

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570272

研究課題名(和文) D-アスパラギン酸含有蛋白質に特異的な分解酵素とその基質の起源、機能進化の解明

研究課題名(英文) Evolutionary considerations of D-aspartyl endopeptidases and its substrates.

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：我々が哺乳類より発見したD-アスパラギン酸エンドペプチダーゼ(D-Aspartyl Endopeptidase: DAEP)は、変性したD-アスパラギン酸(D-Asp)含有タンパク質を特異的に分解する品質管理機構であると考えている。様々な生物種におけるDAEP活性を調べたところ、アフリカツメガエルやバフンウニでは、生殖巣や未受精成熟卵での活性が高いことが明らかになった。また、その局在を調べたところ、ミトコンドリアに分布することが示唆された。従って、これらの水生動物ではDAEPが初期発生に重要な機能を発揮していると考えられた。

研究成果の概要(英文)：D-isomer of Asp (D-Asp) residue is often detected in abnormally aggregated proteins. Therefore it is strongly suggested that formation of D-Asp in proteins is potentially noxious for metabolic turnover. The D-aspartyl endopeptidase (DAEP), which we have discovered from mammals, stereoselectively degrades its substrate at the internal D-Asp residue, and seems to physiologically serve as a kind of quality-control system to maintain the protein homeostasis. On the other hand, a distribution of DAEP in living things is not clear. In African clawed frog (*Xenopus laevis*), high DAEP activity was detectable in its testes, ovaries and unfertilized eggs, though the frog naturally thrives around 20-28°C at the most. In order to elucidate physiological functions of DAEP, we therefore examined comparison of properties of DAEPs, purified from aquatic animals: African clawed frogs and Japanese green sea urchins, with mammalian DAEP.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・進化生物学

キーワード：D-アミノ酸 タンパク質分解酵素 酸化ストレス ミトコンドリア 機能進化 D-アスパラギン酸 ラセミ化 品質管理

1. 研究開始当初の背景

近年、フォールディング病の原因タンパク質に代表される「代謝速度の遅いタンパク質」に D-アスパラギン酸 (D-Asp) 残基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)。ラセミ化 (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、高齢者でラセミ化率が高くなることなど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ことから、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によって分解されているのではないかと考え、独自にその活性測定法を開発してその探索を行った。その結果、哺乳類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 の高分子プロテアーゼを発見した。本酵素は D-Asp 残基を含むタンパク質にのみ基質特異性を示すことが明らかになったので、これを D-Aspartyl Endopeptidase: DAEP と名付けた。ミトコンドリアが活性酸素の原産地であり、それによるタンパク質への悪影響が懸念されることから、DAEP の生理的意義は、Asp 残基が D 化した結果、変性してしまった有害タンパク質に対する品質管理であると考えられた。そこで、DAEP の生理機能についてより詳細な知見を得るため、大量精製や発現系を構築し、その構造の解析に取り組むことにした。

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	バジェット病、骨粗鬆症

2. 研究の目的

しかしながら、いざ DAEP の大量精製を開始すると、DAEP がミトコンドリア内膜に結合した複合体型タンパク質であることが災いする。すなわち、精製の初期段階で膜より界面活性剤で抽出すると、構造的に非常に不安定になり、結果として精製収量が非常に悪くなってしまったのである。そこで、DAEP を構成する各サブユニットの発現系を構築して混ぜ合わせ、DAEP 本体の再構成を試みたが、全くその活性を検出することはできなかった。

したがって、こうした問題点を解決するためには、DAEP の分子進化をさかのぼって、より構造の単純なホモログを得ることが良策であると考えた。様々な生物種 (古細菌、真正細菌、酵母、線虫、魚類、両生類、鳥類) における DAEP 様活性の検索を行った結果、菌類や線虫からは DAEP 様活性を検出することができなかったが、魚類や両生類では、特に生殖巣や未受精成熟卵での DAEP 活性が高いことが明らかになった。そこで、生化学的な分析手法が確立しているアフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) など、より生体構造の単純な生物から DAEP の進化的な起源とその生理的な基質の同定とめざして、様々な生物種における DAEP 様活性のスクリーニングを開始した。

3. 研究の方法

(1) DAEP 様活性の測定法と阻害剤について

分解されると蛍光物質 (アミノメチルクマリン) 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、各試料における DAEP 様活性を探索した。また、新たに特異的阻害剤: Benzoyl-L-Arg-L-His-[D-Asp]-CH₂Cl も開発し、これに対する感受性によって DAEP ホモログであるか否かを評価した。

(2) 成熟過程にあるアフリカツメガエル卵母細胞の仕分けと DAEP 様活性

メスの成熟したアフリカツメガエルを低温麻酔し、卵巣を摘出した。摘出した卵巣をコラゲナーゼで処理し、卵母細胞をばらばらにした後、成熟度に応じた 1-6 の各ステージに分画することを試みた。1-3 は小さくて分けられなかったのでひとまとめにし、4 から 6 はそれぞれ独立して分画した。その後、各サンプルをホモジェナイズし、DAEP 様活性を測定した。

(3) バフンウニ生殖巣における DAEP 様活性

バフンウニ (*Hemicentrotus pulcherrimus*) の成熟・産卵期となる 1 月下旬から三浦半島沖での採取を依頼した。採取したバフンウニを解剖し、体内に 0.5 M KCl を注入することで強制的に排卵・排精させ、卵細胞・精子を回収した。その後、人工海水を 1/4 に薄めたものをホモジェナイズバッファーとしてサンプル調製し、DAEP 様活性を測定した。バフンウニの組織は自家蛍光が強かったため、基質を入れないアッセイ混液と試料を混ぜたものをブランクとした。

(4) 卵巣組織の分画

アフリカツメガエル・バフンウニの卵巣組織をポッター型ホモジェナイザーを用いてホモジェナイズした後、遠心力の強度によって核(600 xg)、ミトコンドリア(9,000 xg)、ミクロゾーム(小胞体・ゴルジ体、100,000 xg)に分画した。

4. 研究成果

(1) アフリカツメガエルにおける DAEP 様活性の分布について

アフリカツメガエルにおける DAEP 様活性の臓器分布は、哺乳類のそれとは大きく異なり、肝臓における活性が著しく低く、生殖巣での活性が高いことが特徴であった(図1)。そこで、性腺刺激ホルモンを注射することによって産卵させた成熟未受精卵(第二減数分裂中期)における DAEP 様活性をしらべたところ、卵巣の DAEP 様活性と比較して、産卵直後の未受精成熟卵では4倍、その膜画分だけ分離すると20倍の比活性が観察された。

成熟未受精卵をオルガネラごとに分画し、DAEP 様活性の局在を調べたところ、ミトコンドリア膜にあることが明らかになったので、これを精製の出発材料としてその精製を試みた。100倍程度の精製度を持つ標品が得られたので、その基本的な性質について検討した結果、マウス肝由来 DAEP と同様にミトコンドリア膜に局在することが示唆され、分子量30万を越える高分子複合体であることが明らかになった。また、哺乳類 DAEP に特異的に結合し、その活性を阻害する合成阻害剤 i-DAEP : Benzoyl-Arg-His-[D-Asp]-CH₂Cl は、アフリカツメガエルの DAEP 様活性も強く阻害した。

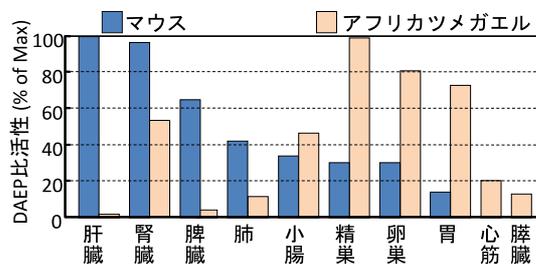


図1: マウスとアフリカツメガエルにおける DAEP 活性の臓器分布

(2) 成熟過程にあるアフリカツメガエル卵母細胞の DAEP 様活性

摘出した卵巣をコラゲナーゼで処理し、卵母細胞をばらばらにした後、成熟度に応じてステージごとに分画した(1から3、および4、5、6)。その後、各サンプルをホモジェナイ

ズし、DAEP 様活性を測定した(図2)。

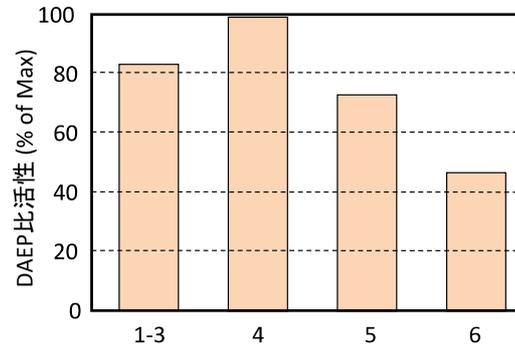


図2: 卵母細胞の成熟ステージごと DAEP 活性

(3) バフンウニ生殖巣における DAEP 様活性

バフンウニを解剖し、生殖巣と消化器に分けて DAEP 様活性を測定したところ、生殖巣からのみ DAEP 様活性が検出された。また、0.5 M KCl 注入による強制排卵・排精で回収した卵細胞・精子からも DAEP 様活性が検出された。細胞内局在を調べた結果、DAEP 様活性はミトコンドリアに局在していた。バフンウニでもマウスやアフリカツメガエルと同様に DAEP 様活性が検出され、卵巣における細胞内局在はミトコンドリアであったことから、100倍程度の精製度を目指して精製を行った。

(4) 他の生物における DAEP 様活性の分布

DAEP の生物界における分布を調べる過程で、メダカ(*Oryzias latipes* var.) やホヤ類(マボヤ *Halocynthia roretzi*、カタユウレイボヤ *Ciona intestinalis*)、植物も検討した。カタユウレイボヤでは生殖巣に DAEP 様活性が検出されたが、マボヤでは明確な活性を検出することはできなかった。また、メダカでは卵細胞に受精卵と受精後(32時間)における卵・受精卵1個あたりの DAEP 様活性を比較し、その差は25%であった(図3)。植物では、ハツカダイコン(*Raphanus sativus* var. *sativus*) とマイクロトム(*Solanum lycopersicum* L.) の各組織(花卉、種子、葉柄、根茎)を分画し、DAEP の分布を調べたが、いずれからも DAEP 様活性を検出できなかった。植物では、分画した組織をホモジェナイズし、現行の測定条件で DAEP 様活性を検出しようとする、バックグラウンドが高くなってしまいうため、DAEP の正確な活性量を見極めることができなかった。DAEP が動物に固有なシステムであるのかどうかを見極めるためには、その活性の指標となる遊離蛍光物質を別の化合物に変えて測定条件を変更し、バックグラウン

ドの低減を図ることが必要であると考えている。

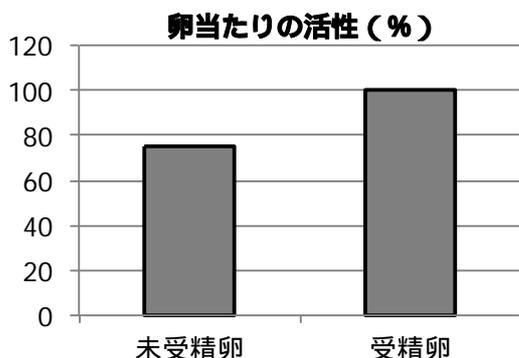


図3 メダカの初期発生における DAEP 活性の変動

(5) まとめ

アフリカツメガエルおよびバフンウニより精製した DAEP 様分解酵素とマウス肝臓より精製した DAEP と比較した結果を表 2 にまとめた。マウス DAEP と比較して至適温度が異なることは、それぞれの生活域の違いから予想の範囲内であったが、意外だったのはその臓器分布である。マウス DAEP の分布が肝臓と腎臓であるのに対し、アフリカツメガエルおよびバフンウニのそれは、生殖巣が主であった。ただし、これらの DAEP 様分解酵素は、哺乳類 DAEP の特異的阻害剤：Benzoyl-L-Arg-L-His-[D-Asp]-CH₂Cl に対する感受性や基質特異性が非常に良く似ていることから、そのホモログであると考えている。これまでの哺乳類 DAEP の生理的な位置づけは、加齢によって不意に生じた D-Asp 含有タンパク質が有害に作用する前にこれを排除する品質管理システムであったが、これらの水生生物における DAEP 様分解酵素の組織分布を考慮すると、原始的な DAEP の生理機能が、受精や初期発生に関わるものと推測できる。また、水生生物由来 DAEP 様分解酵素の分子量が哺乳類 DAEP を比べて小さいことは、本計画の開始当初目指していた「より構造の単純な」DAEP であること示唆している。精製収率の改善がこれからの課題であるが、より収率を上げるための界面活性剤の選定や

表2 DAEPの種による基本的な性質の同異

	マウス	アフリカツメガエル バフンウニ
臓器分布	肝臓、腎臓	生殖巣、卵細胞
細胞内局在	ミトコンドリア	ミトコンドリア
分子量	600 kDa	300 kDa~
至適温度	37°C	~25°C
基質特異性	D-α-Asp	D-α-Asp
阻害剤に対する感受性	あり	あり

精製ステップの再考を行い、水生動物 DAEP の構造を明らかにしたいと考えている。

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2件)

Kinouchi T and Fujii N: Substrate stereoselectivity of mammalian D-aspartyl endopeptidase. *J Chromatogr B*, 879(29): 3349-3352, 2011. 査読有

DOI: 10.1016/j.jchromb.2011.08.031

Mori Y, Aki K, Kuge K, Tajima S, Yamanaka N, Kaji Y, Yamamoto N, Nagai R, Yoshii H, Fujii N, Watanabe M, Kinouchi T, and Fujii N.: UV B-irradiation enhances the racemization and isomerization of aspartyl residues and production of N^ε-carboxymethyl lysine (CML) in keratin of skin. *J Chromatogr B*, 879(29): 3303-3309, 2011. 査読有

DOI: 10.1016/j.jchromb.2011.05.010

〔学会発表〕(計5件)

木野内忠稔、小林優「中性子捕捉反応を利用した植物組織におけるホウ素の *in situ* 可視化法」日本農芸化学会 2014 年度大会、2014 年 3 月 29 日、明治大学・生田キャンパス
木野内忠稔、土屋勇一、山下茂、藤井紀子「水生動物由来 D-アスパラギン酸エンドペプチダーゼの性質の比較」第 85 回日本生化学会大会、2012 年 12 月 16 日、マリメッセ福岡

木野内忠稔、藤井紀子「ウニ由来 D-アスパラギン酸含有タンパク質分解酵素について」第 8 回 D-アミノ酸研究会学術講演会、2012 年 9 月 7 日、滋賀医科大学

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活性について」第 84 回日本生化学会大会、2011 年 9 月 22 日、国立京都国際会館

木野内忠稔、藤井紀子「アフリカツメガエル卵における D-アスパラギン酸含有タンパク質の代謝活動について」第 7 回 D-アミノ酸研究会学術講演会、2011 年 9 月 8 日、東京医科歯科大学

〔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〕

ホームページ等

<http://hlweb.rii.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：