

Award Accounts

第4回 D-アミノ酸学会奨励賞

結合型 D-アミノ酸が引き起こす水晶体 構成蛋白質の機能変化

高田 匠

東京薬科大学 薬学部

1. はじめに

従来から、我々の体を構成するタンパク質は L-アミノ酸のみで構成され、生命体が生きている間に変化することはないと考えられてきた。しかし近年、加齢に応じて発症する白内障、アルツハイマー病、動脈硬化症など加齢性疾患組織内のタンパク質凝集部位にタンパク質結合型 D-アミノ酸(主として D-Asp)が発見されてきた(1-4)。これら生体内タンパク質結合型の D-Asp 形成は加齢に応じた非酵素的な異性化反応の結果である。すなわち、生体内において代謝速度が非常に遅い器官、例えば眼の水晶体などでは体温程度の温度で時間とともにタンパク質中の Asp 残基が化学的に異性化し、タンパク質の構造変化と組織の機能低下を引き起こす。また、これらの異性化率はある程度、アミノ酸配列及びタンパク質の立体構造に依存することが報告されている(5, 6)。以上のようなタンパク質結合型の D-Asp は、生体内において器官の機能存続期間と相関する分子時計とみなされており、迅速に定量することのできる分析法と、異性化 Asp が誘起する詳細なタンパク質の構造と機能変化の解明が待たれる。

現在までに様々な生体内結合型 D-Asp 解析法が報告されているが、それらの包括的な一斉解析法は目的タンパク質内に多数存在する全 Asp 残基から、目的とする D-Asp 一残基の同定と、その分析を行うには長時間を要する。さらに、これらタンパク質中での結合型 D-Asp 形成は組織の機能低下や疾病の原因と関連すると考えら

れているが、実際に形成した結合型 D-Asp がそのタンパク質の生化学的性質や機能にどのような影響を及ぼすのかに関して直接的な検証を行った報告はほとんどない。そこで、著者らは、ヒト高齢者の眼の水晶体をモデル組織とし、その主要構成タンパク質であるクリスタリン中での結合型 D-Asp を網羅的に検知する分析手法の開発を行いながら、結合型 D-Asp 形成が実際に水晶体機能に及ぼす影響について検討してきた。それらの概要と結果を以下の実験 1-3 として紹介する。

実験 1. 生体内タンパク質中結合型 D-Asp 残基一斉解析法の開発

我々のグループは、これまで、水晶体主要構成タンパク質、 α A-クリスタリン中の部分配列中、Asp 残基部位を D- β -Asp に置換し、本配列を 3 回繰り返したリピートペプチドを抗原として作成した D- β -Asp 含有タンパク質認識抗体を用いて生体内での結合型 D- β -Asp 含有タンパク質の網羅的解析を進めてきた。しかしながら、ポリクローナル抗体による検出は簡便ではあるが、定性的であり、さらに、D- β -Asp 含有タンパク質の同定作業及び各異性化部位の同定作業を行うためにはタンパク質の同定、ペプチドマッピング、ペプチド水解物の異性体分析という煩雑な作業を行わなければならないという欠点があった(7-10)。しかし近年、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)と質量分析装置(MS/MS)を用いることでこれらの欠点を補いつつ、さらに高感度で

タンパク質中 Asp 異性体を同定する手法が藤井らにより報告された(図 1)(11)。この手法ではアミノ酸配列情報を必須とするものの、配列情報が既知であるタンパク質に関しては該当タンパク質中の結合型 D-β-Asp 部位を高感度に同定することができる。

本手法はマイクログラムレベルの試料中、タンパク質 トリプシン消化物 分子量選択によるペプチド抽出

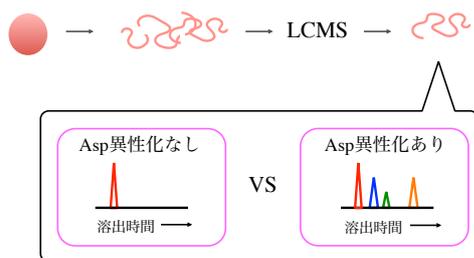


図1) 異性化Asp一斉解析法の概要

フェムトモルレベルのタンパク質中の Asp 異性体を見出すことを可能にした。

しかしながら、最終的に 4 種に分離する Asp 異性体(L-α-Asp、L-β-Asp、D-α-Asp、D-β-Asp)含有ペプチドを、それぞれ同定するために各 Asp 異性体を含む合成コントロールペプチドを用いた確認実験を必要とする。そこで、生体内結合型 D-β-Asp 網羅的解析においてボトルネックとなるこのステップを省略するため、我々は、加齢組織中のタンパク質をトリプシン消化後、質量分析装置に導入する直前、さらに 3 種の各 Asp 異性体認識酵素で処理することでタンパク質中の Asp 異性化部位を、より迅速に分析する方法を開発した(12)(図 2)。

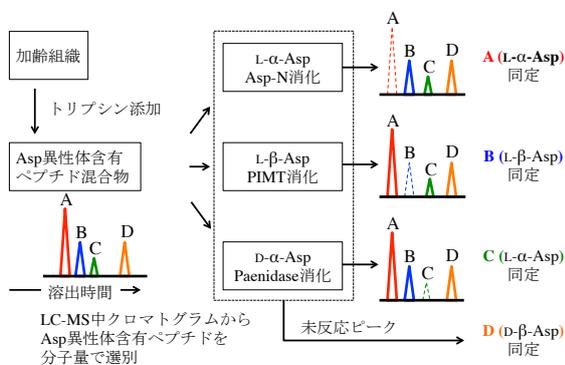


図2) 4種の酵素を用いたタンパク質結合型D-Asp一斉分析法

従来の煩雑な実験ステップを省略できる本手法では LC-MS と市販酵素のみを用いることで、精度良く D-Asp 異性化率を定量することが可能であることから、D-Asp 含有タンパク質を、より簡便な加齢疾患マーカーとして用いることが可能になった。

本手法を加齢後の水晶体の一斉解析に用いて得られた結果を表 1 に示す(12)。一度の解析で加齢後組織(水晶体)中、複数のタンパク質中混合物中から多数の異性化 Asp 部位とその異性化率を同定することが可能であった。

表1) 加齢後の水晶体構成タンパク質内Asp異性化部位

蛋白質	位置	ペプチド配列	ピーク数
αAcrySTALLIN	55-65	TVLDSGISEVR	4
	79-88	HFSPEDLTVK	4
	89-99	VQDDFVEIHGK	3
	104-112	QDDHGYISR	3
αBcrystallin	146-157	IQTGLDATHAER	4
	57-69	APSWFDTGLSEMRR	4
β2crystallin	108-116	QDEHGFISR	3
βScrySTALLIN	89-100	RTDSLSSLRPIK	2
β3crystallin	72-78	WMGLDDR	2
βA3crystallin	33-44	ITIYDQEDFQGK	2
	96-109	WDAWSGSDAYHIER	2
βA4crystallin	13-24	MVVWDEDGFQGR	4

D: Asn残基の脱アミド化により生じたAsp残基

実験 2. D-Asp 形成と α-クリスタリン会合体形成能の関係

水晶体を構成するタンパク質は主として、α-、β-、γ-クリスタリンである。各単量体の分子量はおよそ 2 万であり、α-クリスタリンは通常 40 量体、β-クリスタリンは 2-10 量体の会合体状態を取るいっぽうで、γ-クリスタリンは単量体として存在する。各年代の水晶体中クリスタリンをゲル濾過によってサイズ別に分離後(図 3)、それぞれのクリスタリン画分を LC-MS/MS で分析したところ、本来ヘテロ会合体であるはずの αA-、αB-

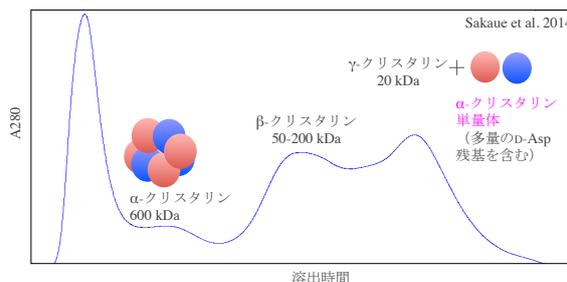


図3) 加齢後の水晶体可溶性画分ゲルろ過クロマトグラフィー図

クリスタリンが γ -クリスタリン画分に単量体として混在していることが明らかになった(13, 14)。これらは、ゲル濾過結果を観察しただけでは判断不可能であるが、微量試料中の Asp 異性化率解析を長所とする前述手法に用いることで評価が可能であった。

実際に分析、評価したところ、これら α -クリスタリン単量体中に見出された異性化 Asp の割合は加齢に応じて増加しており、さらに、その異性化率が水晶体不溶性画分のものと同様であった(14)(図 4)。

以上のように、 α -クリスタリン中に D-Asp が

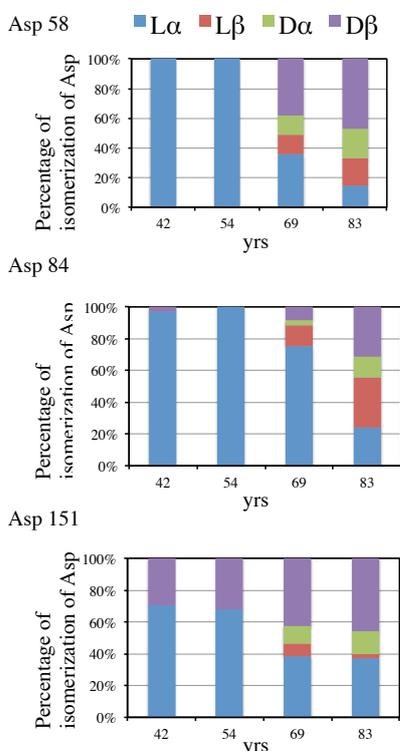


図4) 年齢別 α -クリスタリン単量体中 Asp異性化率の推移

形成されると会合体形成能が失われ、 α -クリスタリンが不溶化することが示唆された。しかし、これまで α -クリスタリンの立体構造が未知なため、これらの Asp の異性化部位と構造との相関性は確認されてはいない。

実験 3. 結合型 D-Asp 形成とタンパク質の機能変化

α -クリスタリンは巨大な会合体状態を維持しつつ、その分子シャペロン機能を発揮することで長期間、水晶体の透明性維持に寄与する。上述したように α -クリスタリンを構成する α A-, α B-サブユニット中の D-Asp 形成と、それに伴う α -クリスタリンサブユニット乖離や不溶化との相関性が示唆されたが、D-Asp を挿入したタンパク質を人為的に作成することは技術的に困難なため、そのようなサンプルを作出し、その機能を調べるという直接的な証明には至っていない。そこで、本研究では上記実験において α B-クリスタリン単量体中に見られた 96 番目の異性化 Asp 残基に着目し、類似配列(KLKVLGDVIEV; 以下 α B-P)中の Asp 残基を 4 種の Asp 異性体(L- α -Asp、L- β -Asp、D- α -Asp、D- β -Asp)に置き換え、化学合成したペプチドを作成し、結合型 D-Asp 形成がポリペプチド構造や機能に与える影響を検討した。その結果、D- β -Asp 含有 α B-P のみが pH 依存的に凝集することが明らかとなった(図 5)。

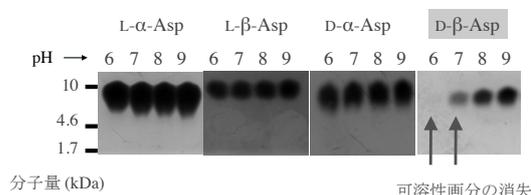


図5) D- β -Asp含有ペプチドが有する pH依存的凝集能

また興味深いことに、本ペプチドのみが若年齢ヒトより抽出、精製した α -クリスタリンに対する凝集誘導能を有することが明らかになった(図 6)。以上の結果は α -クリスタリン中での D-Asp 形成が α -クリスタリンの分子シャペロン機能を低下させ、白内障発症の一因となる可能性を示した。

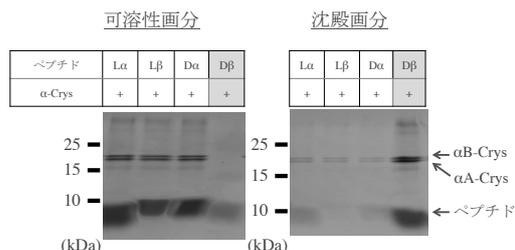


図6) D- β -Asp含有ポリペプチドは α -クリスタリン凝集を誘起する

3. おわりに

生体内の D-アミノ酸は遊離型（生体内、又は食品など）、ペプチド型（薬品など）を問わず知られておりライフサイエンスの一部として捉えられている(15-19)。しかしタンパク質結合型 D-アミノ酸が担う生化学的機能に関する詳細な報告は少ない。これらは微量成分である D-アミノ酸の化学的、物理的性質が L-アミノ酸と同一であるが故に分析法が限られること、タンパク質中への D-アミノ酸導入法が存在しないことに起因する。つまり、アミノ酸光学異性体分析の困難さが、多分野の研究者にとって D-アミノ酸研究参画に対する障壁となっていた。我々のグループは加齢後の組織内（水晶体内）における結合型 D-アミノ酸のスクリーニング手法の開発と、形成された D-Asp が誘起するタンパク質の機能低下及び加齢性疾患（白内障など）発症との関連性を明らかにしてきた。おそらく、生体内タンパク質中での Asp 異性化はタンパク質内 Asp 残基周囲の構造が比較的緩い部位において生じ易い。そして Asp 異性化の結果、誘起されるポリペプチド主鎖伸長や側鎖反転がタンパク質表面又は内部の荷電状態、局所的構造変化などを引き起こし、局所的な相互作用変化を経て加齢後組織の機能を低下させると考えている。

我々が開発、改良を進めている結合型 Asp 異性体一斉同定法は、様々なタンパク質会合体に対して応用可能であり、他の分離方法と組み合わせることで、より多様な試料に応用することが可能である。様々な分野にわたる研究者が D-アミノ酸研究に参画し、D-アミノ酸研究が、益々隆盛をきわめること、また、加齢性疾患治療分野での大きな進歩に寄与することを心より期待している。

謝 辞

本稿で紹介した研究成果は、京都大学原子炉実験所・放射線生命科学研究所・放射線機能生化学研究分野の皆様の協力の下に得られたものである。

文 献

- 1) Fisher GH, Garcia NM, Payan IL, Cadilla-Perezrios R, Sheremata WA, Man EH. D-aspartic acid in purified myelin and myelin basic protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 1986;135(2):683-7.
- 2) Masters PM, Bada JL, Zigler JS, Jr. Aspartic acid racemisation in the human lens during ageing and in cataract formation. *Nature.* 1977;268(5615):71-3.
- 3) Powell JT, Vine N, Crossman M. On the accumulation of D-aspartate in elastin and other proteins of the ageing aorta. *Atherosclerosis.* 1992;97(2-3):201-8.
- 4) Roher AE, Lowenson JD, Clarke S, Wolkow C, Wang R, Cotter RJ, et al. Structural alterations in the peptide backbone of beta-amyloid core protein may account for its deposition and stability in Alzheimer's disease. *J Biol Chem.* 1993;268(5):3072-83.
- 5) Fujii N, Harada K, Momose Y, Ishii N, Akaboshi M. D-amino acid formation induced by a chiral field within a human lens protein during aging. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;263(2):322-6.
- 6) Fujii N, Kawaguchi T, Sasaki H, Fujii N. Simultaneous stereoinversion and isomerization at the Asp-4 residue in betaB2-crystallin from the aged human eye lenses. *Biochemistry.* 2011;50(40):8628-35.
- 7) Aki K, Fujii N, Saito T, Fujii N. Characterization of an antibody that recognizes peptides containing D-beta-aspartyl residues. *Mol Vis.* 2012;18:996-1003.
- 8) Takata T, Shimo-Oka T, Kojima M, Miki K, Fujii N. Differential analysis of D-beta-Asp-containing proteins found in normal and infrared irradiated rabbit lens. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;344(1):263-71.
- 9) Takata T, Shimo-Oka T, Miki K, Fujii N. Characterization of new

D-beta-aspartate-containing proteins in a lens-derived cell line. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;334(4):1022-31.

10) Yang D, Fujii N, Takata T, Shimo-Oka T, Tajima S, Tanaka Y, et al. Immunological detection of D-beta-aspartate-containing protein in lens-derived cell lines. *Mol Vis.* 2003;9:200-4.

11) Fujii N, Sakaue H, Sasaki H, Fujii N. A rapid, comprehensive liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS)-based survey of the Asp isomers in crystallins from human cataract lenses. *J Biol Chem.* 2012;287(47):39992-40002.

12) Maeda H, Takata T, Fujii N, Sakaue H, Nirasawa S, Takahashi S, et al. Rapid survey of four Asp isomers in disease-related proteins by LC-MS combined with commercial enzymes. *Anal Chem.* 2015;87(1):561-8.

13) Sakaue H, Takata T, Fujii N, Sasaki H, Fujii N. Alpha B- and betaA3-crystallins containing d-aspartic acids exist in a monomeric state. *Biochim Biophys Acta.* 2015;1854(1):1-9.

14) Takata T, Fujii N. Isomerization of Asp residues plays an important role in alphaA-crystallin dissociation. *FEBS J.* 2015.

15) Heck SD, Siok CJ, Krapcho KJ, Kelbaugh PR, Thadeio PF, Welch MJ, et al. Functional consequences of posttranslational isomerization of Ser46 in a calcium channel toxin. *Science.* 1994;266(5187):1065-8.

16) Kato S, Ishihara T, Hemmi H, Kobayashi H, Yoshimura T. Alterations in D-amino acid concentrations and microbial community structures during the fermentation of red and white wines. *J Biosci Bioeng.* 2011;111(1):104-8.

17) Montecucchi PC, de Castiglione R, Piani S, Gozzini L, Erspamer V. Amino acid composition and sequence of dermorphin, a novel opiate-like peptide from the skin of *Phyllomedusa sauvagei*. *Int J Pept Protein Res.*

1981;17(3):275-83.

18) Nagata Y, Homma H, Lee JA, Imai K. D-Aspartate stimulation of testosterone synthesis in rat Leydig cells. *FEBS Lett.* 1999;444(2-3):160-4.

19) Oliet SH, Mothet JP. Regulation of N-methyl-D-aspartate receptors by astrocytic D-serine. *Neuroscience.* 2009;158(1):275-83.



高田 匠 (たかた たくみ) 氏

略歴

1997-2001	立命館大学理工学部 応用化学
2001-2003	京都大学大学院理学研究科 化学専攻修士課程
2003-2006	京都大学大学院理学研究科 化学専攻博士課程
2006-2009	オレゴン健康科学大学 博士研究員
2009-2013	マサチューセッツ工科大学 博士研究員
2013-2015	京都大学原子炉実験所 放射線生命科学部門 博士研究員
2015-現在	東京薬科大学 助教