

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K11646

研究課題名（和文）蛋白質分子内の老化を可視化する革新的研究

研究課題名（英文）Innovative Research Visualizing Aging in Protein Molecules

研究代表者

高田 匠（Takata, Takumi）

京都大学・複合原子力科学研究所・准教授

研究者番号：80379007

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：蛋白質中に生じる異性化アスパラギン酸残基（異性化Asp）を蛋白質の新規老化分子マーカーとして定義することが本研究の目的であり、それを可能とする異性化Aspの網羅的な高感度定量解析手法の開発に取り組んだ。その結果として、ヒト水晶体組織内蛋白質（A-クリスタリンおよびB-クリスタリン）中にて加齢に応じて蓄積する異性化Asp部位の網羅的スクリーニング手法の改良と、それぞれの高感度定量解析手法を作製した。これらを実際に用いて、加齢に応じた異性化率の増加を確認し、「蛋白質局所の老化現象の見える化」においてAsp異性化が如何に有用であることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

蛋白質中の異性化Aspを、従来より高い感度で測定する手法を開発した。これを眼球内の水晶体組織へと用いて、加齢に順じて増加する異性化Asp部位（水晶体蛋白質の年齢と定義できる部位）を複数見つけた。また、蛋白質の機能低下との関連性が示されたことから、本手法により評価することができる異性化Asp存在量は、それを含む蛋白質の状態を評価することにつながる可能性がある。代表的な加齢性疾患の原因となる部位には、蛋白質の異常凝集物が蓄積しているため、本手法のさらなる改良や応用が様々な加齢性疾患の早期発見、早期治療への指標となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to define isomerized aspartic acid residues (isomerized Asp) in proteins as novel molecular markers of protein aging, and to develop a comprehensive and highly sensitive quantitative analysis method for isomerized Asp that will make this possible. As a result, we improved a comprehensive screening method for isomeric Asp sites in human lens proteins (A-crystallin and B-crystallin), which accumulate with aging, and developed a highly sensitive quantitative analysis method for each. Using these methods, we confirmed that the isomerization rate increases with aging, and showed how useful Asp isomerization is in "visualization of aging phenomena at protein localities".

研究分野：生化学

キーワード：クリスタリン 白内障 アスパラギン酸 翻訳後修飾 異性化

1. 研究開始当初の背景

アミノ酸はキラル分子であり L-体と D-体の 2 種類が存在する。しかしながら、蛋白質を構成するアミノ酸は L-アミノ酸のみという絶対的規則 (蛋白質結合型アミノ酸残基のホモキラリティー説) があった。しかし近年、この蛋白質結合型アミノ酸残基のホモキラリティー説は打ち破られた。ヒト眼内の水晶体主成分であるクリスタリン蛋白質 (Crys) 中、特定部位のアスパラギン酸残基 (Asp) が著しく D-化しながら、その過程で生じる β-型 (iso-型) Asp を含む、計 4 種の Asp (L-α-Asp、L-β-Asp、D-α-Asp、D-β-Asp) として存在することが判明したためである。つまり、蛋白質結合型アミノ酸残基のホモキラリティーは、加齢に応じた蛋白質内部の自発的化学反应で破綻する。本研究では、この「老化に応じて進む生体内ホモキラリティー破綻」を学術的背景としている。

蛋白質の構造異常をもたらす Asp 異性化は、加齢に応じた自発的化学反应を経て蓄積するが、その部位特異性を決定する因子は未知である。20 種類のアミノ酸中、Asp のみが形成する 5 員環イミド中間体を經由する特有の異性化機構に起因する本修飾は Asp 隣接残基が小さいアミノ酸の場合や、Asp が蛋白質外部に露出している場合などに生じやすいとされている。しかしながら、それを支持する網羅的研究成果は未だ乏しく、また組織内部の局在も明らかとなっていない。これら未解決の問題に解答するためには、より多くの異性化 Asp 部位同定と、それらが蓄積しやすい環境のスクリーニングが必須である。そのため、既存の異性化 Asp 検出手法より高感度かつ網羅的、可能であれば走査的でもある研究手法の開発が求められている。

2. 研究の目的

分子レベルでの老化指標となり得る、Asp 異性化が生じる部位の特定と定量解析手法の開発は加齢性疾患の発症部位予想 (すなわち、蛋白質分子内部の老化現象の可視化) ならびに効果的な予防法開発に極めて有効である。特に迅速、簡便、網羅的かつ定量的な解析手法を開発することができれば、蛋白質内部の加齢進行具合を「見える化」することができるうえ、蛋白質内分子レベルの老化トリガー部位が判明する可能性もあり、これは今後の健康科学関連分野における新しい抗加齢ターゲット因子や診断手法を生み出すことに繋がる。そのため、本研究では微量な結合型 Asp を定量解析可能とする手法を開発し、生体組織 (水晶体) へと用いて本手法の有用性を示し、加齢に応じて蓄積する異常蛋白質中の異性化しやすい Asp 部位を決定し、当部位の異性化率を新規老化分子マーカーとして確立することを研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1) 四重極型の質量分析装置を用いた異性化 Asp 含有ペプチド定量手法の開発

これまで、微量ゆえに検知することができなかった蛋白質内部の異性化 Asp 定量比較を実現するべく、異性化 Asp 分析法の改良に取り組んだ。具体的には、液体クロマトグラフ連結型の四重極型質量分析装置 (LC-Q-MS) と、その特徴でもある Multiple Reaction monitoring (MRM) 法を用いた手法の開発を進めた。本法では、標的分子のクロマトグラムを 標的の質量電荷比 (m/z) と、標的から生じるフラグメント m/z との二つの条件で抽出する。従来の異性化 Asp 検出法ではのみ利用していたが、¹³C が加わることで、高感度かつバックグラウンドのない標的分子のクロマトグラムを抽出することが可能となる。加えて、試料や移動相に含まれる類似分子量有するピークも除去することができるため、結果的にバックグラウンドの極めて少ないクロマトグラムを得ることができ、従来法より精度良く異性化 Asp を定量することができる (図 1)。

実際の実験では、ヒト水晶体の主要構成蛋白質である αA-Cry 中の Asp 部位を含む全酵素消化断片を化学合成して用意し、一つ一つのペプチドを LC-Q-MS へと用いて条件を検討した後、最終的に統合することで水晶体組織中 αA-Crys 画分中の異性化 Asp を網羅的かつ高感度に解析できる手法を作製した。

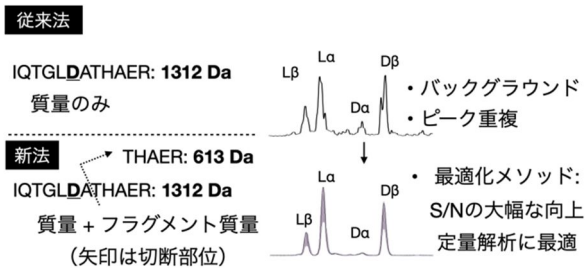


図1) MRM法による蛋白質中の異性化Asp分析手法の概略図

(2) 会合体サイズ別ヒト水晶体構成蛋白質 βB1-Crys 中 Asp212 異性化の解析

質量分析装置を用いた解析手法には、網羅的ゆえの短所があり、それは同一組織試料中に複数

の会合体状態をもつ蛋白質中の異性化 Asp 分析が不可能な点であった。この点をクリアするべく、本研究では、他の蛋白質サイズ別分離手法と組み合わせ、各会合体サイズ別の同一蛋白質内部における同部位の異性化 Asp の解析を試みた。具体的には、加齢後のヒト水晶体内において複数サイズ会合体の形成および異性化 Asp の存在が示唆されていた水晶体構成蛋白質 β B1-Crys 中 Asp212 部位の分析を進めた。

まず、(1) と同様にして、当該部位配列 (β B1-Crys 中の Asp212 を含むトリプシン消化断片配列: $^{203}\text{GYQYLLEPGDFR}^{214}$) を有するペプチドを化学合成し、本ペプチドを Q-MS へと用いてフラグメンテーション条件を検討した。次に、同配列を有しながら、Asp212 部位を他 3 種類の異性体に置換したペプチドを合成し、LC-Q-MS システムへと用いて分離を確認した。サイズ別試料に関しては、水晶体をホモジェナイズし、遠心分離後の可溶性画分をゲル濾過クロマトグラフィーにより分離することで準備した。最後に、最適化した条件を各年代ヒト水晶体試料のサイズ別可溶性画分へと使用し、native β B1-Crys 二量体および四量体中の Asp212 異性化率および異常凝集体中に存在する β B1-Crys 中の Asp212 異性化率を年代別に調査した。

また別途、ホモジェナイズ後のヒト水晶体遠心分離後に沈殿する不溶性画分を回収し、尿素を用いて可溶化させつつ酵素消化した試料を同装置へと用い、不溶性画分中の Asp212 異性化率を分析した。

4. 研究成果

(1) 高感度迅速異性化 Asp 定量手法の開発

作製した α A-Crys 各部における異性化 Asp 検出条件 (表 1) を各年代のヒト水晶体試料へと用いて内部 Asp 異性化を評価した。 α A-Crys 中の 60% 程度の配列カバー率を達成し、Asp 残基に関しても全 Asp のうち 60% 程度をカバーすることに成功しており、これらのうち多くに加齢に応じた異性化率の増加が見られた。加えて、本手法では、従来法と比べて分析に必要な組織内部蛋白質量が 1/1000 となったことから、「蛋白質局所の老化現象の見える化」における本手法の有用性が示された。

表1) 各ペプチドのMRM検出条件

ペプチド配列	MRM transition
MDVTIQHPWFK	467.90>577.31, 701.35>577.31
TVLD S GISEVR	588.32>490.26, 588.32>660.37, 588.32>747.40
FVIFLDVK	490.79>361.21
HFSPE L TVK	586.80>801.44, 586.80>460.31, 586.80>347.23
VQDD F VEHGK	429.55>341.19, 429.55>415.23, 429.55>454.28, 429.55>583.32, 429.55>682.39
QDDHGYISR	364.17>595.32, 364.17>538.3, 364.17>375.24, 545.7>595.32
IQTGLDATHAER	437.89 > 400.20, 437.89 > 512.26, 437.89 > 375.2

(2) 水晶体内凝集形態別の内部 β B1-Crys 中 Asp212 異性化率の増加

従来より、水晶体構成蛋白質の一つ、 β B1-Crys 中では、Asp212 を含むペプチドのピークが複数存在することが知られていた。すなわち、同ペプチド内部の Asp212 異性化が示唆されていた。しかしながらピークの分解能が低いことに加え、m/z は等しくも配列の異なるピークの共存などからピーク面積比の計算が不可能であった。そこで、同部位の Asp 異性化を定量評価するべく (1) の手法を用いた。最初に、当該部位配列 (β B1-Crys 中の Asp212 を含む配列) を有するペプチド標品を化学合成した。次に、精製した本ペプチドを Q-MS へと用いて標的から生じるフラグメント m/z に関する条件検討を行った。最後に、標的としたフラグメント m/z を生じるレーザーの強度を最適化して最終条件を決定した。本条件を各年代ヒト水晶体可溶性画分のサイズ別分離試料に対して用い、 β B1-Crys 中の Asp212 異性化率を年代別に調査した。その結果、native 二量体、四量体に近いサイズの可溶性画分中では、D- α -Asp を含むペプチドが各年代で見られるものの、その相対量が増加とともに減少することが判明した (図 2)。一方で、異常凝集体中の β B1-Crys 中 Asp212 に関して

は、native サイズの可溶性画分中において D- β -Asp を含むピークも見られた。さらに、native サイズ画分中に見られた傾向とは異なり、異常凝集体中の Asp212 に関しては、合計した D-Asp 量が増加とともに増加していた。

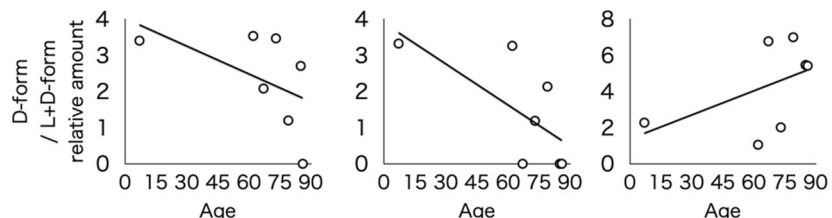


図2) 年代別の可溶性画分中の β B1-クリスタリン内部Asp212の異性化率:
左) 二量体画分, 中) 四量体画分, 右) 異常凝集体画分

(3) 水晶体内不溶性画分中の β B1-Crys 中 Asp212 異性化率の増加

各年代のヒト水晶体不溶性画分中において、サイズ別の分離は不可能であったが、その内部に存在するβB1-Crys 中 Asp212 を含むペプチドのピークは主に (2) で示された D-β-Asp を含むピークと同一のものであり、これらを年代別にプロットすると、加齢に応じた増加傾向が見られた (図 3)。各合成ペプチドの逆相カラム溶出順から推測すると D-β-Asp を含む場合おそらく最もペプチドの疎水性が高くなる。βB1-Crys 凝集には疎水性相互作用が関与すると考えられていることから、Asp212 部位の D-β-Asp への変化により βB1-Crys の疎水性が増加し、それに伴う分子間の異常相互作用の増加が考えられた。

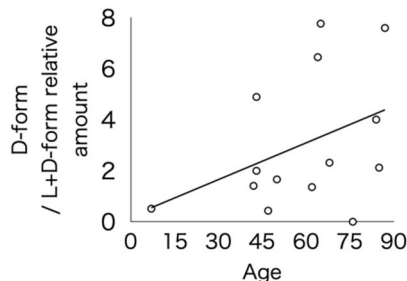


図3) 年代別の不溶性画分中のβB1-クリスタリン内部Asp212の異性化率

まとめ

本研究では、加齢後ヒト水晶体構成蛋白質中の各部位 Asp を標的としたトリプシン消化断片を合成し、それら合成ペプチドを用いた精密な条件検討により高精度かつ高感度の異性化 Asp 定量法を開発した。また、組織内部に多様な会合体状態をもつものに関しては分離後に解析することで、会合状態に応じた Asp 異性化率の変化を確認することに成功した。本法を用いることで、クロマトグラム中において、異なるアミノ酸配列を有しながら m/z が標的と同一となるピークを除去することができ、より感度が高い Asp 異性化分析を遂行することが可能となった。本手法を用い、水晶体構成蛋白質 βB1-Crys の会合体サイズ別、または可溶性別の Asp 異性化率の測定に成功した。ヒト水晶体中で加齢に伴い増加する異常凝集体画分や不溶性画分中において βB1-Crys 内部 Asp212 の D-化進行がみられたことから、加齢に応じて進行する βB1-Crys 内部 Asp212 の D-化が βB1-Crys の水晶体内での分子間相互作用を変化させ、異常凝集体形成や不溶化を引き起こすことが示された。このような異性化 Asp を含んだ蛋白質の異常凝集体の蓄積により、加齢性白内障が惹起される可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Magami Kosuke, Hachiya Naomi, Morikawa Kazuo, Fujii Noriko, Takata Takumi	4. 巻 16
2. 論文標題 Isomerization of Asp is essential for assembly of amyloid-like fibrils of A-crystallin-derived peptide	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0250277
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0250277	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 Takata Takumi, Ha Seongmin, Koide Tamaki, Fujii Noriko	4. 巻 29
2. 論文標題 Site specific rapid deamidation and isomerization in human lens A crystallin in vitro	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Protein Science	6. 最初と最後の頁 941 ~ 951
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/pro.3821	査読の有無 有
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 -
1. 著者名 Fujii Noriko, Takata Takumi, Kim Ingu, Morishima Ken, Inoue Rintaro, Magami Kousuke, Matsubara Toshiya, Sugiyama Masaaki, Koide Tamaki	4. 巻 1868
2. 論文標題 Asp isomerization increases aggregation of -crystallin and decreases its chaperone activity in human lens of various ages	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics	6. 最初と最後の頁 140446 ~ 140446
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbapap.2020.140446	査読の有無 有
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 -
1. 著者名 Fujii Noriko, Takata Takumi, Kim Ingu, Matsubara Toshiya	4. 巻 5
2. 論文標題 Simultaneous and Rapid Detection of Multiple Epimers and Isomers of Aspartyl Residues in Lens Proteins Using an LC-MS-MRM Method	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ACS Omega	6. 最初と最後の頁 27626 ~ 27632
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsomega.0c04197	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 Yamamoto Naoki, Takeda Shun, Hatsusaka Natsuko, Hiramatsu Noriko, Nagai Noriaki, Deguchi Saori, Nakazawa Yosuke, Takata Takumi, Kodera Sachiko, Hirata Akimasa, Kubo Eri, Sasaki Hiroshi	4. 巻 9
2. 論文標題 Effect of a Lens Protein in Low-Temperature Culture of Novel Immortalized Human Lens Epithelial Cells (iHLEC-NY2)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 2670 ~ 2670
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells9122670	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 Inoue Rintaro, Sakamaki Yusuke, Takata Takumi, Wood Kathleen, Morishima Ken, Sato Nobuhiro, Okuda Aya, Shimizu Masahiro, Urade Reiko, Fujii Noriko, Sugiyama Masaaki	4. 巻 11
2. 論文標題 Elucidation of the mechanism of subunit exchange in B crystallin oligomers	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-82250-z	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16件 (うち招待講演 8件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 Takumi Takata, Haruna Sugawa
2. 発表標題 Rapid deamidation/isomerization of Asparagine residues and effect of C-terminal adjacent amino acid residues in human lens A-crystallin
3. 学会等名 The XXV Biennial Meeting International Society for Eye Research (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高田匠
2. 発表標題 加齢に応じて進行する蛋白質中アミノ酸残基異性化に関する分離分析手法の現状
3. 学会等名 第 50 回構造活性相関シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高田匠
2. 発表標題 水晶体構成タンパク質中アミノ酸残基の傷と白内障
3. 学会等名 第61回日本白内障学会・第48回水晶体研究会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 加賀澤悠太, 高田匠
2. 発表標題 B2-クリスタリン中151番目のトリプトファン残基の重要性
3. 学会等名 第61回日本白内障学会・第48回水晶体研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takumi Takata
2. 発表標題 Effect of C-terminal adjacent amino acid residues on deamidation/isomerization of asparagine residues in lens component proteins
3. 学会等名 Fifth International Conference on D-Amino Acid Research（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Inoue, Rintaro, Sakamaki, Yusuke, Takata, Takumi, Morishima, Ken, Wood, Kathleen, Sato, Nobuhiro, Okuda, Aya, Shimizu, Masahiro, Urade, Reiko, Fujii, Noriko, Sugiyama, Masaaki
2. 発表標題 Subunit dynamics in alpha-crystallin through deuteration-assisted small-angle neutron scattering
3. 学会等名 XXV General Assembly and Congress of the International Union of Crystallography - IUCr 2021（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高田 匠
2. 発表標題 迅速にAsp異性化反応が進行するモデル蛋白質の作出と評価
3. 学会等名 第16回 D-アミノ酸学会学術講演会（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高田 匠
2. 発表標題 たんぱく質の中にある年輪 新しい老化の指標について
3. 学会等名 アトムサイエンスフェア講演会2021（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Amber D Rolland, Takumi Takata, Micah T. Donor, Samuel G. Wheeler, Larry L. David, Kirsten J. Lampi, James S. Prell
2. 発表標題 Oligomer structure and formation kinetics of cataract-associated proteins revealed with native ion mobility-mass spectrometry
3. 学会等名 69th American Society for Mass Spectrometry（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高田 匠, 眞上晃輔
2. 発表標題 Asp残基異性化に応じた α -クリスタリン由来ペプチドの機能及び構造の変化
3. 学会等名 第60回日本白内障学会総会・第47回水晶体研究会合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 加賀澤 悠太, 金 仁求, 高田 匠
2. 発表標題 B1-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 第60回日本白内障学会総会・第47回水晶体研究会合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 菅河 晴菜, 高田 匠
2. 発表標題 水晶体構成蛋白質中アスパラギン酸残基異性化に際するC末端側隣接アミノ酸残基の影響
3. 学会等名 第60回日本白内障学会総会・第47回水晶体研究会合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高田 匠
2. 発表標題 クリスタリン内部アミノ酸の翻訳後修飾からみる水晶体老化
3. 学会等名 第59回日本白内障学会総会・第46回水晶体研究会シンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高田 匠, 藤井 紀子
2. 発表標題 A-クリスタリン中のAsp151をAsnに置換した組換え体では、同部位の異性化が10倍速く進行する
3. 学会等名 第59回日本白内障学会総会・第46回水晶体研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高田 匠 , 藤井 紀子
2. 発表標題 蛋白質結合型のアスパラギン酸残基の異性化修飾について
3. 学会等名 第71回日本電気泳動学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takumi Takata, Naomi Hachiya, Noriko Fujii
2. 発表標題 The Effects of Isomerization and Racemization of Asp Residues for Polypeptide Properties
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2020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
---------	---------