

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：蛋白質異常凝集、D-アミノ酸、加齢性疾患、白内障、光学異性体分析

## 1. 研究計画の概要

本研究は、原因不明の加齢性疾患(白内障、皮膚硬化など)の組織にみられる蛋白質の異常凝集化はアミノ酸の D-体化が引き金であるという仮説を証明し、蛋白質の異常凝集を D-Asp を分子指標として統一的に理解することを目的としている。本年度までに下記の研究を行った。

- (1)白内障の主原因である $\alpha$ A-,  $\alpha$ B-クリスタリン (Cry) の異常凝集過程の解析
- (2) 水晶体以外の眼組織における D- $\beta$ -Asp 含有蛋白質の検出
- (3)加齢や紫外線照射によって生じる皮膚の D- $\beta$ -Asp蛋白質中の同定
- (4)D-Asp 含有蛋白質分解酵素 (DEAP) の生化学的性質

## 2. 研究の進捗状況

- (1) ヒトの水晶体の $\alpha$ -Cry は $\alpha$ A-,  $\alpha$ B-Cry より構成されている。本研究では $\alpha$ A-,  $\alpha$ B-Cry のリコンビナント試料を調製し紫外線照射後、その凝集過程を追跡した。その結果、 $\alpha$ B-Cry のみが異常凝集化し、 $\alpha$ A-Cry に変化がなかった。水晶体中では紫外線照射によって $\alpha$ 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) 我々が開発した D- $\beta$ -Asp 含有蛋白質抗体を用いて免疫組織染色により網膜、結膜、角膜の不溶性凝集物に D- $\beta$ -Asp 含有蛋白質を見出した。現在これらの蛋白質をプロテオミクス的手法により同定中である。
- (3) マウスの皮膚に紫外線照射を行い、D- $\beta$ -Asp 含有蛋白質抗体を用いて免疫組織染色を行ったところ、紫外線の線量に依存して表皮に本抗体に陽性の部位が得られた。次いで、紫外線照射皮膚から蛋白質を抽出し、2

次元電気泳動を行い、D- $\beta$ -Asp 含有蛋白質抗体によるウエスタンブロッティングを行い、その陽性スポットの蛋白質をゲル内酵素処理し、得られた断片ペプチドの質量分析を行った。その結果、これらの蛋白質は keratin-1, keratin-6B, keratin-10 keratin-14 であることが明らかとなった。

(4) DEAP は哺乳類のミトコンドリアの内膜に結合し 700 kDa 巨大な複合体構造を有することがわかった。また、スーパーオキシドジスムターゼ (SOD) 欠損マウスでは DAEP 活性が半分に減少していた。

## 3. 現在までの達成度

①当初の計画以上に進展している。

(理由)

(1) の成果は $\alpha$ A-,  $\alpha$ B-Cry という生化学的性質の類似している二種類のサブユニットがストレスに対して異なる応答をするという意外な結果を得ることができた。又、本研究で蛋白質中の Asp 残基の異性化部位を簡便に検出する方法を開発した。

(2) の成果は D- $\beta$ -Asp 含有蛋白質が広く加齢性疾患に蓄積しているという証拠を明確に示しているもので、今後 D- $\beta$ -Asp が様々な加齢性疾患の分子指標となり得る可能性を示している。

(3) 我々は以前の研究で皮膚に紫外線を照射すると蛋白質中の D- $\beta$ -Asp 化が進行することを見出しているが本研究により皮膚のどの蛋白質に D- $\beta$ -Asp 化が進行するのかを初めて同定することができた。

(4) 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。

## 4. 今後の研究の推進方策

(1)ヒトの水晶体中の他の Cry の異性化部位を決定する。また、蛋白質中の D- $\beta$ -Asp 残基

の微量迅速分析法の開発を推進する。  
(2)網膜、結膜、角膜の不溶性凝集物中の D-β-Asp 含有蛋白質を同定する。  
(3)keratin-1, keratin-6B, keratin-10 keratin-14 中の D-β-Asp 部位を決定する。  
(4)DAEP活性を欠損したモデル動物を開発し、上記の問題点を解明していきたいと考えている。

5. 代表的な研究成果  
(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 16 件)

1. **Fujii N.**, Fujii N, Kida M, and **Kinouchi T.** Influence of Lβ-, Dα-, and Dβ-Asp isomers of the Asp-76 residue on the properties of αA-crystallin 70-88 peptide. *Amino Acids* 39, 1393-1399 (2010). 査読：有
2. Yamazaki Y, Fujii N, **Sadakane Y** and **Fujii N.** Differentiation and semiquantitative analysis of an isoaspartic acid in human α-crystallin by post source decay on curved field reflectron. *Anal. Chem.* 82, 6384-6394 (2010)査読：有
3. **Kaji Y.**, Oshika T, Takazawa Y, Fukayama M and **Fujii N.** Accumulation of Dβ-aspartic acid containing proteins in age-related ocular diseases. *Chemistry and Biodiversity* 7, 1364-1370 (2010). 査読：有
4. 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). 査読：有
5. **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 αB-crystallin under UV irradiation. *Biomacromolecules* 9, 431-434 (2008). 査読：有

[学会発表] (計 62 件)

1. 藤井紀子 蛋白質中の D-アミノ酸研究—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)
2. 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)
3. 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)
4. 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)
5. Noriko Fujii The Symposium on Chiral Science & Technology: Mesochemistry & Chemical Wisdom. Stereoinversion of amino acids in proteins and the age-related disease 早稲田大学 2009.9.24-25 (招待講演)
6. 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 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]

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