

SDS-PAGE (7.5%ゲル、二次元目)

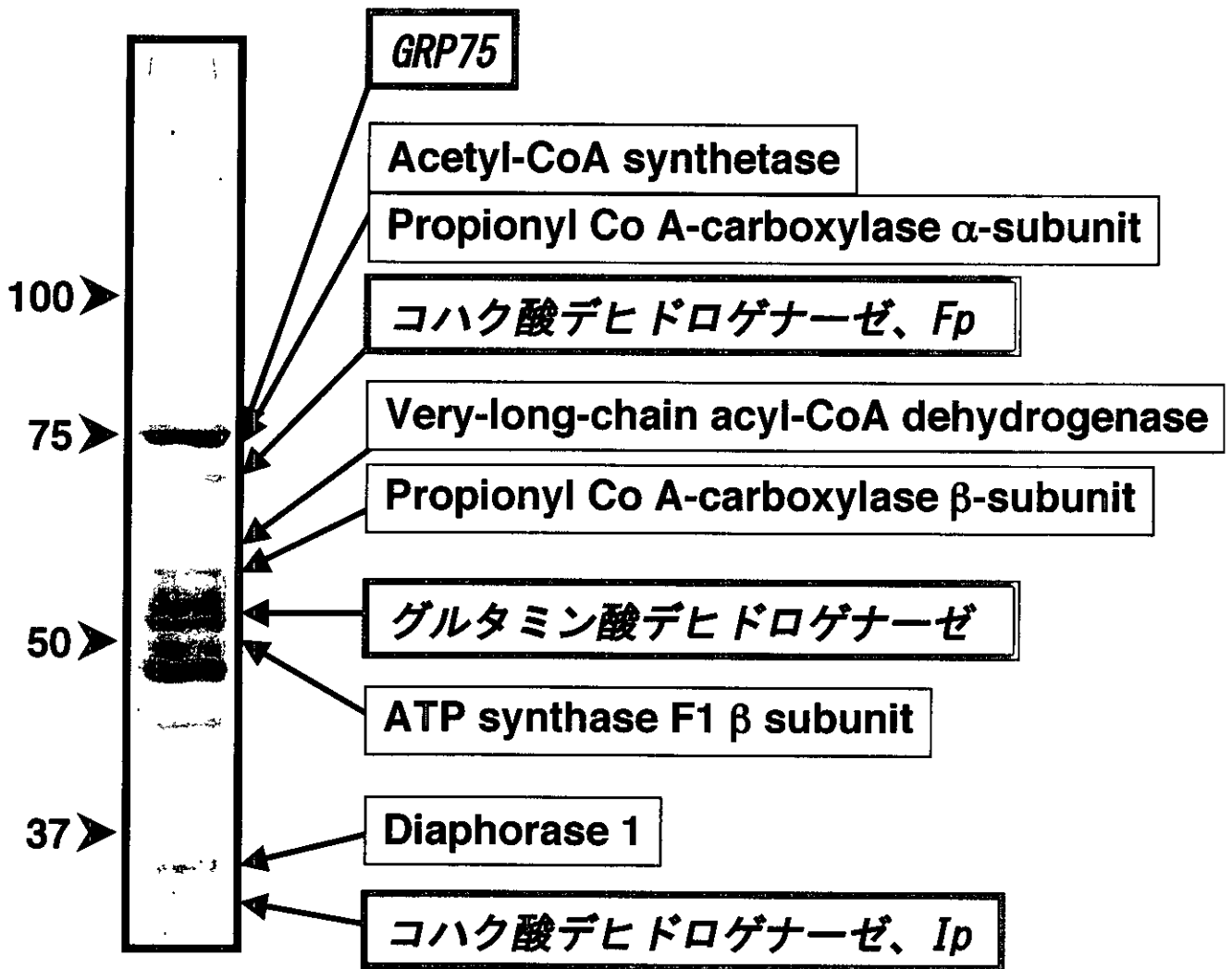


図4 : DAEPを構成する各成分のMALDI-TOF-MSによる同定

DAEPを構成する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。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 E_3)、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) などが同定された。図中、赤線で囲ってあるのは、ビオチン化 i-DAEPによる標識の結果、DAEP活性中心を構成していることが示唆されたものであり、それらも同時に検出された。

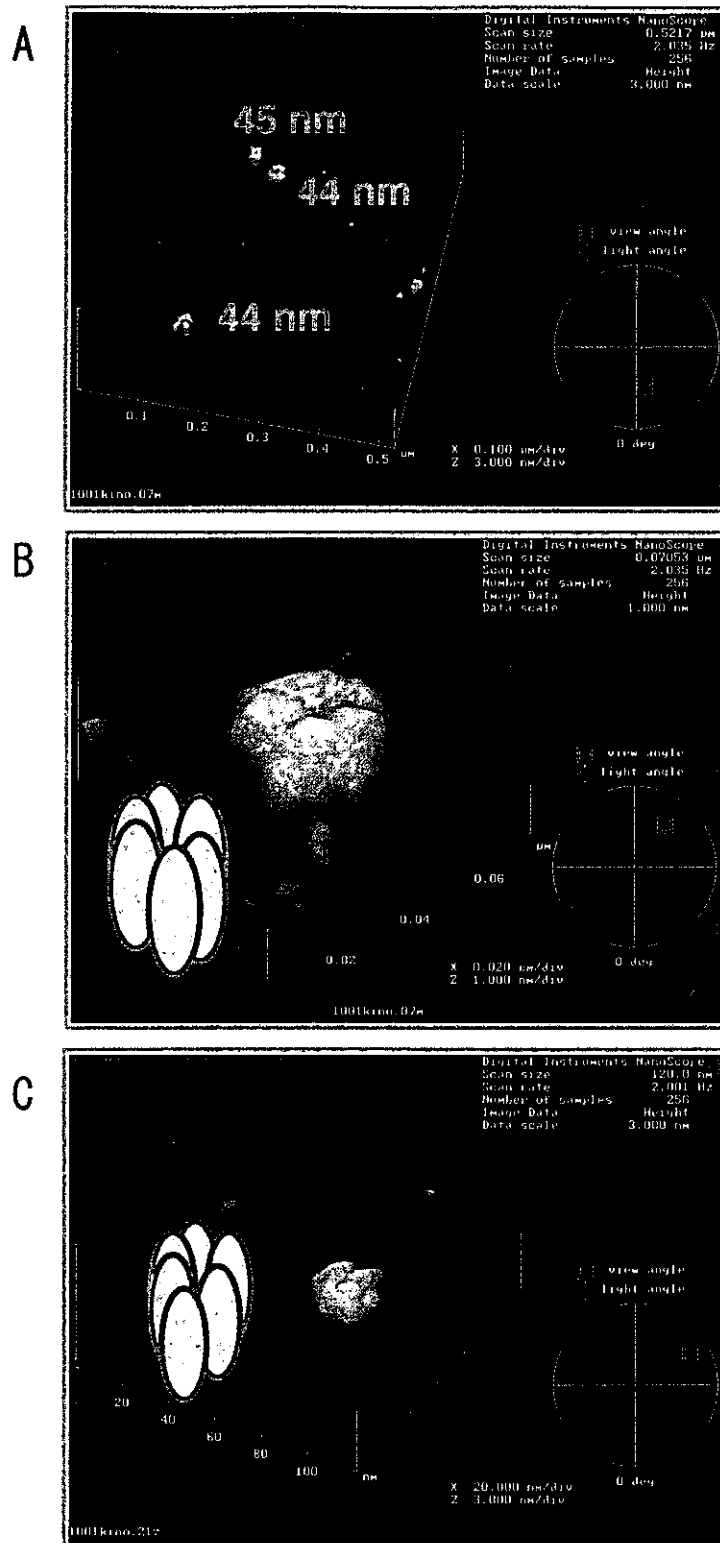


図5：原子間力顕微鏡によるDAEP高次構造の観察

DAEP精製標品を原子間力顕微鏡により観察した。その結果、粒子直径～45 nmの構造物が観察された (A)。さらに倍率を上げて観察をしたところ、花卉状にコンポーネントが配置されているのが確認された (B,C)。これにより、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。

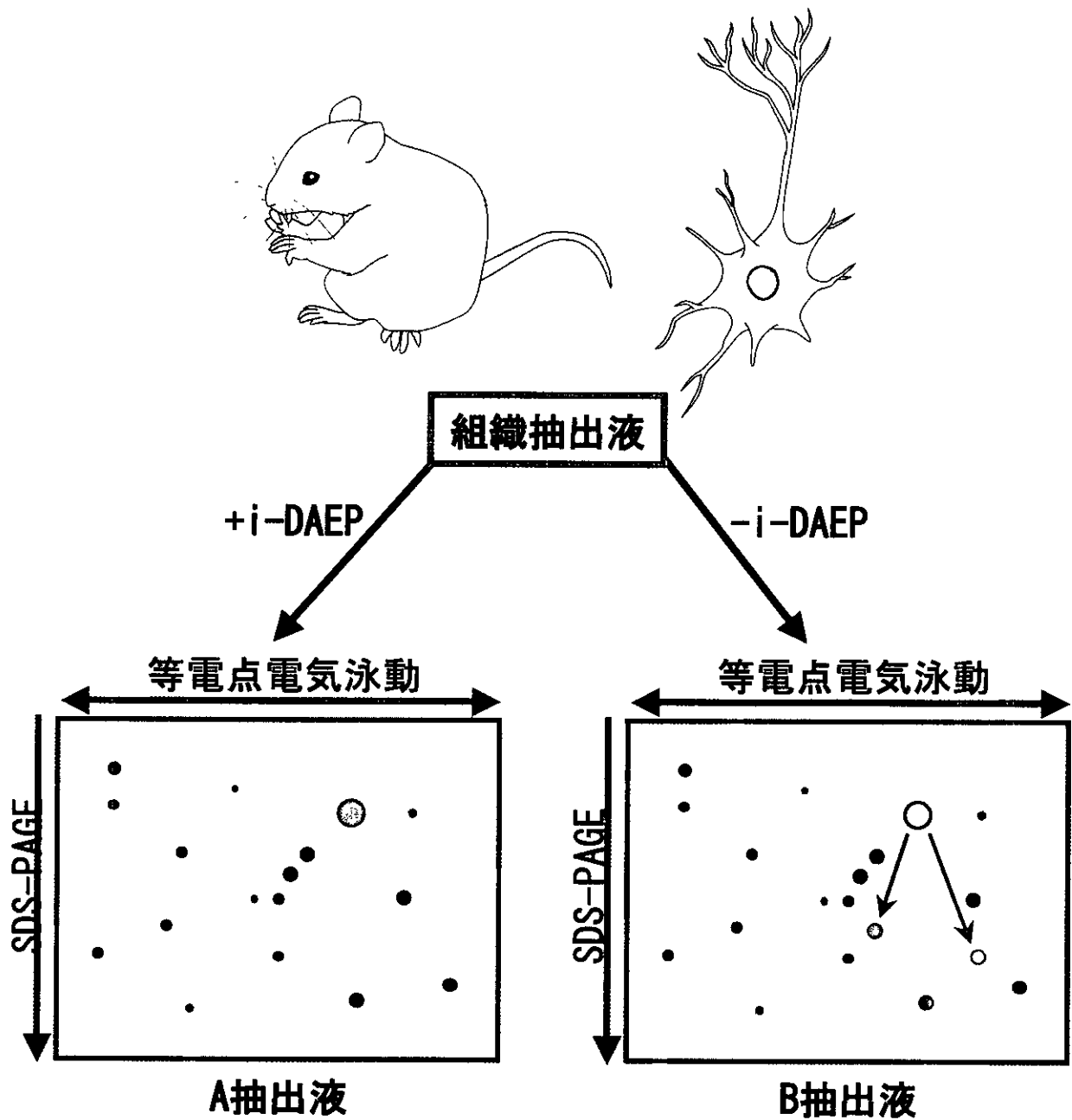
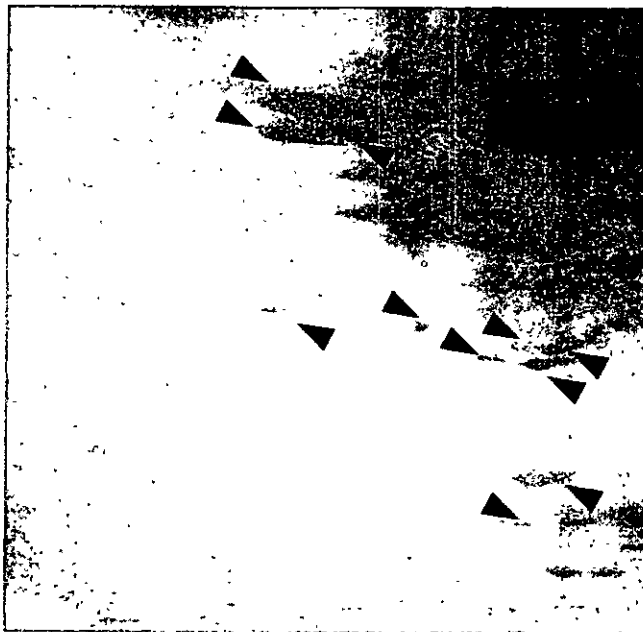


図6：内在性のDAEPを利用したD-Asp含有蛋白質のスクリーニング法の開発

組織抽出液を二等分し、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からの差から D-Asp含有蛋白質を検出する。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。

A抽出液



pH 3

pH 7

B抽出液



図7：マウス脳におけるD-Asp含有蛋白質スクリーニングの結果

120週齢のマウス脳抽出液を用いて解析を行った。等電点電気泳動pHレンジ:3-10 SDS-PAGE：ゲル濃度 4-15%で分離を行った。図中では pHレンジ：3-7、分子量 25,000-75,000の領域を拡大して示してある。その結果、図の赤矢印で示すように A 抽出液 (+i-DAEP) では観察されるものの、B 抽出液 (-i-DAEP) では消失しているスポットが理論どおりに観察された。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β1 鎖) であることが強く示唆された。青矢印は画像のマッチングに用いたランドマークである。

	総活性 <i>units</i>	総蛋白質質量 <i>mg</i>	比活性 <i>units/mg</i>	精製度 <i>-fold</i>	収率 <i>%</i>
総ミトコンドリア	4800	5850	0.821	1	100
CHAPS 抽出画分	1840	885	2.08	2.53	15.1
MACROSEP (100K)	1280	258	4.96	6.05	4.41
DEAE Affi-Gel Blue	790	44.5	17.8	21.6	0.761
RESOURCE Q	371	8.45	43.9	53.5	0.144
Bio-Scale CHT2-I	132	1.44	91.7	112	0.0246
Superose 6 HR 10/30	98	0.44	223	271	0.00752

表 1 : DAEP 精製法の改良

従来、DAEP 精製はウサギ肝臓を試料として行っていたが、今年度は MALDI-TOF-MS による構造解析に適した試料としてマウスを用いて DAEP を精製した。なぜなら、MALDI-TOF-MS による構造解析には、マウスのような充実したデータベースが必要であったからである。また、従来法の欠点であった精製後の DAEP の著しい活性低下を防ぐために、全てのカラム操作に用いる緩衝液に安定化剤として 15%グリセロールを添加した。その結果、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。

抗体名	加えた抗体量	DAEP 残存活性
抗コハク酸 デヒドロゲナーゼ抗体	8 μ g	92%
	2 μ g	98%
抗グルタミン酸 デヒドロゲナーゼ抗体	8 μ g	60%
	2 μ g	78%
抗 GRP75 抗体	8 μ g	57%
	2 μ g	72%
抗 ATP synthase 抗体	8 μ g	60%
	2 μ g	81%
ヤギ IgG	8 μ g	93%
	2 μ g	92%
ウサギ IgG	8 μ g	98%
	2 μ g	98%
マウス IgG	8 μ g	100%
	2 μ g	96%
-		100%

表 2 : 免疫沈降法による DAEP 構成成分の同定

DAEP 活性画分に対して、MALDI-TOF-MS にて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。抗体の代わりに同容の緩衝液を加えたときの DAEP 活性を 100%として、免疫沈降後の残存活性を%で換算してある。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。

厚生労働科学研究費補助金（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のスクリーニング法の開発に関する研究

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・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。そこで平成 13 年度は、DAEP 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アフィニティーラベルし、同定することを行った。

今年度は、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。ヒト脳における実験に先立ち、本法の有効性を実証するために 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。

今後は、実際に様々な症例のヒト脳サンプルを用いて D-Asp 含有蛋白質の動態を調査し、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- $A\beta$ がいつそう蓄積して、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、まず (1) 構造解析に最適な DAEP 精製法を樹立した。また、(2) 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、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、その実用性を確認した。

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 (0.35 M ショ糖、0.2 mM EDTA) 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 (9,000×g、10 分、4°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×g、7 分、4°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°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T¹⁰E)を加え、チューブローテーター(〜1 rpm、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100 K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 CHT2-1)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 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(1 mM) 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 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)。

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°C)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°C 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% プ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の差を解析した。

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。

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 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) 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、寿命の永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の差から D-Asp 含有蛋白質を検出するというものである (図 1)。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 2)。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 β 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。そこで今年度は、DAEP の一次及び高次構造の解析を重点的に行うことを本研究全体の目標として掲げ、そのための精製法の改良に取り組んだ。その結果、比較的安定性の高い DAEP を得ることが出来るようになった。従って、構造解析に限らず、これまで精製後すぐに行わなくてはならなかった実験などを、分担研究者等がそれぞれの作業にあわせて効率的に行える精製標品が得られたことの意義は非常に大きい。しかしながら、現法においても長期保存は難しく、一ヶ月程度の冷蔵保存でその活性は半分以下になってしまう。従って、保存時にはグリセロールの濃度を 50% 程度に高めるなど、さらなる改善が必要であると考えられた。

また、DAEP の基質となるような D-Asp 含有蛋白質の動態を調べるために、i-DAEP を利用したスクリーニング法を開発した。本来は、ヒト脳を試料として実験を行うはずであったが、本学における認可が間に合わず、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。

E. 結論

DAEP の一次及び高次構造の解析を行うために、精製法の改良に取り組んだ。その結果、長期にわたる冷蔵保存によっても活性の低下を遅くする安定性の高い DAEP を得ることが出来るようになった。また、DAEP の基質となるような D-Asp 含有蛋白質の動態を調べるために、i-DAEP を利用したスクリーニング法を開発し、チューブリン関連蛋白質（チューブリン β 1 鎖）がラセミ化していることを発見した。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たため、ラセミ化が進行したものと考えられる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

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

Yamazaki, S., Morita, T., Endo, H., Hamamoto, T., Baba, M., Joichi, Y., Kaneko, S., Okada, Y., Okuyama, T., Nishino, H., Tokue, A.: Isoliquiritigenin suppresses pulmonary metastasis of mouse renal cell carcinoma. *Cancer Lett.* 183(1):23-30, 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.

Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 43(6),
1749-56, 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)

2. 学会発表

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

特になし

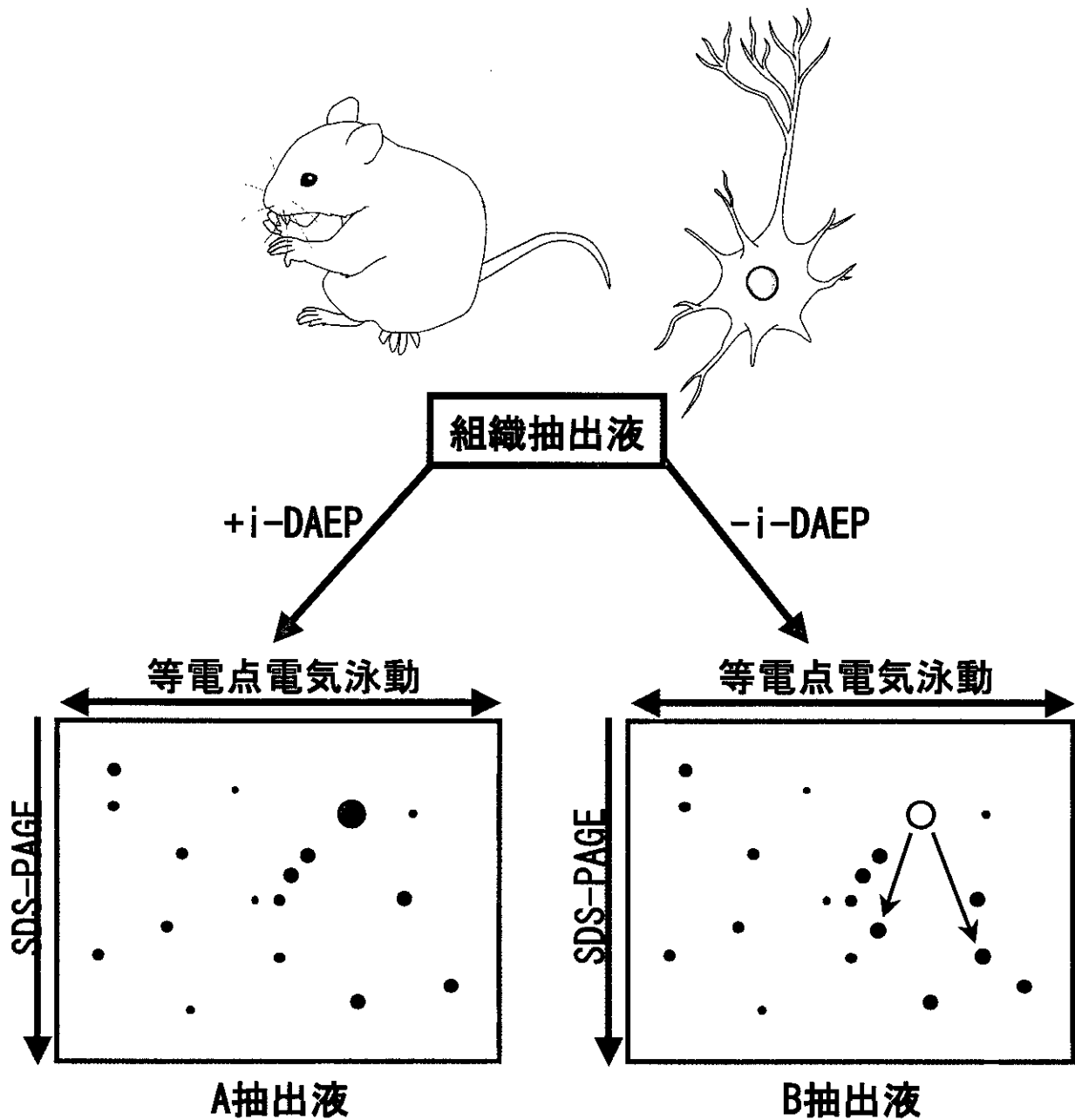
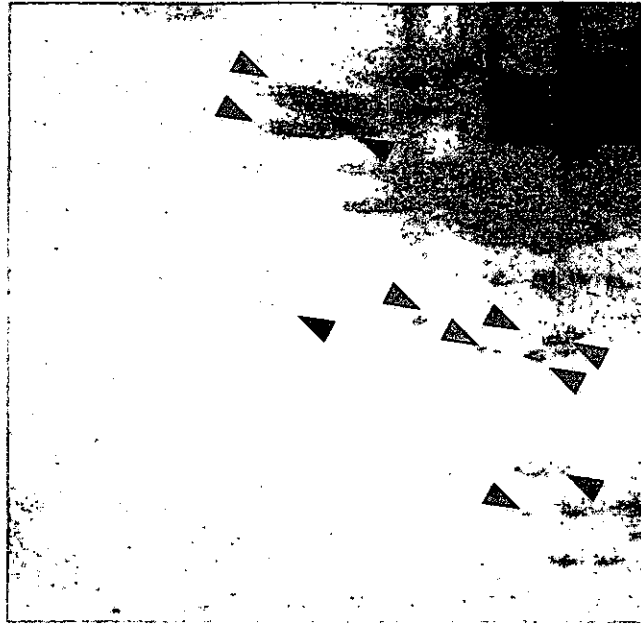


図1：内在性のDAEPを利用したD-Asp含有蛋白質のスクリーニング法の開発

組織抽出液を二等分し、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。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。

A抽出液



pH 3

pH 7

B抽出液



図2：マウス脳におけるD-Asp含有蛋白質スクリーニングの結果

120週齢のマウス脳抽出液を用いて解析を行った。等電点電気泳動pHレンジ:3-10 SDS-PAGE:ゲル濃度 4-15%で分離を行った。図中では pHレンジ:3-7、分子量 25,000-75,000の領域を拡大して示してある。その結果、図の赤矢印で示すように A 抽出液 (+i-DAEP) では観察されるものの、B 抽出液 (-i-DAEP) では消失しているスポットが理論どおりに観察された。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β1鎖) であることが強く示唆された。青矢印は画像のマッチングに用いたランドマークである。

	総活性 <i>units</i>	総蛋白質量 <i>mg</i>	比活性 <i>units/mg</i>	精製度 <i>-fold</i>	収率 <i>%</i>
総ミトコンドリア	4800	5850	0.821	1	100
CHAPS 抽出画分	1840	885	2.08	2.53	15.1
MACROSEP (100K)	1280	258	4.96	6.05	4.41
DEAE Affi-Gel Blue	790	44.5	17.8	21.6	0.761
RESOURCE Q	371	8.45	43.9	53.5	0.144
Bio-Scale CHT2-I	132	1.44	91.7	112	0.0246
Superose 6 HR 10/30	98	0.44	223	271	0.00752

表 1 : DAEP 精製法の改良

従来、DAEP 精製はウサギ肝臓を試料として行っていたが、今年度は MALDI-TOF-MS による構造解析に適した試料としてマウスを用いて DAEP を精製した。なぜなら、MALDI-TOF-MS による構造解析には、マウスのような充実したデータベースが必要であったからである。また、従来法の欠点であった精製後の DAEP の著しい活性低下を防ぐために、全てのカラム操作に用いる緩衝液に安定化剤として 15%グリセロールを添加した。その結果、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。

厚生労働科学研究費補助金（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。さらに、平成 13 年度においては 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。

そこで今年度は、基質誘導体である DAEP 阻害剤をビオチン化したものを精製 DAEP に作用させ、その活性中心を特異的に標識し、MALDI-TOF-MS によって解析することを試みた。その結果、glucose-regulated protein 75 (GRP75)、コハク酸デヒドロゲナーゼ Fp 及び Ip、グルタミン酸デヒドロゲナーゼであることが強く示唆された。さらに、浜本により改良された DAEP 精製法に基づき、マウス肝より抽出した DAEP を非変性アクリルアミド電気泳動法によりさらに精製し、DAEP 複合体を分離した後、MALDI-TOF-MS によってそれらの一次構造を解析した。その結果、Very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase、Diaphorase 1、ATP synthase F1 β subunit、Propionyl Co A-carboxylase α -subunit、Propionyl Co A-carboxylase β -subunit、Acetyl-Co A synthetase 1 が同定された。これらはいずれもミトコンドリアの内膜、もしくはマトリックス画分に局在するエネルギー合成系の必須蛋白質であり、DAEP 自身もまた ATP 合成の際に漏れてくるラジカルにさ

らされ、ラセミ化しやすいことが考えられた。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、との結論に至った。

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、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 の一次構造の解析を重点的に行った。

B. 研究方法

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°C 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°C、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°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。

MALDI-TOF-MS による解析用サンプルの調製

SDS-PAGE 後に PVDF 膜へ転写したバンドを切り出し、1.5ml 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、100mM 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_{PC18} 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。

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。

G. 研究結果

今年度 (平成 14 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) ビオチン化 DAEP 阻害剤により標識された DAEP 活性中心構成成分の MALDI-TOF-MS による同定 (2) DAEP を構成する各成分の MALDI-TOF-MS による同定 (3) 免疫沈降法による DAEP 構成成分の同定、である。

(1) 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

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、スパ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、