

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)。

さらに、その基質特異性について検討した (表 3)。Suc-D-Asp-MCA を分解するときの活性を 100% ととして他の基質に対する分解活性を評価した。その結果、DAEP が非常に高い特異性を持っていることが判明した。そこで次に、実際の D-Asp 含有ペプチドに対する作用を評価するため、L-Asp もしくは D-Asp を 1 残基目と 7 残基目に含む 10 残基からなる合成ペプチドに対する分解活性を観察した (図 4)。この合成ペプチドは、アルツハイマー病の原因蛋白質であるアミロイド蛋白質 ($A\beta$) の 1~10 残基までの配列を表しており、それぞれ、D- $A\beta$ 1-10 : (D-Asp)-AEFRH-(D-Asp)-SGY と L- $A\beta$ 1-10 : (L-Asp)-AEFRH-(L-Asp)-SGY のように図中で表現してある (図中、D-Asp は小文字の d で、L-Asp は大文字の D で示した)。実際の反応は、酵素溶液と上記 D/L- $A\beta$ 1-10 を混合し、37°C、21 時間反応した。その後、100°C で 1 分間加熱することにより反応を止め、この溶液を逆相カラムにアプライし、分解された D/L- $A\beta$ 1-10 の断片を分画した。クロマトグラムから、変化の見られたピークについてペプチドシーケンサーで分析したところ、D- $A\beta$ 1-10 では、21 時間後に 0 時間で分解の観られなかった D- $A\beta$ 1-10 のピークが 2 つに分かれており、それぞれ SGY と dAEFRH であることが判明した。また、D- $A\beta$ 1-10 の N 末端側にある D-Asp には作用していないことが明らかになった。一方、L- $A\beta$ 1-10 は 21 時間後もク

ロマトグラムは変わらず、ペプチドシーケンサーによる解析の結果も 0 時間と同様、分解されていないことが判明した。

ここにおいて、DAEP はエンド型のペプチダーゼ活性を持つことが確認された。

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 との関係进行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。今回、DAEP の酵素的な性質について、非常に多くの知見を得ることができた。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。

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°C、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。その基質特異性は、非常に高いことも判明し、従って、生体内で不要な D-アミノ酸含有蛋白質の分解や、最近の毒素に由来するような外来の D-アミノ酸含有蛋白質に対して、防御的

に機能していることが考えられる。

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 F₁: 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)

Kono, M., Tsuda, T., Ogata, S., Takashima, S., Liu, H., Hamamoto, T., Itzkowitz, S.H., Nishimura, S. and Tsuji, S.: Redefined substrate specificity of ST6GalNAc II: a second candidate sialyl-Tn synthase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 272, 94-97 (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)

2. 学会発表

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 関連蛋白質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)

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

特になし

図1 : DAEPの局在

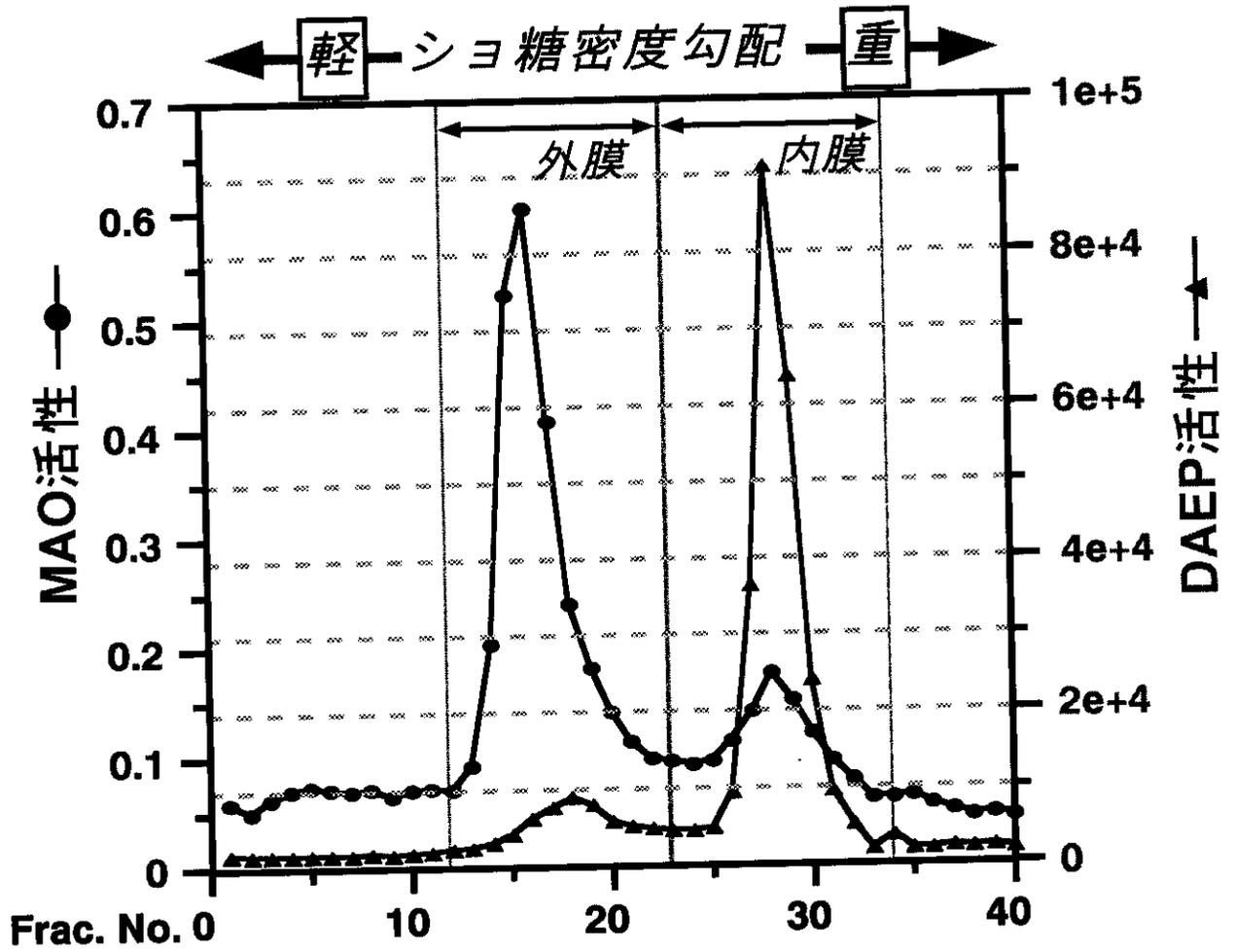
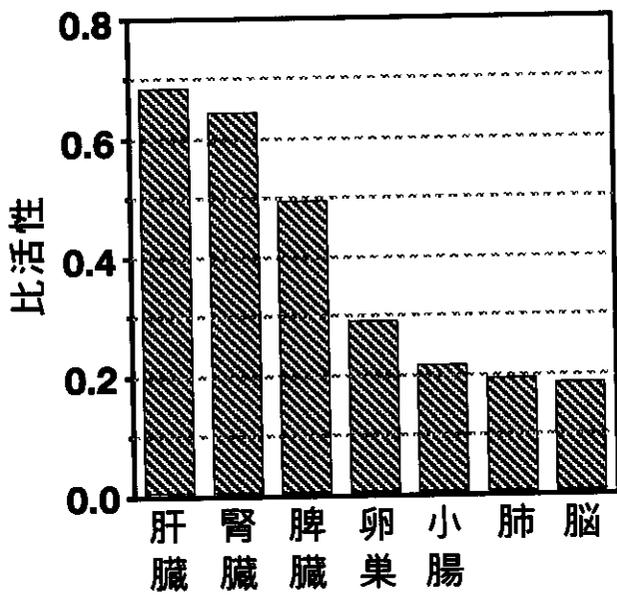


図2：各臓器および細胞内におけるDAEPの分布

A. 各臓器における分布



B. 細胞内小器官における分布

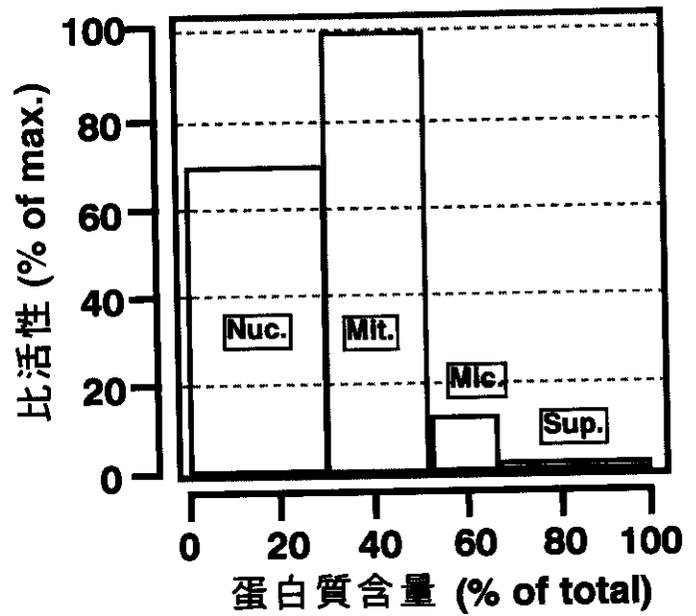


図3: 各臓器における核と
ミトコンドリアのDAEP活性比

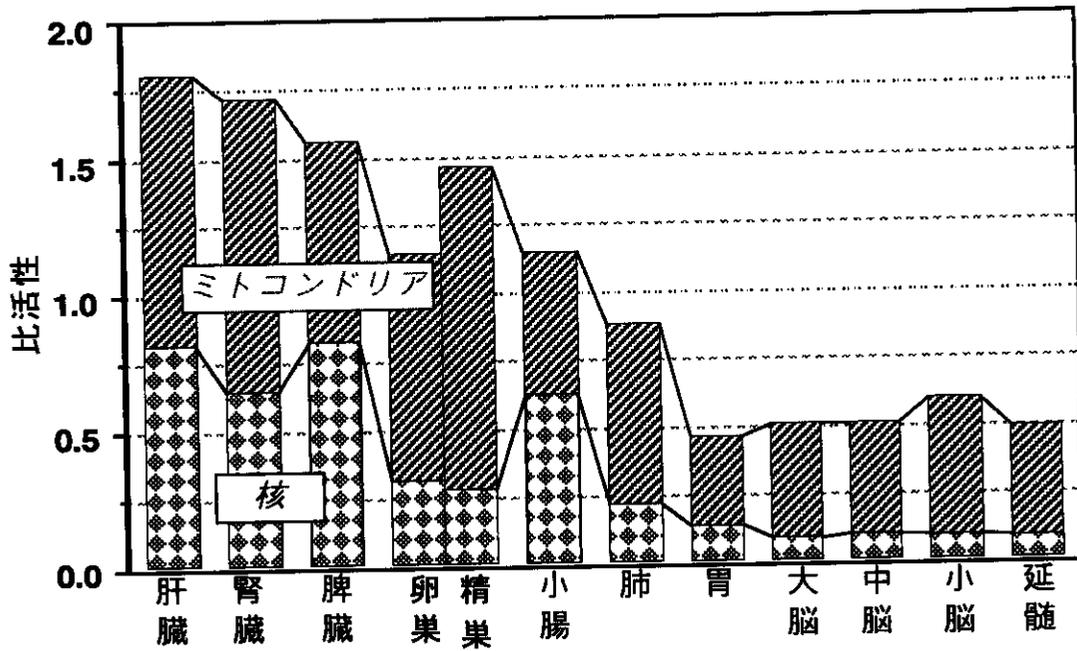
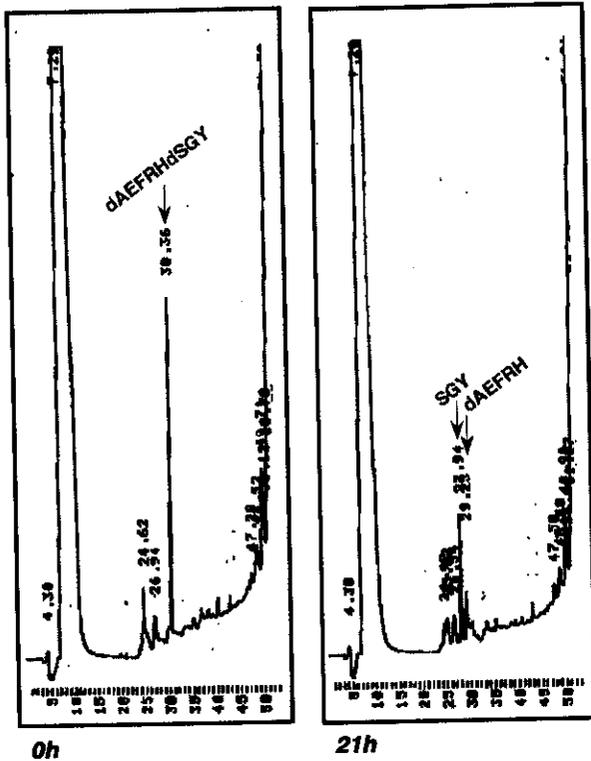
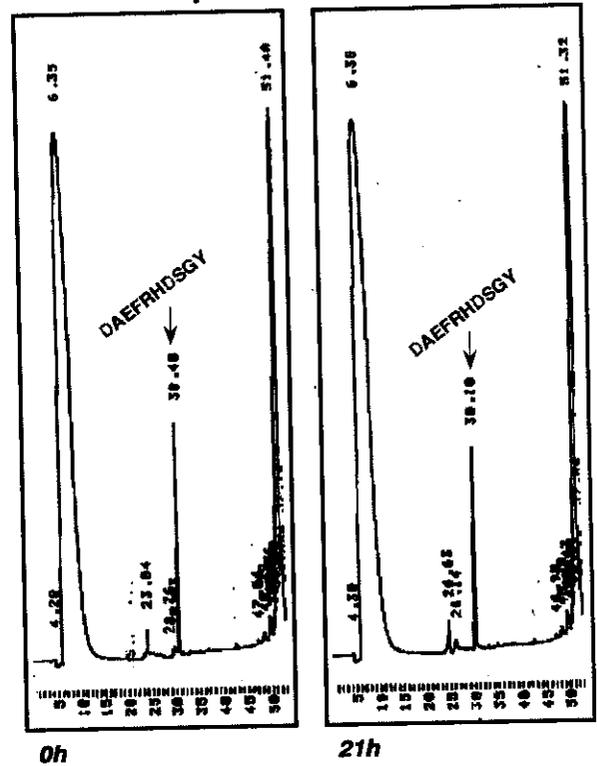


図4 : DAEPによるD-Asp含有アミロイドβ蛋白質の分解

D-AB1-10: 1残基目と7残基目に
D-Aspを含むペプチド



L-AB1-10: 1残基目と7残基目に
L-Aspを含むペプチド



D-AspもしくはL-Aspを含むAβペプチドにDAEPを作用させ、37°Cで21時間保温した。0時間と21時間後の反応液を逆相HPLCによって分離し、分解産物のアミノ酸配列をペプチドシーケンサーによって解析した。

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 <i>units</i>	総蛋白量 <i>mg</i>	比活性 <i>units/mg</i>	精製度 <i>-fold</i>	収率 <i>%</i>
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
MACROSEPT™ (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 %

表3 : DAEPの基質特異性

合成基質	DAEP活性 (%)
Suc-D-Asp-MCA	100
Suc-L-Ala-D-Ser-MCA	< 0.01
Suc-L-Asp-MCA	0.45
Ac-L-Asp-L-Glu-L-Val-L-Asp-MCA	0.11
Ac-L-Tyr-L-Val-L-Ala-L-Asp-MCA	1.42
Suc-Gly-L-Pro-L-Leu-Gly-L-Pro-MCA	0.03
Z-L-Arg-L-Arg-MCA	0.01
L-Leu-MCA	0.52
Suc-L-Leu-L-Leu-L-Val-L-Tyr-MCA	0.02

Ac-: アセチル基
 Suc-: サクシニル基
 Z-: ベンジルオキシカルボニル基

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

分担研究者：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

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、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い、特にその性質の決定に重要な役割を果たす阻害効果を示す阻害剤の探索を行った。その結果、プロテアソーム阻害剤のラクタシスチンと Zn^{2+} が比較的 DAEP の活性を阻害した。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、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。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。i-DAEP は、不可逆的に DAEP に結合し、その IC_{50} は、 $3\mu M$ 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。

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 ($A\beta$) において D-Asp を含む $A\beta$ (D- $A\beta$) が、AD 患者脳の高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- $A\beta$ 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ザーで破碎した。その後、遠心分離 (100×g、5 分、4°C) 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°C) し、その上澄みを更に遠心分離 (9000×g、10 分、4°C) 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°C) 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、ホモジナイザーで軽く懸濁し、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% dutycycIe、2 分) を行い、遠心分離 (100,000×g、60 分、4°C) 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 T¹⁰E¹) を加え、チューブローター (~1rpm、45 分、4°C) で処理し、超遠心分離 (100,000×g、60 分、4°C) 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 (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-Dinitrophenyl-Arg-NH₂ 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)、1 μ l、5M NaCl、4 μ l 及び 0.1M MnCl₂、3 μ l、蛍光基質 (1mM) 10 μ l、並びに蒸留水 72 μ l からなる計 90 μ l の反応液を用い、これに酵素液 10 μ l を加え、総量 100 μ l として、30°C で DAEP の場合 15 分間インキュベートした。蛍光強度は、10%SDS、100 μ l、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

(1) DAEP に対する阻害剤の探索と特異的阻害剤の合成

まず、精製 DAEP を用いてその活性を阻害する物質の探索をはじめた。その結果、既知の阻害剤のほとんどが、DAEP に対して効果

を示さなかった (表 1)。今回探索した中で唯一 DAEP に対して効果を示したのが、プロテアソーム阻害剤のラクタシスチンである (図 1) テアソーム阻害剤としても知られる ALLN (N-acetyl-L-leucinyl-L-leucinyl-L-norleucinal) についても同様に試してみたが、DAEP に対して阻害効果は見られなかった。

今回さらに Zn²⁺ が、DAEP 活性を阻害し得ることが明らかになったが、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 1)。

(2) 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 2)。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

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 3)。

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である DAEP との関係性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。今回、DAEP の酵素的な性質について、多くの知見を得ることができ、特にラクタシスチンによって阻害されることは、20S プロテアソーム同様に 70 万の分子量を持つ DAEP が、その活性中心の構造が類似していることを示唆した。また、新たに開発した DAEP 阻害剤である 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。

現在、本研究を行う上で解決すべき最重要課題は、DAEP の一次構造の解読である。一次

構造の解析が難航する理由として、精製収率の悪さが挙げられ、解析に用いる絶対量が不足している。そこで今回、i-DAEP が DAEP に特異的な阻害剤として利用できることが明らかになったので、DAEP の活性中心サブユニットを同定するために、ビオチン標識した i-DAEP 誘導体を合成した。これをあらかじめ DAEP に作用させることによって、活性中心サブユニットを標識することができ、その後、電気泳動で分離し、ブロッティング後、アビジン化ペルオキシダーゼで検出することによって同定が可能であろう。また、他にもアフィニティーカラムとして精製にも利用できるものと考えている。現在、このビオチン化 i-DAEP 誘導体を用いて DAEP 活性中心の同定とその一次構造の解析を急いでいる。

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明らかになり、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、 $3\mu\text{M}$ 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

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)

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)

Koike, H., Kouchi, Z., Kinouchi, T., Maeda, T., Sorimachi, H., Saido, C.T., Maruyama, K., Okuyama, A., Suzuki, K. and Ishiura, S.: Metabolism of amyloid precursor protein in COS cells transfected with a beta-secretase candidate. *Cytotechnology*, 33, 213-219 (2000)

Kobayashi, M., Kinouchi, T., Hakamata, Y., Kamiakito, T., Kuriki, K., Suzuki, K., Tokue, A., Fukayama, M. and Tanaka, A.: Isolation of an androgen-inducible novel lipocalin gene, Arg1, from androgen-dependent mouse mammary

Shionogi carcinoma cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, (2000), *in press*.

2. 学会発表

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

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)、696 (2000)

木野内忠稔、香川靖雄、浜本敏郎：D-アスパラギン酸含有蛋白質に特異的な分解酵素の探索とその性質について。第 23 回日本分子生物学会年会プログラム・講演要旨集、pp664 (2000)

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

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活性に対する阻害剤の効果

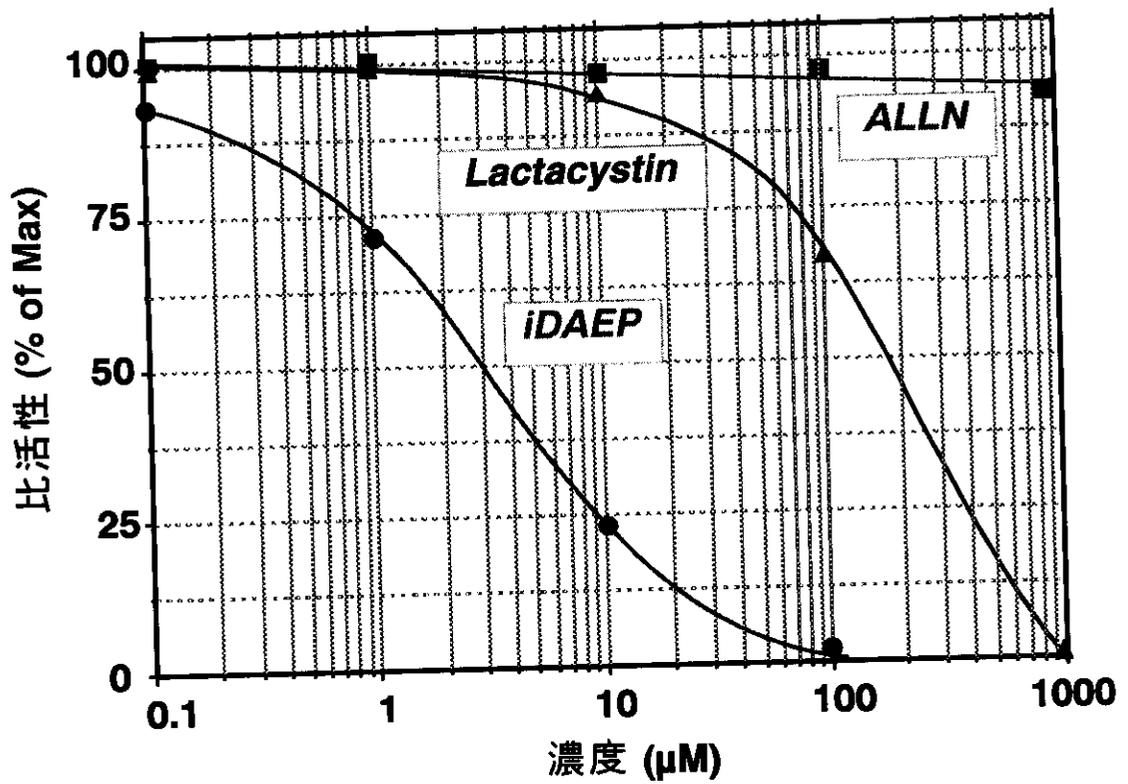
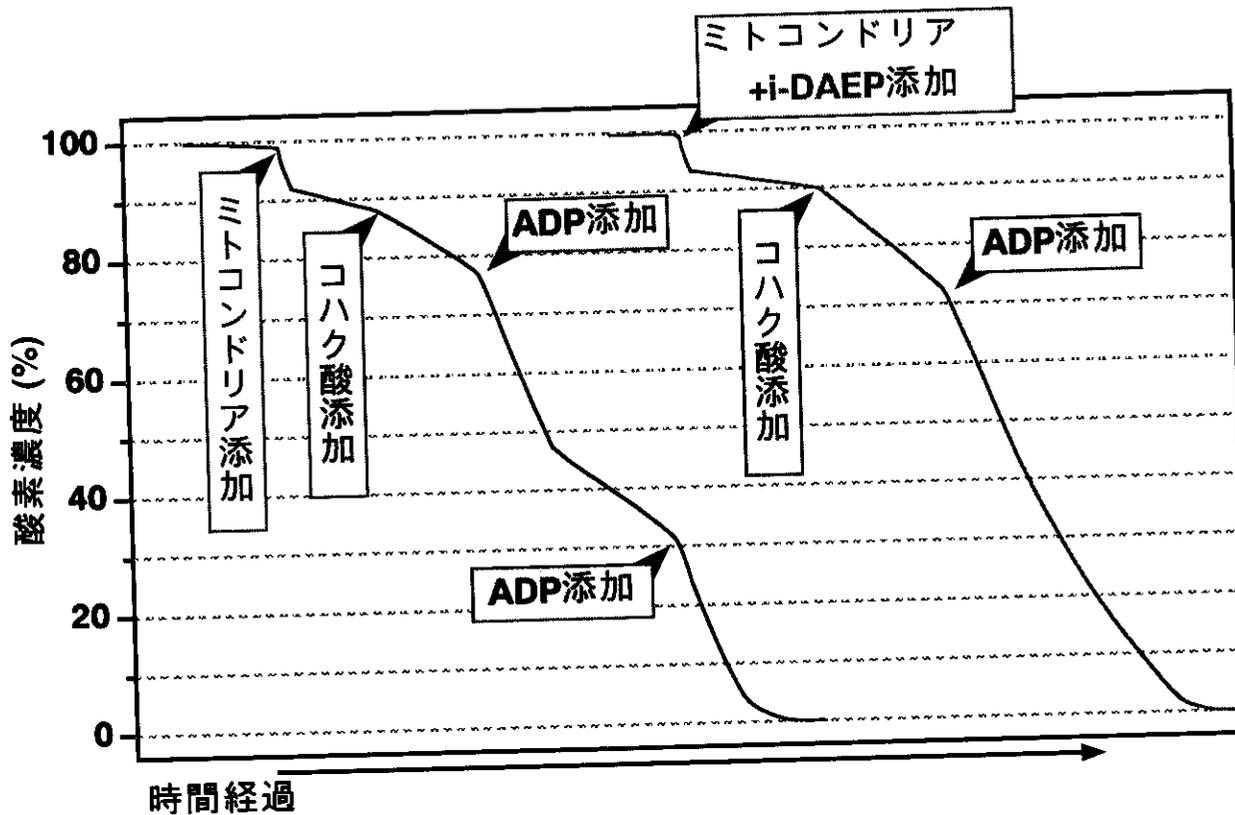
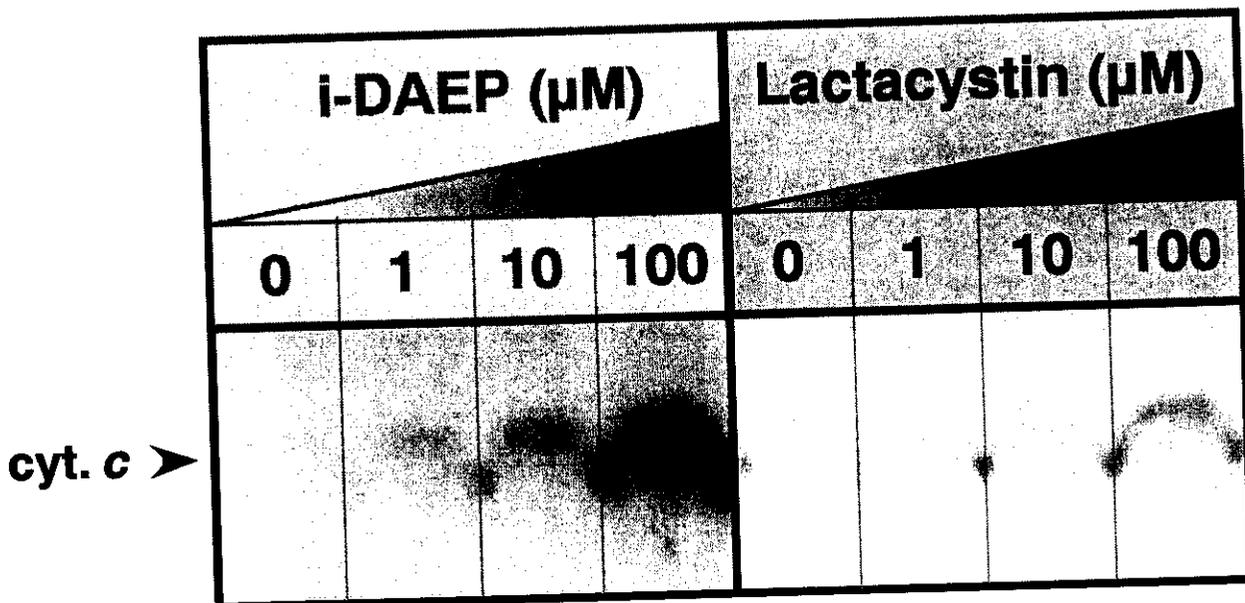


図2 : DAEP阻害剤によるミトコンドリアの呼吸の変化



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 MgCl₂、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3 : 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 MgCl₂、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°C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 : DAEPに対する阻害剤の効果

阻害剤	阻害効果 (%)
セリンプロテアーゼ系	
TPCK (10 μ M)	< 0.1
TLCK (0.1 mM)	< 0.1
PMSF (1 mM)	0.5
DFP (0.5 mM)	15.6
Aprotinin (0.1 mM)	13.8
システインプロテアーゼ系	
E-64 (0.1 mM)	< 0.1
アスパラギン酸プロテアーゼ系	
Pepstatin (10 μ M)	5.3
メタロプロテアーゼ系	
Phosphoramidon (10 μ M)	9.9
o-Phenanthroline (0.1 mM)	8.3
その他	
Leupeptin (30 μ M)	8.5
Chymostatin (5 μ M)	< 0.1
EDTA (1 mM)	< 0.1

III. 研究成果の刊行に関する一覧表～雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kagawa, Y.	The α/β interfaces of α_1/β_1 , α_3/β_3 and F_1 : domain motions and elastic energy stored during rotation.	<i>J. Bioenerg. Biomembr.</i>	32 (5)	471- 484	2000
Ichida, M.	Differential regulation of exonic regulatory elements for muscle-specific alternative splicing during myogenesis and cardiogenesis	<i>J. Biol. Chem.</i>	275 (21)	15992- 16001	2000
Inoki, Y.	Proteoliposomes colocalized with endogenous mitochondria in mouse fertilized egg.	<i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i>	278	183- 191	2000
Inoki, Y.	Ganglioside GD3 and its mimetics induce cytochrome <i>c</i> release from mitochondria.	<i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i>	276	1210- 1216	2000
Kinouchi, T.	Analysis of metabolic pathways of Alzheimer's disease amyloid precursor protein.	Jichi Medical School Journal	23	47-53	2000
Kono, M.	Redefined substrate specificity of ST6GalNAc II: a second candidate sialyl-Tn synthase.	<i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i>	272	94-97	2000
Koike, H.	Metabolism of amyloid precursor protein in COS cells transfected with a beta-secretase candidate.	<i>Cyto-technology</i>	33	213- 219	2000
Kobayashi, M.	Isolation of an androgen-inducible novel lipocalin gene, Arg1, from androgen-dependent mouse mammary Shionogi carcinoma cells.	<i>J. Steroid Biochem. Mol. Biol</i>		<i>in press</i>	2000