catalyst in *N,N*-dimethylformamide. *Carbohydr. Res.*, **346**, 2511-2514 (2011).

(3)A. Tai, Y. Iwaoka and H. Ito, Highly efficient and regioselective production of an erythorbic acid glucoside using cyclodextrin glucanotransferase from *Thermoanaerobacter* sp. and amyloglucosidase., *J. Mol. Catal. B: Enzymatic.*, **92**, 19-23 (2013).

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始懇切丁寧なご指導ご鞭撻賜りました県立広島大学生命環境学部生命科学科 田井章博教授に心より感謝致します。

本論文をご精読頂き有用な指摘を頂きました県立広島大学生命環境学部 野下俊朗教授、齋藤靖和教授、青柳充准教授に深く感謝致します。

本研究におけるAA誘導体の構造解析を行って頂きました岡山県立大学保健福祉学部 伊東秀之教授、タンパク質の解析やご助言などを賜りました島根大学生物資源科学部 石川孝博教授及び西野耕平博士並びにAAとタンパク質のドッキングシミュレーションを行って頂きました島根大学 研究推進室 シニアURA 澤嘉弘特任教授に深く感謝致します。

最後に本研究の基礎を築いて頂いた永見亜門氏並びに多方面でご協力頂きました県立広島大学生体機能化学研究室の皆様へ感謝致します。