

20020245

厚生労働科学研究費補助金

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 14 年度 総括研究報告書

主任研究者 香川靖雄

平成 15 (2003) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告書	
D-アスパラギン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.....	3
香川靖雄 (資料) 図表	
II. 分担研究報告書	
D-アスパラギン酸含有蛋白質のスクリーニング法の開発に関する研究.....	27
浜本敏郎 (資料) 図表	
2. 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 する研究.....	37
木野内忠稔 (資料) 図表	
III. 研究に関わる生命倫理審議関連書類.....	50
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表.....	63

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

総括研究報告書

D-アスパラギン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、この仮説をたて、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。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、ミトコンドリア膜画分に局在する分子量 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（特許出願中）。平成 13 年度では、DAEP の一次構造の解析を行い、その結果、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示唆された。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明らかになり、その活性には他の分子の協力が必要ではないかと考えられた。そこで、ビオチン化した DAEP 阻害剤を新たに開発し、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。その結果、数種類の蛋白質が、ビオチン化 DAEP 阻害剤で標識され、これらの蛋白質が DAEP における基質認識や活性中心を構成していることが示唆された。

従って今年度は、より精度の高い構造解析を行うために、まず DAEP 精製法を改善し、その精製標品を用いて一次及び高次構造の解析を行った（以上、浜本）。その結果、glucose-regulated protein 75 (GRP75)、コハク酸デヒドロゲナーゼ、グルタミン酸デヒドロゲナーゼが DAEP 活性中心を形成するサブユニットであることが明らかになった。さらに、DAEP を構成する他のサブユニットを同様に解析したところ、Very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase（極長鎖アシル CoA デヒドロゲナーゼ）、Diaphorase 1（ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体 E₃）、ATP synthase F1 β

subunit、Propionyl Co A-carboxylase α -subunit、Propionyl Co A-carboxylase β -subunit、Acetyl-Co A synthetase 1 (Fatty acid Coenzyme A ligase, long chain 2) が同定された (木野内)。さらに、原子間力顕微鏡 (別称：走査型プローブ顕微鏡) を用いて、その立体構造を観察した結果、花卉状にコンポーネントが配置された直径 \sim 45 nm の構造物が観察された (香川)。従って、DAEP も他の高分子複合体型の蛋白質分解酵素であるプロテアソームや Lon と同様にリング型の高次構造を持つことが示唆された。また、東京都老人総合研究所との共同研究により、ヒト脳における D-Asp 含有蛋白質の動態を調査する許可を得られたので、それに先立ち、脳における D-Asp 含有蛋白質を検出する方法として、二次元電気泳動を応用したスクリーニング法を開発した。120 週齢のマウス脳を用いて解析した結果、チューブリン関連蛋白質がラセミ化していることが示唆された (浜本)。

以上の結果から、DAEP はミトコンドリア内膜に局在して、ミトコンドリア内の酸化ストレスにより生じたラセミ化蛋白質を分解し、排除することによって、それらがミトコンドリア自体の機能低下や傷害を招くことを予防する酵素であることが示唆された。逆に言うと、もし DAEP にその機能不全が生じた場合、ミトコンドリア内部では酸化ストレスの影響で種々の蛋白質にラセミ化が生じ、それを効率的に排除できなくなることが考えられる。そうなるとラセミ化蛋白質の蓄積の影響は、もはやミトコンドリアだけの問題ではなく、細胞や組織、場合によっては個体レベルでの障害になりかねない。

今後は、本研究によって得られた成果によって、個体レベルでの老化における D-Asp 含有蛋白質の生成機構や動態を明らかにし、さらに、関連する疾病と DAEP の関係が解明されることで、その予防法などを開発することが将来的な目標である。

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・教授（平成 14 年より）

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 (A β) において D-Asp を含む A β (D-A β) が、AD 患者脳の高齢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、例として 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 β 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 の一次及び高次構造の解析と D-Asp 含有蛋白質のスクリーニング法の開発を重点的に行った。

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、マウス 100 匹から摘出した肝臓に対し、10 倍量以上の等張液 (0.25 M ショ糖、0.2 mM EDTA) を加え、ポッター型ホモジナイザーで破砕した。その後、遠心分離 (100 \times g、5 分、4 $^{\circ}$ C) し、その上澄みに 1/2 倍量の高張液 (0.35 M ショ糖、0.2 mM EDTA) を加え、遠心分離 (800 \times g、15 分、4 $^{\circ}$ C) し、その上澄みを更に遠心分離 (9,000 \times g、10 分、4 $^{\circ}$ C) し、その沈殿物に 10 倍量以上の等張液 (0.25 M ショ糖、0.2 mM EDTA) を加え、遠心分離 (9,000 \times g、7 分、4 $^{\circ}$ C) し、沈殿物を回収した。この沈殿物に等張液を加え、ホモジナイザーで軽く懸濁し、20 mg/ml に調製し、Optiprep を用いた密度勾配遠心分離 (1.117–1.185 g/ml) を行い、1.130–1.140 g/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T¹⁰E¹)を加え、チューブローター(〜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)、弱陰イオン交換(DEAE Affi-Gel Blue)、強陰イオン交換(RESOURCE Q)、を行い、ヒドロキシアパタイト(Bio-Scale CHT2-I)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 Succinyl-D-Aspartic acid α -(4-Methyl-Coumaryl-7-Amide (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 1.0 M Tris/HCl (pH8.5)、1 μ l、5 M NaCl、4 μ l 及び 0.1 M 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℃で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 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH5.0) を加えて総量 1.5 ml 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)。

非変性ポリアクリルアミドゲルを用いた DAEP の活性染色

浜本により改良された精製法に基づき、マウス肝より抽出した DAEP を 4%の非変性ポリアクリルアミドゲル (2×TBE、1 mM DTT、0.1%

CHAPS を含むミニスラブゲル) に注入し、2×TBE を泳動用緩衝液として 4℃、16 時間泳動した。泳動終了後、DAEP 活性測定用基質である 1 mM Suc-D-Asp-MCA を含む反応液 (10 mM Tris/HCl(pH8.5)、200 mM NaCl、33 mM MnCl₂) 50 ml に非変性ポリアクリルアミドゲルを浸漬し、37℃で保温しながら攪拌した。15 分間後、非変性ポリアクリルアミドゲルを取り出して、UV トランスイルミネーター (360 nm) でゲル中の DAEP 活性を確認し、最も蛍光を発している部分を切り出した後、常法に従い SDS-PAGE によって、DAEP の構成成分を分子量によって分離した。

二次元電気泳動法による D-アスパラギン酸含有蛋白質の検出

長期間のストレスが蓄積した結果が観察されやすい組織として、120 週齢のマウス脳を用いて D-Asp 含有蛋白質の検出を行った。まず、マウス脳に対し 3 倍量以上の氷冷した等張液 (50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、150 mM NaCl、0.2mM EDTA) と、この等張液に対して 1/100 容のプロテアーゼ阻害剤カクテル (104 mM AEBSF、0.08 mM アプロチニン、3.6 mM ベスタチン、1.4 mM E-64、2.1 mM ロイペプチン、1.5 mM ペプスタチン) 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℃) し、その上澄みを組織抽出液とした。この組織抽出液を等分し、以下 A、B 抽出液とする。A 抽出液には、さらに DAEP 阻害剤を終濃度 0.1 mM となるように加え、対照となる B 抽出液には、DMSO を DAEP 阻害剤と同容 (1%) 加えたのち、両抽出液を 37℃で 6 時間保温した。その後、各抽出液 30 μ l に対し膨潤バッ

ファー (8 M 尿素、0.5% CHAPS、10 mM DTT、0.2% Bio-Lytes、0.001% ブロモフェノールブルー) を 125 μ l 加え、等電点電気泳動を行った (pH レンジ 3-10)。その後、SDS-PAGE によって二次元目の展開を行い、A、B 抽出液の電気泳動パターンを解析した。

MALDI-TOF-MS による解析用サンプルの調製

電気泳動により分離した蛋白質を PVDF 膜へ転写後、目的のスポットを切り出し、1.5 ml チューブ中で還元用緩衝液 (8 M グアニジン、0.5 M Tris-HCl、0.3% EDTA、5% アセトニトリル、10 mM DTT、pH 8.5) 200 μ l とともに 25°C、1 時間保温した。その後、3 mg のモノヨード酢酸を加え、遮光して 15 分間攪拌した。200 μ l の滅菌水、2% アセトニトリル、0.1% SDS 200 μ l で各々 5 分間、攪拌洗浄した後、0.5% ポリビニルピロリドン-40、5 mg/ml メチオニン、100 mM 酢酸を含む緩衝液 200 μ l に PVDF 膜を移し、25°C で 30 分間保温した。その後、PVDF 膜を 200 μ l の 10% アセトニトリル、トリプシン消化用緩衝液 (50 mM 重炭酸アンモニウム、5% アセトニトリルを含む) で洗浄した後、実際にトリプシンを含むトリプシン消化用緩衝液 100 μ l に移し、37°C で保温した。15 時間後、PVDF 膜を取り出して、残った消化用緩衝液を減圧下で \sim 10 μ l になるまで容量を減少させ、ZipTip_{C18} を用いて断片化ペプチドを吸着し、10 mg/ml α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (α -CHCA) を含む 50% アセトニトリル・0.1% TFA、5 μ l でサンプルプレート上に溶出し、MALDI-TOF-MS (アプライド・バイオシステムズ社: Voyager DE-STR) による解析用サンプルとした。

原子間力顕微鏡による DAEP 高次構造の観察

3-アミノジメチルシランを試料台であるマイカ (雲母) にコーティングし、1 時間、室温にて放置した。PBS で洗浄 (1 ml \times 4 回) した後、希釈した精製 DAEP (\sim 200 ng/ml) を滴下し、余剰分を滅菌水にて洗浄した (1 ml \times 5 回)。最終的に減圧下で試料台ごと乾燥し、原子間力顕微鏡 (AFM、Digital Instruments 社: NanoScope IIIa) にて観察した。AFM 観察に使用したプローブはシリコン単結晶プローブ (D-NCH-10V)、測定範囲は、 $0.7 \times 0.7 \mu\text{m}^2$ (Z 25 nm)、測定モードは大気中タッピング・モード AFM である。これら一連の作業は、生体分子計測研究所 (茨城県つくば市榎戸 807 番地の 133) にて行われた。

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 14 年度) は、研究計画に従い、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) DAEP 精製法の改良、(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 MALDI-TOF-MS による同定、(3) DAEP を構成する各成分の MALDI-TOF-MS による同定、(4) 免疫沈降法による DAEP 構成成分の同定、(5) 原子間力顕微鏡による DAEP 高次構造の観察、(6) 内在性の DAEP を利用した D-Asp 含有蛋白質のスクリーニング

法の開発である。

(1) DAEP 精製法の改良

本研究全体における今年度の大きな目標として、DAEP の一次及び高次構造解析があげられる。平成 12 年度に開発した精製法では、精製後の DAEP の活性低下が著しく、その構造が不安定であることが要因として考えられたため、今年度は、まず DAEP の精製法の改善に取り組んだ。大きな改善点は、(1) 精製操作の全ての過程において、四次構造の保護のために緩衝液にグリセロールを入れたこと (15%)、(2) 強陰イオン交換体である RESOURCE Q の前に、弱陰イオン交換体である DEAE Affi-Gel Blue による精製操作を行い、ゲル濾過的効果と夾雑する脂質を効果的に除去してからカラム操作を行うようにしたことである。その結果を、表 1 に示す。ウサギ肝で行っていた従来法と比べ、精製度で 2 倍、収率で 1.8 倍の改善が見られた。従って、本法により得られた精製標品を一次及び高次構造解析に用いることにした。

(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 MALDI-TOF-MS による同定

昨年度浜本により行われた実験により、ビオチン化 i-DAEP も 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 (図 1)。実験に用いたビオチン化 i-DAEP は、スペーサー配列の異なるビオチン化 i-DAEP1 (Biotinyl-(ϵ -aminocaproic acid)-L-Arg-L-His-D-Asp-CH₂Cl、MW: 798.35) とビ

オチン化 i-DAEP2 (Biotinyl-Gly-Gly-D-Asp-CH₂Cl、MW: 505.99) であり、これら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、前もって i-DAEP (「+」で図示) 100 μ M と、その溶媒である DMSO (ポジティブコントロール、「-」で図示) 1% を DAEP 精製標品に添加しておくことによって、ビオチン化 i-DAEP1 及び 2 との競合的な DAEP 活性中心への作用を検討した (図 2)。すなわち、ビオチン化 i-DAEP1、2 の添加 (それぞれ 0.1、1、10、100 μ M) 以前に i-DAEP 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、そのバンドが消失しているはずである。その結果、前もって i-DAEP を加えたものでは、ビオチン化 i-DAEP の種類にかかわらず、その結合が阻害されており、ビオチン化 i-DAEP が選択的に作用していることが明らかになった。そこで、ビオチン化 i-DAEP で標識される 30k、45k、55k、60k、75kDa の分子量を持つ蛋白質について、その一次構造を解析することによって同定することを目指し、MALDI-TOF-MS を用いて解析を行った。その結果、それぞれの分子は、75kDa : glucose-regulated protein 75 (GRP75)、60kDa : コハク酸デヒドロゲナーゼ (subunit A, flavoprotein (Fp))、55kDa : グルタミン酸デヒドロゲナーゼ、30kDa : コハク酸デヒドロゲナーゼ (subunit B, iron sulfur (Ip)) であることが強く示唆された。これらは、その理論的な分子量からも矛盾無く移動度と関連していた。しかしながら、45kDa 付近のバンドは解析できなかった。

(3) DAEP を構成する各成分の MALDI-TOF-MS による同定

次に、DAEP を構成する他のサブユニットを同定するために、一次元目に非変性ポリアクリルアミドゲルを用いた活性染色による選別を行い、二次元目に SDS-PAGE を用いた分子量による選別を行って得られたバンドを MALDI-TOF-MS によって解析した (図 3)。その結果、Very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase (極長鎖アシルCoAデヒドロゲナーゼ)、Diaphorase 1 (ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体 E₃)、ATP synthase, F1 β subunit、Propionyl Co A-carboxylase α -subunit、Propionyl Co A-carboxylase β -subunit、Acetyl-Co A synthetase 1 (Fatty acid Coenzyme A ligase, long chain 2) が同定された (図 4)。

(4) 免疫沈降法による DAEP 構成成分の同定

以上の結果は、DAEP がその活性の局在と矛盾せず、ミトコンドリア内膜に局在する蛋白質から構成される高分子複合体であることを強く支持するものである。しかしながら、MALDI-TOF-MS で得られた情報は、あくまでもデータベースに依存しているため、ペプチドシーケンサーによる解析等に比べると信頼性に欠ける点がある。従って、これまでに得られた結果を確かめるために DAEP 活性画分に対して、(2) および (3) で同定された蛋白質に対する抗体を用いて免疫沈降を行い、DAEP 活性が変化するか否かについて検討を行った。用いた抗体は、抗コハク酸デヒドロゲナーゼ抗体、抗グルタミン酸デヒドロゲナーゼ抗体、抗 GRP75 抗体、抗 ATP synthase 抗体、およびコントロールとして各々の抗体の作成動物に

おける IgG である。その結果、抗グルタミン酸デヒドロゲナーゼ抗体、抗 GRP75 抗体、そして抗 ATP synthase 抗体において濃度依存的に DAEP 活性は減少した (表 2)。従って、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ、GRP75、そして ATP synthase は、DAEP を構成するサブユニットとして実際に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。

(5) 原子間力顕微鏡による DAEP 高次構造の観察

これまでに研究されている高分子複合体型の蛋白質・ペプチド分解酵素のうち、プロテアソームや Lon はリング型の高次構造を持つことが知られている。DAEP もこれらの酵素とほぼ同様の分子量を持つ複合体であり、その高次構造が分かれば、基質認識機構などの機能を推測する上で大きな知見になる。そこで特殊な走査型顕微鏡を用いてその立体構造を観察した。観察に用いたのは走査型プローブ顕微鏡 (Scanning Probe Microscope) のうち、原子間力顕微鏡 (Atomic Force Microscope、以下 AFM) と呼ばれるものである。AFM は垂直方向 0.05 Å、面内方向 2 Å 程度の高い分解能を持ち、三次元分解能に優れている。従って、固体表面の個々の原子や分子を見ることが可能である。また、試料を作成する際に試料に与える人工的なストレスが少ないことでも知られており、最近では DNA-蛋白質の相互作用を解析するツールとしても知られている。その観察の結果、花弁状にコンポーネントが配置された直径 ~45 nm の構造物が観察された (図 5)。従って、DAEP も他の高分子複合体型の蛋白質分解酵素と同様にリング型の高次構

造を持つことが示唆された。

(6) 内在性の DAEP を利用した D-Asp 含有蛋白質のスクリーニング法の開発

我々が分解酵素である DAEP をはじめとして、D-Asp 含有蛋白質の動態を研究することの理由として、それが老化マーカーとして個人差の大きい個体の老化度、言い換えれば、酸化等によるストレスの蓄積度を測る指標になりはしないかということがある。実際に、寿命の長い生物や化石化してしまった生物の年齢の推定に、歯質やレンズに含まれる構成蛋白質の D-Asp 含有蛋白質の含有量が用いられている。それは、代謝的に不活性な蛋白質が化学的な影響によってラセミ化し、その後蓄積していくということによるが、そこで得られる答えはあくまで目安にしかならない。従って、もっと短期間に受けたストレスの影響度を測る指標になる D-Asp 含有蛋白質がないか探していた。なぜなら、ある年齢における個体のストレスの蓄積は、そこから数ヶ月あるいは数年という単位での環境的、あるいは生活習慣的な影響によるものであると考えていたからであり、これ以前にラセミ化した蛋白質について、いつどこで、どのような蛋白質の、どの Asp 残基がラセミ化するのか、ということについての知見が一切なかったためである。そこで、東京都老人総合研究所との共同研究により、ヒト脳における D-Asp 含有蛋白質の動態を調査する許可を得られたので、脳における D-Asp 含有蛋白質を検出するスクリーニング法を開発した。その方法とは、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いことを利用して、同一の組織抽

出液に対し、i-DAEP を加えたもの (A 抽出液) と加えなかったもの (B 抽出液) を用意して 37°C で保温し、各々を二次元電気泳動によって各蛋白質に分離して、その電気泳動パターン之差から D-Asp 含有蛋白質を検出するというものである (図 6)。即ち、i-DAEP を加えた A 抽出液では、内在性の DAEP による D-Asp 含有蛋白質の分解が i-DAEP によって阻害されるが、B 抽出液では DAEP によって積極的に分解されるので、A 抽出液と比較した場合、移動度が大きい (分子量の小さい)、もしくは消失したスポットとして D-Asp 含有蛋白質が検出される。その後、そのスポットについて MALDI-TOF-MS で同定を行うというものである。そこで、ヒト脳を用いた実験に先立ち、本実験系の有効性を確認するために、まず 120 週齢のマウス脳を用いて解析を行った。その結果、図の矢印で示すように A 抽出液では観察されるものの、B 抽出液では消失しているスポットが理論どおりに観察された (図 7)。そこで、このスポットを切り出して MALDI-TOF-MS を用いてその同定を行ったところ、チューブリン関連蛋白質 (チューブリン $\beta 1$ 鎖) であることが強く示唆された。

D. 考察

昨年度までの研究成果により、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、分解酵素である DAEP の視点から検討可能になった。特に平成 13 年度において新たに開発された DAEP 阻害剤：i-DAEP は、非常に高い特異性を持っており、これにビオチンを結合させたビオチン化 i-DAEP もまた DAEP 活性をより効果的に阻害するも

のであった。そこでビオチン化 i-DAEP を用いて DAEP をアフィニティーラベルした結果、実際に標識されたのが GRP75、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ、そしてコハク酸デヒドロゲナーゼであった。昨年度、ペプチドシーケンサーを用いた実験から、DAEP の構成因子には GRP78/BiP に相同な配列を持つものがあるとの結果が得られたが、①試料がウサギ由来であり、データベース上に十分なウサギ由来のデータがないことや、②元々のその局在が小胞体であること、そして③GRP78 と GRP75 は同じ HSP70 ファミリーに属する分子シャペロンであり、内部配列がよく保存されていること、また④今年度浜本により改良された精製法により、非常に精製度の高い標品が得られるようになったこと、⑤基質類似体として設計された阻害剤である i-DAEP のアフィニティーラベルにより同定されたことなどの理由から、GRP75 が DAEP の活性中心サブユニット、もしくは相互作用する重要な因子の一つとして作用していることが考えられた。その作用とは、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、GRP75 のように変性蛋白質に結合して、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ていても想像に難くない。実際に、生体内にはプロテアソームのように ATP 依存的シャペロンと協調して蛋白質分解をするものもあり、GRP75 もまた ATP 依存的に働く分子シャペロンであることを考えると、人工基質のような小さな分子ではなく、実際のラセミ化蛋白質の認識には ATP が必要なのかもしれない。また、市販の精製

グルタミン酸デヒドロゲナーゼを購入し、DAEP 活性があるかどうかについて調べてみたところ、非常に微量ながら DAEP 活性を認めることが出来た。GRP75 もグルタミン酸デヒドロゲナーゼもその局在はミトコンドリア内の可溶性画分であるマトリックスであると考えられており、DAEP が CHAPS によってミトコンドリア内膜から抽出されてくる蛋白質であることを考えると、DAEP 複合体の中に膜に局在する構成成分が無くてはならないことになる。そのような視点から結果を見ると、DAEP 構成因子として同定されたもののうち、実際にミトコンドリア内膜と直接的・間接的に親和性を持っていることが確認されているのは、Very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase、ATP synthase, F1 β subunit、そしてコハク酸デヒドロゲナーゼであることが分かる。これらが、DAEP を内膜に引き留め、その局在を確かなものとしていると考えられる。

では、どうして DAEP 複合体にはこのようにエネルギー合成系の必須蛋白質ばかりが含まれているのであろうか。研究当初、我々は DAEP 誕生の背景として、構成蛋白質など、もっと代謝的に活性の低いものがラセミ化し、その基質として存在することが必要であろうと考えていた。実際に、浜本による D-Asp 含有蛋白質スクリーニング法で検出されたのが チューブリン関連蛋白質であることも、このような仮説を支持している。しかしながら、研究の進展につれて、DAEP の局在がミトコンドリア内膜に最も多いことや、蛋白質のラセミ化を積極的に進める原因となるラジカルや活性酸素の発生源もまたミトコンドリア内膜に局在する複合体 I 及び III であることが

分かってくるにつれて、DAEP の基質もまたその周辺に最も多く存在するのではないかと考えられた。即ち、DAEP を構成する因子にもラジカル・活性酸素の影響を受けやすいものが含まれている、ということである。従って、DAEP は基質を特別に求めて誕生したのではなく、電子伝達系から漏れてくるラジカルの影響を直接的に受ける近傍の蛋白質が寄り集まり、各々の品質管理をして自力校正不能なラセミ化が生じた場合に、いち早くそれを検出・排除し、ターンオーバーを亢進することによってエネルギー生産効率の低下を抑制する、言い換えると、自身の機能不全を自覚し、新品と置き換わる運命にある、そのような背景のもとに生まれてきたのではないかと、この結論に至った。そのように考えると、DAEP 複合体を構成する各サブユニットが、いずれもミトコンドリア内に局在するエネルギー合成系の必須蛋白質ばかりであり、特に複合体 II を構成するコハク酸デヒドロゲナーゼや ATP 合成酵素が含まれていることに合目的な理由を得ることが出来る。しかも精製後の DAEP の不安定要因が、DAEP 内部に含まれたラセミ化蛋白質の自己消化によるものであれば納得しやすい。今後は、結晶化による精密な立体構造の解析を行うことによって、①各 DAEP 構成因子のその活性における役割が明らかになり、②他の一般的な L-アミノ酸に特異的なプロテアーゼ、ペプチダーゼとの構造上の比較により、DAEP の独特な基質特異性が進化論的にどのように獲得されたものであるかが明らかになるであろう。

以上は、本研究において D-Asp 含有蛋白質の動態を分解酵素の視点から研究したときに

得られる考察であるが、肝心の基質としての D-Asp 含有蛋白質について、いつどこでどのような蛋白質のどの Asp 残基がラセミ化するのか、ということについての知見は、一切なかったのである。その大きな障害として D-Asp 含有蛋白質の検出の難しさがあげられる。現実的な問題として、これまでに発見された D-Asp 含有蛋白質は、クリスタリンや β アミロイド蛋白質などごくわずかであり、代謝的に不活発なものばかりである。だからこそ、発見されやすかったのだ、ということもできるが、我々の体内に発現するする全ての蛋白質の Asp 残基にラセミ化の可能性があり、ラセミ化の結果、疾患の要因となり得る限り、その検出法の開発が急務であると考えた。そこで、i-DAEP を利用したスクリーニング法を開発した。ヒト脳を試料として実験を行うことを目的として、今年度はその技術開発に従事した。ヒト同様、長期間に渡るストレスの影響が観察されやすい組織として、120 週齢のマウス脳を用いてスクリーニングした結果、チューブリン関連蛋白質（チューブリン β 1 鎖）がラセミ化されていることが強く示唆された。脳・神経系におけるチューブリンの役割は、その軸索等の神経突起を維持する細胞骨格として働いていることが知られており、寿命の長い神経細胞では長期間に渡ってストレスにさらされることが考えられる。従って、ラセミ化していることは想像に難しくなく、本法の有用性が示された。しかしながら、120 週齢程度の老化マウスで得られたデータが、そのままヒトでも反映されるのかということについては疑問の余地が残る。また、今回得られた結果のなかで、明らかな差を示すスポットはチューブリ

ンだけであったが、実際にはもっと多くの蛋白質がラセミ化していることが考えられ、スクリーニング時の検出数や検出感度をより高めることが必要になると思われる。今後は、他の酸化ストレスマーカーを指標にして組織の老化度を大まかに検定してから、本法を用いてヒト脳における D-Asp 含有蛋白質の動態を調査する予定である。

最後に繰り返しになるが、ラセミ化蛋白質の生成原因として、非酵素的な物理化学的な影響が考えられている。特に活性酸素の影響は大きく、各個人がどのような生活習慣と食習慣を送っているのか、と言うことにも大きく依存することと思われる。例えば、心身のリフレッシュのために、もしくは肥満の予防のために適度な運動が欠かせない、という方々もいるだろう。しかしながら、同時にバランスの乱れた食事をとっているなら、適度なはずの運動も逆効果になる。脂質の多い食事をとっていれば、それは過酸化脂質、脂質ペルオキシドとなり、また、ビタミン C、E などに欠けていけば、体内の抗酸化作用が低下する。こうした短期から長期にわたる食事・生活習慣のマーカーとしても、D-アミノ酸蛋白質は利用可能なのではないだろうか。遺伝子の多型解析だけでは分からない、もしくは判断のつきにくい個々人の事象にも、もっと漠然とした体調不良にも科学的根拠を与えるものとして、我々は D-アミノ酸含有蛋白質の動態の研究の発展に期待し、また従事するのである。

E. 結論

以上の成果から、これまで全く不明であった

哺乳類における D-Asp 含有蛋白質の動態が分解酵素の視点から明らかになった。従来、非脊椎動物にのみ存在が知られていた D-Asp 含有蛋白質に対する代謝機構であったが、哺乳類においてはその活性がミトコンドリア内膜に局在し、酸化ストレスにより生まれてくるラセミ化蛋白質を排除することによって、ミトコンドリア自体を保護する役割を持っていることが示唆された。このような保護機構を持つに至った理由としては、哺乳類の寿命の長さによるものと考えられる。即ち、紫外線や活性酸素と言った老化ストレスのたぐいは、加齢とともに様々な組織・細胞内において遺伝子の変異や蛋白質の修飾・変性を引き起こし蓄積していく。生物が進化の過程でこうした有害化した蛋白質の排除機構として DAEP を得たのは必然ではなかろうか。今回 DAEP 構成因子として同定された蛋白質が、いずれもミトコンドリアに局在するエネルギー代謝系のものであったことは、それ自身が非常に酸化ストレスにさらされる立場にあるものなので、少なからず驚きであった。従って、生理的な環境下では、シャペロンである GRP75 と協調しながら、場合によっては自分自身に発生したラセミ化を認識し、自ら分解することをいとわないことによって、新規の正常な機能を持った蛋白質合成を促し、ミトコンドリアという細胞内組織の機能を保護していることが考えられた。

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, 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

Satoh, M., Hamamoto, T., Seo, N., Kagawa, Y., Endo, H.: Differential sublocalization of the dynamin-related protein OPA1 isoforms in mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun.* 300 (2), 482-493, 2003

Tamada, H., Sakashita, E., Shimazaki, K., Ueno, E., Hamamoto, T., Kagawa, Y., Endo, H.: cDNA cloning and characterization of Drbl, a new member of RRM-type neural RNA-binding protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 297(1), 96-104, 2002

Kagawa, Y., Yanagawa, Y., Hasegawa, K., Suzuki, H., Yasuda, K., Kudo, H., Abe, M., Matsuda, S., Ishikawa, Y., Tsuchiya, N., Sato, A., Umetsu, K., and Kagawa, Y.: Single nucleotide polymorphism of thrifty genes for energy metabolism: evolutionary origins and prospects for intervention to prevent obesity-related diseases. *Biochem Biophys Res Commun.* 295, 207-222, 2002

香川靖雄 『『ミトコンドリアとミトコンドリア病』、序文：基礎医学から-クローン生物、遺伝子治療の時代を迎えて-』日本臨床増刊号、60(4): 1-3 (2002)

香川靖雄 「朝ご飯の効用と研究動向 世界と日本の朝食研究から 科学的な調査・研究が証明する朝食の必要性 朝ご飯平成13年度—その効用、研究動向、戦後史、近未来像 朝ごはん 平成14年3月 (2002)

香川靖雄 「生活習慣のはなし (1) 医師は長生きか」最新医学、57(5)、102-104(2002)

香川靖雄 「生活習慣病の予防における栄養と遺伝子」日本総合健診医学会第30回記念大会—特別講演Ⅲ—総合健診別刷、29(3) (2002)

香川靖雄 「老化のバイオサイエンスとミトコンドリア」*Geriatric Neurosurgery* (10)

上西一弘、太田篤胤、福島洋一、香川靖雄 「フラクトオリゴ糖の配合が麦芽飲料中カルシウムの吸収に及ぼす影響と長期飲用時の安全性に関する検討」*栄養学雑誌* 60(1)11-18 (2002)

香川靖雄 「生活習慣病のはなし (2) 生涯傷病期間の短縮」最新医学、57(6) 106-108 (2002)

柳沢佳子、川端輝江、田中修、長谷川恭子、香川靖雄 「FABP2, MTP, SCAP 遺伝子の一塩基多型はジアシルグリセロールの作用に影響

- する」第 56 回日本栄養・食糧学会 大会講演要旨集 p. 307 (2002)
- 平岡真実、安田和人、香川靖雄「葉酸栄養状態と葉酸代謝関連酵素の多型について」第 56 回日本栄養・食糧学会大会講演要旨集 p. 211 (2002)
- 佐藤史、香川靖雄「ミトコンドリア DNA 総塩基配列決定法による糖尿病遺伝子の解析」第 56 回日本栄養・食糧学会大会講演要旨集 p. 147 (2002)
- 香川靖雄「生活習慣のはなし (3) 人命は地球より重いか、鴻毛より軽いか」最新医学 57(7) 118-120 (2002)
- 香川靖雄「食事と栄養 その 1 高血圧と無機質」老年病予防、35(2002)
- 香川靖雄「生活習慣のはなし(7)行動変容が糖尿病予防に最も有効」最新医学社 57(11)、101-102 (2002)
- 生体エネルギー研究会 第 28 回討論会 講演要旨集
- 香川靖雄、柳沢佳子、曾根英行「エネルギー関連の一塩基多型の人種差」(2002)
- 香川靖雄「生活習慣病の話(8)安全でない健康食品」最新医学 57(12)、100-102(2002)
- 香川靖雄「新ガイドラインの考え方 医師の立場から 特集 管理栄養士国家試験新ガイドライン—その概要と栄養士への期待(2)」臨床栄養 101(6) (2002)
- 香川靖雄「生活習慣のはなし(4)喫煙と悪習慣症候群」最新医学、57(8)、110-112 (2002)
- 香川靖雄「生活習慣のはなし(6)飢餓の歴史と未来の危機管理」最新医学、57(10)、106-108 (2002)
- 香川靖雄「生活習慣のはなし(5)食事・生活習慣の科学的根拠」最新医学、57(9)、108-110 (2002)
- 香川靖雄「生活習慣病(前編)ー遺伝子から病態までー栄養:アジア人の SNP と生活習慣病」最新医学 3 月(2002)
- 香川靖雄「生活習慣病(前編)ー遺伝子から病態までー序論 生活習慣病ー遺伝子、病態、予防、臨床ー」最新医学 3 月増刊号 7-9 (2002)
- 香川靖雄「テロメラーゼの病態生理」SELECTED ARTICLES 2002、55-64(2002)
- 香川靖雄「生活習慣のはなし(9)百寿者の生活習慣と遺伝子」最新医学社、58(1)、122-124 (2003)
- 香川靖雄「生活習慣のはなし(10)肥満と生活習慣」最新医学社、58(2)、100-102 (2003)
- 香川靖雄「“健康寿命”と生活習慣病 Part1

新しい健康の医療概念」ザ・クインテッセンス the Quintessence 22(3) (2003)

木野内忠稔、香川靖雄「老化にともなう D-アスパラギン酸含有蛋白質の増加とその分解酵素について」酵素工学研究会講演会講演要旨集、31-34 (2002)

木野内忠稔、西尾秀喜、西内祐二、渡邊正知、池田雅志、松井寿夫、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 75 回日本生化学会大会発表抄録集、74 (8)、1038 (2002)

香川靖雄「食事と栄養 その 3 健康は 1 つの健康食品や薬物では守れない」動脈予防 75(2003)

香川靖雄「高齢化社会と生活習慣病」公孫樹 8、5-6 埼玉銀杏会(2003)

香川靖雄「人種の差・ミトコンドリア・生活習慣病」細胞工学 21(1):106-114 (2002)

学会発表

木野内忠稔、香川靖雄「老化にともなう D-アスパラギン酸含有蛋白質の増加とその分解酵素について」第 47 回酵素工学研究会、京都 (2002 年 5 月 10 日)

柳沢佳子、川端輝江、田中修、長谷川恭子、香川靖雄「FABP2、MTP、SCAP 遺伝子の一塩基多型はジアシルグリセロールの作用に影響する」第 56 回日本栄養・食糧学会、札幌 (2002 年 8 月 21 日)

平岡真実、安田和人、香川靖雄「葉酸栄養状態と葉酸代謝関連酵素の多型について」第 56 回日本栄養・食糧学会、札幌 (2002 年 8 月 21 日)

佐藤史、香川靖雄「ミトコンドリア DNA 総塩基配列決定法による糖尿病遺伝子の解析」第 56 回日本栄養・食糧学会、札幌 (2002 年 8 月 20 日)

木野内忠稔、西尾秀喜、西内祐二、渡邊正知、池田雅志、松井寿夫、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 75 回日本生化学会大会、京都 (2002 年 10 月 17 日)

玉田寛、坂下英司、島崎久仁子、植野理恵子、浜本敏郎、香川靖雄、遠藤仁司「神経性 RNA 結合タンパク質 (Drb1) の発生段階的な発現調節」第 25 回日本分子生物学会年会、横浜 (2001 年 12 月 11、12 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

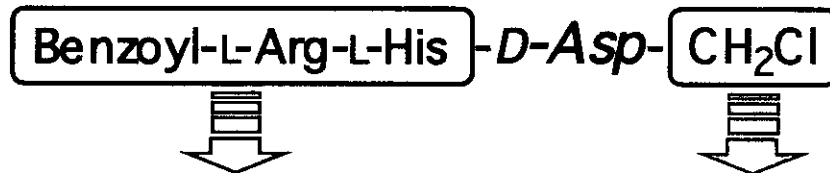
特になし

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。

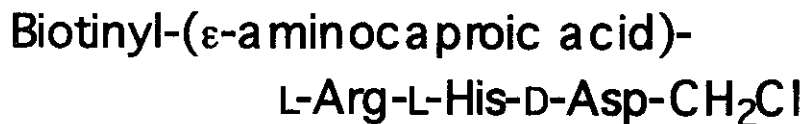
○ iDAEP [m.w.: 563.01]



保護基とスペーサー配列

活性中心サブユニットと
共有結合する

○ Biotinyl iDAEP-1 [m.w.: 798.35]



○ Biotinyl iDAEP-2 [m.w.: 505.99]



図1 : DAEP阻害剤の構造とその作用機序

本実験に用いた各 DAEP阻害剤の化学構造とその作用機序を示す。i-DAEPは、活性測定用の基質である Suc-D-Asp-MCAの構造をもとに、その類似体として DAEP活性中心に共有結合することを狙ったものである。D-Aspを中心に、その N 末端側は保護基とスペーサー配列、その C 末端側は共有結合性のメチルケトン基になっている。さらに、アフィニティーラベル用に開発されたビオチン化 i-DAEP1及び 2 は、スペーサー配列の異なる、即ち分子量が大きく異なる構造をしており、DAEP 活性中心を標識した際にペプチドフィンガープリントをとることによって、それらが結合した断片が判断できるように設計した。

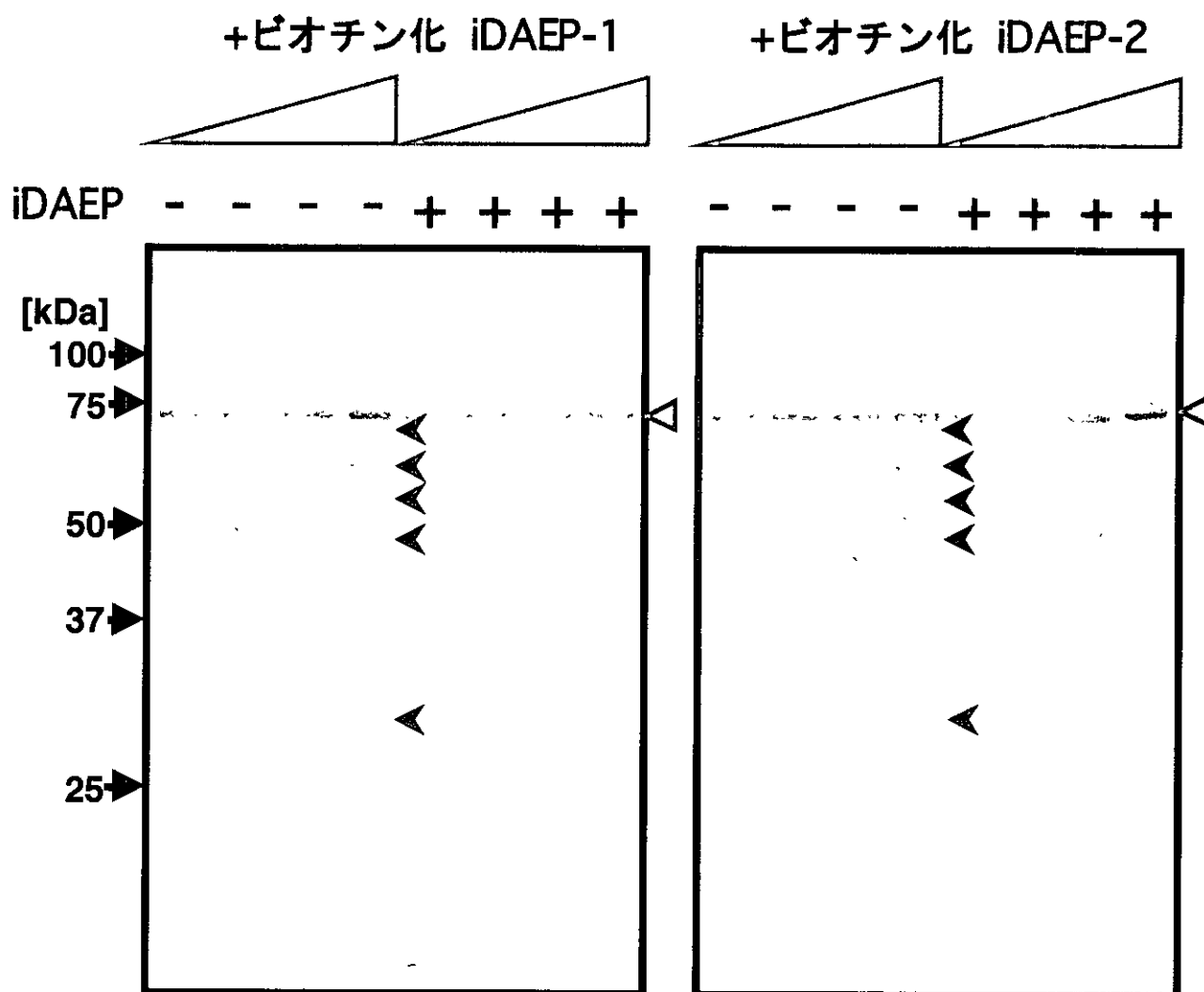


図2： ビオチン化DAEP阻害剤を用いたDAEP活性中心サブユニットのMALDI-TOF-MSによる同定

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、前もって i-DAEP (+) 100 μM とその溶媒である DMSO (-) 1%を DAEP精製標品に添加しておくことによって、ビオチン化 i-DAEP1及び2との競合的な DAEP活性中心への作用を検討した。加えたビオチン化 i-DAEP1、2の量は左から 0.1、1、10、100 μM である。その結果、前もって i-DAEPを加えたものでは、ビオチン化 i-DAEPの種類にかかわらず、その結合が阻害されており、ビオチン化 i-DAEPが選択的に作用していることが明らかになった。従って、ビオチン化 i-DAEPで標識される 30k、45k、55k、60k、75kDa の分子量を持つ蛋白質が、DAEP活性中心サブユニットであることが示唆された（赤矢印）。そこで、これらの蛋白質の一次構造を MALDI-TOF-MSを用いて解析を行った結果、それぞれ、75kDa：glucose-regulated protein 75 (GRP75)、60kDa：コハク酸デヒドロゲナーゼ (subunit A, flavoprotein (Fp))、55kDa：グルタミン酸デヒドロゲナーゼ、30kDa：コハク酸デヒドロゲナーゼ (subunit B, iron sulfur (Ip)) であることが強く示唆された。45kDa 付近のバンドは解析できなかった。青矢印は、ビオチンの検出に用いたストレプトアビジン・パーオキシダーゼの非特異的な吸着である。

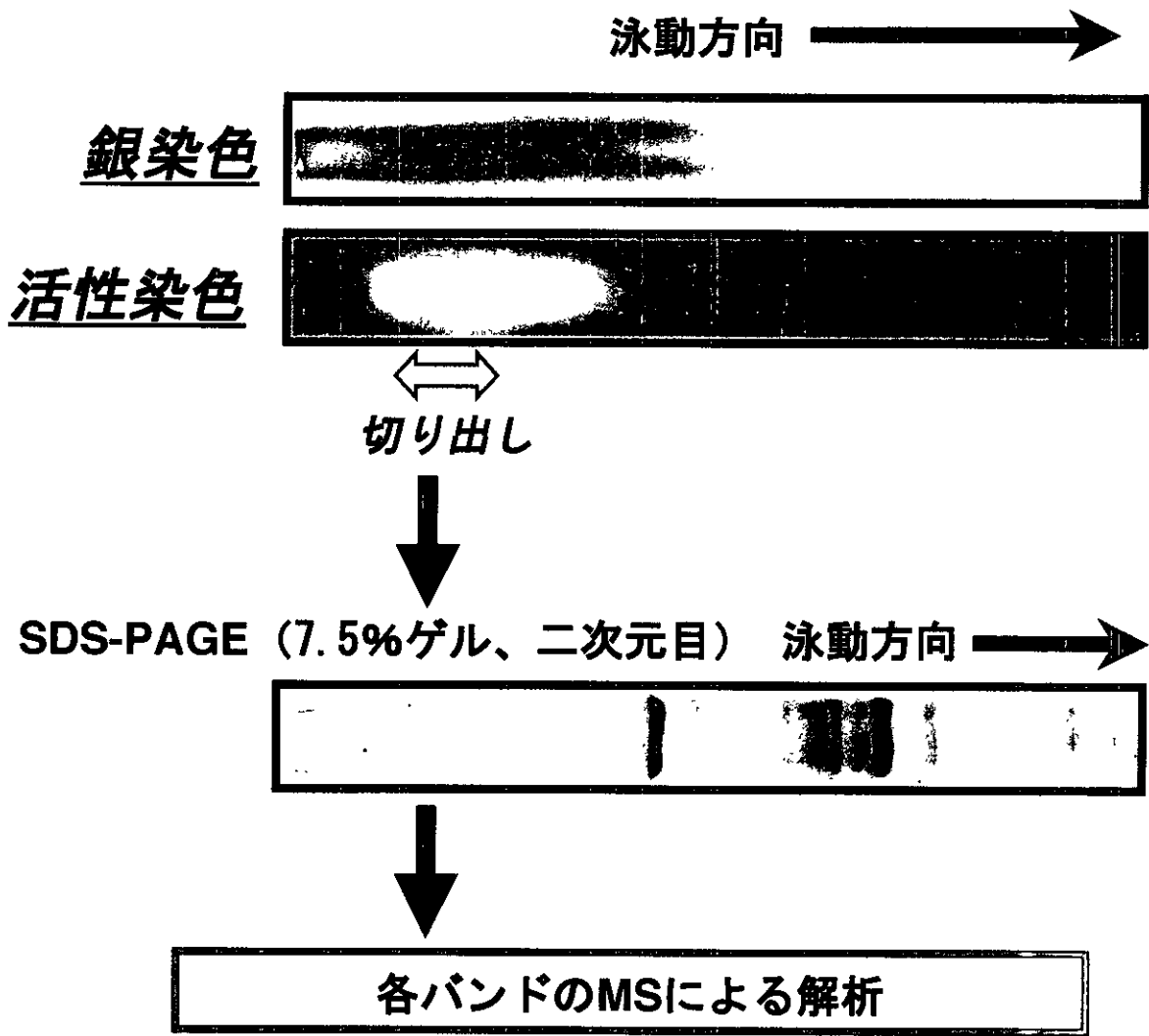


図3：非変性ポリアクリルアミドゲルを用いたDAEPの活性染色とSDS-PAGEによるDAEP構成成分の分離

4%の非変性ポリアクリルアミドゲルにより DAEP精製標品を電気泳動し、活性染色によってその純度を検定した。泳動終了後、DAEP活性測定用基質である 1 mM Suc-D-Asp-MCAを含む反応液にゲルを浸漬し、37°Cで保温しながら攪拌した。15分間後、非変性ポリアクリルアミドゲルを取り出して、UVトランスイルミネーター (360 nm) でゲル中の DAEP活性を確認し、最も蛍光を発している部分を切り出した後、常法に従い SDS-PAGEによって、DAEPの構成成分を分子量によって分離した。最上段のゲルは、活性染色後に銀染色によってゲル中の蛋白質を染色したものである。