

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 4 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2012

課題番号：20350077

研究課題名（和文） 蛋白質異常凝集過程の解明とその修復機構

研究課題名（英文） Mechanism of abnormal protein aggregation and the study of the repair enzyme.

研究代表者

藤井 紀子 (FUJII NORIKO)

京都大学・原子炉実験所・教授

研究者番号：90199290

研究成果の概要（和文）：加齢性眼疾患（白内障、加齢性黄斑変性症、角膜変性症など）、皮膚硬化などでは原因不明の蛋白質の異常凝集化が生じている。その原因は、蛋白質中に非酵素的に生じる D-アミノ酸が蛋白質の異常凝集を惹起し、疾患の発症に関与していることを蛋白質科学的に明らかにした。D-アミノ酸の生成は紫外線照射や酸化ストレスによって促進することも明らかとなった。さらに質量分析を用いた新規の D-アミノ酸迅速分析法の開発にも成功した。（208 字）

研究成果の概要（英文）：

Abnormal aggregation in protein from age-related diseases such as cataracts, age-related macular degeneration and solar elastosis has been observed. In this study, we examined the biologically uncommon D-amino acids in the cataractous eye lens and UV-damaged skin of elderly individuals. The formation of the D- amino acids in the protein was accelerated by UV-irradiation and oxidative stress. We proposed that D-amino acids may be one of the triggers for abnormal aggregation of proteins and can induce the partial unfolding of the corresponding proteins, leading to a diseased state. We demonstrated a new method for the analysis of isomerization of individual Asp residues in proteins using LC-MS. This makes it possible to analyze isomers of Asp residues in proteins precisely and quickly.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	11,300,000	3,390,000	14,690,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	15,600,000	4,680,000	20,280,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：蛋白質の異常凝集、D-アミノ酸

## 1. 研究開始当初の背景

老人性白内障の水晶体や、アルツハイマー病の脳内、動脈硬化の血管壁、光老化の皮膚などに異常な蛋白質凝集体が蓄積し、正常の蛋白質には存在しえない D-アミノ酸が存在することが報告されていたが、どの蛋白質のどの部位に D-アミノ酸が存在し、どのような機構で、どのくらい生成し、蛋白質異常凝集にどのように関与するかなどの詳細な研究が全くなされていなかった。我々は研究開始時に老人性白内障の(α)クリスタリン(Cry)中の特異的な部位に D-β-アスパラギン酸(Asp)を検出していたので、「加齢による蛋白質の異常凝集は蛋白質構成アミノ酸の D-体化が引き金である」という仮説を立て、D-β-Asp を分子指標として体内の様々な部位で共通して生じている種々の蛋白質の異常凝集を統一的に理解することを目標とした。

## 2. 研究の目的

- (1) αA-, αB-Cry の異常凝集過程の解析
- (2) 蛋白質中で生じる D-β-Asp 部位の特徴
- (3) 水晶体以外の眼内 D-β-Asp 含有蛋白質
- (4) 皮膚の D-β-Asp 蛋白質中の同定
- (5) Asp 異性体ペプチドの物性および機能変化
- (6) Asp 異性体を含むペプチドの迅速分析法の開発
- (7) D-Asp 含有蛋白質分解酵素 (DEAP) の生化学的性質

本研究の分担者の木野内が発見した D-Asp 含有タンパク質を特異的に認識する酵素 D-Aspartyl Endopeptidase (DAEP) を本凝集体に作用させ治療への道を探る。

## 3. 研究の方法

- (1) αA-, αB-Cry の異常凝集過程の解析

ヒトの水晶体の α-Cry は αA-, αB-Cry より構成されている。本研究では αA-, αB-Cry の組替体を調製し、紫外線照射後、その凝集過程を中性子散乱により追跡した。

(2) 蛋白質中で生じる D-β-Asp 部位の特徴  
老人性白内障の水晶体から βB2-クリスタリンを抽出、精製し、トリプシン処理を行い、そのペプチド断片を質量分析によって同定した。同定後、Asp 残基を含むペプチドを加水分解し、ジアスレオマーに誘導体化し、HPLC によって光学異性体分析を行った。

(3) 水晶体以外の眼内 D-β-Asp 含有蛋白質  
白内障以外の複数の加齢性眼疾患の異常凝集沈着物質に対して我々が開発した抗 D-β-Asp 含有ペプチド抗体を用いて免疫組織染色を行った。

(4) 皮膚の D-β-Asp 蛋白質中の同定  
マウスの皮膚に紫外線を照射し、紫外線照射量に依存して D-β-Asp 含有蛋白質が増加するかどうかを D-β-Asp 含有ペプチド抗体を用いて免疫組織染色で確認した。さらに免疫組織染色で陽性に染色された蛋白質を抽出し、その蛋白質をプロテオミクス的手法により特定した。

(5) Asp 異性体ペプチドの物性および機能変化  
αA-Cry(αAC) の 70-88 番のアミノ酸から構成されるペプチド部分 (αAC:70KFVIFL76DVKHFSE84DLTV88K) はインシュリンの凝集を促進することが知られている。今回我々は、上記ペプチドのアミノ酸の内、76 番目の Asp (76D) を 4 つの異性体 (Lα, Lβ, Dα, Dβ) に置換したペプチドを合成し、Asp の異性化がペプチドの性質にどのような影響を与えるかについて検討した。

(6) Asp 異性体を含むペプチドの迅速分析法の開発

結合型の Aso 異性体の定量を効率よく進める

ため、質量分析を用いた方法を開発した。

(7) D-Asp 含有蛋白質分解酵素 (DEAP) の生化学的性質

D-Asp 含有蛋白質を特異的に分解する酵素 (DEAP) の活性が酸化ストレスによって影響するかどうかをスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) 欠損マウスで調べた。

#### 4. 研究成果

(1)  $\alpha$ A-,  $\alpha$ B-Cry の異常凝集過程の解析

紫外線照射によって  $\alpha$ B-Cry のみが異常凝集化し、 $\alpha$ A-Cry には変化がなかった。水晶体中では  $\alpha$ B-Cry がダメージを受けても  $\alpha$ A-Cry が構造や機能を保持し、紫外線ストレスに対応可能であることが判明した。

(2) 蛋白質中で生じる D- $\beta$ -Asp 部位の特徴

$\beta$ B2-クリスタリンの Asp-4 残基が部位特異的に著しく D- $\beta$ -体化していることを初めて特定した。PDB にアクセスしたところ、 $\beta$ B2-クリスタリンの Asp-4 残基周辺は表面に曝されたフレキシブルな構造を有する部位であったことから Asp 残基は立体構造上、表面に曝されたフレキシブルな構造のところで D- $\beta$ -体化し易いことが初めて明らかとなった。

(3) 水晶体以外の眼内 D- $\beta$ -Asp 含有蛋白質 失明原因となる加齢性黄斑変性症の網膜、角膜変性症の角膜に D- $\beta$ -Asp 含有蛋白質が存在していることを見出した。また本研究により糖尿病など新たな疾患との関連が示唆された。

(4) 皮膚の D- $\beta$ -Asp 蛋白質中の同定

マウスの皮膚では紫外線照射量に依存して D- $\beta$ -Asp 含有蛋白質 (Fig.1 の矢印) が増加した。その蛋白質は表皮のケラチン蛋白質である事を質量分析で決定した。さらに、D- $\beta$ -Asp 化しているケラチンは紫外線照射量に依存して非酵素的な糖の付加も同時に生じていることが明らかとなった。

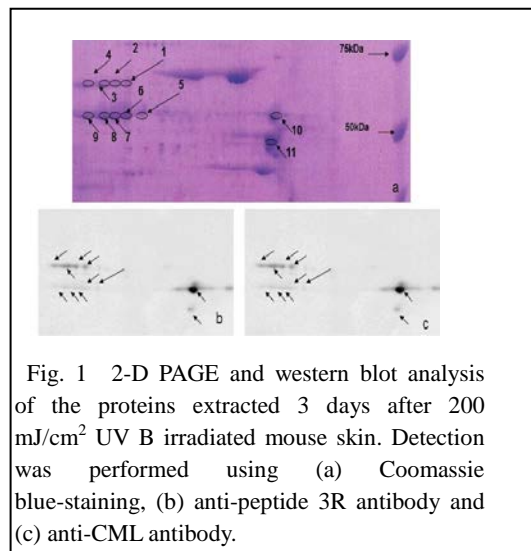


Fig. 1 2-D PAGE and western blot analysis of the proteins extracted 3 days after 200 mJ/cm<sup>2</sup> UV B irradiated mouse skin. Detection was performed using (a) Coomassie blue-staining, (b) anti-peptide 3R antibody and (c) anti-CML antibody.

(5) Asp 異性体ペプチドの物性と機能変化

$\alpha$ A-Cry ( $\alpha$ AC) の 70-88 の異性体ペプチド中の 76 番目の Asp を L $\beta$ , D $\alpha$  に D $\beta$  に置換した異性体ペプチドでは疎水性の低下、二次構造の消失 (Fig 2)、インシュリンとの相互作用の低下を引き起こした。1残基の Asp の異性化がペプチド全体の構造と機能に大きく影響することが明らかとなった。

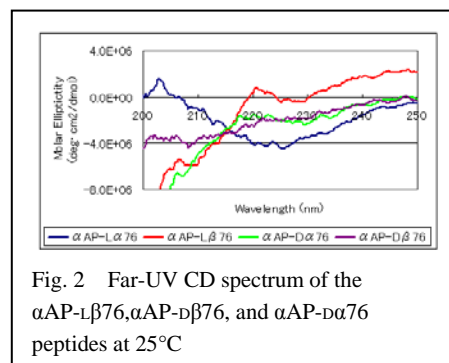


Fig. 2 Far-UV CD spectrum of the  $\alpha$ AP-L- $\beta$ 76,  $\alpha$ AP-D- $\beta$ 76, and  $\alpha$ AP-D- $\alpha$ 76 peptides at 25°C

(6) Asp 異性体を含むペプチドの迅速分析法の開発

質量分析 (LC/MS) で Asp の異性体は複数のピークに分離する。質量、MS/MS が同一で複数のピークに分離しているものが異性体であることが判明したので、Asp の異性体含有ペプチドを簡便に分析することができ、これにより分析時間が飛躍的に短縮できた (Fig 3)。

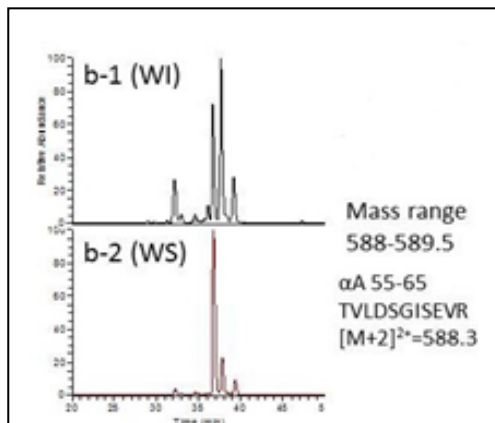


Fig. 3 A LC-MS chromatogram of a typical tryptic peptide of WI and WS fractions of lens proteins. MS range 588-589.5 m/z of WI and WS fraction

(7) D-Asp 含有蛋白質分解酵素 (DEAP) の生化学的性質

SOD 欠損マウスでは DAEP 活性が 1/2 に減少していた。DAEP 活性は酸化ストレスによって大きく変動することが考えられた。

#### 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 18 件)

1. Aki K, Fujii N and Fujii N. Kinetics of isomerization and inversion of aspartate58 of  $\alpha$ A-crystallin peptide mimics under physiological conditions. *PLoS One*. 2013 8 (3):e58515. doi:10.1371/journal.pone.0058515.
2. Miura Y, Harumiya S, Ono K, Fujimoto E, Akiyama M, Fujii N, Kawano H, Wachi H and Tajima S. Galectin-7 and actin are components of amyloid deposit of localized cutaneous amyloidosis. *Experimental Dermatology* 22, 36-40 (2013).
3. Fujii N, Sakaue H, Sasaki H and Fujii N. A rapid comprehensive LC-MS based survey of the Asp isomers in crystallins

from human cataract lenses. *J. Biol. Chem.* 287, 39992-40002 (2012).

4. Fujii N, Fujii N, Kida M, and Kinouchi T. Influence of L $\beta$ -, D $\alpha$ -, and D $\beta$ -Asp isomers of the Asp-76 residue on the properties of  $\alpha$ A-crystallin 70-88 peptide. *Amino Acids* 39, 1393-1399 (2010).
  5. Yamazaki Y, Fujii N, Sadakane Y and Fujii N. Differentiation and semiquantitative analysis of an isoaspartic acid in human  $\alpha$ -crystallin by post source decay on curved field reflectron. *Anal. Chem.* 82, 6384-6394 (2010)
  6. Kaji Y, Oshika T, Takazawa Y, Fukayama M and Fujii N. Accumulation of D $\beta$ -aspartic acid containing proteins in age-related ocular diseases. *Chemistry and Biodiversity* 7, 1364-1370 (2010).
  7. Sakai-Kato K, Kinouchi T, Fujii N, Imai K and Utsunomiya-Tate N. Screening system for D-Asp-containing proteins using D-aspartyl endopeptidase and two-dimensional gel electrophoresis. *Amino Acids* 36, 125-129 (2009).
  8. Sugiyama M., Fujii N., Morimoto Y., Kurabayashi S., Vigild, M., Sato T., Nakagawa T., Ito K., Mori K. and Fukunaga T. Structural evolution of human recombinant  $\alpha$ B-crystallin under UV irradiation. *Biomacromolecules* 9, 431-434 (2008).
- [学会発表] (計 75 件)
1. Fujii N. A new method for the analysis of isomerization of individual Asp residues in proteins using LC-MS. 2nd Annual Conference and EXPO of AnalytiX-2013 Suzhou, China. March, 20-24 2013 (invited).

2. 藤井紀子 「加齢性疾患に見られるタンパク質構成アミノ酸のラセミ化」第4回キラルサイエンス&テクノロジーシンポジウム 早稲田大学 2013. 3. 1
3. 藤井智彦 藤井紀子 「LC-MS を用いたタンパク質中の異性体アスパラギン酸残基の新しい分析方法」 第 85 回 日本生化学会大会 マリンメッセ福岡 2012. 12. 14-16
4. 藤井紀子 「ラセミ化と加齢性疾患ーリウマチ性疾患との関わりー」 大阪リウマチカンファレンス 北浜フォーラム 2012. 8. 11 (招待講演)
5. 藤井紀子 「加齢性眼疾患に見られるタンパク質の異常凝集とアミノ酸のラセミ化」第 23 回眼科酸化ストレス研究会 神戸商工会議所 2012. 7. 28 (招待講演)
6. 藤井紀子 「身近な D-アミノ酸、その存在と役割」日本アミノ酸学会第 3 回産官学連携シンポジウム 東京大学弥生講堂 2012. 6. 4 (招待講演)
7. 藤井紀子 「白内障とアミノ酸のラセミ化」第 38 回 水晶体研究会 慶応大学 2012. 1. 7-8 (招待講演)
8. Fujii N, Fujii N. and Sakaue H. D-Amino acids in lens crystallins and cataract. International conference on medical genetics and genomics, Bharathidasan Univ., Tiruchirappali, India, 12-14, December, 2011 (招待講演)
9. 藤井紀子 「白内障における水晶体蛋白質の化学変化」日本白内障学会ウインターセミナー 六本木アカデミーヒルズ 2011. 12. 3-4 (招待講演)
10. Fujii N, Fujii N and Sugiyama M. Abnormal protein aggregation due to the presence of D-aspartyl residues in cataractous lenses. International Union of Materials Research Societies (IUMRS)-ICA 2011. Taipei, Taiwan, 19-22, Sep.2011 (invited).
11. 藤井紀子 京都大学国際フォーラム 2011「新たな知の統合に向けて」京大百周年記念講堂 2011. 10. 15
12. 木野内忠稔, 土屋勇一, 山下茂, 藤井紀子 アフリカツメガエルにおける D-アスパラギン酸エンドペプチダーゼについて 第 84 回日本生化学会大会 京都国際会館 2011. 9. 19-24 (招待講演)
13. 藤井紀子 白内障水晶体中のクリスタリンの Asp 残基の反転 第 84 回日本生化学会大会 京都国際会館 2011. 9. 19-24 (招待講演)
14. 藤井紀子 蛋白質中の D-アミノ酸研究ー最近の飛躍的進歩 生命の起原および進化学会第 36 回学術講演会 福岡工業大学 2011.3.15-3.18 (招待講演)
15. 藤井紀子 白内障と蛋白質の変化 藤井紀子(招待)第 37 回 水晶体研究会 日光金谷ホテル 2011. 1.8-9(招待講演)
16. 藤井紀子 水晶体構造タンパク質の加齢性変化と白内障 第 59 回高分子討論会 北海道大学 2010.9. 15-17 (招待講演)
17. 藤井紀子 白内障クリスタリン中のアミノ酸残基のラセミ化と蛋白質の構造変化 第 49 回日本白内障学会総会 大阪国際会議場 2010.6.25-27 (招待講演)
18. Fujii N The Symposium on Chiral Science & Technology: Mesochemistry & Chemical Wisdom. Stereo-inversion of amino acids in proteins and the age-related disease 早稲田大学 2009.9.24-25 (招待講演)
19. 藤井紀子 加齢性疾患に見られるタンパク質異常凝集体の存在とD-アスパラギン酸の

蓄積日本農芸化学会 2009 大会 福岡国  
際会議場 2009.3.28 (招待講演)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

<http://hlweb.rii.kyoto-u.ac.jp/fl/>

## 6. 研究組織 連携研究者加える

### (1) 研究代表者

藤井 紀子 (FUJII NORIKO)  
京都大学 ・ 原子炉実験所 ・ 教授  
研究者番号：90199290

### (2) 研究分担者

杉山 正明 (SUGIYAMA MASAOKI)  
京都大学 ・ 原子炉実験所 ・ 教授  
研究者番号：10253395  
森本 幸生 (MORIMOTO YUKIO)  
京都大学 ・ 原子炉実験所 ・ 教授  
研究者番号：80200450  
木野内 忠稔 (KINOUCHI TADATOSHI)  
京都大学 ・ 原子炉実験所 ・ 講師  
研究者番号：90301457  
齊藤 毅 (SAITO TAKESHI)  
京都大学 ・ 原子炉実験所 ・ 助教  
研究者番号：10274143

### (3) 連携研究者

定金 豊 (SADAKANE YUTAKA)  
鈴鹿医療科学大学 ・ 薬学部 ・ 教授  
研究者番号：60293304  
加治 優一 (KAJI YUICHI)

筑波大学 ・ 医学部 ・ 准教授  
研究者番号：50361332  
佐々木洋 (SASAKI HOROSHI)  
金沢医科大学 ・ 医学部 ・ 教授  
研究者番号：60260840  
後藤 祐児 (GOTO YUJI)  
大阪大学蛋白質研究所 ・ 教授  
40153770