

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：31305

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K16981

研究課題名(和文) 白内障の病態形成に関わるクリスタリン中のアミノ酸残基D-体化機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of D-amino acid residue formation in crystallin involved in the pathogenesis of cataract

研究代表者

真鍋 法義 (Manabe, Noriyoshi)

東北医科薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：10392383

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：白内障の病態形成に関わるクリスタリン中アスパラギン酸やアスパラギン残基の非酵素反応には、触媒が必要とされる。そこで、触媒として乳酸やリン酸、酸化残基が働いているという仮説のもと、計算化学・物理化学的実験・生化学的実験を用いて研究を行った。計算化学的検討では、乳酸触媒による活性化障壁が生理的条件下で反応が進行する値付近であった。これは、生化学実験により支持することができた。さらに、緩衝液の影響も確認できた。紫外線の影響については、UVを照射した試料のNMRスペクトルの変化を解析することで、アミノ酸の構造変化から明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

白内障の原因は様々考えられるが、その1つとしてクリスタリン中のアスパラギン酸(Asp)残基の異性化が挙げられる。Asp残基が異性化する経路は非酵素反応だが、反応には触媒が必要となる。本研究では、乳酸やリン酸緩衝液を異性化経路の触媒とし、反応が生理的条件下で起こるかを計算化学的に明らかとし、その結果を生化学実験により補完確認すること。また、紫外線の影響をNMR法を用いてAsp残基の異性化から明らかとする方法を確立すること。以上から、世界の失明原因第1位である白内障の病態形成に関わる因子解明とその新規検出方法の検討を行った。

研究成果の概要(英文)：The non-enzymatic reactions of aspartic acid and asparagine residues in crystallin, which are involved in the pathogenesis of cataracts, require a catalyst. Based on the hypothesis that lactate, phosphate, and oxidized residues act as catalysts for this reaction, we conducted a study using computational chemistry, physicochemical experiments, and biochemical experiments.

In the computational chemistry study, the lactate-catalyzed activation barrier was near the value at which the reaction proceeds under physiological conditions. This was supported by biochemical experiments. Furthermore, the effect of buffer solution was also confirmed. The effect of UV light was clarified by analyzing the changes in the NMR spectra of the UV-irradiated samples and the structural changes of amino acids.

研究分野：物理化学

キーワード：白内障病態形成 計算化学 NMR

## 1. 研究開始当初の背景

生体内に存在するアミノ酸は、L-体のみで構成されると考えられてきた。しかし、近年の光学異性体分析技術の発展により、D-体のアミノ酸 (D-アミノ酸) が結合型・遊離型のどちらも広く存在していることが明らかとなっている。また、タンパク質中の D-アミノ酸残基が多く検出されるのは加齢に関連するタンパク質であり、白内障などの加齢性疾患において増加することが知られている。L-体のアスパラギン (Asn) やアスパラギン酸 (Asp) が D-体の Asp に変化する経路では、非酵素的に反応が進行するが反応には触媒が必要であり、隣接残基や近接する残基の影響が報告されている。また、紫外線 (UV-B) の影響により、L-Asp の D-体化が引き起こされる。さらには、脳内における加齢の指標として、乳酸濃度の上昇が利用できる。タンパク質製剤が、運搬するキャリア (例えば、PLGA などのフィルム) に含有されると、PLGA の分解時に成分であるグリコール酸や乳酸が遊離しタンパク質製剤を不活化する。などの報告がある。つまり、乳酸や紫外線は L-Asp や L-Asn の D-Asp への変化を促進することで、クリスタリンの凝集を誘起し、白内障につながっている可能性がある (図 1)。

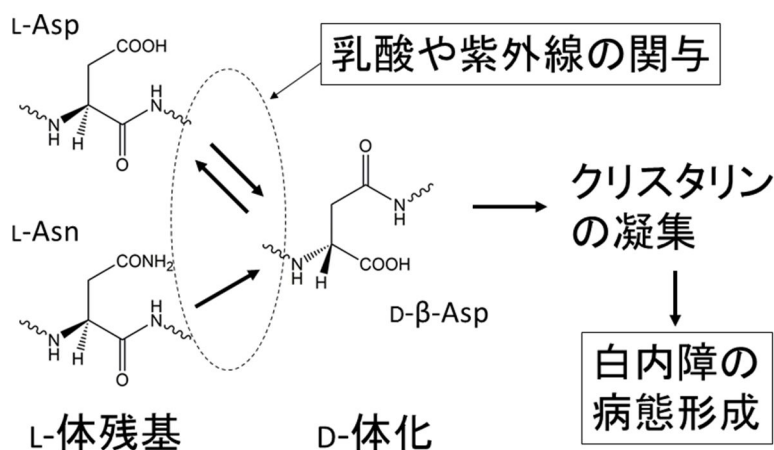


図 1 研究の背景

## 2. 研究の目的

本研究は、白内障につながるクリスタリン中アミノ酸残基の D-体化機構を、計算化学的・生化学的・物理化学的手法を相互補完的に利用することで解明することを目的とした。

(1) 計算化学的手法：クリスタリン中の特に Asn や Asp 残基に注目し、L-体の Asn や Asp が D-体の Asp へと変化する多段階反応の経路計算を行う。その際、加齢の指標になりうる乳酸や、紫外線の影響による酸化残基を触媒として配置する。そして、乳酸や酸化残基が反応の活性化エネルギーにおよぼす影響を明らかとする。

(2) 生化学的手法：計算化学的手法により得られた結果を、モデルペプチドを用いて実験的に検証する。

(3) 物理化学的手法：Trp 残基の酸化による Asp 残基の異性化のメカニズムの詳細を明らかとするため、NMR 法によりペプチド中の Asp 残基の異性化を同定する方法を確立する。また、その方法を用いて紫外線を照射したモデルジペプチド L-Asp-L-Trp の Asp 残基の異性化を in situ で捉える。

これらにより、D-アミノ酸が発生する機構を解明し、白内障の病態形成の理解や予防につなげる。

## 3. 研究の方法

(1) 計算化学的手法による L-Asp や L-Asn 残基の D-体化におよぼす乳酸や紫外線の触媒機構の解明：L-Asp や L-Asn 残基のモデル化合物が D-体化する多段階におよぶ反応機構への、解離状態の乳酸の触媒効果を、計算化学的に構造最適化、エネルギー計算を行い、反応の活性化エネルギーを求めることで検討した。

(2) 生化学的手法による計算結果の検証：計算化学的に求めた結果を、実際にモデルペプチドを用いた生化学実験により検証した。乳酸や酸化残基の濃度を变化させた実験から、D-体化反応の

活性化エネルギーを算出し、計算化学的に求めた数値と比較した。これにより、推定した反応機構の妥当性を検証した。

(3) 物理化学的手法：4種類のモデルジペプチド L-Asp-L-Trp、L-isoAsp-L-Trp、D-Asp-L-Trp、D-isoAsp-L-Trp の各水溶液について各種 2次元 NMR スペクトルを測定し、NMR 信号の帰属を行った。さらに、L-Asp-L-Trp ジペプチド水溶液に  $0.2 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$  の UV-B (302 nm) を照射し、経時的に回収した試料について各種 NMR スペクトルを測定して、異性化の程度の判別を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 計算化学的手法

解離状態の乳酸を触媒として配置した L-Asp や L-Asn の非酵素反応は、L-Asp から中間体であるスクシンイミド (Suc) までが 5 段階反応であり、活性化障壁は  $101.6 \text{ kJ/mol}$  であった。また、中間体である Suc のラセミ化反応は 1 段階で反応が進行し、その活性化障壁は  $132.0 \text{ kJ/mol}$  であった。L-Asn から Suc までの反応は、4 段階で反応が進行しその活性化障壁は  $115.7 \text{ kJ/mol}$  であった。これらのように、解離状態の乳酸を利用することで生理的条件下での非酵素反応が進行する活性化障壁の目安である  $120 \text{ kJ/mol}$  をおおむね下回る結果を得ることができた。

##### (2) 生化学的手法

水晶体タンパク質であり異性化が報告されている A-クリスタリンの 58 残基目の Asp (Asp58) を含む 11 残基のモデルペプチドを用いて研究を行った。乳酸濃度を段階的に変化させた溶媒でモデルペプチドを 70 °C で保存し、各設定時間経過後に HPLC で各 Asp 異性体の濃度変化を観察した。その結果、乳酸の濃度依存的に L-Asp の異性体である L-Asp、D-Asp、D-Asp 濃度が増加していくことを明らかとした (図 2)。また、保存温度を変化させて異性化反応実験を行うことで、アレニウスプロットから活性化障壁の値を算出したところ、乳酸濃度  $100 \text{ mM}$  では  $101.6 \text{ kJ/mol}$  となり、計算結果を生化学実験からも支持することができた。さらに、リン酸緩衝液の触媒効果は  $90 \text{ kJ/mol}$  程度となり、緩衝液の影響も検討できた。これらから、様々な因子が触媒効果を発揮していることを明らかとした。

計算化学的手法の結果と生化学的手法を比較し、反応機構の妥当性を評価したのは初めての報告である。

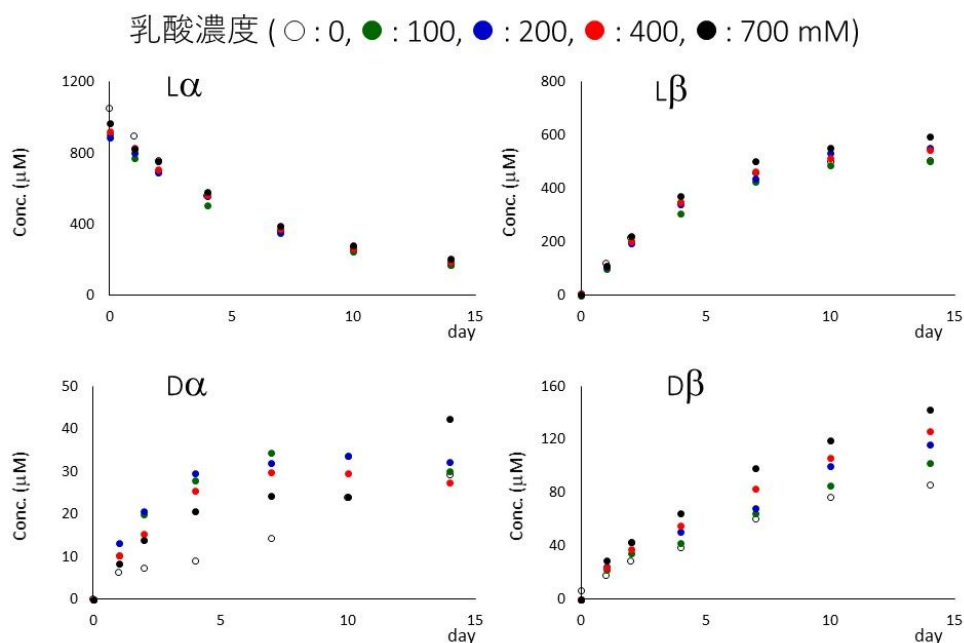


図 2 Asp 残基異性化の濃度変化

##### (3) 物理化学的手法

酸化 Trp 残基の同定を試みた。4種類のモデルジペプチドの各種 2次元 NMR スペクトルを測定し、L体とD体、L体とiso体の区別が可能であった (図 3)。また、UV-B の照射により Trp 残基に起こる化学構造変化を、核磁気共鳴 (NMR) 法と質量分析 (MS) 法を組み合わせる研究を行った。Asp-Trp ジペプチド水溶液に UV-B (302 nm) を照射し、UV 照度を計測しながら試料を回収した。Asp-Trp 水溶液は、UV-B 照射により茶色に呈色し、UV 光量の増加に伴い呈色が濃くなった。MS 法による解析においては、時間依存的に原料のピークが減少し、NMR スペクトルパターンの比較により、UV を照射した L-Asp-L-Trp ジペプチド水溶液の NMR スペクトルにおいて、Asp 残

基に由来する信号の化学シフトや NOE パターンが変化していた。以上から、UV 照射によりジペプチド中において Asp 残基の異性化を示唆する結果が得られた。

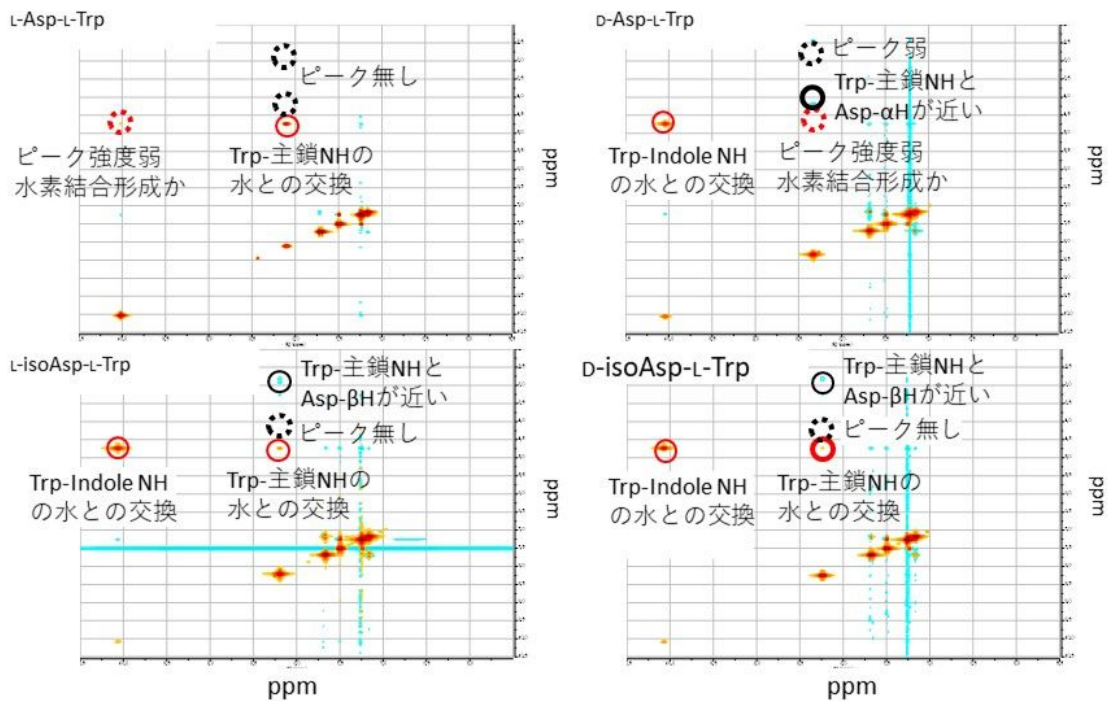


図3 異性化モデルペプチドのNMRスペクトル解析: NOESY (NH領域)

## 5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Ryota Kirikoshi, Noriyoshi Manabe, Ohgi Takahashi	4. 巻 23
2. 論文標題 Phosphate-Catalyzed Succinimide Formation from an NGR-Containing Cyclic Peptide: A Novel Mechanism for Deammoniation of the Tetrahedral Intermediate	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 2217
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/molecules23092217	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 Ohgi Takahashi, Ryota Kirikoshi and Noriyoshi Manabe	4. 巻 7
2. 論文標題 Racemization of Serine Residues Catalyzed by Dihydrogen Phosphate Ion: A Computational Study	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Catalysts	6. 最初と最後の頁 363
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/catal7120363	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 Ryota Kirikoshi, Noriyoshi Manabe and Ohgi Takahashi	4. 巻 19
2. 論文標題 Phosphate-Catalyzed Succinimide Formation from Asp Residues: A Computational Study of the Mechanism	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 637
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms19020637	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 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 真鍋法義, 星憲司, 大野詩歩, 山口芳樹
2. 発表標題 紫外線照射によるトリプトファン残基の化学構造変化
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 真鍋法義, 佐々木雅人, 田中大, 加藤創, 藤村務, 柴田信之, 高橋央宜
2. 発表標題 白内障病態形成に関わるクリスタリン中Asp残基異性化の乳酸による触媒機構 ~ 計算化学的・生化学的検討 ~
3. 学会等名 第57回白内障学会総会・第44回水晶体研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高橋央宜, 桐越亮太, 大野詩歩, 真鍋法義
2. 発表標題 アスパラギン酸残基からのスクシンイミド生成: リン酸水素イオン-カルシウムイオン接触イオン対による触媒作用の可能性
3. 学会等名 第14回 D-アミノ酸学会学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高橋央宜, 大野詩歩, 真鍋法義
2. 発表標題 Asp-His配列からのスクシンイミド形成: His側鎖による分子内触媒機構
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大野詩歩, 真鍋法義, 高橋央宜
2. 発表標題 リン酸二水素イオンを触媒とするAsp-Ser配列からのスクシンイミド生成
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 真鍋法義, 佐々木雅人, 田中大, 大野賢一, 大野詩歩, 桐越亮太, 加藤創, 藤村務, 柴田信之, 高橋央宜
2. 発表標題 白内障の病態形成に関するクリスタリン中Asp残基異性化の乳酸による触媒機構 ~ 計算化学的・生化学的検討 ~
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Noriyoshi Manabe, Ryota Kirikoshi, Ohgi Takahashi
2. 発表標題 Lactic acid-catalyzed non-enzymatic deamidation of asparagine residues to four aspartic acid isomers: a computational study
3. 学会等名 The International Conference of D-Amino Acid Research (IDAR2017) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ryota Kirikoshi, Noriyoshi Manabe, Ohgi Takahashi
2. 発表標題 Phosphate-catalyzed succinimide formation from Asp residues: a computational study of the mechanism
3. 学会等名 The International Conference of D-Amino Acid Research (IDAR2017) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ohgi Takahashi, Ryota Kirikoshi, Noriyoshi Manabe
2. 発表標題 Racemization of serine residues catalyzed by dihydrogen phosphate ion: a computational study
3. 学会等名 The International Conference of D-Amino Acid Research (IDAR2017) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 真鍋法義, 岩淵明音, 山本琴音, 桐越亮太, 高橋央宜
2. 発表標題 Asp-Aspモチーフにおける非酵素反応: 水4分子を含むモデル計算
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高橋央宜, 安達夢, 工藤雅仁, 進藤和記子, 桐越亮太, 真鍋法義
2. 発表標題 スクシンイミド残基のラセミ化: リン酸二水素イオンによる触媒機構の計算化学的研究
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 真鍋法義, 大野詩歩, 山口芳樹
2. 発表標題 NMR法によるペプチド中のAsp残基異性化のin situ判別
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件



8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------