

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25288075

研究課題名(和文) 加齢性疾患にみられる蛋白質異常凝集の機構解明とその修復

研究課題名(英文) Mechanism of abnormal protein aggregation in the age-related diseases and the study of the restoration

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,500,000円

研究成果の概要(和文)：加齢性疾患では、その原因蛋白質中のアスパラギン酸(Asp)残基の異性化が蛋白質の不溶化を惹起し、疾患発症に至る過程が共通している。本研究では、まず、蛋白質中のAsp異性体の迅速分析法の開発を行った。次に加齢性白内障の水晶体の不溶化蛋白質中では部位特異的にAsp残基が正常なL-Asp残基からD-Asp、L-Asp、D-Asp体へ著しく異性化し、異常凝集や解離を惹起すること、紫外線照射が、異性化を促進することなどを明らかにした。さらにRNaseIに3つの異常異性体を挿入すると、その活性が失われたことから蛋白質中のAsp残基の異性化は蛋白質の機能を著しく変化させることが初めて明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Biologically uncommon D-Asp, D-Asp, L-Asp (Asp) isomers have been widely detected in proteins from age-related diseases such as cataract, age-related hearing loss and Alzheimer diseases. In this study, we developed a new method for rapidly identifying Asp isomers in proteins based on a combination of LC-MS/MS and isomer-specific enzymes. We detected the isomeric Asp sites precisely, quickly at the femtomole level in lens crystallins. The amount of Asp isomer was greater in the insoluble fraction of lens proteins from elderly donors. The stereoinversion of Asp in lens proteins induce not only the highly aggregate and but also dissociate to monomer. The isomerization of the Asp in the protein was accelerated by UVB-irradiation. We synthesized RNase A which was replaced with L-Asp, D-Asp and D-Asp at the position 121 of L-Asp. The L-Asp containing RNase A have high catalytic activity, while the L-Asp, D-Asp and D-Asp containing RNase A lost the enzyme activities.

研究分野：生化学

キーワード：老化 D-アミノ酸 蛋白質異常凝集 白内障 アミノ酸の異性化反応 D-アスパラギン酸 LC-MS/MS

## 1. 研究開始当初の背景 (3-5ページ)

蛋白質はL-アミノ酸のみから構成されているために正しい折りたたみ構造を形成し、その機能を発揮している。しかし、近年、白内障、加齢性黄斑変性症、アルツハイマー病、加齢性難聴等、種々の加齢性疾患の原因蛋白質中にD-β-アスパラギン酸(Asp)が蓄積し、その生成機構が明らかとなってきた。すなわちAsp残基は正常なL-α体から5員環イミドを介してD-α-, L-β-, D-β-体へと異性化する。蛋白質中にこれらの異性体が生成されると蛋白質の高次構造が乱れ、蛋白質の変性や異常凝集が起こる。Asp残基のD-体化はAsp残基の側鎖の反転を、β-結合はペプチド結合の主鎖を長くするため、蛋白質の立体構造に直接大きな影響を及ぼし、異常凝集が生じ、機能低下を引き起こすと考えられる。これらの発見は蛋白質中のアミノ酸は従来考えられていたよりも温和な条件下で容易に反転するということが判明した。しかし、蛋白質中のAsp残基の異性体の検出は容易ではなく、迅速簡便な定量法が望まれていた。

## 2. 研究の目的

本研究ではまず、蛋白質中のAsp異性体の迅速分析法の開発を行い、以下の項目について研究を行った。

- (1) 蛋白質中のAsp異性体の迅速分析法の開発
- (2) 蛋白質中のAsp残基の異性化と異常凝集化、機能変化との関係
- (3) 紫外線照射とAsp残基の異性化
- (4) γ線照射と酸化、脱アミド化
- (5) Asp異性体含有蛋白質の作出と機能解析
- (6) 加齢性内耳機能障害とD-β-Asp含有蛋白質
- (7) D-Asp含有蛋白質分解酵素 (DEAP)

## 3. 研究の方法

(1) 蛋白質中のAsp異性体の一斉迅速分析：水晶体蛋白質をトリプシン処理し、得られたペプチド断片を液体クロマトグラフ質量分析装置 (LC/MS) で分析した。Aspの異性体を含むペプチドは質量、MS/MSが同一で複数のピークに分離するので、これを指標として異性体ペプチドを探索した。4種類の異性体含有ペプチドの同定はAspの異性体に特異的な市販酵素を作用させた。

(2) 蛋白質中のAsp残基の異性化と異常凝集化、機能変化との関係：

水晶体の蛋白質を不溶性画分と可溶性画分に分離後、可溶性画分をゲルろ過クロマトグラフにより、サイズ別に分離後、それぞれの画分中に含まれるクリスタリン (Cry) をトリプシン処理してLC/MSにより、どのCry中のどのAsp残基が異性化しているのかを分析した。

(3) 紫外線照射とAsp残基の異性化：Asp残基周辺にUVBの波長を吸収するトリプトファン残基を導入したペプチドを合成し、Asp残基の異性化がUVB照射によって促進するかどうかを検討した。

(4) γ線照射と酸化、脱アミド化：

4週齢のラット水晶体に5-500 Gyのγ線を照射し、Cry中のアミノ酸残基の酸化、脱アミド化、異性化部位の一斉解析をLC/MSで分析した。

(5) Asp異性体含有蛋白質の作出と機能解析：

RNase A (1-124) 中のAsp121残基に4種類のAsp異性体を導入したRNase Aを作成した。その方法はRNase Aの1-109までの配列を蛋白質発現法により合成し、RNase Aの110-124まではAsp121をL-α-, L-β-, D-α-, D-β-体に置換したペプチドを化学合成し両者を連結させた。これを用いて酵素活性を測定した。

(6) 加齢性内耳機能障害とD-β-Asp含有蛋白質：

マウスに騒音を曝露し、聴性脳幹反応 (ABR) 平衡感覚を解析する平均台試験、内耳のパラフィン標本あるいは凍結標本による酸化リン脂質抗体、D-β-Asp抗体を用いた免疫組織染色を実施した。

(7) D-Asp含有蛋白質分解酵素 (DAEP)：

DAEP欠損マウスを作製し、D-Asp含有蛋白質が体内で蓄積するモデル動物を構築し、D-化しやすい蛋白質の同定を試みた。

## 4. 研究成果

(1) 蛋白質中のAsp異性体の一斉迅速分析：

従来、4種類の異性体含有ペプチドの同定は標品を化学合成し、その溶出時間を比較することにより決定していたが、この方法は時間とコストがかかる。そこで、本研究ではペプチド中のAsp異性体を特異的に認識する市販酵素を作用させ、4種類の異性体含有ペプチドの同定に成功した。すなわち、L-α体を含むペプチドにはAsp-Nを、L-β-, D-α-体を含むペプチドに関してはそれぞれ、Protein L-isoadaspartyl methyltransferase (PIMT)、paenidaseという酵素を作用させ、L-α-, L-β-, D-α-, D-β-Asp含有ペプチドが同定できた。

(2) 蛋白質中のAsp残基の異性化と異常凝集化、機能変化との関係：

Cryはその大きさの違いによりα-, β-, γ-Cryに分類されている。これらCryが相互作用することにより水晶体の透明性を維持している。α-, β-Cryは通常、会合体を形成しているが、これらのCryはAsp残基が異性化することにより、凝集が進み、また、正常な会合体形成能が失われ解離し、単量体化することが初めて明らかとなった (図1)。

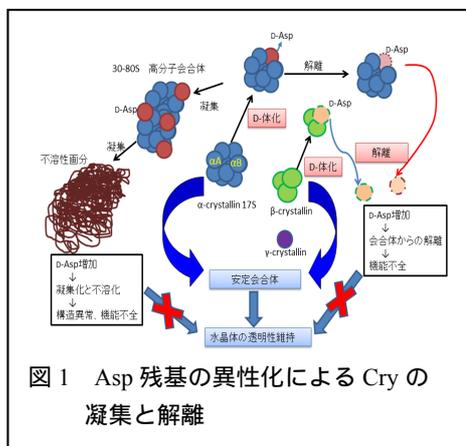


図1 Asp 残基の異性化による Cry の凝集と解離

### (3) 紫外線照射と Asp 残基の異性化 :

Asp 残基周辺にトリプトファン (Trp) 残基を導入したペプチドに紫外線照射すると、コントロールと比較して Asp 残基の異性化が進行した。このことから、Trp が紫外線のエネルギーを吸収し、吸収したエネルギーで Asp が D 体化したのではないかと考えられた。

### (4) $\gamma$ 線照射と酸化、脱アミド化 :

Cry 中での酸化は 5 Gy の照射では生じず、50 Gy 以上の照射によって初めて Met, Trp, His 残基に酸化が生じた。脱アミド化は、5 Gy の照射によって多数の Asn, Gln 残基で生じていた。これらの酸化、脱アミド化部位は加齢性白内障の水晶体中で生じている部位と共通していた。この結果から  $\gamma$  線照射が加齢性白内障の発症機構を解明する上で有用なツールであることが明らかとなった。他方、異性化は本照射条件では生じなかった。

(5) Asp 異性体含有蛋白質の作出と機能解析: L- $\alpha$ -Asp を導入した RNase A のみが酵素活性を有し、L- $\beta$ -, D- $\alpha$ -, D- $\beta$ -Asp を導入した RNase A では活性が完全に失われることが明らかとなった。この結果から蛋白質中のたった 1 残基の Asp 残基異性体の存在により、蛋白質の機能が劇的に変化することが初めて明らかとなった。

### (6) 加齢性内耳機能障害と D- $\beta$ -Asp 含有蛋白質:

低周波騒音曝露群は、非曝露群と比較して内耳前庭機能が有意に低下する事が分かった。また、酸化リン脂質抗体、D- $\beta$ -Asp 抗体を用いた免疫組織染色では、非曝露群と比較して、低周波騒音曝露群は内耳前庭の辺縁部において、強い陽性像が観察された。以上の結果より、低周波騒音は内耳前庭機能の障害を誘発する事が示唆された。

### (7) D-Asp 含有蛋白質分解酵素 (DAEP) :

全身欠損のみならず、肝臓におけるコンディショナルにおいても胎性致死であり、DAEP 欠損マウスを得ることはできなかった。そこで、DAEP が生殖巣のみ発現しているカ

タウレイボヤの卵巣に対し、RNAi による発現抑制を行ったが、その活性に大きな変動はなく、哺乳類肝臓に発現する DAEP とは別種の存在が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 38 件) すべて、査読あり。

1. Sakaue H, Kinouchi T, Fujii N, Takata T and Fujii N. Isomeric replacement of a single aspartic acid induces a marked change in protein function: The Example of Ribonuclease A. *ACS Omega* 2, 260-267 (2017) doi:10.1021/acsomega.6b00346.
2. Kim I, Saito T, Fujii N, Kanamoto T and Fujii N. One-shot LC-MS/MS analysis of post-translational modifications including oxidation and deamidation of rat lens  $\alpha$ - and  $\beta$ -crystallins induced by  $\gamma$ -irradiation. *Amino Acids* 48, 2855-2866 (2016). doi: 10.1007/s00726-016-2324-y
3. Fujii N, Takata T, Fujii N and Aki K. Isomerization of aspartyl residues in crystallins and its influence upon cataract *Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects* 1860,183-191 (2016). doi: 10.1016/j.bbagen.2015.08.001
4. Takata, T and Fujii N. Isomerization of Asp residues plays an important role in  $\alpha$ A-crystallin dissociation. *FEBS J.* 283, 850-859 (2016). doi: 10.1111/febs.13635.
5. Ohgami N, Yajima I, Iida M, Li X, Oshino R, Kumasaka MY, Kato M. Manganese-mediated acceleration of age-related hearing loss in mice. *Sci Rep*, 6:36306 (2016).
6. Kim I, Saito T, Fujii N, Kanamoto T, Chatake T and Fujii N. Site specific oxidation of amino acid residues in rat lens  $\gamma$ -crystallin induced by low dose  $\gamma$ -irradiation. *Biochem. Biophys. Res. Commu.* 466, 622-628 (2015). doi: 10.1016/j.bbrc.2015.09.075
7. Ramkumar S, Fujii N, Sakaue H, Fujii N, Thankappan B, Kumari RP, Natarajaseenivasan K, Anbarasu K. Real-time heterogeneous protein-protein interaction between  $\alpha$ A-crystallin N-terminal mutants and  $\alpha$ B-crystallin using quartz crystal microbalance (QCM). *Amino Acids.* 47, 1035-1043 (2015). doi: 10.1007/s00726-015-1935-z.
8. Maeda H, Takata T, Fujii N, Sakaue H, Nirasawa S, Takahashi S, Sasaki H and Fujii N. Rapid Survey of Four Asp Isomers in Disease-Related Proteins by LC-MS combined with Commercial Enzyme. *Anal. Chem* 87, 561-568 (2015). doi:10.1021/ac504413e

9. Sakaue H, Takata T, Fujii N, Sasaki, H and Fujii N.  $\alpha$ B- and  $\beta$ A3-crystallins containing D-Aspartic acids exist in a monomeric state. *Biochimica et Biophysica Acta -Proteins and Proteomics*, 1854, 1-9 (2015) doi: 10.1016/j.bbapap.2014.10.006
10. Kaji Y, Oshika T, Nejima R, Mori S, Miyata K and Fujii N. Immunohistochemical localization of D- $\beta$ -aspartic acid-containing proteins in pterygium. *J Pharm Biomed Anal.*116,86-89(2015) .doi:10.1016/j.jpba.2015.01.057

〔学会発表〕(計 90 件)

1. 藤井紀子: 生命の起原及び進化学研究に端を発した D-アミノ酸研究の進歩 第 41 回生命の起原および進化学会学術講演会 九州工業大学 飯塚キャンパス(福岡県飯塚市)(2017 年 3 月 28-30 日) 招待講演
2. 藤井紀子: D-アミノ酸で測る眼と皮膚の老化 日本食品・機械研究会 大阪国際会議場(大阪府大阪市)(2017 年 1 月 31 日) 招待講演
3. Noriko Fujii, Takumi Takata, Norihiko Fujii, Hiroshi Sasaki Age-dependent isomerization and racemization at specific aspartyl residues in lens crystallins :Analysis and biological relevance XXII Biennial Meeting of the International Society for Eye Research 京王プラザホテル(東京都新宿区)(2016 年 9 月 25-29 日) 招待講演
4. 藤井紀子: 生命起原で確立した生物ホモキラリテイの非絶対性 日本地球化学会年会 セッション「初期地球と生命起源の地球化学」 大阪市立大学(大阪府大阪市)(2016 年 9 月 16 日) 招待講演
5. 藤井紀子: 生命科学におけるパラキラリテイの重要性 第 36 回日本眼薬理学会 帝京大学 板橋キャンパス(東京都板橋区)(2016 年 9 月 10 日) 招待講演
6. 藤井紀子: 白内障原因蛋白質の変化をとらえる化学的アプローチ 第 55 回白内障学会総会、第 42 回水晶体水晶体研究会 いわて県民情報交流センター アイーナ(岩手県盛岡市)(2016 年 7 月 29-31 日) 招待講演
7. 藤井紀子: 紫外線照射と老化によって促進する蛋白質中の D-アミノ酸の生成 第 38 回日本光医学・光生物学会 京都リサーチパーク(京都府京都市)(2016 年 7 月 22-23 日) 招待講演
8. 藤井紀子: 生物界の右左 D-アミノ酸で見る生命現象の不思議 鳥取大学生物応用工学科特別セミナー 鳥取大学(鳥取県鳥取市)(2016 年 6 月 16 日) 招待講演
9. 藤井紀子: アミノ酸の形と老化 第 120 回日本眼科学会総会 仙台国際センタ
- ー(宮城県仙台市)(2016 年 4 月 7-9 日) 招待講演
10. 藤井紀子、高田匠、坂上弘明、藤井智彦: 加齢による蛋白質ホモキラリテイの破れ 第 41 回生命の起原および進化学会学術講演会 鳴門教育大学(徳島県鳴門市)(2016 年 3 月 14-16 日) 招待講演
11. Noriko Fujii: Crystallin racemization and insolubilization of lens proteins International Conference on the Lens 2015 Sheraton Kona Resort & Spa(ハワイ(アメリカ))(2015 年 12 月 6-11 日) 招待講演
12. 藤井紀子: 蛋白質異常凝集と D-アミノ酸 第 88 回日本生化学会・第 37 回日本分子生物学会年会合同大会 神戸ポートピアホテル(兵庫県神戸市)(2015 年 12 月 1-4 日) 招待講演
13. 藤井紀子: 老化における蛋白質ホモキラリテイの破れ さきがけ 20 周年記念講演会 東大工学部(東京都文京区)(2015 年 11 月 14-15 日) 招待講演
14. 藤井紀子: LC-MS を用いた白内障クリスタリン中の異性体アミノ酸の迅速分析法 第 54 回日本白内障学会総会・第 41 回水晶体研究会 合同開催 ミッドランドホール(愛知県名古屋市)(2015 年 9 月 18-20 日) 招待講演
15. Noriko Fujii, Takumi Takata, Norihiko Fujii, Hiroshi Sasaki: Isomerizations of aspartyl residues in lens crystallins from age-related cataracts. Asia-ARVO 2015 Symposium パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)(2015 年 2 月 16-19 日) 招待講演
16. Noriko Fujii: The importance of the idea of "Parachirality" in life science 3rd International Symposium on the SOAI Reaction and Related Topic Bánó Mária Kastélyszálló(ハンガリー)(2015 年 9 月 2-5 日) 招待講演
17. 藤井紀子: LC-MS/MS による蛋白質中の Asp 異性体の迅速解析 第 15 回日本蛋白質科学会年会 あわぎんホール(徳島県徳島市)(2015 年 6 月 24-26 日) 招待講演
18. 木野内忠稔、北波利雄、藤井紀子: フェルラ酸のアミロイド前駆体タンパク質分解に対する作用の二相性 2015 年度農芸化学会大会 岡山大学 津島キャンパス(岡山県岡山市)(2015 年 3 月 26-29 日)
19. Noriko FUJII, Norihiko FUJII, Takumi TAKATA, Hiroki MAEDA, Hiroaki SAKAUE: Protein aggregation and racemization of amino acids Japan-Hungary Joint Seminar "Mechanism and regulation of aberrant protein aggregation" 阪大蛋白研(大阪府吹田市)(2014 年 11 月 18-20 日) 招

- 待講演
20. Noriko Fujii : A novel rapid comprehensive analysis of D-amino acids in cataract lens proteins using LC-MS The 2nd International Conference of D-Amino Acid Research IDAR2014 栃木県総合文化センター(栃木県宇都宮市)(2014年9月2-5日) 招待講演
  21. Kinouchi T and Fujii N. : The Hunt For D-Aspartyl Endopeptidase In Various Living Things: Vertebrates, Aquatic Animals, And Plants., The 2nd International Conference of D-Amino Acid Research, 栃木県総合文化センター(栃木県宇都宮市)(2014年9月2-5日)
  22. Noriko Fujii : Rapid Analysis of D-amino acids in Proteins using LC-MS Origins 2014 奈良県新公会堂(奈良県奈良市)(2014年7月6-11日) 招待講演
  23. 藤井紀子: 老化や酸化ストレスによるD-アミノ酸含有蛋白質の蓄積 第14回日本抗加齢医学会総会 大阪国際会議場(大阪府大阪市)(2014年6月6-8日) 招待講演
  24. 大神信孝: 環境ストレスと関連する聴覚系疾患の解析 第84回日本衛生学会学術総会 シンポジウム1「環境因子により誘発される疾患の機構解明: 実験研究による解析」岡山コンベンションセンター(岡山県岡山市)(2014年5月26日)
  25. 藤井紀子: 加齢性眼疾患における蛋白質の変化をとらえる化学的アプローチ 第118回日本眼科学会総会 帝国ホテル(東京都千代田区)(2014年4月2-5日) 招待講演
  26. 藤井紀子: 放射線照射による蛋白質への影響 シンポジウム「宇宙にひろがる人類文明の未来」 京都大学百周年記念講堂(京都府京都市)(2014年2月2日) 招待講演
  27. 藤井紀子: D-アスパラギン酸が惹起する蛋白質の異常凝集と加齢性疾患 ビタミンB 研究委員会 平成25年度シンポジウム 大阪大学中之島センター(大阪府大阪市)(2014年1月31日) 招待講演
  28. Noriko Fujii : Rapid Analysis of the Isomers of Individual Asp residues in Lens Crystallins from Elderly Donors Using LC-MS International Conference on the Lens Sheraton Kona Resort & Spa(ハワイ(アメリカ))(2014年1月19-24日) 招待講演
  29. 藤井紀子: 放射線照射による水晶体クリスタリンの構造機能変化とAsp異性体の一斉解析、シンボ名:「放射線と水晶体」第67回日本臨床眼科学会総会シンポジ

ウム パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)(2013年10月31日-11月3日) 招待講演

30. 大神信孝、飯田真智子、加藤昌志 : Partial impairment of c-Ret accelerates age-related hearing loss 第36回日本神経科学大会 / Neuroscience2013 国立京都国際会館(京都府京都市)(2013年6月20-23日)

〔図書〕(計3件)

Noriko Fujii, Takumi Takata, Norihiko Fujii, Kenzo Aki and Hiroaki Sakae、Springer、D-Amino acids: Physiology, Metabolism, and Application, 2016、241- 254  
藤井紀子 他、シーエムシー出版、光老化科学の最前線、2015、301

藤井紀子、株式会社 化学同人、CSJ カレントレビュー17 「極限環境の生体分子過酷な環境下での機能を科学する」、2014、196

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

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

## 6. 研究組織

### (1) 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

### (2) 研究分担者

加治 優一 (KAJI YUICHI)

筑波大学・医学部・准教授

研究者番号: 50361332

大神信孝 (Ohgami Nobutaka)

名古屋大学・大学院医学系研究科・講師

講師

研究者番号: 80424919

### (3) 連携研究者

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

### (4) 研究協力者

( )