

令和 2 年 5 月 22 日現在

機関番号：32659

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K16605

研究課題名(和文) 白内障の病態形成に関わるアスパラギン酸異性化メカニズムの解明

研究課題名(英文) Investigation of isomerization mechanism of aspartic acid involved in the development of cataract

研究代表者

坂上 弘明 (Sakaue, Hiroaki)

東京薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：80734855

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではアスパラギン酸残基およびグルタミン酸残基の異性化を詳細かつ簡易に検出する手法の開発に成功した。モデルペプチドと芳香族アミノ酸を混合した溶液に紫外線を照射したところ、ペプチド中のアスパラギン酸残基の異性化反応は抑制された。すなわち、芳香族アミノ酸が吸収したエネルギーは、異性反応に転用されるのではなく、エネルギーを吸収した後、分解されることで、ペプチドを保護したものと考えられた。一方で、pHの変化や還元性を有する糖の共存が異性化を促進させることも示唆された。このことから、紫外線によるアスパラギン酸残基の異性化促進作用はアミノ酸への直接的な作用ではなく、間接的に生じることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タンパク質中のアスパラギン酸残基の異性化は、タンパク質機能を劇的に変化させることを以前の研究により明らかにしている。白内障の発症と水晶体クリスタリン中のアスパラギン酸残基の異性化には相関があることから、アスパラギン酸残基の異性化を抑制することは白内障の予防薬や発症時期を遅らせる薬剤の開発に繋がる。本研究により、芳香族アミノ酸はアスパラギン酸残基の異性化を抑制することが明らかになった。また、還元性を有する糖やわずかなpHの変化が異性化を促進することが示唆された。本研究で得られた知見は、アスパラギン酸残基の新たな異性化促進メカニズムを考察する上で有意義なものであると言える。

研究成果の概要(英文)：In this study, we succeeded in developing a rapid method for detecting isomerization of aspartic acid (Asp) residue and glutamic acid (Glu) residue. Aromatic amino acids such as tryptophan and tyrosine suppressed the isomerization reaction of Asp residues in peptides by ultraviolet. It was considered that the energy absorbed by the aromatic amino acids were not transferred to the isomerization reaction of Asp and was used for decomposition to protect the peptide from isomerization. On the other hand, it was also suggested that pH change and coexistence of reducing sugars promote isomerization. It was suggested that UV irradiation accelerated the isomerization of Asp indirectly.

研究分野：生化学

キーワード：D-アミノ酸 アスパラギン酸 異性化 紫外線

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

白内障は特定の遺伝的背景のない健康人においても、加齢に従って罹患率が急上昇し(80歳代ではほぼ全員が発症)著しいQOLの低下を招くため、高齢化社会における危惧すべき疾患である。白内障は認知度が高く、罹患者数も多い疾患でありながら、有効な治療薬は存在せず、外科手術以外に効果的な治療法は存在しない。白内障治療薬もしくは発症を遅らせる医薬品が開発できれば、日本における高齢者医療費を大きく削減することが可能となる。

白内障の誘発因子のひとつとして、紫外線の影響が示唆されている。Sasakiらはシンガポールおよびアイスランドにおける白内障発症率を石川県と比較し、紫外線量の多いシンガポールでは石川県の2.1倍白内障発症率が高く、紫外線量の少ないアイスランドでは石川県の0.4倍白内障発症率が低いことを明らかにした。この研究に対応するように、Fujiiらによるマウス水晶体を用いたin vivo研究では、UVBの照射により水晶体の白濁が見られると同時に、クリスタリン中のAsp残基の異性化が進行する事が明らかとなった。このように、紫外線曝露とAsp残基の異性化および白内障発症の間には相関関係が見られるものの、Asp残基には紫外線を吸収する部位が存在せず、紫外線とAsp残基の異性化がどのように関連しているのかが不明である。

2. 研究の目的

本研究は、白内障の病態形成に重要であるアスパラギン酸(Asp)異性化反応を促進する因子について解明することを目的とした。Asp残基は紫外線を吸収しないものの、タンパク質構成アミノ酸であるトリプトファンやチロシンは芳香環を分子内に有しており、紫外線を吸収する。すなわち、Asp残基と芳香族アミノ酸が空間的に隣接した場合、芳香族アミノ酸が吸収した紫外線エネルギーの一部がAsp残基へ転移し、異性化反応を促進するのではないかと考えた。

3. 研究の方法

ペプチド中のAsp残基には、鏡像関係にあるL体とD体に加え、結合様式の異なる α 体と β 体が存在する。従って、Asp異性体にはL α 、L β 、D α 、D β の4種類が存在する。

本研究では、配列中に1つだけAsp残基を有するペプチド“TVDLSGISEVR”のAsp(D)をL α 、L β 、D α 、D β の4種類に置換したAsp異性体ペプチドを合成した。これをHPLCにより分離すると疎水性度の違いにより、4種の異性体ペプチドが分離する。通常、生体を構成するAsp残基はL α 体のみである。L α 体のペプチドに対し紫外線(UVB)を照射し、HPLCにより分析した際、分割されたピークの溶出時間が異性体ピークの溶出時間と一致すれば、Asp残基がどの異性体へと異性化したのか分析することが可能である。

このような方法を開発し、L α 体のペプチドに芳香族アミノ酸や糖、さらにはpHの変化など種々の条件でペプチドを処理し、Asp残基の異性化について検討を行った。

4. 研究成果

当初、HPLCを用いる方法により紫外線照射によって生じるAsp異性体を検出しようと試みたが、異性体と一致しないピークが多数検出された(図1)。ペプチド配列中に存在するグルタミン酸(Glu;E)はAspと構造が類似している。Aspは五員環のスクシンイミド体を形成して異性化するのに対し、Gluは六員環のイミド体を形成するため、Gluの異性化反応によって生じたピークが検出された可能性が示唆された。そこで、Aspの4つの異性体に加え、Gluの異性体であるL α 、L γ 、D α 、D γ を加えた全16種類の組み合わせの異性体ペプチドを合成し、異性体ペプチドの分離条件を検討した。すべてのペプチドを分離することは出来なかったものの、13個のペプチドピークに分離することが可能となり、AspのみならずGluの異性化も同時に解析することが可能となった。この手法を用いて、ペプチド中のAspおよびGlu異性体の検出を試みたものの、検出されたピークはペプチドの異性体ピークではなく、紫外線によって生じた分解物が主であることが示唆された。そこで、三連四重極型質量分析計を用い、プレカーサーイオン、およびそのプロダクトイオンの質量を用いたMRM測定により、目的ペプチドのみの解析を可能とする手法を確立した(図2)。

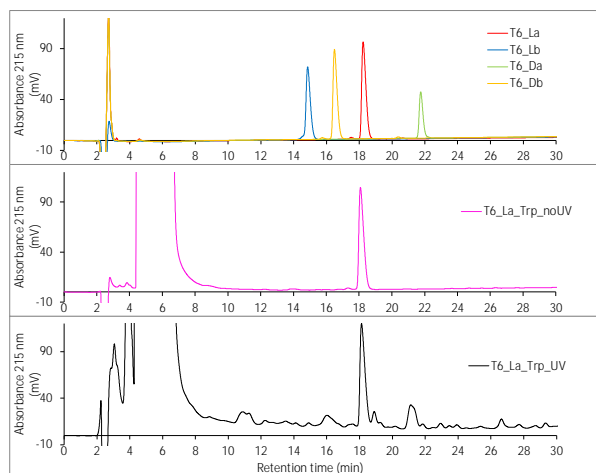


図 1

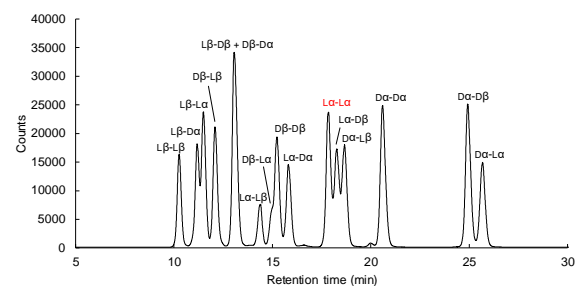


図 2

この手法を用いて検討した結果、芳香族アミノ酸のペプチドへの添加は、Asp 異性化反応を抑制することが明らかとなった。すなわち、照射された紫外線は芳香族アミノ酸によって吸収されるが、そのエネルギーは Asp へ転移されることなく、分解されてエネルギーを放出するものと考えられた。このため、溶液中の分解物は増加する一方で、Asp 残基の異性化は抑制されたと考えられる。しかしながら、なぜペプチドへ紫外線を照射すると、紫外線吸収部位が無いにもかかわらず、異性化が進行するのか解明するまでには至らなかった（図 3）。一方で、芳香族アミノ酸以外の Asp 異性化促進因子を探索するために、pH や糖に注目し、検討した。その結果、ペプチド溶液に還元糖であるグルコースを添加した場合には異性化が促進されたが、非還元糖であるスクロールを添加した場合には異性化反応は促進されなかった。以上のことから、カルボニル炭素が Asp 異性化の促進に関わる可能性が示唆された（図 4）。メイラード反応や AGE 化と Asp 異性化の関連性については今後の検討課題である。

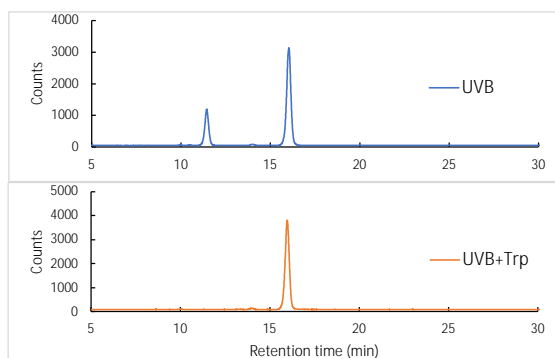


図 3

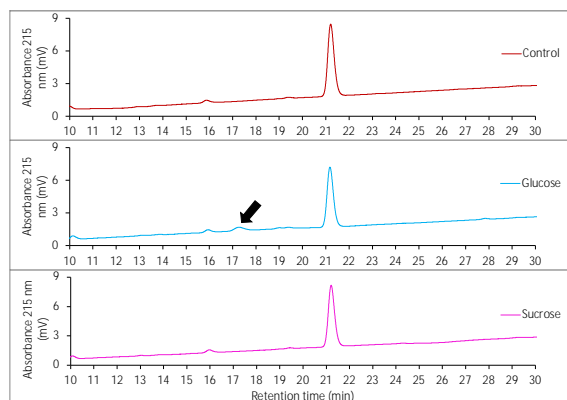


図 4

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Fujii Noriko, Takata Takumi, Fujii Norihiko, Aki Kenzo, and Sakaue Hiroaki	4. 巻 1866
2. 論文標題 D-Amino acids in protein: The mirror of life as a molecular index of aging	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics	6. 最初と最後の頁 840 ~ 847
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1016/j.bbapap.2018.03.001	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hiroaki Sakaue, Tadatoshi Kinouchi, Norihiko Fujii, Takumi Takata, and Noriko Fujii	4. 巻 2
2. 論文標題 Isomeric Replacement of a Single Aspartic Acid Induces a Marked Change in Protein Function: The Example of Ribonuclease A	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 ACS Omega	6. 最初と最後の頁 260-267
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsomega.6b00346	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Takashi Kanamoto, Hiroaki Sakaue, Yasushi Kitaoka, Ryo Asaoka, Kei Tobiume, and Yoshiaki Kiuchi	4. 巻 45
2. 論文標題 D-Alanine Is Reduced by Ocular Hypertension in the Rat Retina.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Current Eye Research	6. 最初と最後の頁 490-495
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1080/02713683.2019.1666995	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Hiroaki Sakaue
2. 発表標題 A single aspartyl isomer at a specific site induces a change in protein function.
3. 学会等名 The 3rd International Conference of D-Amino Acid Research (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----