厚生科学研究費補助金

長寿科学総合研究事業

D-アミノ酸含有蛋白質に起因する疾病の病態解明とその特異的な分解酵素による治療法の開発に関する研究

平成 12 年度　総括研究報告書

主任研究者　香川靖雄

平成 13 年 3 月

目　次

I.　総括研究報告書
D-アミノ酸含有蛋白質に起因する疾病の病態解明とその特異的な
分解酵素による治療法の開発に関する研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 1
香川靖雄
（資料）図表

II.　分担研究報告書
1. D-アミノ酸含有蛋白質の精製とその性質の決定に関する研究・・・・・・ 16
浜本敏郎
（資料）図表

2. D-アミノ酸含有蛋白質分解酵素に特異的な阻害剤の探索と
新規阻害剤の合成に関する研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 29
木野内忠稔
（資料）図表

III. 研究成果の刊行に関する一覧表・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 38

IV.　研究成果の刊行物・別刷・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 40

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
総括研究報告書

D-アミノ酸含有蛋白質に起因する疾病の病態解明とその特異的な分解酵素による治療法の開発に関する研究

主任研究者：香川靖雄　女子栄養大学副学長・医化学教室教授

研究要旨

従来、哺乳類の構成アミノ酸は、すべてL型だけであると考えられていたが、加齢と共に遊離のD型アスパラギン酸（D-Asp）やD-Asp含有蛋白質が、体内で生じることが明らかになり、D-Asp含有蛋白質は、白内障や動脈硬化、プリオン病などの疾病との関連が指摘されている。特にアルツハイマー病では、D-Asp残基を含むβアミロイド蛋白質が、実際の患者脳で発見され、その因果関係が注目されている。我々は、こうした有害なD-Asp含有蛋白質に対する排除機構として、D-Asp含有蛋白質に特異的な分解酵素があるのではないか、との仮説をたて、D-Asp含有蛋白質に特異的な分解酵素の探索を行った。その結果、特異的なエンド型分解酵素の精製に成功した。従って、この酵素をD-aspartyl endopeptidase（DAEP）と名付け、今年度においてはDAEPの性質についての研究を重点的に行った。その結果、大きく分けて以下に示す3つの成果が得られた。
(1) 従来、非脊椎動物にのみ存在が知られていた、D-アミノ酸含有蛋白質に対する代謝機構が、哺乳類にもD-Asp含有蛋白質分解酵素として存在することが明らかになったこと、(2) その局在や基本的な性質が明らかになったこと、(3)その阻害剤の開発に成功したこと、である。特にDAEP阻害剤（以下、i-DAEP）は、不可逆的にDAEPに結合し、その IC_{50} は、3μMであり、ミトコンドリアに処理すると、チトクローム *c* の放出を誘導することが明らかになった。従って、DAEPは単にD-Asp含有蛋白質の分解酵素としてのみ存在するのではなく、それが局在するミトコンドリアの機能にも深く関与していることが示唆された。

分担研究者氏名・所属施設名及び所属施設における職名
浜本敏郎　自治医科大学生化学講座
　　　　　機能生化学研究室・助教授
木野内忠稔　自治医科大学生化学講座
　　　　　機能生化学研究室・助手

A. 研究目的

私たち哺乳動物において､その生体組織や体液を構成する蛋白質は､従来 L 型のアミノ酸からのみ構成されると考えられていた。ところが近年､加齢とともに､遊離の D 型アスパラギン酸 (D-Asp) や D-Asp 含有蛋白質が、体内で生じることが明らかになり、D-Asp 含有蛋白質は、白内障や動脈硬化、プリオン病などの疾病との関連が指摘されている。特に興味深いのは、アルツハイマー病 (AD) の原因蛋白質であるβアミロイド蛋白質 (Aβ) においてD-Asp を含む Aβ (D-Aβ) が、AD 患者脳の老人斑の構成成分として何種類も発見されたことである。それらはいずれも自己凝集し、その結果、神経毒性を持つことが、*in vitro* で確認されており、発症や症状の進行に深く関係しているものと考えられている。しかし一方で、AD 患者の脳では、遊離の D-Asp は健常脳に比較し、減少していることも報告されている。これら一見、矛盾する結果に対し、我々は以下のような仮説を立てた。即ち、我々の体内には、防御システムとして、D-Asp 含有蛋白質に対する特異的な分解酵素が存在しており、AD では、その酵素活性が著しく減退した結果、遊離の D-Asp 量が減少し、D-Aβがいっそう蓄積して、AD の進行を促進しているのではないか、と言うものである。そこで、D-Asp 含有蛋白質分解酵素の探索方法を開発し、分離・同定を行った。その結果、ごく最近、哺乳動物で初めてその精製に成功した。従って、本酵素の性質や作用機序を解明し、その遺伝子をクローニングすることによって、AD を始め D-Asp 含有蛋白質に起因する白内障や動脈硬化などの疾病の治療法、予防法を開発し、また、血液検査などによって本酵素の活性を調べることによって、D-Asp 含有蛋白質に起因する疾病の発症前診断や、症状の経過を予測する方法を開発することが本研究の目的である。

B. 研究方法

DAEP 精製法

本研究で用いた DAEP は以下の手順で精製した。まず、ウサギ肝臓に 10 倍量以上の等張液(0.25M ショ糖、0.2mM EDTA)を加え、ポッター型ホモジナイサーで破砕した。その後、遠心分離(100×g、5 分、4℃)し、その上澄みに 1/2 倍量の高張液(0.35M ショ糖、0.2mMEDTA)を加え、遠心分離(800×g、15 分、4℃)し、その上澄みを更に遠心分離(9000×g、10 分、4℃)し、その沈殿物に 10 倍量以上の等張液(0.25M ショ糖、0.2mM EDTA)を加え、遠心分離(9000×g、7 分、4℃)し、沈殿物を回収した。この沈殿物に等張液(0.25M ショ糖、0.2mM EDTA)を加え、ホモジナイサーで軽く懸濁し、20mg/ml に調製し、Optiprep を用いた密度勾配遠心分離(1.117-1.185g/ml)を行い、1.130-1.140g/ml を分画し、ミトコンドリア画分を得た。このミトコンドリア画分に超音波処理

(50% dutycycle、2 分)を行い、遠心分離(100,000×g、60 分、4℃)し、その沈殿物(=ミトコンドリア総膜画分)に抽出緩衝液(1.0% CHAPS を含む T[10]E[1])を加え、チューブローテーター(～1rpm、45 分、4℃)で処理し、超遠心分離(100,000×g、60 分、4℃)し、その沈殿物を上記抽出緩衝液に懸濁し再抽出を繰り返し、その上澄みに順次 100K 限外ろ過(MACROSEP)、強陰イオン交換(RESOURCE Q)、強陽イオン交換(RESOURCE S)を行い、ヒドロキシアパタイト(Bio-Scale CHT2-1)カラムににかけ、最終的にゲルろ過し(Superose 6HR10/30)、DAEP 精製品を得た。

DAEP 活性測定法

測定用基質として合成した Nma-Phe-Arg-His-D-Asp-Ser-Gly-Tyr-Lys-2,4-Dinitro-phenyl-Arg-NH_2 を用い、以下の手順で活性測定を行った。反応液として 1.0M Tris/HCl(pH8.5)、1μl、5M NaCl、4μl 及び 0.1M $MnCl_2$、3μl、蛍光基質(1mM)10μl、並びに蒸留水 72μl からなる計 90μl の反応液を用い、これに酵素液 10μl を加え、総量 100μl として、30℃で DAEP の場合 15 分間インキュベートした。蛍光強度は、10%SDS、100μl、さらに 0.1M 酢酸緩衝液(pH5.0)を加えて総量 1.5ml として、蛍光光度計で測定した(測定条件:励起波長 380 mm、蛍光波長 460 mm)。

なお、本研究における実験動物の使用について、動物愛護に関する配慮は、全て女子栄養大学及び自治医科大学倫理委員会規程、及び自治医科大学実験医学センターの動物実験規程に従って実施された。

C. 研究結果

今年度(平成 12 年度)は、研究計画に従い、まず DAEP の酵素としての性質決定を行うことを目的として、以下の順に研究を実施した。即ち、(1) DAEP 精製法の改良、(2) 至適温度等の酵素的性質の検討、(3) DAEP に対する阻害剤の探索とその特異的阻害剤の合成、(4) DAEP 阻害剤の生理機能への影響、である。

(1) DAEP 精製法の改良

これまで、DAEP のミトコンドリア膜における局在が判明していなかったため、その精製の際には、ミトコンドリアの総膜画分を精製材料として用いていた。そのため、精製初期における夾雑蛋白質の多さにより比活性が上昇せず、このことが DAEP の最終的な精製収率を低下させる原因の一つであると考えられた。そこで、ミトコンドリア外膜のマーカー酵素であるモノアミンオキシダーゼの分布をもとに、内・外膜をスクロース密度勾配遠心法により分画し、DAEP の局在を検討した(図 1)。その結果、DAEP はミトコンドリア内膜に存在していることが判明し、ミトコンドリア内膜を精製の初期材料とすることで、その収率の向上が見込まれた(表 1)。現在、この結果を元に、さらなる精製法の改良に取り組んでいる。

(2) 至適温度等の酵素的性質の検討

上記(1)により、DAEP 精製標品が得られるようになったので、DAEP の生理機能を知るため、基本的な酵素的性質の検討を行った。その結果を表 2 に示す。また、DAEP は、肝臓の核とミトコンドリアにおいて、その総活性

比がほぼ 1：1 で存在していることが明らかになっていたが、今回、他の臓器においてその存在比を検討したところ、脳や精巣/卵巣では、ミトコンドリアに全体の 80%程度の DAEP が存在していることが分かり、腎臓、脾臓、小腸などの臓器では、肝臓同様にその総活性比はほぼ 1：1 で推移し、臓器の特異性と DAEP 活性の関係が示唆された（図2、3)。

（3）DAEP に対する阻害剤の探索と特異的阻害剤の合成

DAEP の生理機能に関して、より多くを知るために、DAEP 活性を阻害する物質の探索を行った。すでにプロテアソーム阻害剤のラクタシスチンが、DAEP に対しても作用することがわかっていたが、今回さらに亜鉛イオン（Zn^{2+}）が、DAEP 活性を阻害し得ることが明らかになった。しかしながら、ラクタシスチン、亜鉛イオンともに、その特異性は DAEP だけに限定できない。従って、細胞内で DAEP 活性を阻害し、その効果がどのように表現型に現れるのかについて、検討することを目的とした研究を実施するには、より特異的な阻害剤の開発が急務であると考えられた。そこで DAEP が D-Asp 特異的な分解酵素であることを考慮し、基質アナログとしてその阻害剤を設計した。こうして完成したのが i-DAEP である（現在、特許申請中のため、i-DAEP についての構造や合成法などについては、特許取得後、公開する)。i-DAEP は、ラクタシスチンに比べ 10 倍以上の DAEP 阻害効果をもつことが明らかになった（図4)。

（4）DAEP 阻害剤の生理機能への影響

i-DAEP の特性が明らかになったので、我々は DAEP が局在するミトコンドリアに対して i-DAEP を投与し、ミトコンドリアの機能にどのような影響が出るか観察した。その結果、ミトコンドリアにおける ADP→ATP 変換反応において、酸素の消費速度を促進することが観察された（図 5)。また、同様にして i-DAEP を投与すると、ミトコンドリアからのチトクローム *c* 放出の促進効果も観察され、DAEP は単に D-Asp 含有蛋白質の分解酵素としてのみ存在するのではなく、それが局在するミトコンドリアの機能にも深く関与していることが示唆された（図6)。

D. 考察

本研究の大きな目的は、D-Asp 含有蛋白質に起因する疾患とその分解酵素：DAEP との関係を明らかにするとともに、DAEP を利用して、D-Asp 含有蛋白質疾患の治療法を開発することである。これまでに、DAEP の酵素的な性質については、多くの知見を得ており、新たに開発した DAEP 阻害剤：i-DAEP は、非常に高い特異性を持つことが分かった。従って、これまで全く不明だった哺乳類における D-Asp 含有蛋白質の代謝機構について、分解酵素の視点から検討可能になったことは、D-Asp 含有蛋白質の蓄積機序の解明に大きく寄与するものと考えている。さらに、マウスなどに i-DAEP を投与することによって、D-Asp 含有蛋白質の蓄積を再現するモデル動物の開発を現在検討している。

また、i-DAEP が、図らずもアポトーシスを引き起こすことが示唆された。このことは、i-DAEP と既存の抗ガン剤との組み合わせで、

よりガン細胞に特異的な抗腫瘍効果をもつ薬剤の開発の可能性を示唆するものである。今後は、DAEP 遺伝子をクローニングすることによって、DAEP に対する知識をさらに深め、D-Asp 含有蛋白質に起因する各疾病との関連を家系調査などを行って明らかにする。そして、その結果を利用して、血液検査などの方法で DAEP 活性を検査し、D-Asp 含有蛋白質に起因する疾患の治療法や発症前診断、症状の経過を予測する方法を開発することが成果として期待できる。

E. 結論

従来、非脊椎動物にのみ存在が知られていた、D-アミノ酸含有蛋白質に対する代謝機構が、哺乳類に存在し、各臓器において DAEP は、肝臓、腎臓、脾臓、卵巣/精巣、脳などの順に比活性が高く、細胞内においては、ミトコンドリア内膜に局在する分子量 70 万の高分子複合体であることが明らかになった。その酵素的性質は、至適温度 37℃、至適 pH8.5 であり、2 価のカチオンにより、比活性が 2 倍に上昇するが、Zn^{2+}によってその活性は阻害される。さらに、DAEP 活性を阻害する特異的な阻害剤である i-DAEP は、不可逆的に DAEP に結合し、その IC_{50} は、3μM であり、ミトコンドリアに処理すると、チトクローム *c* の放出を誘導することが明らかになった。従って、DAEP は単に D-Asp 含有蛋白質の分解酵素としてのみ存在するのではなく、それが局在するミトコンドリアの機能にも深く関与していると考えられる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Kagawa, Y., Hamamoto, T. and Endo, H.: The α/β interfaces of α_1/β_1, α_3/β_3 and F_1: domain motions and elastic energy stored during rotation. *J. Bioenerg. Biomembr.* 32 (5), 471-484 (2000)

Ichida, M., Hakamata, Y., Hayakawa, M., Ueno, E., Ikeda, U., Shimada, K., Hamamoto, T., Kagawa, Y. and Endo, H.: Differential regulation of exonic regulatory elements for muscle-specific alternative splicing during myogenesis and cardiogenesis. *J. Biol. Chem.* 275 (21), 15992-16001, (2000)

Inoki, Y., Hakamata, Y., Hamamoto, T., Kinouchi, T., Yamazaki, S., Kagawa, Y. and Endo, H.: Proteoliposomes colocalized with endogenous mitochondria in mouse fertilized egg. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 278, 183-191 (2000)

Inoki, Y., Miura, T., Kajimoto, T., Kawase, M., Kawase, Y., Yoshida, Y., Tsuji, S., Kinouchi, T., Endo, H., Kagawa, Y. and Hamamoto, T.: Ganglioside GD3 and its mimetics induce cytochrome *c* release from mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 276, 1210-1216 (2000)

Kinouchi, T., Ishiura, S., Suzuki, K., Kagawa, Y. and Hamamoto, T: Analysis of metabolic

pathways of Alzheimer's disease amyloid precursor protein. Jichi Medical School Journal, 23, 47-53 (2000)

香川靖雄編「遺伝子医療の発展」最新医学 55 巻 1 号、最新医学社(2000)

香川靖雄「生活習慣病を防ぐ-健康寿命をめざして」pp. 1-217、岩波新書、東京(2000)

香川靖雄編「生化学-分子から病態まで」東京化学同人、pp. 1-356、東京(2000)

香川靖雄「科学が証明する朝食のすすめ」女子栄養大学出版部、pp. 1-221、東京(2000)

香川靖雄・笹月健彦編「岩波講座現代医学の基礎-遺伝と疾患」、pp. 1-192、東京 (2000)

2. 学会発表

ISSFAL (国際脂質脂肪酸会議) シンポジウム講演「Uncoupling Proteins and Energy Metabolism」筑波国際会議場(2000 年 6 月 7 日)

第 5 回国際線溶学会シンポジウム特別講演、生活習慣病、東京国際フォーラム (2000 年 6 月 17 日)

第 6 回日本遺伝子治療学会、同国際シンポジウム、会長講演「生活習慣病の遺伝子治療」東京笹川記念館(2000 年 7 月 27-29 日)

第 10 回健康医学会、第 10 周年記念特別講演「生活習慣病と健康医学」(2000 年 11 月 18 日)

第 23 回日本分子生物学会、教育講演「生活習慣病と SNPs」(2000 年 12 月 15 日)

木野内忠稔、香川靖雄、浜本敏郎：哺乳類における D-アスパラギン酸含有蛋白質に特異的な分解酵素について。生化学、72 (8)、pp696 (2000)

遠藤仁司、植野恵理子、浜本敏郎、香川靖雄：ミトコンドリアの凝集と融合に関わる新規ヒト遺伝子。生化学、72 (8)、pp793 (2000)

岩田耕育、徳久幸子、成瀬克子、香川靖雄、河原林裕、菊池久、養王田正文：超好熱性古細菌 *Pyrococcus horikoshii* 由来アスパラギン酸ラセマーゼの機能解析。生化学、72 (8)、pp832 (2000)

三上智子、香川靖雄、林純一：マウス組織におけるミトコンドリア呼吸機能の加齢変化。生化学、72 (8)、pp964 (2000)

福島亜紀子、太田篤胤、酒井健介、高崎みさお、香川靖雄、佐久間慶子：DNA アレイを用いるフラクトオリゴ糖により誘導される遺伝子の同定。生化学、72 (8)、pp1041 (2000)

木野内忠稔、香川靖雄、浜本敏郎：哺乳類における D-アスパラギン酸含有蛋白質に特異的な分解酵素について。生化学、72 (8)、pp696 (2000)

遠藤仁司、植野恵理子、浜本敏郎、香川靖雄：ミトコンドリアの凝集と融合に関わる新規ヒト遺伝子。生化学、72 (8)、pp793 (2000)

遠藤仁司、植野恵理子、浜本敏郎、香川靖雄：ミトコンドリア融合因子 Fzo のヒト関連遺伝子群のクローニング。第 23 回日本分子生物学会年会プログラム・講演要旨集、pp597(2000)

鬼山奈穂子、植野恵理子、浜本敏郎、林純一、香川靖雄、遠藤仁司：ヒト Fzo 関連蛋白の細胞内局在と機能。第 23 回日本分子生物学会年会プログラム・講演要旨集、pp597(2000)

植野恵理子、多胡憲治、内海健、富永眞一、浜本敏郎、香川靖雄、遠藤仁司：スプライシング因子 SF2/ASF と Y-box 結合蛋白質は結合する。第 23 回日本分子生物学会年会プログラム・講演要旨集、pp538(2000)

玉田寛、植野恵理子、島崎久仁子、浜本敏郎、香川靖雄、遠藤仁司：脳特異的 RNA 結合蛋白 (BBPB) の時期的発現と機能の解析。第 23 回日本分子生物学会年会プログラム・講演要旨集、pp538(2000)

車昇勲、福島亜紀子、佐久間慶子、香川靖雄、：ドコサヘキサエン酸のマウスに対する慢性な多面的効果の cDNA あれいによる分析。第 23 回日本分子生物学会年会プログラム・講演要旨集、pp421(2000)

木野内忠稔、香川靖雄：哺乳類における D-アスパラギン酸含有蛋白質に特異的な分解酵素と、その阻害剤について。シンポジウム「D-アミノ酸バイオシステムの医化学」東京大学山上会館、平成 13 年 2 月 28 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案特許登録

特になし

3. その他

分担研究者である木野内が、発明の名称「D-アスパラギン酸含有蛋白質分解酵素の阻害剤」、整理番号：PS01-961、出願番号：特願 2001-099904 として、平成 13 年 3 月 30 日に特許願を出願した。

図1 ：DAEPの局在

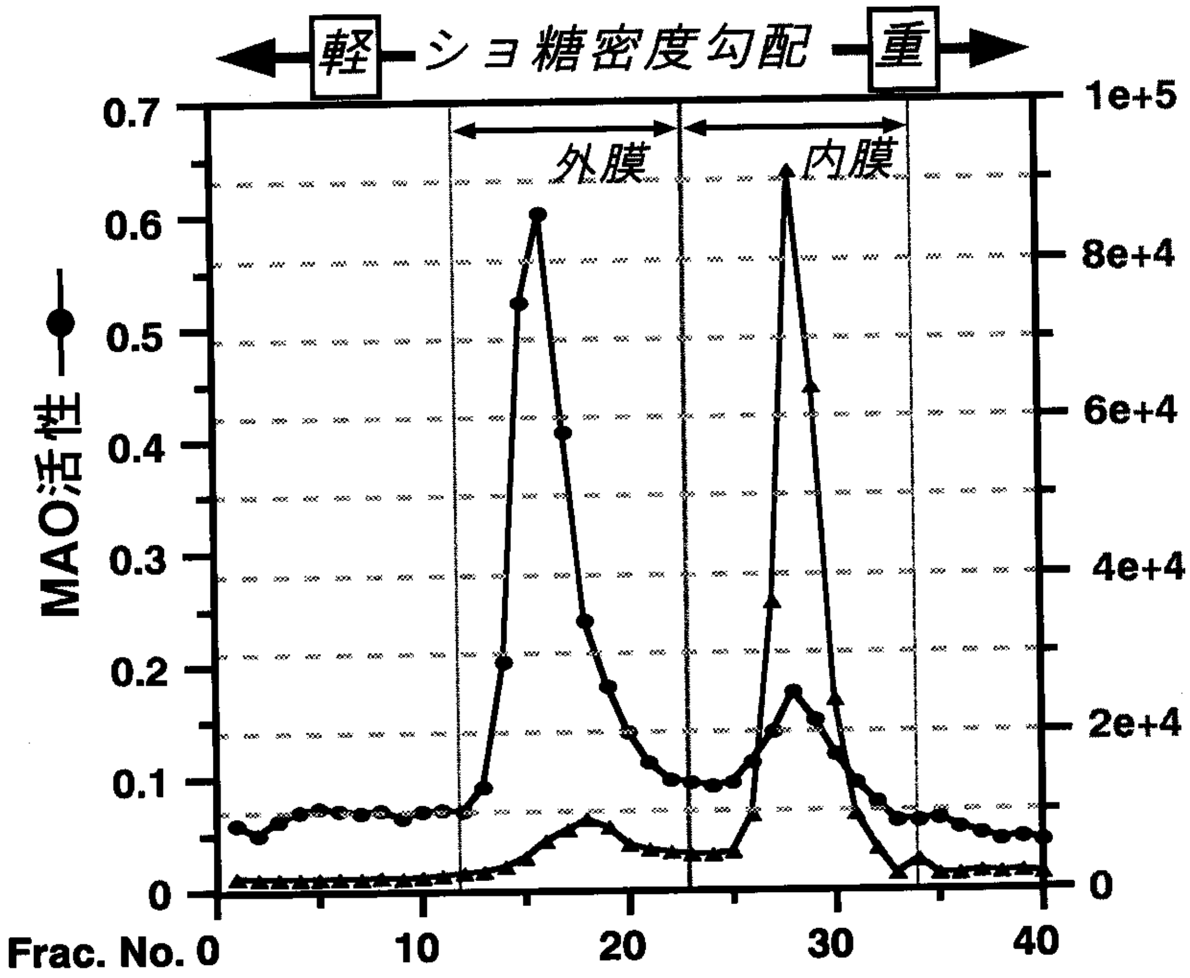
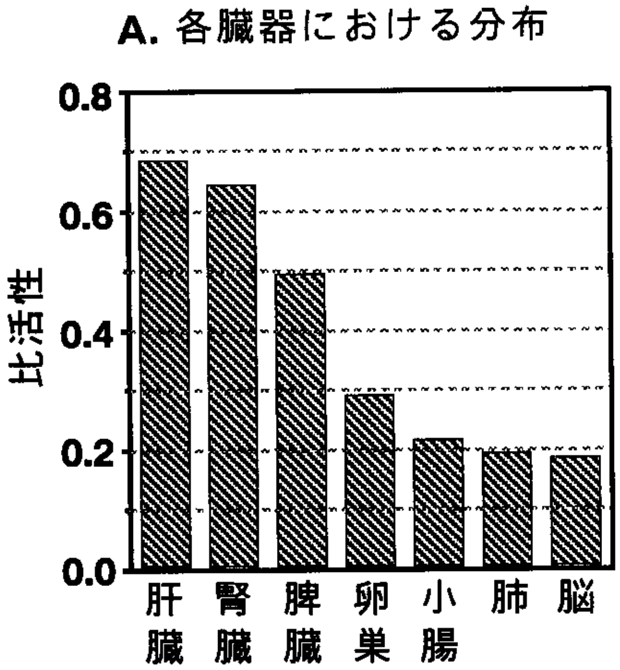

軽
ショ糖密度勾配
重
外膜
内膜
MAO活性
DAEP活性
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
1e+5
8e+4
6e+4
4e+4
2e+4
0
Frac. No. 0
10
20
30
40

図2：各臓器および細胞内におけるDAEPの分布



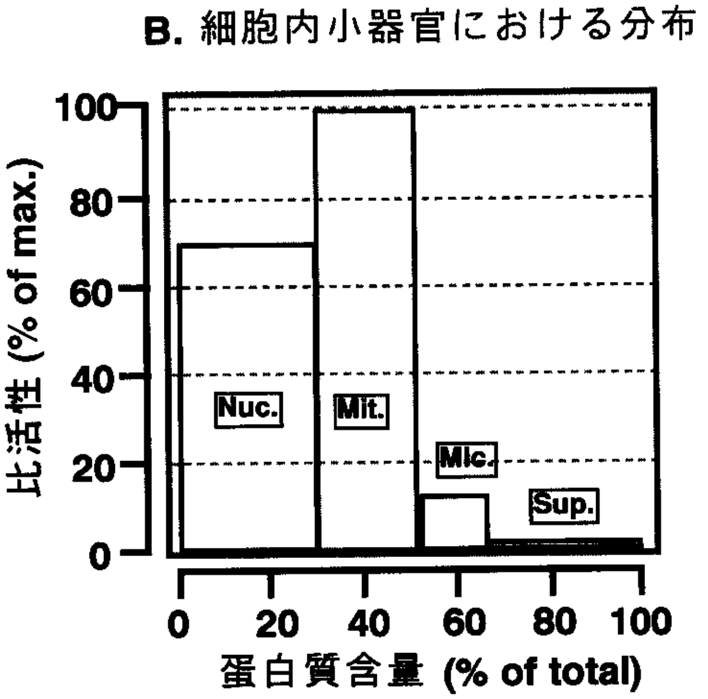


図3:各臓器における核とミトコンドリアのDAEP活性比

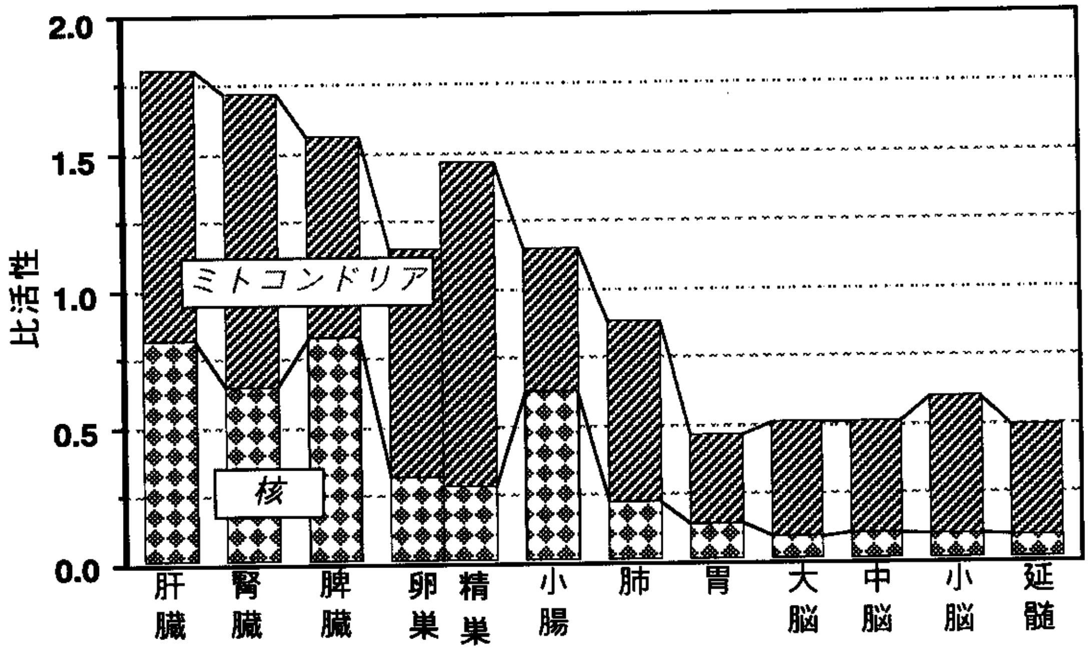


図4：DAEP活性に対する阻害剤の効果

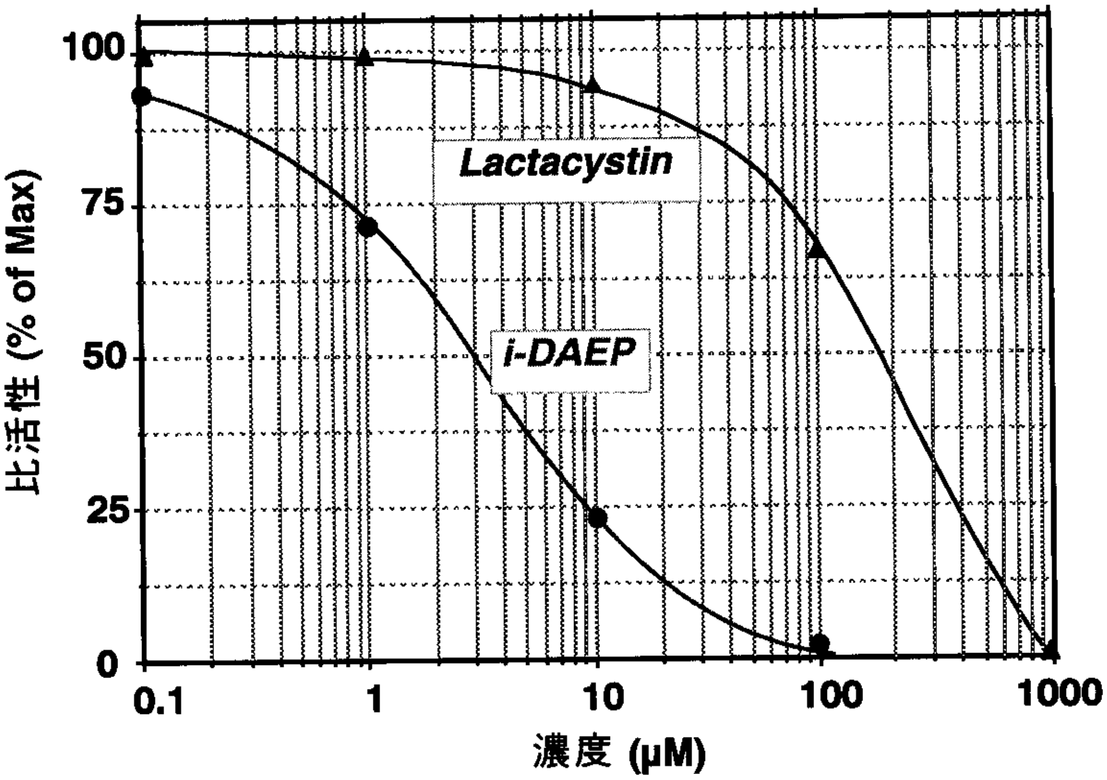
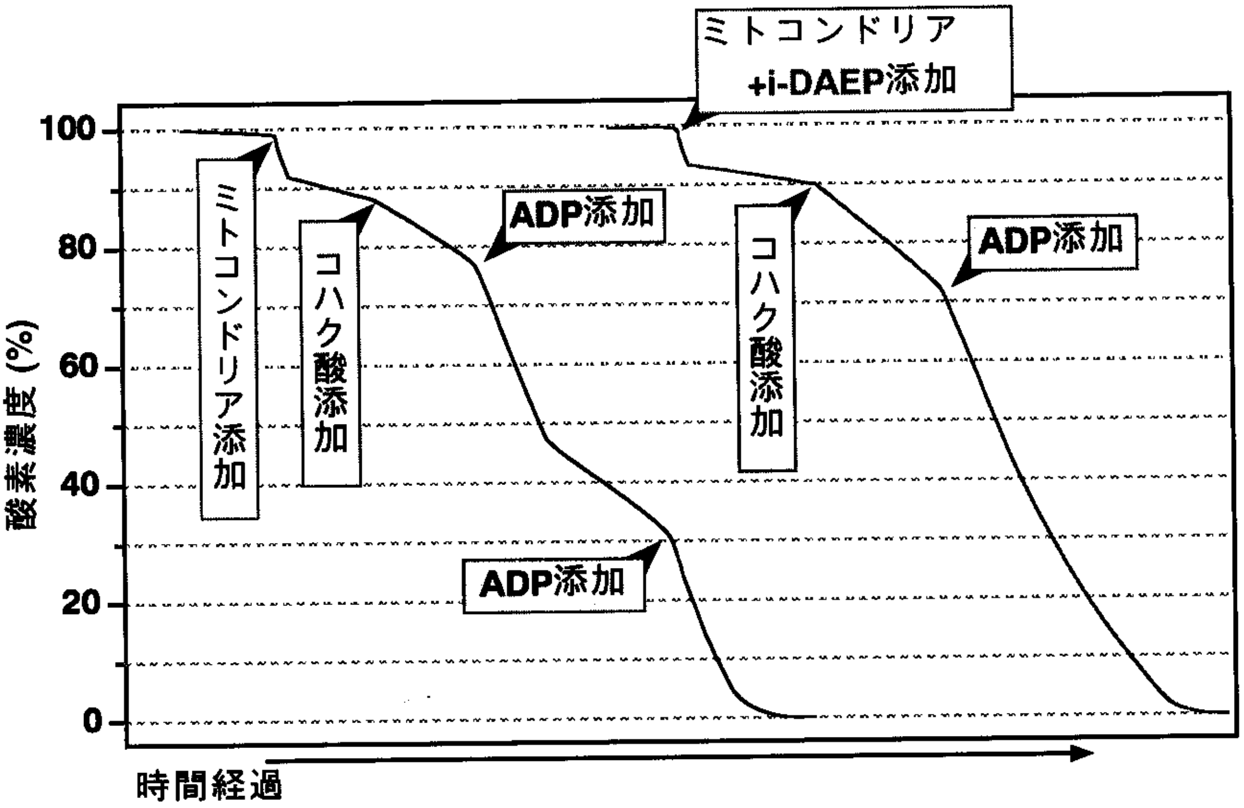
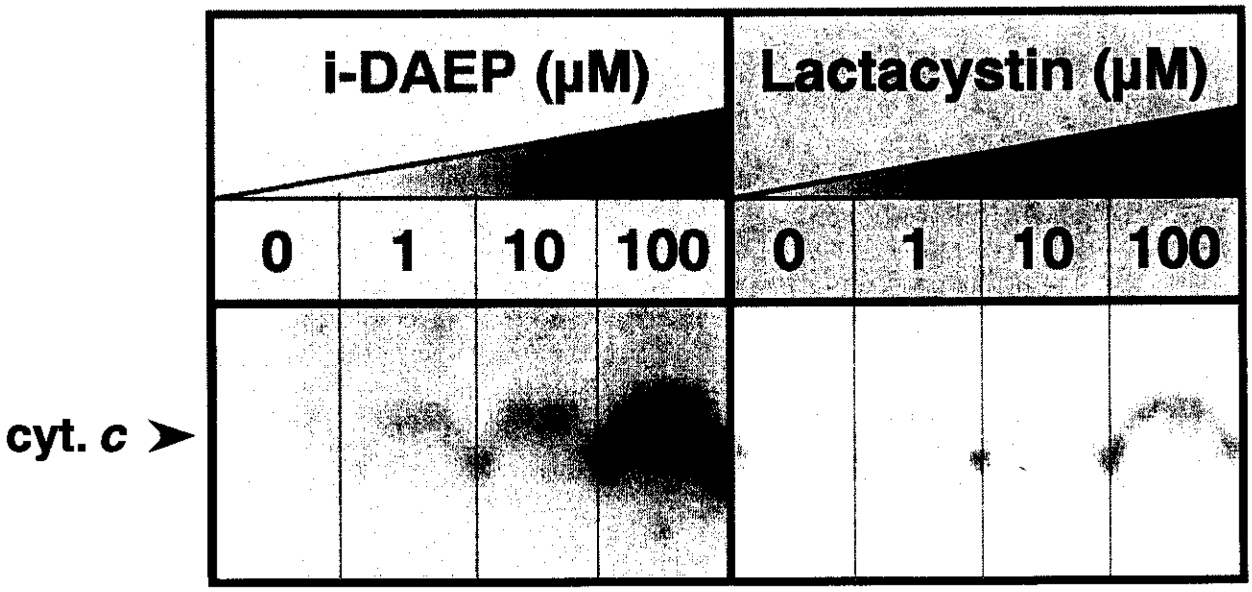


図5：DAEP阻害剤によるミトコンドリアの呼吸の変化



分画したミトコンドリアにDAEP阻害剤を加え、その後、ミトコンドリア呼吸測定用反応液（0.25 Mスクロース、10 mM KCl、2 mM $MgCl_2$、0.2 mM EDTA、20 mMリン酸カリウム(pH 7.4)）に懸濁し、以後、酸素電極によって、反応液中の酸素濃度の変化を経時的に測定した。次に、終濃度が2-5 mMになるようコハク酸ナトリウムを添加し、さらに、終濃度が0.2-0.3 mM ADP になるようにADPを添加し、状態3と状態4の呼吸を測定した。

図6：DAEP阻害剤によるチトクロームcの放出



分画したミトコンドリアにDAEP阻害剤を加え、その後、チトクロームc放出反応液（0.25 Mスクロース、10 mM KCl、1.2 mM $MgCl_2$、0.4 mM EDTA、2 mMコハク酸ナトリウム、1mMリン酸カリウム(pH 7.4)、10 mM HEPES-KOH (pH 7.4)）に懸濁し、37℃で60分間保温した。その後、反応液を遠心分離し、その上清を抗チトクロームcによってウエスタンブロッティングを行った。

表1: ウサギ肝臓ミトコンドリア画分からのDAEP精製のまとめ

	総活性 *units*	総蛋白量 *mg*	比活性 *units/mg*	精製度 *-fold*	収率 *%*
ミトコンドリア抽出画分	3290	17800	0.185	1	100
CHAPS抽出画分	423	1030	0.412	2.23	5.77
MACROSEP™ (100k)	441	482	0.915	4.95	2.32
RESOURCE™ Q	84.8	16.3	5.21	25.8	0.0916
RESOURCE™ S	55.3	11.0	5.04	27.3	0.0621
Bio-Scale CHT2-I	32.6	2.39	13.6	73.9	0.0134
Superose™ 6 HR 10/30	18.0	0.752	23.9	130	0.00422

表2:DAEPの基本的な酵素的性質

分子量	70万
至適pH	pH 7.5-8.5
至適温度	35-40 °C
金属イオンの影響	
非存在下	100 %
Mg^{2+}、Ca^{2+}、Sr^{2+}、Ba^{2+}、Mn^{2+}	~200 %
Zn^{2+}	< 0.01 %
界面活性剤の影響	
非存在下	100 %
SDS 0.01-0.05 %	< 0.01 %

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
分担研究報告書

D-アミノ酸含有蛋白質の精製とその性質に関する研究

分担研究者：浜本敏郎　自治医科大学生化学講座機能生化学研究室・助教授

研究要旨

従来、哺乳類の構成アミノ酸は、すべて L 型だけであると考えられていたが、加齢と共に遊離のD型アスパラギン酸（D-Asp）やD-Asp含有蛋白質が、体内で生じることが明らかになり、D-Asp含有蛋白質は、白内障や動脈硬化、プリオン病などの疾病との関連が指摘されている。特にアルツハイマー病では、D-Asp 残基を含むβアミロイド蛋白質が、実際の患者脳で発見され、その因果関係が注目されている。我々は、こうした有害な D-Asp 含有蛋白質に対する排除機構として、D-Asp 含有蛋白質に特異的な分解酵素があるのではないか、との仮説をたて、D-Asp 含有蛋白質に特異的な分解酵素の探索を行った。その結果、特異的なエンド型分解酵素の精製に成功した。従って、この酵素を D-aspartyl endopeptidase（DAEP）と名付け、今年度においては DAEP の性質についての研究を重点的に行った。その結果、DAEP はミトコンドリア内膜に局在し、至適温度 37℃、至適 pH8.5 であり、2 価のカチオンにより、比活性が 2 倍に上昇するが、Zn^{2+}によってその活性は阻害された。また、実際に 10 残基からなる D-Asp 含有ペプチドをエンド型の様式で限定分解するペプチダーゼ活性を持つことが確認された。

A. 研究目的

私たち哺乳動物において、その生体組織や体液を構成する蛋白質は、従来 L 型のアミノ酸からのみ構成されると考えられていた。ところが近年、加齢とともに、遊離の D 型アスパラギン酸 (D-Asp) や D-Asp 含有蛋白質が、体内で生じることが明らかになり、D-Asp 含有蛋白質は、白内障や動脈硬化、プリオン病などの疾病との関連が指摘されている。特に興味深いのは、アルツハイマー病 (AD) の原因蛋白質であるβアミロイド蛋白質 (Aβ) において D-Asp を含む Aβ (D-Aβ) が、AD 患者脳の老人斑の構成成分として何種類も発見されたことである。それらはいずれも自己凝集し、その結果、神経毒性を持つことが、*in vitro* で確認されており、発症や症状の進行に深く関係しているものと考えられている。しかし一方で、AD 患者の脳では、遊離の D-Asp は健常脳に比較し、減少していることも報告されている。これら一見、矛盾する結果に対し、我々は以下のような仮説を立てた。即ち、我々の体内には、防御システムとして、D-Asp 含有蛋白質に対する特異的な分解酵素が存在しており、AD では、その酵素活性が著しく減退した結果、遊離の D-Asp 量が減少し、D-Aβがいっそう蓄積して、AD の進行を促進しているのではないか、と言うものである。そこで、D-Asp 含有蛋白質分解酵素の探索方法を開発し、分離・同定を行った。その結果、ごく最近、哺乳動物で初めてその精製に成功した。従って、本酵素の性質や作用機序を解明し、その遺伝子をクローニングすることによって、AD を始め D-Asp 含有蛋白質に起因する白内障や動脈硬化などの疾病の治療法、予防法を開発し、また、血液検査などによって本酵素の活性を調べることによって、D-Asp 含有蛋白質に起因する疾病の発症前診断や、症状の経過を予測する方法を開発することが本研究の目的である。

B. 研究方法

DAEP 精製法

本研究で用いた DAEP は以下の手順で精製した。まず、ウサギ肝臓に 10 倍量以上の等張液 (0.25M ショ糖、0.2mM EDTA) を加え、ポッター型ホモジナイサーで破砕した。その後、遠心分離 (100×g、5 分、4℃) し、その上澄みに 1/2 倍量の高張液 (0.35M ショ糖、0.2mMEDTA) を加え、遠心分離 (800×g、15 分、4℃) し、その上澄みを更に遠心分離 (9000×g、10 分、4℃) し、その沈殿物に 10 倍量以上の等張液 (0.25M ショ糖、0.2mM EDTA) を加え、遠心分離 (9000×g、7 分、4℃) し、沈殿物を回収した。この沈殿物に等張液 (0.25M ショ糖、0.2mM EDTA) を加え、ホモジナイサーで軽く懸濁し、20mg/ml に調製し、Optiprep を用いた密度勾配遠心分離 (1.117-1.185g/ml) を行い、1.130-1.140g/ml を分画し、ミトコンドリア画分を得た。このミトコンドリア画分に超音波処理 (50% dutycycle、2 分) を行い、遠心分離 (100,000×g、60 分、4℃) し、その沈殿物 (=ミトコンドリア総膜画分) に抽出緩衝液 (1.0% CHAPS を含む $T^{10}E^{1}$) を加え、チューブローテーター (～1rpm、45 分、4℃) で処理し、超遠心分離 (100,000×g、60 分、4℃) し、その沈殿物を上記抽出緩衝液に懸濁し再抽出を繰り返

し、その上澄みに順次 100K 限外ろ過(MACROSEP)、強陰イオン交換(RESOURCE Q)、強陽イオン交換(RESOURCE S)を行い、ヒドロキシアパタイト(Bio-Scale CHT2-1)カラムにかけて、最終的にゲルろ過し(Superose 6HR10/30)、DAEP 精製品を得た。

DAEP 活性測定法

測定用基質として合成した Suc-D-Asp-MCA を用い、以下の手順で活性測定を行った。反応液として 1.0M Tris/HCl(pH8.5)、1μl、5M NaCl、4μl 及び 0.1M $MnCl_2$、3μl、蛍光基質(1mM)10μl、並びに蒸留水 72μl からなる計 90μl の反応液を用い、これに酵素液 10μl を加え、総量 100μl として、30℃で DAEP の場合 15 分間インキュベートした。蛍光強度は、10%SDS、100μl、さらに 0.1M 酢酸緩衝液(pH5.0)を加えて総量 1.5ml として、蛍光光度計で測定した(測定条件:励起波長 380 nm、蛍光波長 460 nm)。

なお、本研究における実験動物の使用について、動物愛護に関する配慮は、全て女子栄養大学及び自治医科大学倫理委員会規程、及び自治医科大学実験医学センターの動物実験規程に従って実施された。

C. 研究結果

今年度(平成 12 年度)は、研究計画に従い、まず DAEP の酵素としての性質決定を行うことを目的として、以下の順に研究を実施した。即ち、(1) DAEP 精製法の改良、(2) 至適温度等の酵素的性質の検討、である。

(1) DAEP 精製法の改良

これまで、DAEP のミトコンドリア膜における局在が判明していなかったため、その精製の際には、ミトコンドリアの総膜画分を精製材料として用いていた。そのため、精製初期における夾雑蛋白質の多さにより比活性が上昇せず、このことが DAEP の最終的な精製収率を低下させる原因の一つであると考えられた。そこで、ミトコンドリア外膜のマーカー酵素であるモノアミンオキシダーゼの分布をもとに、内・外膜をスクロース密度勾配遠心法により分画し、DAEP の局在を検討した(図 1)。その結果、DAEP はミトコンドリア内膜に存在していることが判明し、ミトコンドリア内膜を精製の初期材料とすることで、その収率の向上が見込まれた(表 1)。現在、この結果を元に、さらなる精製法の改良に取り組んでいる。

(2) 至適温度等の酵素的性質の検討

上記(1)により、DAEP 精製標品が得られるようになったので、DAEP の生理機能を知るため、基本的な酵素的性質の検討を行った(表 2)。至適温度 37℃、至適 pH8.5 であり、2 価のカチオンにより、比活性が 2 倍に上昇するが、Zn^{2+}によってその活性は阻害された。また、界面活性剤(SDS)に対する感受性を検討した結果、非常に低濃度な SDS にさらされた状態でもその活性は著しく低下することが明らかになった。

また、DAEP は、肝臓の核とミトコンドリアにおいて、その総活性比がほぼ 1:1 で存在していることが明らかになっていたが、今回、他の臓器においてその存在比を検討したところ、脳や精巣/卵巣では、ミトコンドリアに全