様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　元 年　 ６ 月 １３ 日現在

機関番号：３４１０４
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2016～2018
課題番号：１６Ｋ０８２０７

研究課題名（和文）光化学的新技術を利用した脳内老化タンパク質の網羅的解析法の開発

研究課題名（英文）Development of photochemical screening for aged proteins in brain

研究代表者
定金　豊（Sadakane, Yutaka）

鈴鹿医療科学大学・薬学部・教授

研究者番号：６０２９３３０４

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,800,000円

研究成果の概要（和文）：タンパク質中のAsnおよびAsp残基は修復酵素PCMTの働きにより、本来生体内にはない特殊構造のD-isoAsp残基が蓄積することが知られている。本研究では加齢性疾患と脳内のタンパク質のアミノ酸残基の老化との関連を明らかにするために副次的に生成するD-isoAsp残基に着目した。独自の光反応化学技術と遺伝子工学技術を用いてD-isoAsp残基を解析するツールを開発することを目的に、修復酵素PCMTの点突然変異体の作成や活性部位の分子進化をエラー頻度の高いPCRで促進するなどの研究を実施し、ツール開発の基礎的検討を終えることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義
本研究の遂行により加齢性疾患との関連を明らかにする新たなツール開発の基礎的研究成果を得ることができた。本研究の社会的意義は、超高齢化社会での喫緊の課題である加齢性疾患の発病の理解に役立つ成果が得られたことであり、学術的意義は、アミノ酸の構造変化を修復すべき酵素が、機構上副次的にD-isoAsp残基を蓄積してタンパク質機能に影響を及ぼすという特殊な現象に着目した独創的な研究であることである。

研究成果の概要（英文）：Both Asn and Asp residues in the proteins were transformed to D-isoAsp residues by repairing process of the repair enzyme PCMT and D-isoAsp residues were accumulated in aged proteins. In this study, we focused on D-isoAsp residues in proteins to study the relationship to the age-related diseases. Thus, we aimed to develop the useful tools for analyzing the D-isoAsp residues by using unique photochemical technology and gene engineering techniques. We performed the point mutation researches and molecular evolution studies using error-prone PCR technique and accomplished the basic researches for developing the new tool.

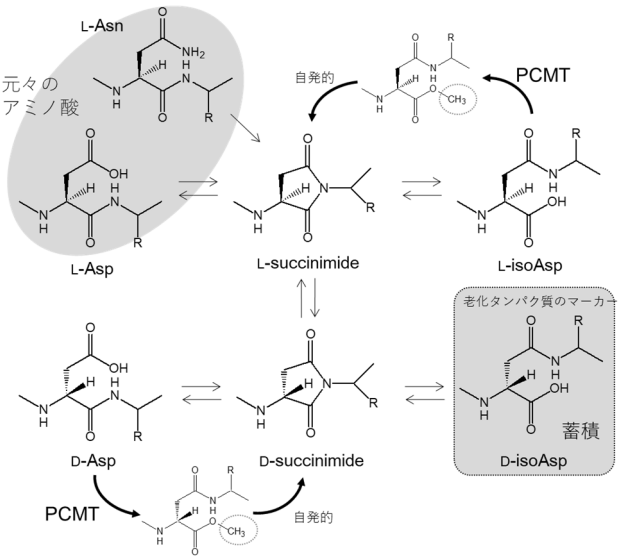
研究分野：分析化学

キーワード：老化　アスパラギン残基　アスパラギン酸残基　コンフォメーション病　光　ファージ　加齢性疾患　修復酵素

１．研究開始当初の背景

多くの加齢性疾患（アルツハイマー病、動脈硬化、白内障、加齢黄斑変性、パーキンソン病など）では、疾患の原因タンパク質中で特定残基のアミノ酸が D-アミノ酸残基に変化していることが分析化学の進歩とともに次々と発見されていた。特に、アスパラギン（Asn）とアスパラギン酸（Asp）残基は構造異性体が発見される頻度が高く、その構造変化機構も明らかにされている。生体内には Asn および Asp 残基の構造異性体を修復する酵素 Protein carboxyl methyltansferase（PCMT）が存在している。修復酵素 PCMT のノックアウトマウスは多量の構造異性体が脳内に蓄積し、わずか 60 日程度で死に至ることが明らかになっている。これらの結果は、加齢に伴う Asn および Asp 残基の構造異性体の出現が、タンパク質に重篤な機能障害をもたらし機能不全を引き起こすことを示している。

Asn および Asp 残基の構造変化機構と修復酵素 PCMT の修復機構の考察から、修復する過程で副産物として構造的に特殊な D-isoAsp 残基を蓄積することが指摘されていた（右図）。D-isoAsp 残基の蓄積はタンパク質の生理機能にどのような影響を及ぼすかは、D-isoAsp 残基を簡便に定量する方法がないため未だ不明な点が多い。生命維持に必須である修復酵素 PCMT が副次的とはいえ D-isoAsp 残基を蓄積する結果になるという生理的な欠陥と加齢性疾患の発病機構との関わりは非常に興味深い考察であり、学術的にも社会的にも意義のある問いである。この問いに答えるためには、まずはタンパク質内にある D-isoAsp 残基の量を簡便に測定する方法が必要であるが、未だ開発されていない状況であった。



２．研究の目的

我々は Asn および Asp 残基の構造異性体を簡便に定量する方法の開発研究を行っている。既に、ペプチド標準品を用いた簡便定量法、および質量分析法を用いた半定量法の開発に成功しており、これらの方法を用いて Asn および Asp 残基の変化速度がタンパク質の高次構造に依存することを証明するなどの成果もあげている。同時に、独自の光化学反応を組み込んだ先端技術の開発を進めており、効率的なクローニングを保証する光化学的新技術の開発に成功している。

本研究では、加齢性疾患の発病機構と関わりが期待されるタンパク質中の D-isoAsp 残基の定量法を開発すること、そして D-isoAsp 残基が蓄積したタンパク質を網羅的かつ効率的に解析することを目的としている。そのために、我々が開発した独自の光化学的新技術と遺伝子工学技術を駆使し、D-isoAsp 残基を修復する酵素を創製することを目指す。

３．研究の方法

独自の光反応化学技術で新規修復酵素 PCMT の開発に利用できる技術を確立するために、まずは脳内でのタンパク質の老化現象について調べる方法の開発を試みた。

（１）老化しやすく、脳内に豊富に存在するタンパク質として知られているカルモジュリン（CaM）を用いて、タンパク質の老化条件を検討した。
（２）修復酵素 PCMT に光反応基を組み込んだ光反応性 PCMT を作製し、老化した CaM 提示ファージでパニング実験を行った。
（３）脳内で老化しやすいタンパク質群を得るため、作製した光反応性 PCMT を用いてヒト脳 cDNA 発現提示ファージライブラリーをスクリーニングした。

次に D-isoAsp 残基を修復する酵素を作製するため、以下の実験を実施した。

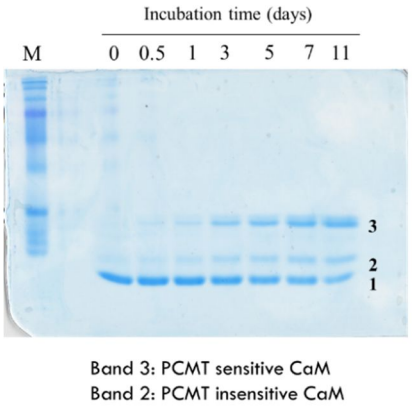
（４）修復酵素 PCMT 遺伝子の活性部位付近を、エラー頻度の高い条件で PCR 増幅（Error-prone PCR）させ、増幅した遺伝子断片を加工して遺伝子組換え変異修復酵素 PCMT 群を構築した。

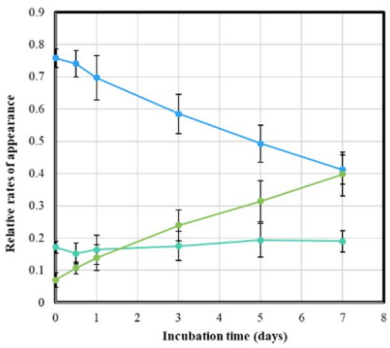
（５）これらの変異修復酵素 PCMT 群を提示ファージに導入し、D-isoAsp 残基をもつペプチド断片で濃縮し、 D-isoAsp 残基を認識する修復酵素 PCMT の単離を試みた。

（６）修復酵素 PCMT のアミノ酸残基の点突然変異体を作成し、D-isoAsp 残基に特異的な酵素の作成を試みた。

４．研究成果

（１）CaM を用いた脳内タンパク質の老化条件の検討： CaM の Asn 残基は脱アミド化しやすく PCMT の基質になることが知られている。脳内タンパク質の Asn 残基がどの程度の速度で構造変化するのか、CaM を用いて調べた。CaM を弱塩基性条件下で静置し電気泳動の移動度の違いで構造変化の速度を調べた結果、静置１日から構造変化が観察され、静置１週間で半分程度の CaM が構造変化していることが明らかになった（右図）。アミノ酸残基の構造変化はタンパク質全体からみると微小な変化と考えられるが、電気泳動の移動度に大きな影響を及ぼす。この結果はアミノ酸残基の構造変化がタンパク質の全体構造に影響を与えていることを示している。

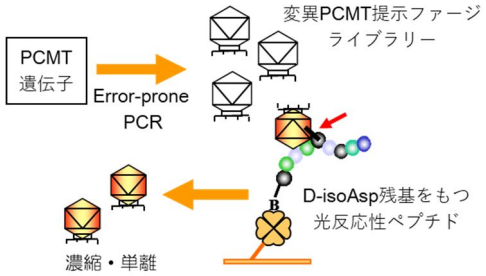




（２）老化 CaM 提示ファージのパニング実験：脳内で老化しやすいタンパク質群のスクリーニングのためにまずはモデル実験を行った（右図）。独自の光反応化学技術を用いて修復酵素 PCMT に光反応基を導入し、光反応性 PCMT を作製した。PCMT の活性化部位に近い部分に遺伝子工学技術を用いてシステイン（Cys）残基を導入した組換え PCMT を作製し、thiosulfonate 基をもつ光反応基を導入した。Cys 導入部位は２箇所で検討したが、そのうちのひとつでは組換え体が可溶化せず使用できなかった。次に CaM 提示ファージを弱塩基性で１週間程度静置し、老化した CaM 提示ファージを作製し、コントロールファージと任意に混合しパニングによる選択率を測定した。ファージの静置条件、パニングの選択条件などを調整して、光反応性 PCMT をリガンドとして数十倍程度の選択率を得ることができた。

（３）ヒト脳 cDNA 発現提示ファージライブラリーのスクリーニング：ヒト脳 cDNA 発現提示ファージライブラリーを弱塩基性条件で静置し、提示タンパク質の老化を促進した。光反応性 PCMT でパニング実験を行い、ラウンドを繰り返したが各ラウンドで回収できるファージ数に変化がみられず、特定タンパク質を提示しているファージを濃縮することはできなかった。

（４）遺伝子組換え変異修復酵素 PCMT 群の構築：修復酵素 PCMT の活性部位を含む遺伝子断片をエラー頻度の高い条件で PCR 増幅（Error-prone PCR）した。PCR 条件（Mn^{2+}濃度、dNTP 量、PCR 回数など）をいくつか変えて突然変異体を作製した。増幅した遺伝子断片を完全長の PCMT が発現できるように再構築した遺伝子を、提示ファージに組み込み変異 PCMT 提示ファージライブラリーを構築した（右図）。



（５）D-isoAsp 残基を認識する修復酵素 PCMT の単離実験：クリスタリンの部分ペプチド TVLDSGISEVR の L-Asp を D-isoAsp に変えたペプチドを合成し，N 末端に光反応基を導入したペプチドを合成した。変異 PCMT 提示ファージライブラリーを光反応性ペプチドでパニング実験を行い（右図）、ラウンドを繰り返したが各ラウンドで回収できるファージ数に変化がみられず、D-isoAsp 残基を認識する PCMT を濃縮することはできなかった。

（６）修復酵素 PCMT のアミノ酸残基の点突然変異体の作成：ヒト PCMT で点突然変異が報告されているアミノ酸残基について、活性部位に近いと思われる２つの変異体を作製した。TVLDSGISEVR の L-Asp を様々な Asp 構造変異体で変えたペプチドを用いて、D-isoAsp 体への親和性を調べている。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 4 件）

① Yutaka Sadakane, Masahiro Kawahara (2018) Implications of Metal Binding and Asparagine Deamidation for Amyloid Formation. 査読有 *Int J Mol Sci.* 19 (8). pii: E2449. doi: 10.3390/ijms19082449.

② 定金　豊 (2017) タンパク質中のアミノ酸レベルの自発的構造変化の分析と意義、査読有、ぶんせき　2017　第 7 号　p305-311

③ 定金　豊 (2016) 市販の酵素を組合せた LC-MS でのアミノ酸残基の構造的異性化の迅速な分析法 ぶんせき　トピックス　2016 第 1 号　p30

④ Yutaka Sadakane, Yasumaru Hatanaka (2016) Photoaffinity electrophoretic mobility shift assay using photoreactive DNA bearing 3-trifluoromethyl-3-phenyldiazirine in its phosphate backbone. 査読有 *Anal. Biochem.* 506, 1-7.

〔学会発表〕（計 14 件）

①定金　豊：（招待講演）タンパク質内でのアミノ酸残基の老化：高速キラル分析と生体機能への影響　第 79 回分析化学討論会　（福岡）　2019 年 5 月 18 日

②森本正大、鶴田大将、田中温季、定金　豊：修復酵素 PIMT を利用したタンパク質内のアミノ酸老化解析　日本薬学会第 139 年会（千葉）　2019 年 3 月 23 日

③定金　豊：（招待講演）タンパク質内の D－アミノ酸分析と神経変性疾患との関わり　D アミノ酸学会第 4 回ワークショップ　（東京）2019 年 2 月 15 日

④森本正大、鶴田大将、田中温季、定金　豊：異性化修復酵素 PIMT を利用したタンパク質内のアミノ酸構造変化の解析　新アミノ酸分析研究会第 8 回学術講演会（東京）2018 年 12 月 17 日

⑤鶴田 大将，森本 正大，定金 豊：修復酵素 PIMT とヒドラ ジンを用いた化学修飾法による isoAsp 残基部位特定法の確立ための基礎的検討　第 14 回 D アミノ酸学会（富山）2018 年 9 月 5 日

⑥定金　豊、森下優花、森本正太：再現性の良いアミロイド線維形成条件の検討と阻害物質探索への応用　第 64 回　日本薬学会東海支部学術大会（名古屋）2018 年 6 月 30 日

⑦定金　豊，窪田安紘、藤原　将平，　大塚　功：糖鎖ミメティックペプチド結合特性の光アフィニティーラベリング分析　日本薬学会第 138 年会（金沢）　2018 年３月 27 日

⑧定金 豊、千田紗弓、出口　拓：スクシンイミド中間体の開環と閉環反応に及ぼすアミノ酸側鎖の影響　第 7 回新アミノ酸研究会（東京）　2017 年 12 月 4 日

⑨定金　豊，窪田安紘、藤原　将平，　大塚　功：糖鎖ミメティックペプチド結合特異性の光化

学的分析　日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部合同学術大会 2017（三重） 2017 年 11 月 26 日
⑩定金　豊，藤原　将平，　大塚　功：光反応性糖鎖ミメティックペプチドを用いた結合解析法の開発　日本薬学会第 137 年会（仙台）　2017 年 3 月 27 日
⑪大塚 功, 定金 豊, 羽田 紀康, 渥美 聡孝, 垣内 信子：光アフィニティーラベル法による糖鎖機能解明を志向した分子ツールの開発 Sialyl-LeX 型糖鎖リガンドの合成　日本薬学会第 137 年会（仙台）　2017 年 3 月 25 日
⑫田中 健一郎, 森 美和子, 水野 大, 定金 豊, 川原 正博：食品中カルノシンの carbon カラム HPLC による定量分析　日本薬学会第 137 年会（仙台）　2017 年 3 月 27 日
⑬定金 豊、祖父江友宏、地主 将典：タンパク質中のアミノ酸残基の老化に伴う経時的構造変化を可視化する解析法の確立　第 6 回新アミノ酸研究会（東京）　2016 年 11 月 4 日
⑭定金 豊、祖父江友宏、地主 将典：カルモジュリンのアミノ酸レベルの老化と構造解析法の確立　第 9 回 D アミノ酸学会（高知）　2016 年 9 月 15 日

〔図書〕（計 1 件）
①　Yutaka Sadakane, Isao Ohtsuka, and Yasumaru Hatanaka (2017) Photoreactive　biomacromolecules: Installation of photoreactive units and applications for analyzing biological interfaces. *in Photoaffinity Labeling for Structural Probing within Protein. ed Yasumaru Hatanaka and Makoto Hashimoto,* Springer pp 129-157.

〔産業財産権〕
○出願状況（計 0 件）
○取得状況（計 0 件）

〔その他〕
ホームページ等
https://www.suzuka-u.ac.jp/wp-content/uploads/2018/06/pp_sadakane.pdf

６．研究組織
研究代表者のみ