

令和 2 年 5 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K13220

研究課題名(和文) LC-MS/MSによる加齢性白内障のクリスタリン中の翻訳後修飾に対する一斉分析

研究課題名(英文) One-shot LC-MS/MS analysis of post-translational modifications in crystallin of age-related cataract

研究代表者

金 仁求 (KIM, INGU)

京都大学・複合原子力科学研究所・研究員

研究者番号：90784265

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：白内障は、水晶体中の蛋白質の構造に変化が生じ、秩序構造が乱れ、凝集が進み異常凝集化・不溶化することに起因する加齢性疾患である。本研究では、LC-MS/MSにより酸化、脱アミド化、異性化の迅速解析を行い問題を解決した。不溶性画分への移行段階である高分子量(HMW)画分中の -Cryの正常な会合体を形成しているnative状態の -Cry中のAsp残基の異性化率を比較した結果、10～80代の加齢性白内障水晶体中のHMW画分には -Cryが存在し、その (B1)画分中Asp212残基の異性化が促進していた。Asp残基の異性化と蛋白質の凝集、不溶化との関連が強く考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

白内障発症の原因は今もって未解明で、水晶体の蛋白質が異常凝集化するためであるという現象論にとどまっている。本研究の独創的な点は、加齢性白内障患者のアミノ酸の異性体部位を明らかにし、その迅速分析の開発を行ってきた点にある。これらの成果をもとにして、年齢別、疾患別の水晶体の分析を行うことにより、疾患の発症時期の予測、防御、治療への道を探ることができる。また、アルツハイマー病やパーキンソン病など他の加齢性疾患の原因蛋白質の分析にも応用できる。高齢化社会での医療費軽減に貢献できると考えている。

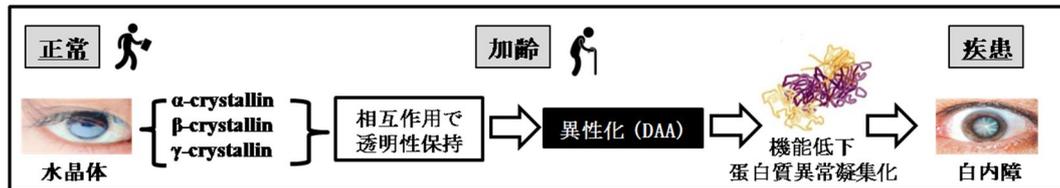
研究成果の概要(英文)： This study demonstrates for the first time that Asp 212 residue in B1-crystallin in HMW and WL fractions is specifically isomerized. The Asp212 residue in native B1-crystallin isomerizes shifts to the HMW fraction binds to -crystallin causes aggregation and insolubilization, It may be possible to contribute to the formation of cataracts.

研究分野：応用健康科学

キーワード：加齢性疾患 白内障 異性化 蛋白質異常凝集 LC-MS/MS 老化

1. 研究開始当初の背景

眼の水晶体はその主成分である α -、 β -、 γ -クリスタリン(Cry)間の相互作用によって形成された規則的な会合体によってレンズとしての機能を保持している。白内障は加齢に伴い、これら



クリスタリン間の相互作用が低下し凝集と不溶化が生じ発症すると考えられている。白内障のクリスタリン中では酸化、脱アミド化、異性化及び非酵素的糖化など複数の翻訳後修飾が検出されており、これらが凝集のトリガーと考えられてきた。しかし、従来の報告は単発的で、どの翻訳後修飾が異常凝集のキーであるのか、あるいはこれら複数の翻訳後修飾が互いに関連して異常凝集を惹起するのかが不明であった。そこで、本研究ではこの課題を解決するために年齢の異なるヒトの水晶体一個を用いて、液体クロマトグラフィー質量分析装置によりこれら総ての翻訳後修飾の一斉迅速分析を行い、白内障発症要因の究明に迫る。本研究においてはこれらの分析技術に基づいて、異なる年齢のヒト水晶体について分析を行い、加齢における酸化、脱アミド化、異性化の関連性について定量するとともに、これらの翻訳後修飾によって異常凝集を引き起こし不溶化各 Cry 間の相互作用にどのような影響を与え異常凝集し不溶化しているかを定量しつつ、それぞれの反応速度定数を算出し、白内障発症の時期を予測する。また、異常凝集に関して不溶化に関する研究を行い確率な白内障発症の時期を予測する。(凝集をほごす何らかの酵素を発見することにより白内障疾患の解明が可能になると考えられる。)

2. 研究の目的

眼の水晶体はその主成分である α -、 β -、 γ -クリスタリン(Cry)間の相互作用によって形成された規則的な会合体によってレンズとしての機能を保持している。白内障は加齢に伴い、これら Cry 間の相互作用が低下し凝集と不溶化が生じ発症すると考えられている。白内障の Cry 中では酸化、脱アミド化、異性化、非酵素的糖化など複数の翻訳後修飾が検出されており、これらが凝集のトリガーと考えられてきた。しかし、従来の報告は単発的で、どの翻訳後修飾が異常凝集のキーであるのか、あるいはこれら複数の翻訳後修飾が互いに関連して異常凝集を惹起するのかが不明である。そこで、本研究ではこの課題を解決するために年齢の異なるヒトの水晶体一個を用いて、液体クロマトグラフ-質量分析装置によりこれら総ての翻訳後修飾の一斉迅速分析を行い、白内障発症要因の究明に迫る。本研究により白内障発症時期の予測が可能になると考えられる。

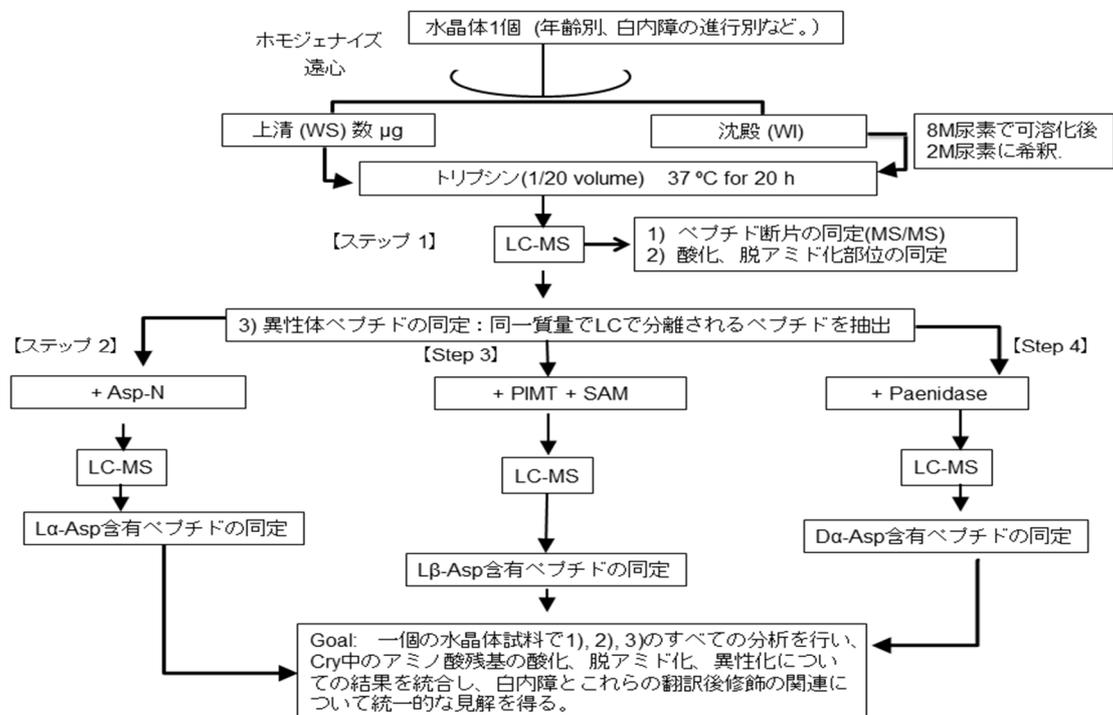
3. 研究の方法

年齢別、白内障進行度の異なるヒト水晶体試料について、遠心分離により可溶性画分と不溶性画分に分別後、ゲルろ過クロマトグラフィーで各画分に分け、得られる 16 種類の Cry 混合物につきトリプシン処理し、得られたペプチド断片を LC-MS/MS で分析する。

上記で得たペプチドの同定、酸化、脱アミド化については、Proteome Discoverer で分析する。

アスパラギン酸残基の異性体は同一質量、同一配列で LC 上複数のピークとして分離されるペプチドを選択し、その同定は下の図で示す市販酵素 AspN, PIMT, Paenidase を使用して決定する。

年齢別にヒト水晶体の酸化、脱アミド化、異性化の度合いがわかるので、それらのデータを整理し、反応速度定数を求めるとともにタンパク質の凝集や不溶化に関するメカニズムを求める。



4. 研究成果

ヒト眼の水晶体は主成分である α -、 β -、 γ -クリスタリン(Cry)間の相互作用によって形成された規則的な会合体によってレンズとしての機能を保持している。白内障は、水晶体中の蛋白質の構造に変化が生じ、秩序構造が乱れ、凝集が進み 異常凝集化 不溶化することに起因する加齢性疾患である。白内障のCry中では酸化、脱アミド化、異性化及び非酵素的糖化など複数の翻訳後修飾が検出されており、これらが凝集のトリガーと考えられている。本研究では、液体クロマトグラフ質量分析法(LC-MS/MS)により酸化、脱アミド化、異性化の迅速解析を行い問題を解決した。また、比較的簡便に Asp 異性体を決定する方法を見出した。Asp 残基の異性体分析においては主成分である β -Cry 中の Asp 残基が 4 つの Asp 異性体が異性化しているために、LC 上で分離され多くの部位で異性化部位が検出された。だが、他のCryである α -Cry に関しては β -Cry に比べ量が少なく分析が混乱であ報告が少ない。そこで、不溶性画分への移行段階である高分子量(HMW)画分中の β -Cry の正常な会合体を形成している native 状態の β -Cry 中の Asp 残基の異性化率を比較した結果、10~80代の加齢性白内障水晶体中の HMW 画分には β -Cry が存在し、その (B1)画分中 Asp212 残基の異性化が促進していた。しかし、凝集していない native 状態の (B1)画分中 Asp212 残基の異性化は見られなかった。このことから、Asp212 の異性化が β -Cry の凝集化を引き起こしCryの不溶化過程にある HMW 画分へ移行したと考えられた。また、WS画分に加え WI 画分に関しても、同様な実験を行った結果、Asp 残基の異性化は WS 画分のCryよりも WI 画分のCryに高い割合で進んでおり、Asp 残基の異性化と蛋白質の凝集、不溶化との関連が強く考えられる。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 藤井紀子、高田匠、金仁求	4. 巻 70
2. 論文標題 蛋白質中のD-アミノ酸と老化	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 臨床免疫・アレルギー科	6. 最初と最後の頁 467-474
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 0件/うち国際学会 5件）

1. 発表者名 金仁求、高田 匠、加治 優一、藤井 紀子
2. 発表標題 -クリスタリン中のアスパラギン酸残基の異性化
3. 学会等名 D-アミノ酸学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 金仁求、高田 匠、加治 優一、藤井 紀子
2. 発表標題 -クリスタリン中のAsp残基の異性化分析
3. 学会等名 日本白内障学会及び水晶体研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Noriko Fujii, Takumi Takata, Norihiko Fujii, Kenzo Aki, Hiroaki Sakaue, Ingu Kim
2. 発表標題 The mechanism of D-amino acid formation in proteins and new method of protein-bound D-amino acid detection
3. 学会等名 The 3rd International Conference of D-Amino Acid Research (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ingu Kim, Noriko FUJII
2. 発表標題 Analysis of the Post-translational Modifications of the Individual Amino Acids in Lens Proteins which were induced by irradiation and aging
3. 学会等名 The 3rd International Conference of D-Amino Acid Research (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 高田 匠、金 仁求、藤井 紀子
2. 発表標題 Alpha-クリスタリン相互作用能に関するAsp異性化
3. 学会等名 第56回日本白内障学会及び第43回水晶体研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 金 仁求、高田 匠、加治優一、藤井 紀子
2. 発表標題 LC-MS/MSによる白内障クリスタリンの翻訳後修飾の一斉分析
3. 学会等名 第56回日本白内障学会及び第43回水晶体研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kosuke Magami, Takumi Takata, Ingu Kim, Tadatoshi Kinouchi, Noriko Fujii
2. 発表標題 The function of A-crystallin peptide 66-80 is dramatically changed by Asp76 isomerization
3. 学会等名 第90回日本生化学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Seongmin Ha, Ingu Kim, Takumi Takata, Noriko Fujii
2. 発表標題 Identification of D-amino acid-containing peptides in human serum
3. 学会等名 第90回日本生化学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kazuki Ishihara, Ingu Kim, Takumi Takata, Noriko Fujii
2. 発表標題 Kinetics of Isomerization of Aspartate 58 of A-Crystallin Peptide Mimics at various pH
3. 学会等名 第90回日本生化学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Noriko Fujii, Takumi Takata, Ingu Kim, Rintaro Inoue, Kouske Magami, Ken Morishima, Masaaki Sugiyama
2. 発表標題 Changes in size, Asp isomerization, and chaperone activity of human lens α -crystallin and high molecular weight protein complexes
3. 学会等名 International Conference on the Lens (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kosuke Magami, Takumi Takata, Ingu Kim, Noriko Fujii
2. 発表標題 The lost chaperone activity of human lens α -crystallin-derived peptide 66-80 is dramatically recovered by the replacement of L -isomer at Asp76
3. 学会等名 International Conference on the Lens (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ingu Kim, Noriko Fujii
2. 発表標題 Analysis of the post-translational modifications of the individual amino acids in lens proteins which were induced by irradiation and aging
3. 学会等名 International Conference on the Lens (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