

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K16514

研究課題名(和文) 眼の水晶体を構成する蛋白質中で、加齢に応じ蓄積する結合型D-Aspに関する研究

研究課題名(英文) Age-related Asp Isomerizations in Lens Alpha-crystallin

研究代表者

高田 匠 (Takata, Takumi)

京都大学・原子炉実験所・特定准教授

研究者番号：80379007

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト水晶体の主要構成蛋白質であるクリスタリン(Cry)中では加齢に伴い、構成アスパラギン酸の異性化修飾(D-Asp)が蓄積する。我々はこれまで、可溶性画分中のCry内部D-Asp分布を示してきた。しかし、実際にはCryは水晶体内で様々な会合状態をとる。本研究では、これらをサイズ別に分離し、個別に内部Asp異性化率を比較し、Asp異性化がどのようにしてCry会合状態や機能へと影響を及ぼし、白内障発症へと結びつくのかを検討した。その結果、Cry単量体中のAsp異性化率が顕著であり、かつ不溶性画分中のものと類似していたことから、Asp異性化がCry単量体化および不溶化に関与する可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：The lens α -crystallin is composed of two subunits A- and B-crystallin (A-Crys and B-Crys), which form various oligomers and complexes. Recent studies have shown that many aspartyl residues (Asp) in A-Crys inverted to isomers (L-Asp, D-Asp, D-Asp) with age. It has not been well understood whether Asp isomers in native polymeric A-Crys are different from those in dissociated A-Crys or those in aggregated complexes. We therefore examined to clarify the distribution of Asp isomers in dissociated A-Crys and those in aggregated A-Crys. The results showed that the isomerization of Asp 58 in A-Crys were highly detectable from the monomeric fraction. In addition, age-dependent Asp 58 isomerization in α -Crys is similar to the ratio from lens insoluble fraction. The isomerization of Asp as well as many other modifications would reduce the normal subunit-subunit interaction of α -Crys with aging, result in senile cataract formation.

研究分野：生化学

キーワード：D-アミノ酸 クリスタリン 白内障 加齢 タンパク質異常凝集 質量分析

1. 研究開始当初の背景

近年、白内障、アルツハイマー病、動脈硬化症など加齢性の疾患組織内、異常蛋白質の凝集部位に、蛋白質結合型のD-アミノ酸（主としてD-Asp）が多量に発見されている。これら蛋白質中におけるD-Asp蓄積は加齢による非酵素的な異性化反応の結果である。L-アミノ酸の重合体である蛋白質中にD-アミノ酸が生じ、正常な蛋白質の高次構造が乱されることで不溶化や凝集が生じると考えられる。たとえば、ヒト眼の透明性維持に必須である水晶体内の α -クリスタリン蛋白質中では加齢後に結合型D-Aspの蓄積が観察されていることから、結合型D-Aspの蓄積と加齢性白内障発症との関連性が長く指摘されてきた。しかしながら、 α -クリスタリンには様々な会合形態が報告されており、どの形態の α -クリスタリンが加齢性白内障の発症に関与するのかわかりませんでした。例えば、 α -クリスタリンは通常、一定の大きさを有する会合体構造をとるが、加齢後には、それらが会合しあつた巨大凝集体構造をとる。また一方で、様々なストレスに応じた各構成サブユニット（ α A-クリスタリンまたは α B-クリスタリン）の解離も報告されている。したがって、様々な会合形態を有する α -クリスタリン中における、それぞれの会合状態に応じた異性化率の決定が急務であった。

加えて、Asp異性化のクリスタリンへ及ぼす影響も未知部分が多い。通常、クリスタリン内に生じる修飾がクリスタリンに与える影響を解明するには、修飾が見られた部位に各種修飾モデルとして該当アミノ酸を導入し、そのクリスタリンの物性を野生型と比較すればよい。しかしながら、Asp異性化に関しては技術的に異性化Aspをタンパク質中へと導入することが不可能である。それゆえ、クリスタリン蛋白質内部における、D-Asp形成のクリスタリンへの具体的影響はこれまで未知であった。

2. 研究の目的

本研究では、我々がこれまで独自に開発した迅速・簡便な異性化Asp分析法に加え、様々な分子サイズ依存的な分離手法を組み合わせることで、加齢後ヒト水晶体内で異常凝集を形成するクリスタリン分子や、解離した単量体分子のAsp異性化率を個別に比較する。これにより、クリスタリン会合体の凝集またはクリスタリン会合体からの解離に、どのようにAsp異性化が寄与しているのかを検討することを目的とした。

一方、Asp異性化がクリスタリン構造や機能に及ぼす影響を調査するため、見出したAsp部位に対して他アミノ酸への変異を導入したクリスタリン群を作成し、生化学的解析に用い、Asp異性化がクリスタリン分子に与える影響を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

- (1) 加齢後ヒト水晶体内でクリスタリン解離・会合に関与するAsp部位の同定
年齢別のヒト水晶体をホモジェナイズし、遠心分離によって可溶性画分を抽出した。可溶性画分を濃縮後にゲル濾過クロマトグラフィーへと用いて、サイズ別に分離し、凝集体、会合体、単量体それぞれの画分を個別に回収し、トリプシン消化をおこなった後、生じた消化断片をLC-MSを用いたD-Asp一斉分析に用いて、各凝集体サイズ別のクリスタリン内Asp異性化率を測定、比較した。
- (2) Asp部位変異含有クリスタリンの作成
上記で見出した α A-クリスタリン中のAsp異性化部位に、他アミノ酸を変異導入し、大腸菌を用いてリコンビナントヒト α A-クリスタリンを作成した。作成した α A-クリスタリン変異体と野生型を機能解析に用いて、該当Asp部位の重要性を評価した。機能の評価として、 α A-クリスタリンの有する分子シャペロン機能（他分子の凝集を抑制する）を測定した。基質となる蛋白質としては同じく水晶体内に存在する γ D-クリスタリンを用いた。大腸菌を用いて作成したリコンビナントヒト γ D-クリスタリンを変性剤で完全変性させた後、迅速に条件別希釈リフォールディングすることで凝集性を測定する。この際に各種 α A-クリスタリン変異体（A、B）を加え、凝集抑制能を野生型と比較した。

4. 研究成果

- (1) 加齢後水晶体内 α A-クリスタリンの会合状態とゲル濾過による分離
加齢後水晶体は分子量毎に分離することができる（図1）。凝集体（>1000 kDa）、会合体（600-800 kDa）、単量体（およそ20 kDa）内にそれぞれの α A-クリスタリンは含まれていた。これまでに、単量体画分中に顕著なAsp異性化率を有する α B-クリスタリンサブユニットの存在が報告されていたことから、同様のAsp異性化が α A-クリスタリンサブユニット中にも存在すると仮定し、単量体部分をLC-MSをベースとした微量D/L分析手法に用いた。その結果、 α A-クリスタリンのトリプシン消化後断片が単量体画分内に存在することが明らかとなり、さらに、そのAsp異性化率が年齢に応じて増加する傾向にあることが示された（図2）。

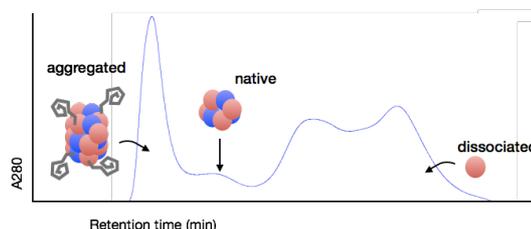


図1. 69歳ヒト水晶体のゲル濾過チャート

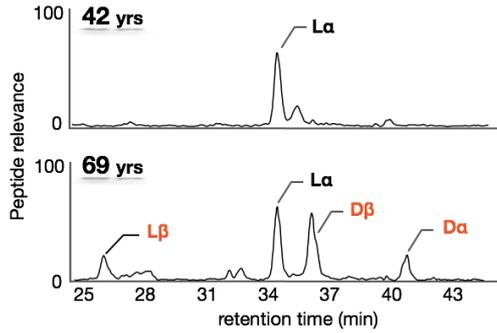


図2. 加齢後水晶体可溶性画分の単量体内における Asp58 含有ペプチド逆相分離チャート

(2) 年代別 α A-クリスタリン単量体内の Asp 異性化率

続いて、様々な年齢の加齢性白内障患者水晶体を同実験に用いて、単量体内部 Asp 異性化率を比較した (図3)。その結果、単量体内部 Asp の異性化が、総じて年齢依存的に増加していた。また、部位によっては早期から異性化が生じ、進行することも明らかとなった。

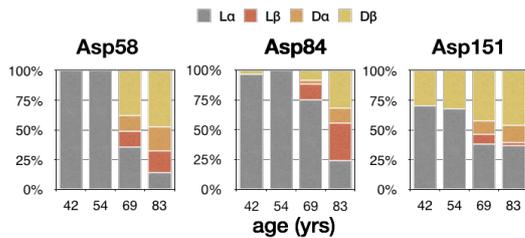


図3. 加齢に応じて増加する水晶体内 α A-クリスタリン単量体中 Asp 残基の異性化率

(3) 年代別 α A-クリスタリン凝集体内の Asp58 異性化率の比較

加齢後水晶体内には native 会合体、単量体に加えて加齢に応じて増加する凝集体も存在する。そこで、凝集体中の α A-クリスタリン中 Asp58 異性化率を測定し、会合体、単量体それぞれに含まれる α A-クリスタリン中 Asp58 異性化率と比較した (図4)。その結果、単量体中における Asp58 の異性化が著しく進行していることが明らかとなった。

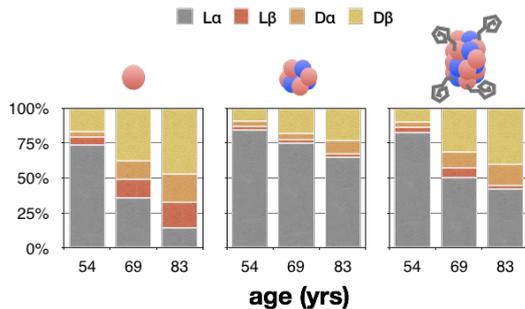


図4. 加齢後ヒト水晶体中における各会合形態毎の α A-クリスタリン中 Asp58 異性化率の比較

(4) Asp58 変異含有クリスタリンの作成

前述までの実験によって、ヒトクリスタリン凝集体および解離した単量体画分中の α A-クリスタリン内 Asp58 残基に顕著な異性化を見出した。次に、その影響を推測するべく、Asp58 を他のアミノ酸残基に変化させた α A-クリスタリン変異体の作成に取り組み、大腸菌内を用いて各 α A-クリスタリン変異体を作成した (以下、変異体 A, B)。各変異体の有する分子シャペロン機能を測定した結果、シャペロン機能の低下が明確であった。

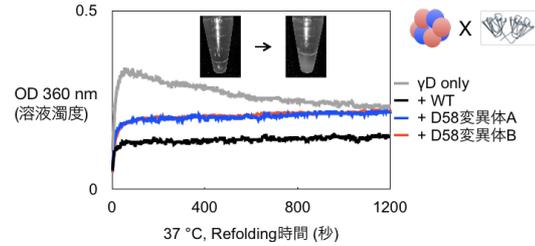


図5. α A-クリスタリン中の Asp58 変異体に見られたシャペロン機能低下

(5) まとめ

本研究では、加齢後ヒト水晶体内の α A-クリスタリン中における Asp 異性化率が分子サイズに応じて異なることが明らかとなった。また、いずれの場合も加齢に応じて増加することが示された。単量体中の Asp 異性化率が顕著であり、かつ過去に報告されている不溶性画分中の Asp 異性化率と類似しており、これら単量体が不溶化クリスタリン凝集体から解離したものである可能性が示された。また、 α A-クリスタリン中において Asp58 残基は、そのシャペロン機能に関して重要な部位であることが明確になった。

実際のヒト水晶体内ではクリスタリン内の Asp 異性化修飾に加えて、脱アミド化、糖化、紫外線による架橋、酸化なども生じることで、より巨大な会合体が形成され、白内障が進行する。とくに、Asp 異性化に代表されるような、周囲の native 構造に依存して加齢に応じて部位特異的に蓄積する修飾は、その部分変性部位を予測することが可能である。したがって、将来的には同部位の異性化修飾および変性促進を阻害する薬剤の投与により加齢性白内障発症の遅延が可能であると考えられる。

本研究の遂行により、内在的な化学修飾の蓄積により生じる蛋白質異常凝集をターゲットとする、これまででない薬剤リード化合物開発の基礎になる研究成果が得られた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

- ① Serebryany E, Takata T, Erickson E, Schafheimer N, Wang Y, King JA. Aggregation of Trp > Glu point mutants of human gamma-D crystallin provides a model for hereditary or UV-induced cataract. *Protein science*. 2016. 6. 1115-1128. DOI: 10.1002/pro.2924.
- ② Inoue R, Takata T, Fujii N, Ishii K, Uchiyama S, Sato N, Oba Y, Wood K, Kato K, Fujii N and Sugiyama M. New insight into the dynamical system of α B-crystallin oligomers. *Scientific Reports*. 2016. 6. 29208. DOI: 10.1038/srep29208.
- ③ Takata T and Fujii N. Isomerization of Asp residues plays an important role in α A-crystallin dissociation. *FEBS J*. 2016. 283 850-859. DOI: 10.1111/febs.13635.
- ④ Fujii N, Takata T, Fujii N, Aki K. Isomerization of aspartyl residues in crystallins and its influence upon cataract. *Biochim Biophys Acta*. 2016. 1860(1PtB):183-91. DOI:10.1016/j.bbagen.2015.08.001.
- ⑤ Takata T, Fujii N. Effect of Asp 96 isomerization on the properties of a lens α B-crystallin-derived short peptide. *J Pharm Biomed Anal*. 2015. 116: 139-44. DOI:10.1016/j.jpba.2015.06.017.
- ⑥ Fujii N, Takata T, Fujii N. Quantitative analysis of isomeric (1- α -, 1- β -, D- α -, D- β -) aspartyl residues in proteins from elderly donors. *J Pharm Biomed Anal*. 2015. 116: 25-33. DOI: 10.1016/j.jpba.2015.04.029.
- ⑦ Maeda H, Takata T, Fujii N, Sakaue H, Nirasawa S, Takahashi S, Sasaki H, Fujii N. Rapid survey of four Asp isomers in disease-related proteins by LC-MS combined with commercial enzymes. *Anal Chem*. 2015. 87: 561-8. DOI: 10.1021/ac504413e.
- ⑧ Sakaue H, Takata T, Fujii N, Sasaki H, Fujii N. Alpha B- and β A3-crystallins containing d-aspartic acids exist in a monomeric state. *Biochim Biophys Acta*. 2015. 1854: 1-9. DOI: 10.1016/j.bbapap.2014.10.006.

[学会発表] (計 13 件)

- ① T. Takata, T. Sato, H. Sasaki and N. Fujii. 「Age-related abnormal Asp Isomers distribution in lens specific α A-crystallin monomeric and

- polymeric state] XXII Biennial Meeting of the International Society for Eye Research. 2016年9月「Tokyo (Japan)」
- ② 高田匠, 秋元賀子, 水野晃治, 林伸和, 竹中祐子, 川島眞, 佐藤隆 「EGFR 阻害剤による痤瘡様皮疹における毛嚢内薬物の LC/MS 解析」第 115 回日本皮膚科学会総会・学術大会(京都)2016年6月「国立京都国際会館(京都・京都市)」
 - ③ T. Takata, T. Sato and N. Fujii 「Age-related Asp Isomerizations in Dissociated Alpha-crystallin from Aged Lens」The Association For Research in Vision and Ophthalmology. 2016年5月「Seattle (USA)」
 - ④ 根橋智宏, 高田匠, 村川智美, 秋元賀子, 水野晃治, 佐藤隆 「RAF および MEK 阻害剤によるざ瘡様皮疹の発症機構解明」日本薬学会 第 136 年会 2016年3月「パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)」
 - ⑤ 藤井紀子, 高田匠, 坂上弘明, 藤井智彦 「加齢による蛋白質ホモキラリターの破れ」第 41 回生命の起原および進化学会学術講演会 招待講演 2016年3月「鳴門教育大学(徳島・鳴門市)」
 - ⑥ T. Takata and N Fujii. Isomerization of Asp residues is different between monomer and hetero-polymer of alpha-crystallin in aged human lens. International Conference on the Lens 2015. Invited speaker 2015年12月「Kailua (USA)」
 - ⑦ 藤井紀子, 藤井智彦, 高田匠, 前田裕貴 「LC-MS による白内障クリスタリン中の異性体アミノ酸の迅速分析法」第 54 回日本白内障学会総会・第 41 回水晶体研究会 合同大会 2015年9月「ミッドランドスクエア・オフィスタワー(愛知・名古屋市)」
 - ⑧ 高田匠, 藤井紀子, 佐藤隆 「眼内水晶体に対し紫外線および近赤外線が及ぼす影響」第 6 回近赤外線研究会 2015年9月「コンベンションルーム AP 品川アネックス(東京都・港区)」
 - ⑨ R. Inoue, T. Takata, N. Fujii, N. Sato, Y. Oba, S. Takata, N. Fujii and M. Sugiyama. 「KINETICS OF SUBUNITS IN α -CRYSTALLIN AS STUDIED BY SMALL-ANGLE NEUTRON SCATTERING」2015年9月「Berlin (Germany)」
 - ⑩ 藤井紀子, 高田匠, 藤井智彦 「LC-MS/MS による老化蛋白質中の D-アミノ酸一斉分析」第 11 回 D-アミノ酸学会 2015年8月「シティーホールプラザアオーレ長岡(新潟・長岡市)」
 - ⑪ 高田匠, 藤井紀子 「加齢後のヒト水晶体内における α A-クリスタリン単量体内と会合体内の Asp 異性化率の相違」第 11 回 D-アミノ酸学会 2015年8月「シテ

ィーホールプラザアオーレ長岡(新潟・長岡市)」

- ⑫ 高田匠, 藤井紀子 (受賞講演)「結合型 D-アミノ酸が引き起こす水晶体クリスタリンの機能変化」第 11 回 D-アミノ酸学会 2015 年 8 月「シティーホールプラザアオーレ長岡(新潟・長岡市)」
- ⑬ HA SEONGMIN, 高田匠, 藤井紀子「血液中の D-アミノ酸含有ペプチドの探索」第 15 回日本蛋白質科学会年会 2015 年 6 月「あわぎんホール(徳島・徳島市)」

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高田 匠 (TAKATA, Takumi)

京都大学・原子炉実験所・特定准教授

研究者番号： 80379007