

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-アスパラギン酸含有蛋白質分解酵素の活性中心サブユニットの同定に関する研究

分担研究者：浜本敏郎 自治医科大学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仮説を立て、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、平成 12 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、各臓器において DAEP は、肝臓、腎臓、脾臓、卵巣/精巣、脳の順に比活性が高く、細胞内においては、ミトコンドリア膜面に局在する分子量 70 万の高分子複合体であることが明らかになった。さらに、DAEP 活性を抑制する特異的な阻害剤の開発に成功した。

従って今年度は、新規の蛋白質分解酵素である DAEP の活性中心サブユニットの構造解析を行うために、ビオチン化した DAEP 阻害剤を開発し、DAEP 活性中心サブユニットを直接標識し、同定することを試みた。新たに合成したビオチン化 DAEP 阻害剤は、従来の DAEP 阻害剤と同様に DAEP に対し、非常に高い阻害活性を示すことが明らかになった。その結果、等電点 pI10、分子量 50k と 90kDa の二種類の蛋白質が、ビオチン化 DAEP 阻害剤で標識され、現在、これらの蛋白質についてその一次構造を MALDI-TOF-MS を用いて解析している。今後は、DAEP の構造を明らかにし、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ものと考えている。

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、平成 12 年度においては、D-Asp 含有蛋白質分解酵素の存在を確かめるために、その分離・同定を行った結果、実際に D-Asp 含有蛋白質を分解する新規の酵素を発見し、これを D-Aspartyl Endopeptidase (DAEP) と名付けた。従って、DAEP 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は、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や予防法の開発にきわめて重要であると考えられた。そこで、今年度は DAEP の一次構造の解析を重点的に行った。

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°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、チューブローテーター (~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)、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、37°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)。

DAEP 阻害剤: *i*-DAEP (Bz-Arg-His-D-Asp-CH₂Cl) の合成法

①HCl · H-D-Asp(OcHex)-CH₂Cl

Boc-D-Asp(OcHex)-OH 6.31 g (20.0 mmol) をテトラヒドロフラン (100 ml) に溶かし、氷冷撹拌下にクロロギ酸イソブチル 2.71 ml (21.0 mmol) および *N*-メチルモルフォリン 2.31 ml (21.0 mmol) を加えた。10 分間撹拌した後析出した塩を濾去し、濾液にジアゾメタン/エーテル溶液 (200 ml) を加え、冷却下に 1 時間撹拌した。この反応液に 4.5 N 塩酸/ジオキサン 17.8 ml (80.0 mmol) を加え 20 分間撹拌した後、水を加え洗浄した。有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水・飽和食塩水・10%クエン酸水・飽和食塩水で順次洗浄し、無水硫酸マグネシウ

ム上乾燥した。有機層を減圧濃縮して油状物を得た。油状物に、4.5 N 塩酸/ジオキサン 44 ml (0.20 mol) 加え室温で 30 分間撹拌した後、減圧濃縮した。残渣にイソプロピルエーテルを加え固化、5.40 g (95%) 得た。

②Boc-His(Bom)-OPac

Boc-His(Bom)-OH 40 g (0.107 mol) の *N,N*-ジメチルホルムアミド (DMF) 溶液 (50 ml) に、炭酸セシウム 20.8 g (0.064 mol) 水溶液を加え撹拌した。反応液を減圧濃縮し、再び DMF に溶かし、氷冷撹拌下に臭化フェナシル (Pac-Br) 19.1 g を加えた。室温で 4 時間撹拌した後、反応液に酢酸エチル (500 ml) と水 (500 ml) を加え抽出した。酢酸エチルを留去し、残渣にヘキサンを加え固化した。47.3 g (74%)

③Boc-Arg(Tos)-His(Bom)-OPac

Boc-His(Bom)-OPac 10g (20.2 mmol) にトリフルオロ酢酸 (TFA, 70 ml) を加え、-5°C 冷却化に 10 分間、室温で 50 分間撹拌した。TFA を留去し、残渣に 4.5 N 塩酸/ジオキサン (9 ml, 40.5 mmol) を加え混ぜ合わせた後に、エーテルより固化した。得られた塩酸塩および Boc-Arg(Tos)-OH 12.1 g (24.3 mmol)、HOBt 2.87 g (21.2 mmol) を DMF (100 ml) に溶かし、-10°C 冷却撹拌下に EDC 3.89 ml (21.2 mmol) を加えた。室温で 2 時間撹拌した後、反応液に酢酸エチル (500 ml) と水 (500 ml) を加え抽出した。酢酸エチルを留去し、残渣にイソプロピルエーテルを加え固化した。8.0 g (49%)

④Bz-Arg(Tos)-His(Bom)-OPac

Boc-Arg(Tos)-His(Bom)-OPac 8.0 g (10.0

mmol)に TFA(60 ml)を加え、-5°C冷却化に 10 分間、室温で 50 分間攪拌した。TFA を留去し、残査に 4.5 N-HCl/ジオキサン(4.4 ml, 20.0 mmol)を加え混ぜ合わせた後に、エーテルより固化した。得られた塩酸塩および安息香酸 1.46 g (12.0 mmol)、HOBt 1.61 g(12.0 mmol)を DMF(80 ml)に溶かし、-10°C冷却攪拌下に EDC 2.19 ml(12.0 mmol)を加えた。室温で 4 時間攪拌した後、反応液に酢酸エチル(500 ml)と水(500 ml)を加え抽出した。酢酸エチルを留去し、残査にジエチルエーテルを加え固化した。固体を濾取した。6.8 g(84.6%)

⑤Bz-Arg(Tos)-His(Bom)-OH

Bz-Arg(Tos)-His(Bom)-OPac 6.8 g(8.4 mmol)を酢酸(100 ml)に溶かし、45°Cで加温しながら亜鉛末(15 g)を加え 1 時間攪拌した。亜鉛末を除き、酢酸を留去した。残査を、クロロホルム・メタノール混合溶媒(v/v=4/1, 60 ml)に溶かし、1 N 塩酸(17 ml)を加えた後減圧濃縮した。残査にジエチルエーテルを加え結晶化した。5.7 g (98.3%)

⑥Bz-Arg(Tos)-His(Bom)-D-Asp(OcHex)-CH₂Cl

Bz-Arg(Tos)-His(Bom)-OH 576 mg(0.835 mmol)、HCl · H-D-Asp(OcHex)-CH₂Cl 237 mg(0.835 mmol)およびHOBt 125 mg(0.918 mmol)の DMF(5 ml)溶液を攪拌しながら、EDC 0.168 ml(0.918 mmol)を加えた。2 時間後、反応液に水を加え析出した個体を濾取した。水洗した後、減圧乾燥し、811 mg(106%)得た。

⑦Bz-Arg-His-D-Asp-CH₂Cl

Bz-Arg(Tos)-His(Bom)-D-Asp(OcHex)-CH₂Cl

1.70 g(1.85 mmol)およびパラクレゾール 2.86 ml(27.7 mmol)をフッ化水素(HF)反応管に入れ、無水 HF(約 26 ml)を導入した。反応管を氷冷し、1 時間攪拌した。過剰の HF を留去し、残査にジエチルエーテルを加え固化した。0.91 g 得た。この固体を水(30 ml)に溶かし、YMC Pack ODS (SH-363-5, 30 x 250 mm)カラムに適用した。5%アセトニトリル/0.1% TFA から 30%アセトニトリル/0.1% TFA への直線勾配による溶出(60 分、流速:20 ml/分)で精製した。当該ペプチドを含む画分を集め、1 N 塩酸(3 ml)を加え凍結乾燥した。褐色粉末 235 mg 得た。

略号

Arg, アルギニン; Asp, アスパラギン酸; Gly, グリシン; Ser, セリン; His, ヒスチジン; Phe, フェニルアラニン; Tyr, チロシン; Lys, リジン; Nma, N-メチルアントラニル酸; DNP, 2,4-ジニトロフェニル; cHex, シクロヘキシル; Bzl, ベンジル; BrZ, 2-ブロモベンジルオキシカルボニル; Bom, ベンジルオキシメチル; Tos, トシル; Pac, フェナシル; DMF, N,N-ジメチルホルムアミド; MBHA resin, パラメチルベンズヒドリルアミン樹脂; HOBt, 1-ヒドロキシベンゾトリアゾール; EDC, 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド

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

平成12年度において開発したDAEP阻害剤：*i*-DAEPが非常に特異性が高く、その性質として活性中心と共有結合することを利用して、今年度は、DAEPの活性中心サブユニットの構造解析を行うために、ビオチン化した*i*-DAEP (Biotinyl-Arg-His-D-Asp-CH₂Cl)を合成し、これによってDAEP活性中心サブユニットを直接標識し、同定することを試みた。原理としては、ビオチン化*i*-DAEPと精製DAEPを反応させ、その後、アビジン化ペルオキシダーゼをプローブとして用いたウエスタンブロッティングによって、ビオチン化*i*-DAEPと結合したDAEP活性中心サブユニットの検出を行うというものである(図1)。これに先立ち、まずは、ビオチン化*i*-DAEPが、実際にDAEPに対する阻害活性を持つのかどうかについて検討を行った。

(1) *i*-DAEPとビオチン化*i*-DAEPによるDAEPの活性阻害

精製DAEPに対し、ビオチン化*i*-DAEP、もしくは*i*-DAEPを濃度を変えて20°Cで5分反応させ、その後、DAEP活性を測定し、残存活性を図に示した。その結果、ビオチン化*i*-DAEPは、従来の*i*-DAEPよりもさらに5%ほど阻害活性が強いことが明らかになった(図2)。これは、*i*-DAEPがビオチン化されたことによって、空間的にDAEPの活性中心をより広く占有したことが原因であると考えられた。

(2) ビオチン化DAEP阻害剤を用いたDAEP活性中心サブユニットの同定

(1)の結果により、ビオチン化*i*-DAEPが*i*-DAEPと同様の効果を持つことが明らかになったので、これを利用してDAEP活性中心サブユニットを同定することを試みた。ビオチン化*i*-DAEPが他の分子に非特異的に結合する可能性についても考慮すべきであると考え、①*i*-DAEPと、②*i*-DAEPと同様にDAEPの活性中心に結合することが分かっているプロテアソーム阻害剤のラクタシスチン、そして③プロテアソーム阻害剤でありながら、DAEPの活性を阻害しないエポキシソミシン、④①～③の各阻害剤の溶媒であるDMSO(ポジティブコントロール)の以上4種類の薬剤をあらかじめDAEP標品に添加しておくことによって、ビオチン化*i*-DAEPとの競合的なDAEP活性中心への作用を検討した。すなわち、ビオチン化*i*-DAEPの添加以前にこれらの物質がDAEPの活性中心を占有していれば、後から加えたビオチン化*i*-DAEPは、DAEP活性中心に結合することが出来ず、ポジティブコントロールや、DAEPと結合しないエポキシソミシンと比べると、そのバンドが消失しているはずである。その結果、50k、65k、90kDaの分子量を持つ蛋白質において、*i*-DAEPとラクタシスチンを前処理した試料では、ビオチン化*i*-DAEPの選択的な結合が阻害されていることが分かった(図3)。従って、これらの分子がDAEP活性中心サブユニットであることが考えられた。さらに、二次元電気泳動によって、等電点と分子量の差でDAEPの各サブユニットを分離し、ビオチン化*i*-DAEPで標識されたサブユニットを確認したところ、等電点pI10、分子量50kと90kDaにバンドが確認された(図4)。これらの分子のなかにDAEPの活性中心を構成するサブユニットがあると

考えられ、現在、その一次構造を MALDI-TOF-MS を用いて解析している。

D. 考察

平成 12 年度では、DAEP の酵素的な性質について詳細に検討し、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。そこで、今年度は、DAEP の一次構造の解析を重点的に行った。なぜなら、DAEP のアミノ酸配列が解読されることによって、DAEP 遺伝子のクローニングが容易に可能になり、①SNPs 解析による家系調査を行い、DAEP 遺伝子に起因した疾病の調査が出来る、②大量発現系を構築し、その三次元構造を結晶解析することによって、その作用機序や、新たな阻害剤の開発が出来る、また、③他の L-アミノ酸に特異的なプロテアーゼ、ペプチダーゼとの進化論的な比較が出来ることによって、DAEP の独特な基質特異性がどのように獲得されたものであるかが明らかになるから、等々である。

今回、ビオチン化した *i*-DAEP と未修飾の *i*-DAEP では、ビオチン化 *i*-DAEP の方が、DAEP 活性をさらに 5%程度抑制することが明らかになった。これは、ビオチン化 *i*-DAEP が、従来の *i*-DAEP と比べ、空間的により大きく広がる立体構造をしているため、DAEP 活性中心サブユニット周辺を空間的に大きく阻害した結果であると推測している。今後は、DAEP の構造を明らかにし、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、哺乳類にも存在し、その分解酵素である DAEP の活性中心サブユニットを同定するため、DAEP 阻害剤として新たに開発した *i*-DAEP をビオチン修飾したものを合成し、これによって DAEP 活性中心サブユニットの標識を試みた。二次元電気泳動によって、等電点と分子量の差で DAEP の各サブユニットを分離し、ビオチン化 *i*-DAEP で標識されたサブユニットを確認したところ、等電点 pI10、分子量 50k と 90kDa にバンドが確認された。これらの分子のなかに DAEP の活性中心を構成するサブユニットがあると考えられ、現在、その一次構造を MALDI-TOF-MS を用いて解析している。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Hayakawa, M., Sakashita, E., Ueno, E., Tominaga, Si. S., Hamamoto, T., Kagawa, Y. and Endo, H.: Muscle-specific exonic splicing silencer for exon exclusion in human ATP synthase gamma subunit pre-mRNA. *J. Biol. Chem.*, 277, 6974-6984, 2002

Sakai, R., Kinouchi, T., Kawamoto, S., Dana, M., Hamamoto, T., Tsuru, T., Okubo, K. and Yamagami, S.: Construction of human corneal endothelial cDNA library and identification of novel active genes. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2002, In press

Hamamoto, T., and Tsuji, S.: Sialyltrans-ferases: ST3Gal-II in *Handbook of Glycosyltransferases and Related Genes*. eds. Taniguchi, N. et al. Springer-Verlag Tokyo 2002 p.274-278

Hamamoto, T., and Tsuji, S.: Sialyltrans-ferases: ST6Gal-I in *Handbook of Glycosyltransferases and Related Genes*. eds. Taniguchi, N. et al. Springer-Verlag Tokyo 2002 p.295-300

2. 学会発表

Sakai, R., Yamagami, S., Tsuru, T., Kinouchi, T., Hamamoto, T., Dana, M.R., Kawamoto, S., Okubo, K.: Construction of human corneal endothelial cDNA library and identification of novel and active genes. in *The Association for Research in Vision and Ophthalmology*, Fort Lauderdale, Florida, USA (2001年4月30日)

木野内忠稔、香川靖雄、浜本敏郎「哺乳類のD-アスパラギン酸含有蛋白質分解酵素とその阻害剤について」第74回日本生化学大会、京都 (2001年10月25日)

平岡真実、鬼山奈穂子、中田和人、浜本敏郎、林純一、香川靖雄、遠藤仁司「ヒト Fzo 関連蛋白質群はミトコンドリア膜上で複合体を形成する」第24回日本分子生物学会年会、横浜 (2001年12月10日)

酒井理恵子、山上聡、水流忠彦、川本祥子、大久保公策、木野内忠稔、浜本敏郎、M Reza Dana「ヒト角膜内皮細胞のcDNAライブラリー作成と未知遺伝子同定の試み」第25回角膜カンファレンス、大阪 (2001年2月8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

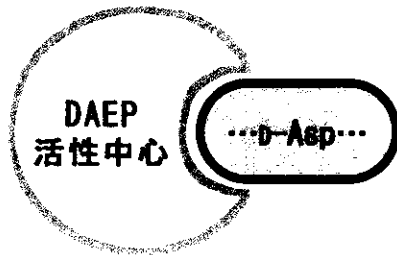
特になし

3. その他

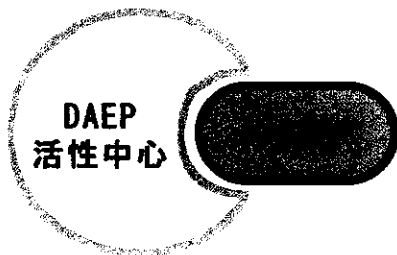
特になし

図1：ビオチン化 *i*-DAEPの作用機序

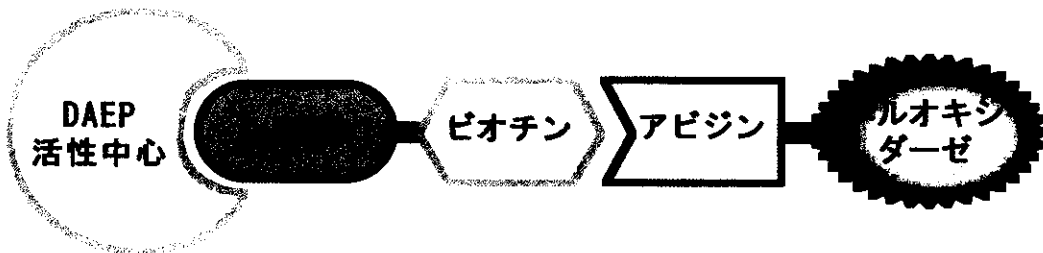
①：DAEP活性中心と基質の複合体



②：DAEP活性中心と *i*-DAEPの複合体

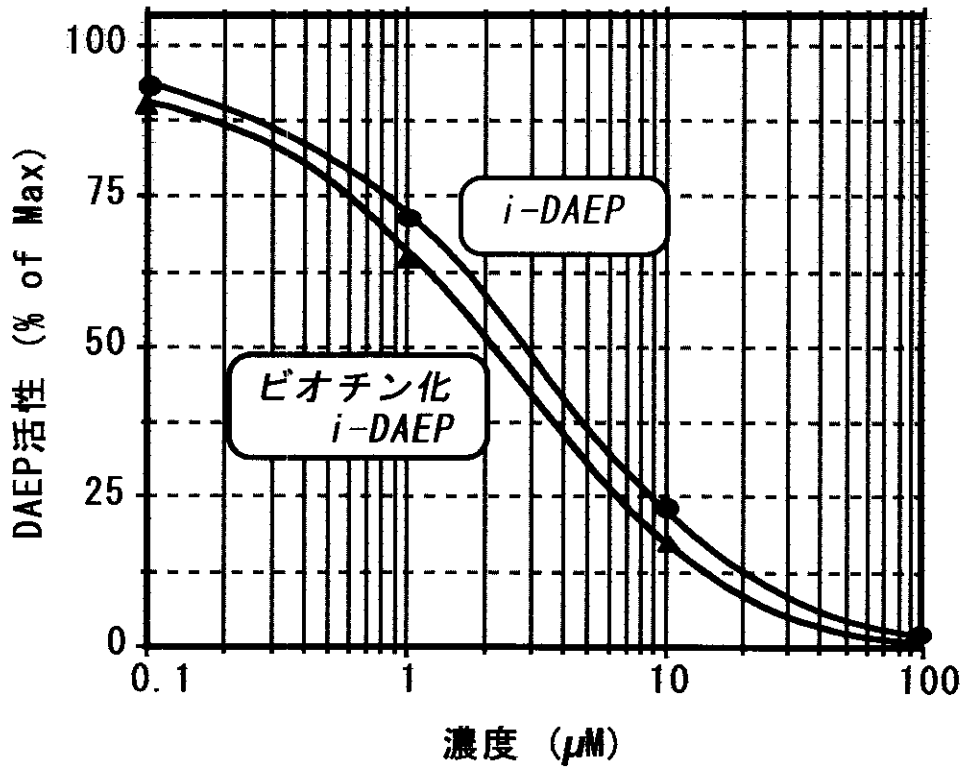


③：DAEP活性中心とビオチン化 *i*-DAEPの複合体



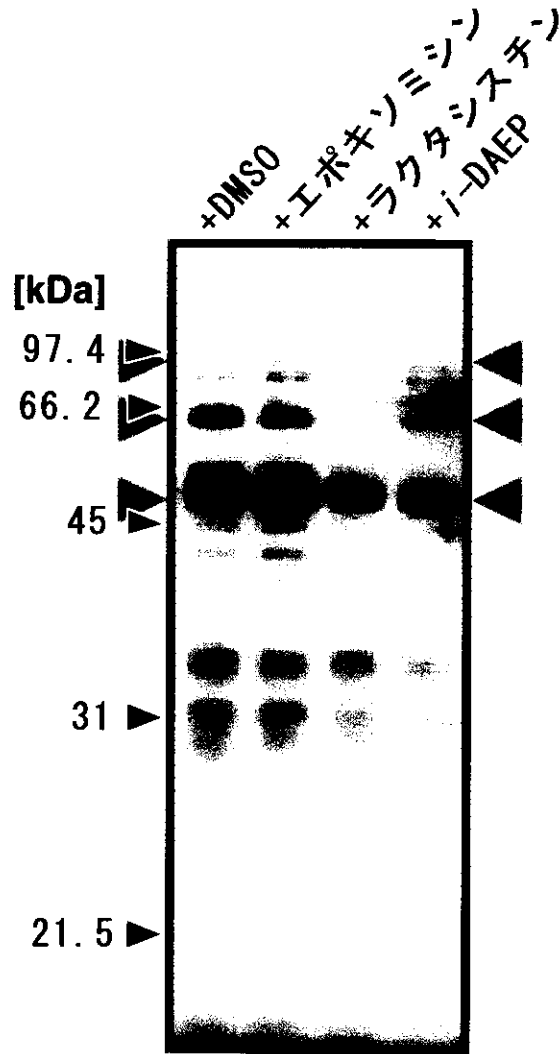
本来DAEPは、その活性中心において①のように、D-Aspを含む基質と複合体を形成する。その性質を利用して開発したのが、DAEP阻害剤：*i*-DAEPであり、②のように活性中心に共有結合することによって、その活性を阻害する性質を持っている。同様に、ビオチン化した*i*-DAEPも、③のようにDAEP活性中心に結合するので、アビジン化ペルオキシダーゼをプローブとしたウエスタンブロッティングを行うと、ビオチン・アビジン複合体を形成し、DAEP活性中心を検出することが出来る。

図2： ビオチン化 *i*-DAEPの阻害曲線



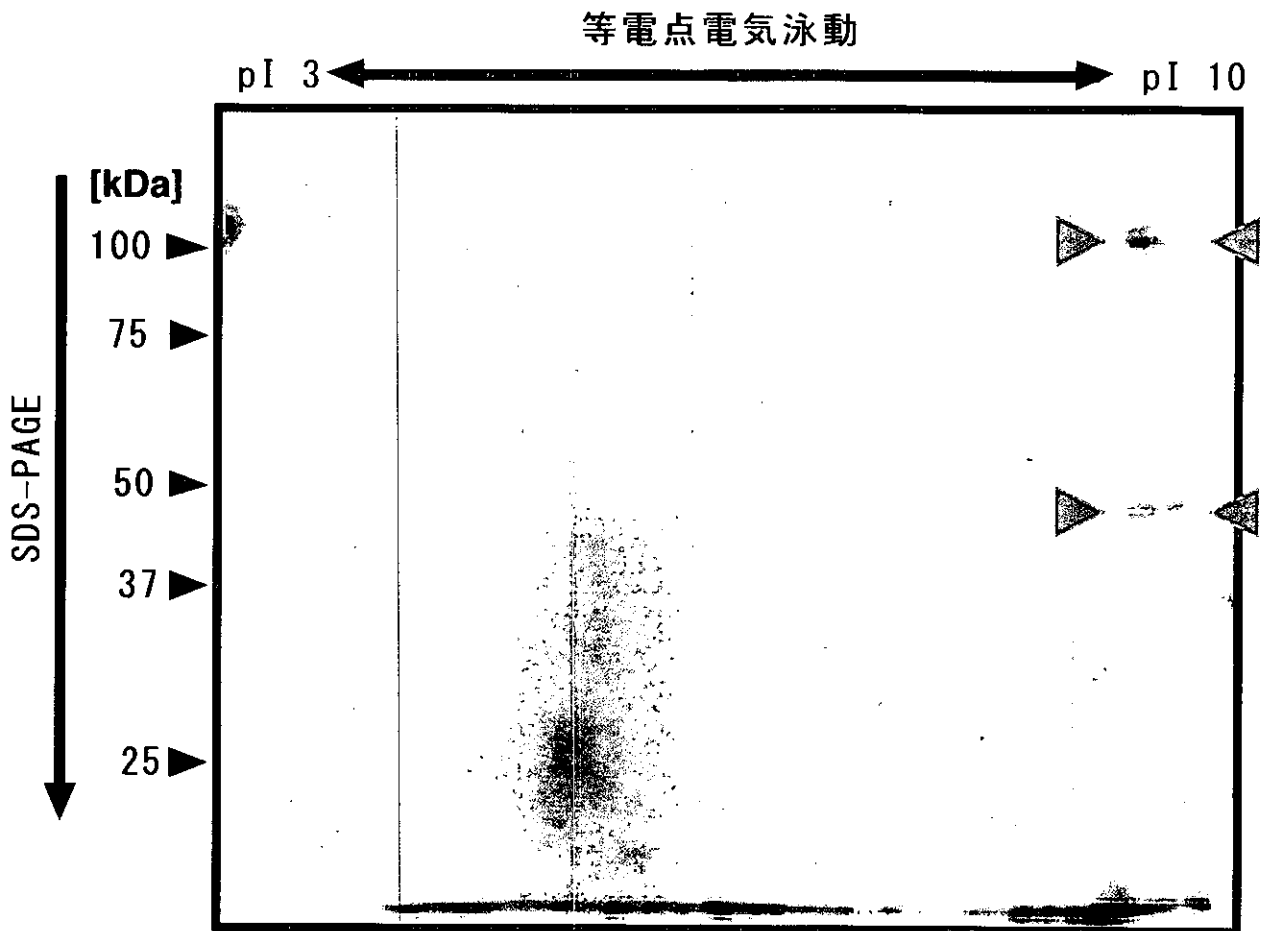
ビオチン化 *i*-DAEPと *i*-DAEPを室温でそれぞれ5分間DAEPと反応させた後、その活性を測定し、その阻害効果をグラフに示した。横軸にそれぞれの阻害剤の濃度を示し、縦軸にその濃度のときのDAEP残存活性を示した。

図3：ビオチン化*i*-DAEPによるDAEP活性中心サブユニットの標識



あらかじめ、DAEP溶液にDMSO、エポキシソミシン、ラクタシスチン、*i*-DAEP（終濃度 $10\mu\text{M}$ ）を加え、室温で5分間反応させる。その後、すべての反応液にビオチン化*i*-DAEP（終濃度 $10\mu\text{M}$ ）を加え、さらに5分間反応させ、これを試料としてSDS-PAGEを行った。その後、アビジン化ペルオキシダーゼをプローブとしてウエスタンブロットティングを行った結果、矢印（赤色）で示したように、50k、65k、90kの3種類の蛋白質が、ビオチン化*i*-DAEPと競合阻害されていることが明らかになった。

図4：ビオチン化*i*-DAEPによるDAEP活性
中心サブユニットの標識



あらかじめ、DAEP溶液にビオチン化*i*-DAEP（終濃度10 μ M）を加え、これを試料として二次元電気泳動を行い、その後、アビジン化ペルオキシダーゼをプローブとしてウエスタンブロッティングを行った。その結果、矢印（赤色）で示したように、50k、90kの3種類の蛋白質が検出された。

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-アスパラギン酸含有蛋白質分解酵素の一次構造解析に関する研究

分担研究者：木野内忠稔 自治医科大学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、平成 12 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。

今年度においては新規の蛋白質分解酵素である DAEP の一次構造の解析を中心的に行った。その結果、小胞体においてシャペロンとして機能する glucose-regulated protein 78 (GRP78/BiP) が、DAEP を構成するサブユニットの一つ、もしくは、生理的条件下で相互作用する分子であることが明らかになった。しかしながら、BiP 単独では DAEP 活性を有さない、もしくは、賦活化しないことが示唆された。従って、DAEP 複合体の中で BiP は、その分子認識機構を、D-Asp 含有蛋白質を基質として選択するために機能させているものと考えられた。

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 は健常脳と比較し、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、実際に D-Asp 含有蛋白質を分解する新規の酵素を発見し、これを D-Aspartyl Endopeptidase (DAEP) と名付けた。従って、DAEP 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は、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や予防法の開発にきわめて重要であると考えられた。そこで、今年度は DAEP の一次構造の解析を重点的に行った。

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°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 T¹E¹) を加え、チューブローテーター (~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-NH₂、及び Succinyl-D-Aspartic acid α -(4-Methyl-Coumaryl-7-Amide) 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、37°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

今年度は、DAEP の一次構造解析を行うために、以下の順に研究を実施した。即ち、(1) ペプチドシーケンサーを用いた精製 DAEP サブユニットの N 末端側一次構造の解読、(2) 抗 BiP 抗体による DAEP 活性の変化の観察、(3)

BiP と DAEP 活性について、である。

(1) ペプチドシーケンサーを用いた精製 DAEP サブユニットの N 末端側一次構造の解読

まず、昨年度確立した DAEP 精製法に従って、ウサギ肝から BiP を精製し、それを SDS-PAGE によって各サブユニットに分離した (図 1)。DAEP は、20 個以上の小分子からなる高分子複合体であることを確認しているため、上下のバンドと十分分離している 75kDa 付近の 2 本のバンド、及び 30kDa のバンドについて、ペプチドシーケンサーを用いて N 末端側からのアミノ酸配列の分析を試みた。その結果、75kDa 付近の 2 本のバンドについて、共に 10 残基の解読に成功し、その配列は小胞体においてシャペロンとして機能する分子、glucose-regulated protein 78 (GRP78/BiP) の一部と完全に一致した。また、30kDa のバンドは、N 末端側がブロックされており、アミノ酸配列を解読することが出来なかった。

(2) 抗 BiP 抗体による DAEP 活性の変化の観察

上記 (1) により、BiP が DAEP を構成するサブユニットの一つ、もしくは、直接 DAEP と相互作用する分子であることが示唆されたので、これを確かめるために DAEP 活性画分に対して、抗 BiP 抗体を用いて免疫沈降を行い、BiP の除去に伴って、DAEP 活性が変化するか否かについて検討を行った。その結果、抗 BiP 抗体濃度依存的に DAEP 活性は減少した (表 1)。従って、BiP は DAEP を構成するサブユニットの一つ、もしくは、生理的条件下で相互作用する分子であることが強く示唆された。

(3) BiP と DAEP 活性について

次に、BiP が単独で DAEP 活性を有するの否かについて検討するため、まず、大腸菌において BiP の発現系を構築し、DAEP 活性を調べた。pET16b プラスミドベクターにサブクローニングした BiP 遺伝子を、25℃で IPTG によって発現誘導した結果、大部分の BiP を可溶性画分に回収することが出来た (図 2)。従って、この可溶性画分に含まれる BiP は、生理的条件下における構造を有していることが考えられ、この試料を用いて DAEP 活性の測定を行った。その結果、DAEP 活性を見いだすことは出来なかった。しかしながら、以上の結果は、大腸菌抽出液中に共存する様々な夾雑物が、DAEP 活性の発現を阻害していることも考えられたため、次に、ウサギ網状赤血球を用いた *in vitro* 翻訳系によって BiP を発現させ、DAEP 活性を測定することを試みた (図 3)。BiP の発現は、抗 BiP 抗体によるウェスタンブロッティングによって確認し、確実に BiP が含まれる試料を用いて DAEP 活性を測定したが、その活性を確認することは出来なかった。*in vitro* 翻訳系のポジティブコントロールとしてルシフェラーゼを共に発現させ、その活性は維持されていたことから、この *in vitro* 翻訳系が正確に機能していることが確認されているので、大腸菌による発現系の結果と併せて、BiP は DAEP 活性を有さない、もしくは、単独では賦活化しないことが示唆された。

D. 考察

本研究の一番の目的は、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 を利用した D-Asp 含有蛋白質疾患の治療法を開発することである。平成 12 年度では、DAEP の酵素的な性質について詳細に検討し、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。そこで、今年度は、DAEP の一次構造の解析を重点的に行った。なぜなら、DAEP のアミノ酸配列が解読されることによって、DAEP 遺伝子のクローニングが容易に可能になり、①SNPs 解析による家系調査を行い、DAEP 遺伝子に起因した疾病の調査が出来る、②大量発現系を構築し、その三次元構造を結晶解析することによって、その作用機序や、新たな阻害剤の開発が出来る、また、③他の L-アミノ酸に特異的なプロテアーゼ、ペプチダーゼとの進化論的な比較が出来ることによって、DAEP の独特な基質特異性がどのように獲得されたものであるかが明らかになるから、等々である。

実際には、DAEP は 20 個以上のサブユニットから構成される高分子複合体であり、その精製収量も極めて少ないため、解析には困難を要したが、小胞体シャペロンとして知られる glucose-regulated protein 78 (GRP78/BiP) が、DAEP を構成するサブユニットの一つ、もしくは、生理的条件下で相互作用する分子であることが示唆された。しかしながら、*in vitro* 翻訳系、及び、大腸菌による発現系によって、単独で BiP を発現させ、DAEP 活性の測定を試みたが、DAEP 活性は観察されず、BiP は DAEP 活性を有さない、もしくは、単独では賦活化

しないことが示唆された。

以上の結果から、BiP が DAEP 活性中心サブユニットではないことが考えられたが、DAEP が D-Asp 含有蛋白質を基質として認識する上で、他の L-アミノ酸からなる蛋白質と明確に区別する機構が必要であることを考えると、BiP のようにフォールディングやアッセンブリーが不完全な蛋白質に結合して、品質管理を行う機能を持つものが、D-Asp 含有蛋白質を認識し、その分解を行うものと一緒に複合体を形成していることは、プロテアソームの例から観ても、合目的であると考えられる。実際に、BiP は A β と結合し、プロテアーゼと協調することによってその分解を促進することが複数報告されており（例、Kakimura, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 16; 281(1):6-10, 2001)、DAEP における BiP の相互作用も想像に難くない。それでは、DAEP 活性中心サブユニットとは、どのような構造をしているのだろうか？既存のプロテアーゼ阻害剤を探索したところ、唯一、プロテアーゼ阻害剤として知られるラクタシスチンが DAEP 活性を阻害したが、同様の機能を持つエポキシミシンは、DAEP 活性を阻害しなかった（図 4）。同様の結果が、カテプシン A に対しても観察されることが、Kozlowski らによって報告されている（*Tumour Biol.*, 22(4):211-5, 2001）。両阻害剤共に、プロテアソームの同じサブユニットのスレオニン残基に結合することが知られているので、それらの構造に由来する空間的な広がり之差が、DAEP やカテプシン A で観られる感受性之差に結びついているものと考えられる。実際に分担研究者である浜本の報告にもあるように、今回、ビオチン化した *i*-DAEP と未修飾の

i-DAEP では、ビオチン化 *i*-DAEP の方が、DAEP 活性をさらに 5%程度抑制することが明らかになった。従って、DAEP においてその活性中心サブユニット周辺の構造は、基質を呼び込むポケットが存在し、これを空間的に大きく阻害した結果が、上記阻害剤の阻害活性之差を生んだものと推測している。今後は、DAEP の構造を明らかにし、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、哺乳類にも存在し、その分解酵素である DAEP の性質についての一次構造の解析を行った。その結果、小胞体シャペロンとして知られる glucose-regulated protein 78 (GRP78/BiP) が、DAEP を構成するサブユニットの一つ、もしくは、生理的条件下で相互作用する分子であることが示唆された。しかしながら、*in vitro* 翻訳系、及び、大腸菌による発現系によって、単独で BiP を発現させ、DAEP 活性の測定を試みたが、DAEP 活性は観察されず、BiP は DAEP 活性を有さない、もしくは、単独では賦活化しないことが示唆され、現在では、DAEP 複合体の中で BiP が果たす機能とは、D-Asp 含有蛋白質を基質として選択するためにあるものと考えている。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Sakai, R., Kinouchi, T., Kawamoto, S., Dana, M., Hamamoto, T., Tsuru, T., Okubo, K. and Yamagami, S.: Construction of human corneal endothelial cDNA library and identification of novel active genes. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2002, In press

2. 学会発表

Sakai, R., Yamagami, S., Tsuru, T., Kinouchi, T., Hamamoto, T., Dana, M.R., Kawamoto, S., Okubo, K.: Construction of human corneal endothelial cDNA library and identification of novel and active genes. in *The Association for Research in Vision and Ophthalmology*, Fort Lauderdale, Florida, USA (2001年4月30日)

酒井理恵子、山上聡、水流忠彦、川本祥子、大久保公策、木野内忠稔、浜本敏郎、M Reza Dana「ヒト角膜内皮細胞のcDNAライブラリー作成と未知遺伝子同定の試み」第25回角膜カンファレンス、大阪（2001年2月8日）

木野内忠稔、香川靖雄、浜本敏郎「哺乳類のD-アスパラギン酸含有蛋白質分解酵素とその阻害剤について」第74回日本生化学大会、京都（2001年10月25日）

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特になし

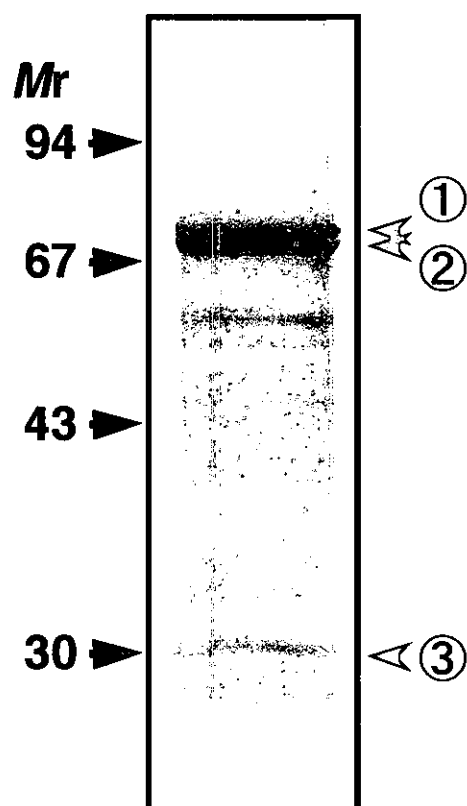
2. 実用新案特許登録

特になし

3. その他

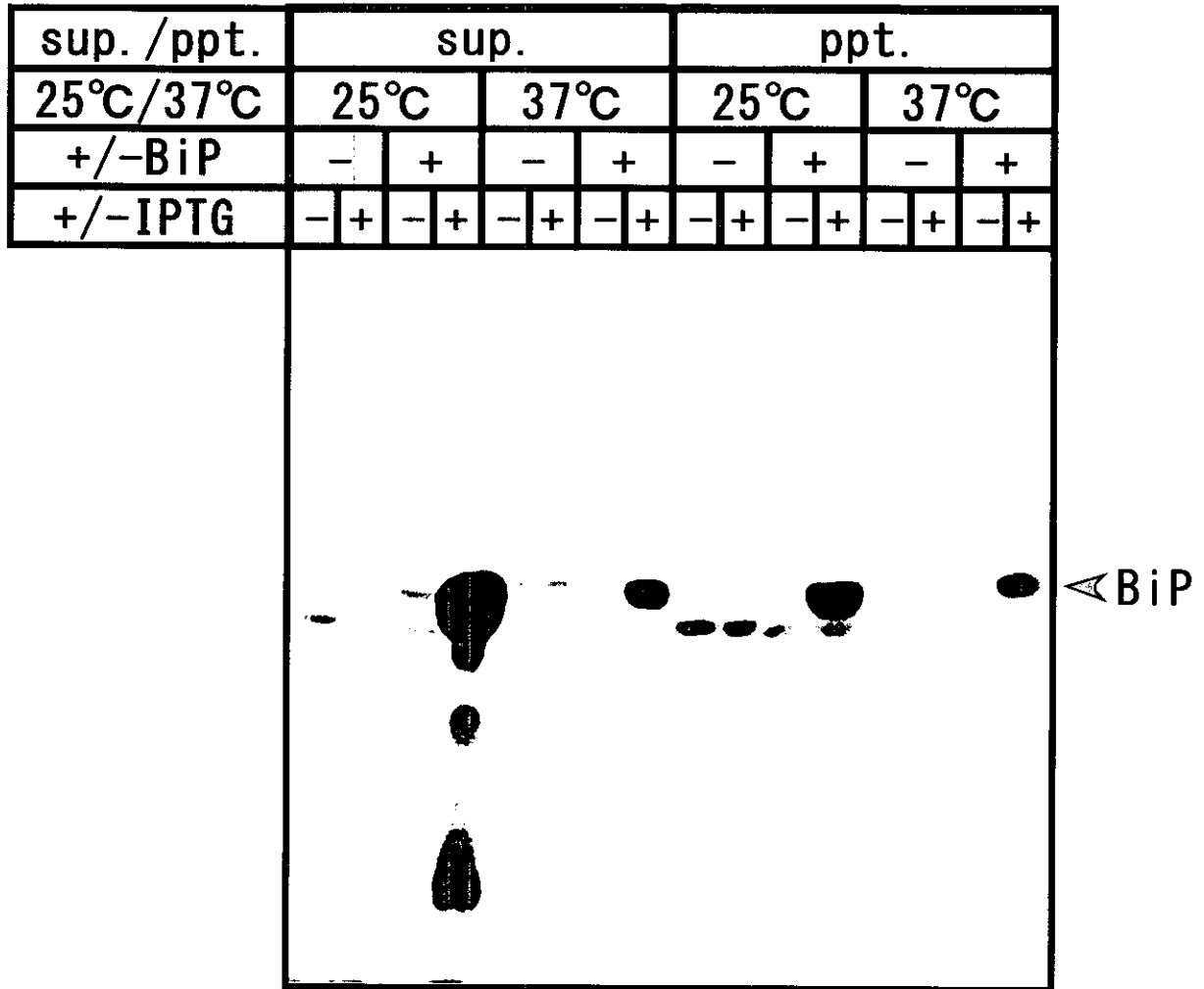
発明の名称「D-アスパラギン酸含有蛋白質分解酵素の阻害剤」、整理番号：PS01-961、出願番号：特願2001-099904として、平成13年3月30日に特許願を出願した。

図1 : DAEPのN末端側一次構造の解読



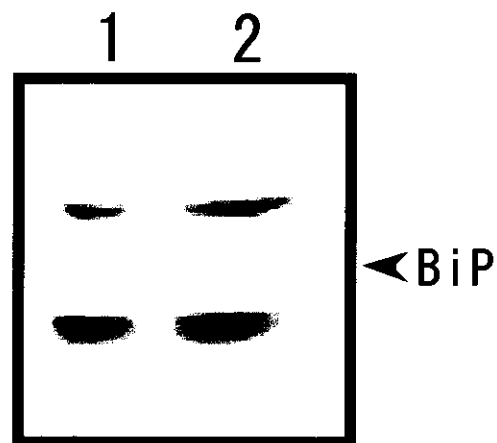
DAEPをSDS-PAGEによって各サブユニットに分離し、ペプチドシーケンサーによつてのN末端側一次構造の解読を行った。その結果、①と②のN末端は、ともにEEEDKKEDVGであり、BiPのそれと完全に一致した。③については、解析不能であった。

図2：大腸菌によるBiPの発現



大腸菌を用いて、BiPの発現系を構築した。25°C、もしくは37°Cで培養し、IPTGによる誘導を行った。抗BiP-C末抗体によるウエスタンブロッティングを行い、その発現を確認したところ、大部分のBiPを25°Cで培養し、IPTG誘導したときの可溶性画分（sup.）に回収できた。-BiP：エンベクター、ppt.：沈渣

図3 : *in vitro*翻訳系によるBiPの発現



*in vitro*翻訳系により、BiP遺伝子を発現させた。抗BiP-C末抗体によるウエスタブロットティングにより、その発現を確認した。1: エンプティーベクター、2: BiP