

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590278

研究課題名（和文）酸化ストレスによって生じるD-アスパラギン酸含有蛋白質の動態と
その代謝機構の研究研究課題名（英文）Metabolic and Kinetic Study of D-Aspartate-Containing Protein Caused by
Oxidative Stress

研究代表者

木野内 忠稔 (Tadatoshi Kinouchi)

京都大学・原子炉実験所・講師

研究者番号：90301457

研究成果の概要（和文）：従来、ヒトのタンパク質は、全て L 型のアミノ酸から作られると考えられてきたが、近年、タンパク質中のアスパラギン酸（Asp）が酸化ストレスによって D 化することが判明し、それがタンパク質の変性を誘発して老化関連疾患（アルツハイマー病など）の原因になると考えられている。我々は、D-Asp 含有タンパク質を特異的に分解する酵素：D-Aspartyl Endopeptidase: DAEP を発見し、それが有害な D-Asp 含有タンパク質の品質管理をすることによって、生体の恒常性を保っているものと考えている。

研究成果の概要（英文）：The formation and accumulation of D-aspartate residue (D-Asp) in proteins caused by oxidative stress leads to denaturation of proteins, and is consequently responsible for aging-related misfolding diseases such as Alzheimer's disease. We sought to identify that an unknown protease selectively degrades the D-Asp-containing protein, namely D-aspartyl endopeptidase (DAEP), and finally purified it. DAEP therefore seems to physiologically serve as the quality control system against the noxious D-Asp-containing protein in the long life span of mammals.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：D-アミノ酸、フォールディング病、タンパク質分解酵素、酸化ストレス、ミトコンドリア、老化、ラセミ化

1. 研究開始当初の背景

従来、ヒトのタンパク質は、全て L 型のアミノ酸から構成されていると考えられてきた。しかしながら、フォールディング病の原因タンパク質など、細胞外で代謝速度の遅いタンパク質に D-アスパラギン酸 (D-Asp) を含むものが発見され、発症との因果関係が指摘されている (表 1)。D 化の原因として、申請者らは温度や酸化ストレスによる非酵素的な化学変化であることを示し、その反応速度論的な解析を行い、高齢者で D 化率が高くなることを明らかにしてきた。一方、細胞内から D-Asp 含有タンパク質は見つかっていなかった。したがって、有害な D-Asp 含有タンパク質は、細胞内では特異的なプロテアーゼの品質管理を受けて分解されているのではないかと考え、独自に活性測定法を開発してその探索を行った (方法(1))。その結果、哺乳類のミトコンドリアの内膜に結合し、巨大な複合体構造を有する 700 kDa のプロテアーゼを発見した。本酵素は、D-Asp 含有ペプチドを D-Asp 残基の C 末端側でエンド型の様式で切断し、L-Asp 含有ペプチドを全く分解しないという高い基質特異性を有していたことから、これを D-Aspartyl Endopeptidase: DAEP と名付けた。

表1 D-Asp含有タンパク質と関連疾患	
D-Asp含有タンパク質	関連疾患
βアミロイドタンパク質 タウタンパク質	アルツハイマー病
αA-クリスタリン	白内障
プリオンタンパク質	プリオン病
ミエリン塩基性タンパク質	多発性硬化症
エラスチン	動脈硬化
コラーゲン	パジェット病、骨粗鬆症

2. 研究の目的

老化と共に体内で増加する D-Asp 含有タンパク質に対し、DAEP がスカベンジャーとして作用するならば、その生理機能は抗老化・抗ストレス機構であると捉えることが出来る。そこで本研究では、D-Asp 含有タンパク質の動態を調査し、DAEP による代謝システムの全貌を理解することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) DAEP の活性測定法と阻害剤について

分解されると蛍光物質 (MCA) を遊離する人工基質: Succinyl-[D-Asp]-MCA を開発し、その分解活性を指標として、ウサギを材料に各臓器における DAEP 活性を探索した。その結果、肝ミトコンドリアに高い DAEP 活性を見出し、これを精製材料として DAEP の精製法を樹立した。また、新たに特異的阻害剤: Benzoyl-L-Arg-L-His-[D-Asp]-CH₂Cl も開発した。

(2) DAEP による D-Asp 含有タンパク質の探索法について

原理: D-Asp 含有タンパク質を探索・同定すべき試料 (タンパク質抽出液) を等分し、一方には精製した DAEP と共に DAEP 阻害剤を加え (図 1 左)、残りには精製した DAEP のみを加える (図 1 右)。それらを一定時間後に二次元電気泳動で分離すると、左の試料では D-Asp 含有タンパク質がスポットとして検出されるが、右の試料では、DAEP により分解されてしまうため、より小さなスポットになる、もしくは消滅してしまう。元のスポットを質量分析計を用いて同定する。

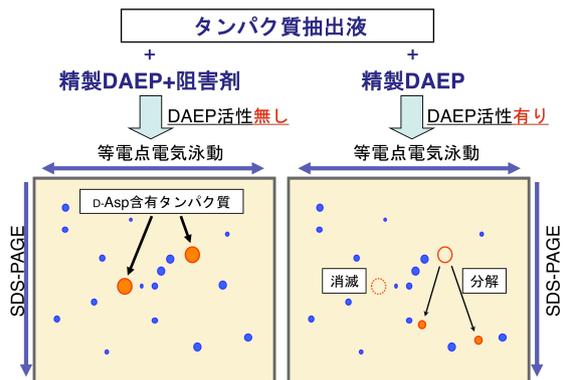


図 1: 二次元電気泳動による D-Asp 含有タンパク質の探索原理

4. 研究成果

(1) DAEP の基質特異性について

生体内での D-Asp 含有タンパク質の動態を調査するにあたり、まず、その特異的な分解酵素である DAEP の基質特異性について詳細に検討した。なぜなら、DAEP を用いて新規

の D-Asp 含有タンパク質の探索が高精度に実現できるからである(方法(2)、成果(3)を参照)。様々な合成基質を用いて DAEP の基質特異性を検討したところ、L- α -Asp や D- α -Ser を含む合成基質を分解しなかった。そこで、D 化や基質の長さ、周辺配列が DAEP の基質特異性に及ぼす影響について調べるため、 α A-クリスタリンの部分配列(Thr-Val-Leu-Asp-Ser-Gly-Ile-Ser-Glu-Val-Arg)をモデルペプチドとして、4 残基目の Asp をそれぞれ L- α -Asp、L-isoAsp (L- β -Asp)、D- α -Asp、D-isoAsp (D- β -Asp) に置換したものを合成し、その切断活性を検討した。 α A-クリスタリンの部分配列をモデルペプチドとした理由は、実際に老化した水晶体から D 化した Asp 残基を含む α A-クリスタリンが発見されているからである。実験の結果、D- α -Asp を含むペプチドのみ DAEP は分解し、他のペプチドは分解しなかった(図 2)。次に、40 残基からなる β アミロイドタンパク質を基質に用いて DAEP の分解活性を検討した。その結果、7 残基目に D- α -Asp を含む β アミロイドタンパク質を分解した。以上の結果から、DAEP は D- α -Asp

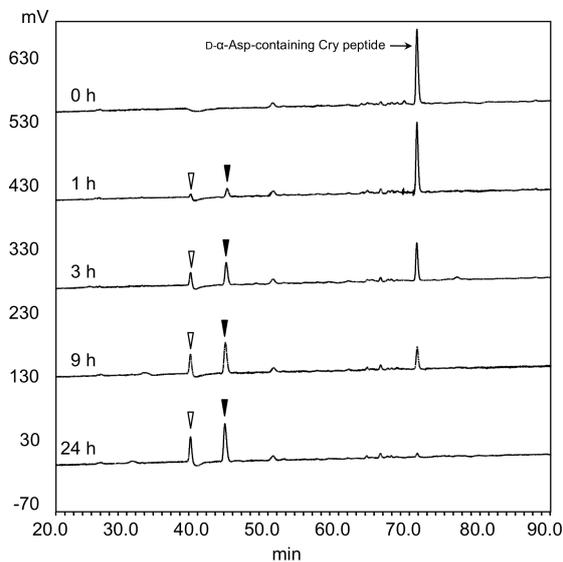


図 2: DAEP による D- α -Asp 含有タンパク質の分解
D- α -Asp を含む α A-クリスタリン (Cry) の部分ペプチドと DAEP を 37°C で混合し、各時間の Cry ペプチドの分解の様子を逆相 HPLC によって観察した。その結果、経時的に Cry ペプチドは Thr-Val-Leu-Asp (▽) と Ser-Gly-Ile-Ser-Glu-Val-Arg (▼) に分解された。

を含むペプチド性基質に非常に高い基質特異性を示すことが明らかになった。

(2) マウスにおける DAEP 活性の加齢による変化について

若年から老年まで週齢の異なる野生型のマウスを用いて DAEP 活性が加齢とともにどのように変動するのか調べた。その結果、12 週齢に比べ 69 週齢ではその活性は 2.5 倍に上昇したが、121 週齢では減少し、12 週齢とほとんど変わらなかった。この現象は、加齢ともなって D-Asp 含有タンパク質が増加し、それを基質とする DAEP の活性も上昇したが、その後さらに加齢が進むと酸化ストレスによって DAEP 自身も損傷するため、活性が低下したと考えられた。これを証明するため、次に生体内で酸化ストレスが亢進しているスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) 欠損マウスを用いて、DAEP の活性を調べた。その結果、DAEP 活性は半分に減少していた。従って、長期にわたる酸化ストレスの曝露には DAEP 自身の損傷も大きく、それが D-Asp 含有タンパク質の蓄積を亢進し、最終的に個体の老化を招くのではないかと考えられた。

(3) D-Asp 含有タンパク質の探索と同定

研究方法②で樹立した探索法を用いて、老化マウス脳から D-Asp 含有タンパク質の探索を行ったところ、ミエリン塩基性タンパク質、チューブリン関連タンパク質、チトクローム c 酸化酵素などが発見された。現在も探索を継続している。

(4) 哺乳類以外での DAEP 活性について

哺乳類は、長寿で活発に生命活動を行う一方で、体内で酸化ストレスが亢進することから、蓄積する D-Asp 含有タンパク質に対し、DAEP のような品質管理システムを進化の過程で獲得したものと推測している。そこで、哺乳類以外の生物種における DAEP 活性を調査し、DAEP の進化的な起源を探ることにした。調査した生物種は、*Thermoplasma acidophilum*、*Archaeoglobus fulgidus*、*Pyrococcus horikoshii*、*Thermococcus celericrescens* (以上、古細菌)、大腸菌、*Thermus thermophilus* (グラム陰性真正細菌)、酵母

(*Saccharomyces cerevisiae*)、線虫(*Caenorhabditis elegans*)、サバ(卵)、ニワトリ(卵、肝)、アフリカツメガエル(卵)である。上記古細菌と *T. thermophilus* は高度好熱菌であり、遊離アミノ酸に対するラセマーゼを発現していることから DAEP の存在が期待されたが、その活性は検出限界以下であった。一方、ニワトリ肝、サバ卵、アフリカツメガエル卵からは高い DAEP 活性を検出することができた。大腸菌、酵母、線虫では DAEP 活性がないことをあわせて考えると、DAEP は生物進化の比較的新しい次期(4-5億年前)に出現した特異な分子であると考えられる。また、これまで DAEP を抗老化・抗ストレス機構としてとらえてきたので、サバ卵、アフリカツメガエル卵から DAEP 活性が検出されたことは、初期発生においても DAEP が生理的に機能していることを示唆するものであり、非常に興味深い。

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 7 件)

- ① Kinouchi T and Fujii N: Structural Consideration of Mammalian D-Aspartyl Endopeptidase. *Chemistry and Biodiversity*, **7** (2010) 1403-1407. 査読有
- ② Kinouchi T, Matsuda A, Kawakami S, Shimizu T, Shirasawa T and Fujii N: Influence of Oxidative Stress on D-Aspartyl Endopeptidase Activity. *Chemistry and Biodiversity*, **7** (2010) 1398-1402. 査読有
- ③ Fujii N, Fujii N, Kida M and Kinouchi T: Influence of L β -, D α -, and D β -Asp Isomers of the Asp-76 Residues on the Properties of α A-Crystallin 70-88 Peptide. *Amino Acids*, **39** (2010) 1393-1399. 査読有
- ④ Fujii N, Kaji Y, Fujii N, Motoie R, Mori Y and Kinouchi T: Collapse of Homochirality of Amino Acids in Protein from Various Tissues During Aging. *Chemistry and Biodiversity*, **7** (2010) 1389-1397. 査読有
- ⑤ Motoie R, Fujii N, Tsunoda S, Nagata K, Shimo-Oka T, Kinouchi T, Fujii N, Saito T and Ono K: Localization of D- β -Aspartyl Residue-Containing Proteins in Various Tissues. *Int. J. Mol. Sci.*, **10** (2009) 1999-2009. 査読有
- ⑥ 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** (2009) 125-129. 査読有
- ⑦ Nakamura T, Sakai M, Sadakane Y, Haga T, Goto Y, Kinouchi T, Saito T and Fujii N: Differential Rate Constants of Racemization of Aspartyl and Asparaginy Residues in Human α A-crystallin Mutants. *Biochim Biophys Acta*, **1784** (2008) 1192-1199. 査読有

[学会発表] (計 13 件)

- ① Kinouchi T & Fujii N: Quality Control of Damaged Mitochondrial Proteins by D-Aspartyl Endopeptidase. *7th Conference of Asian Society for Mitochondrial Research and Medicine*, 2010年12月16日、福岡国際会議場・福岡
- ② 木野内忠稔、土屋勇一、山下茂、藤井紀子「D-アスパラギン酸エンドペプチダーゼ活性の進化的考察」第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会、2010年12月7日、神戸ポートアイランド・兵庫
- ③ 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卵における新規D-アスパラギン酸エンドペプチダーゼについて」第6回D-アミノ酸研究会学術講演会、2010年9月17日、富山国際会議場・富山
- ④ 木野内忠稔、藤井紀子「哺乳類以外の生物種におけるD-アスパラギン酸エンドペプチダーゼ活性について」第33回日本基礎老化学会大会、2010年6月17日、名古屋大学野依記念学術交流館・愛知
- ⑤ 木野内忠稔、加藤くみ子、藤井紀子「D-アスパラギン酸タンパク質の網羅的な検索法の開発」第82回日本生化学会大会、2009年10月22日、神戸ポートアイランド・兵庫

- ⑥ Kinouchi T, Saito T & Fujii N.: Substrate Specificity and Properties of Mammalian D-Aspartyl Endopeptidase. *1st International Conference of D-Amino Acid Research*, 2009年7月3日、淡路夢舞台国際会議場・兵庫
- ⑦ 木野内忠稔、加藤くみ子、藤井紀子「D-アスパラギン酸含有蛋白質のスクリーニング法の開発」第25回日本老年学会総会・第32回日本基礎老化学会大会、2009年6月20日、パシフィコ横浜・神奈川
- ⑧ 木野内忠稔、加藤くみ子、藤井紀子「特異的な分解酵素を用いた D-アスパラギン酸含有蛋白質のスクリーニング法の開発」第9回日本蛋白質科学会年会、2009年5月20日、熊本全日空ホテルニュースカイ・熊本
- ⑨ 木野内忠稔、藤井紀子「ほ乳類の D-アスパラギン酸エンドペプチダーゼの基質特異性」第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会、2008年12月10日、神戸ポートアイランド・兵庫
- ⑩ Sakai-Kato K, Kinouchi T, Fujii N, Imai K, and Utsunomiya-Tate N: Development of screening system for D-Asp-containing proteins. *HPLC2008 Kyoto*, 2008年12月4日、京都大学桂キャンパス船井哲良記念講堂・京都
- ⑪ 木野内忠稔、藤井智彦、清水健一、川口剛広、藤井紀子「哺乳類由来 D-Aspartyl endopeptidase の基質特異性と分解能力について」第4回 D-アミノ酸研究会学術講演会、2008年9月20日、名古屋大学・愛知
- ⑫ Kinouchi T & Fujii N: Isolation and Characterization of Mammalian Specific Enzyme for Racemized Proteins, D-Aspartyl Endopeptidase. *33rd FEBS Congress & 11th IUBMB Conference*, 2008年6月30日、アテネ・ギリシャ
- ⑬ 木野内忠稔、藤井紀子「哺乳類由来 D-アスパラギン酸エンドペプチダーゼの基質特異性について」日本基礎老化学会第31回大会、2008年6月13日、信州大学・長野
- ⑭ 木野内忠稔、藤井紀子「哺乳類における D-アスパラギン酸エンドペプチダーゼの基質特異性の検討」第8回日本蛋白質科学会年会、2008年6月12日、タワーホール船堀・東京

〔図書〕(計1件)

- ① 医学大辞典(第二版)、木野内忠稔(分担執筆)、伊藤正男、井村裕夫、高久史麿(総編集)、医学書院(2009)

〔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0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.rri.kyoto-u.ac.jp/fl/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木野内 忠稔 (Tadatoshi Kinouchi)
 京都大学・原子炉実験所・講師
 研究者番号：90301457

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：