

ビオチン化 i-DAEP1、2 の添加 (それぞれ 0.1、1、10、100  $\mu\text{M}$ ) 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相関していた。しかしながら、45kDa 付近のバンドは解析できなかった。

## (2) 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  $E_3$ )、ATP synthase, F1  $\beta$  subunit、Propionyl Co A-carboxylase  $\alpha$ -subunit、Propionyl Co A-carboxylase  $\beta$ -subunit、Acetyl-Co A synthetase 1 (Fatty acid Coenzyme A ligase, long chain 2) が同定された (図 4)。

## (3) 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、(1) および (2) 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 1)。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。

#### D. 考察

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、現在では 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る。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  $\beta$  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、各 DAEP 構成因子のその活性における役割が明らかになり、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。

## E. 結論

MALDI-TOF-MS による DAEP 構成因子の解析の結果、glucose-regulated protein 75 (GRP75)、コハク酸デヒドロゲナーゼ (subunit A, flavoprotein (Fp))、コハク酸デヒドロゲナーゼ (subunit B, iron sulfur (Ip))、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ、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<sub>3</sub>)、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、このうち、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は基質類似体である DAEP 阻害剤との親和性から、その活性中心を構成していると考えられた。特異的抗体による免疫沈降の結果もまた上記の結果を支持している。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

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、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)

## 2. 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)

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)

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

特になし

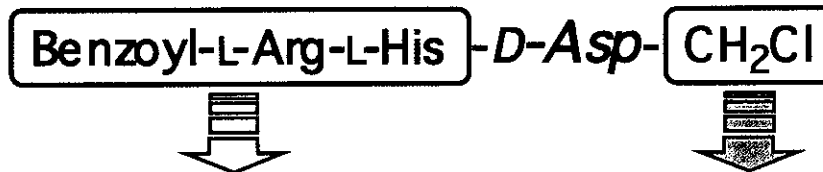
## 2. 実用新案特許登録

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。

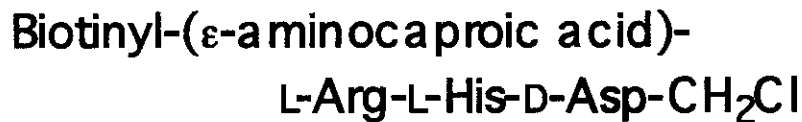
● iDAEP [m.w.: 563.01]



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。

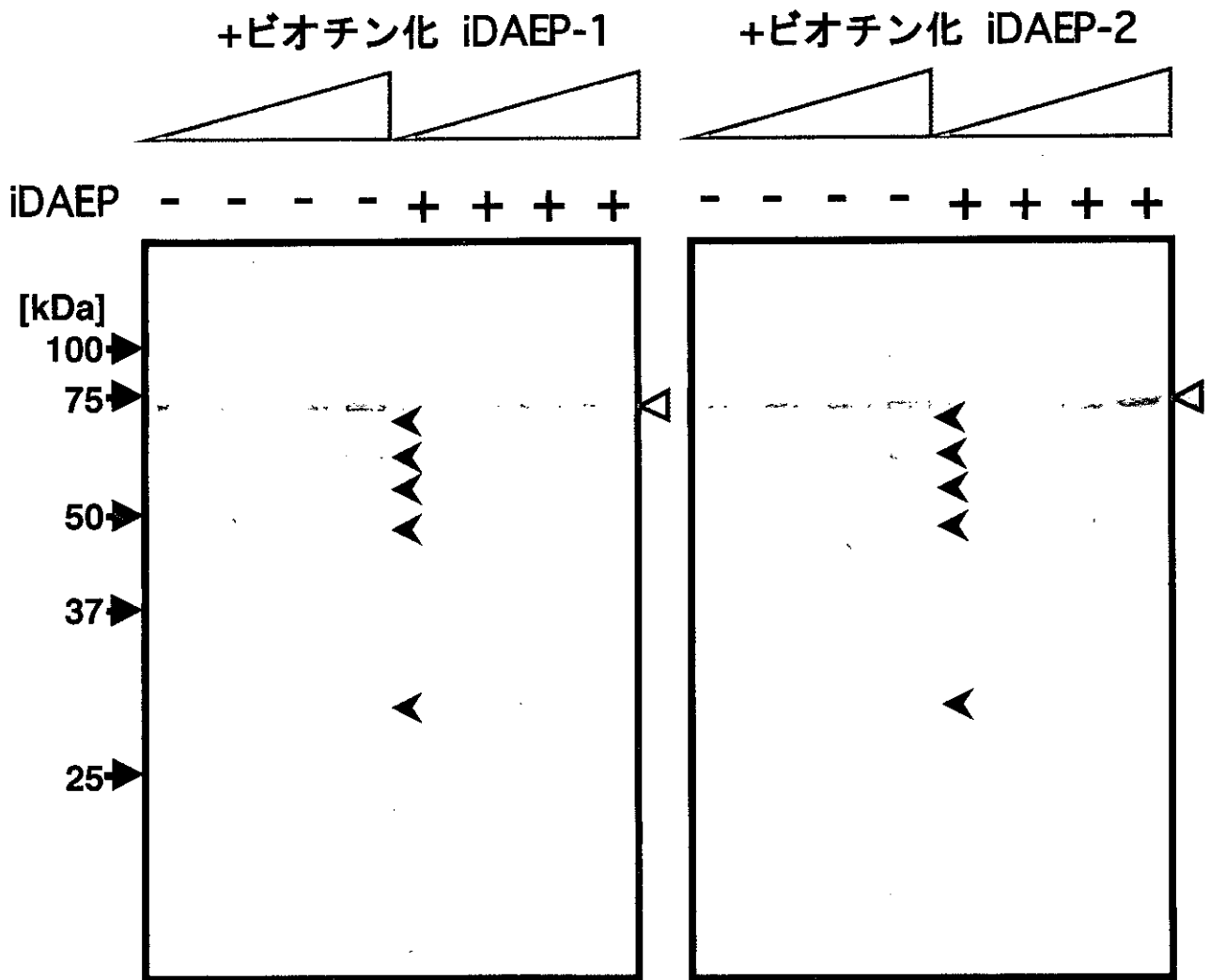
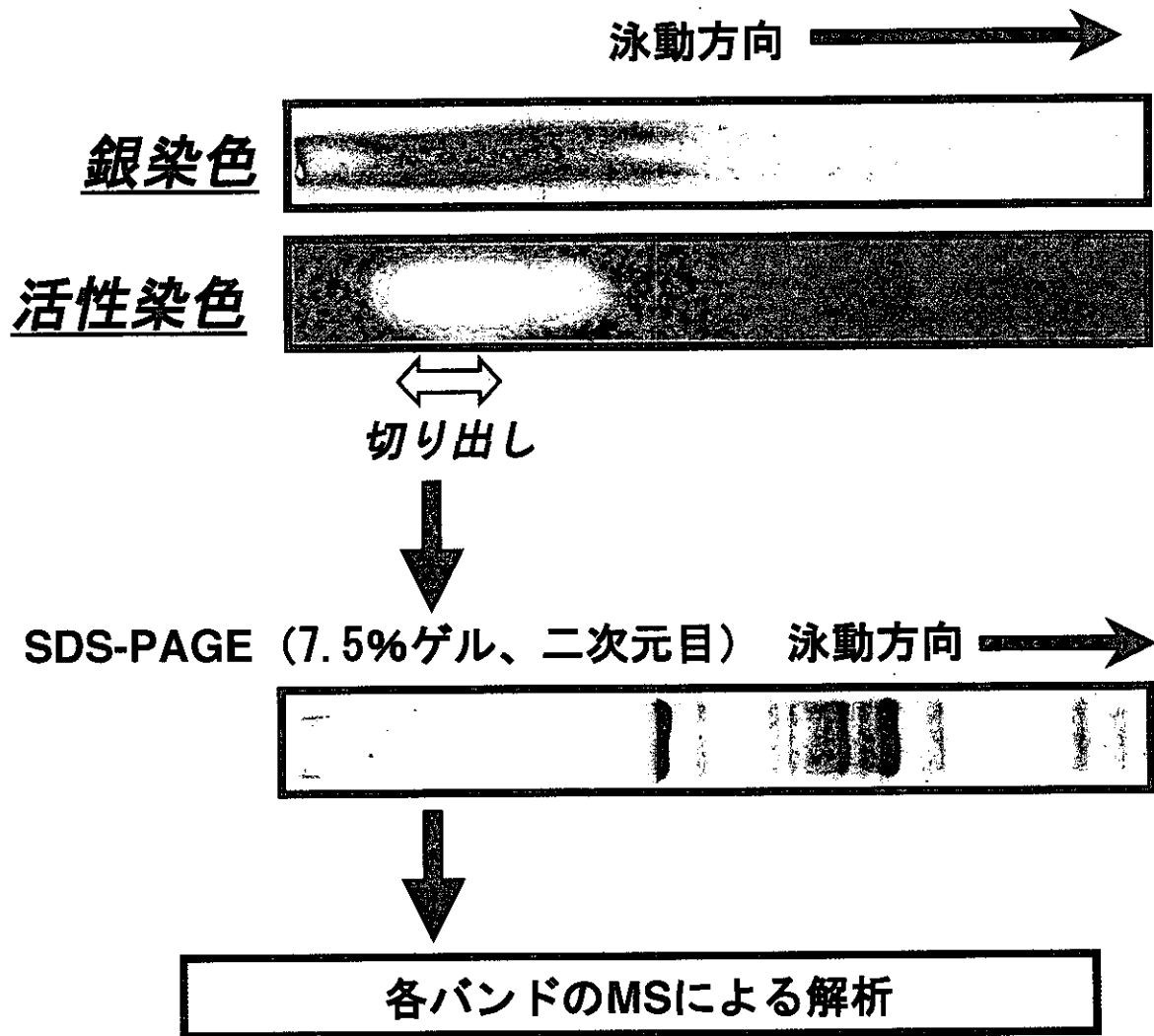


図2： ビオチン化DAEP阻害剤を用いたDAEP活性中心サブユニットのMALDI-TOF-MSによる同定

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  $\mu\text{M}$  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  $\mu\text{M}$  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。

## SDS-PAGE (7.5%ゲル、二次元目)

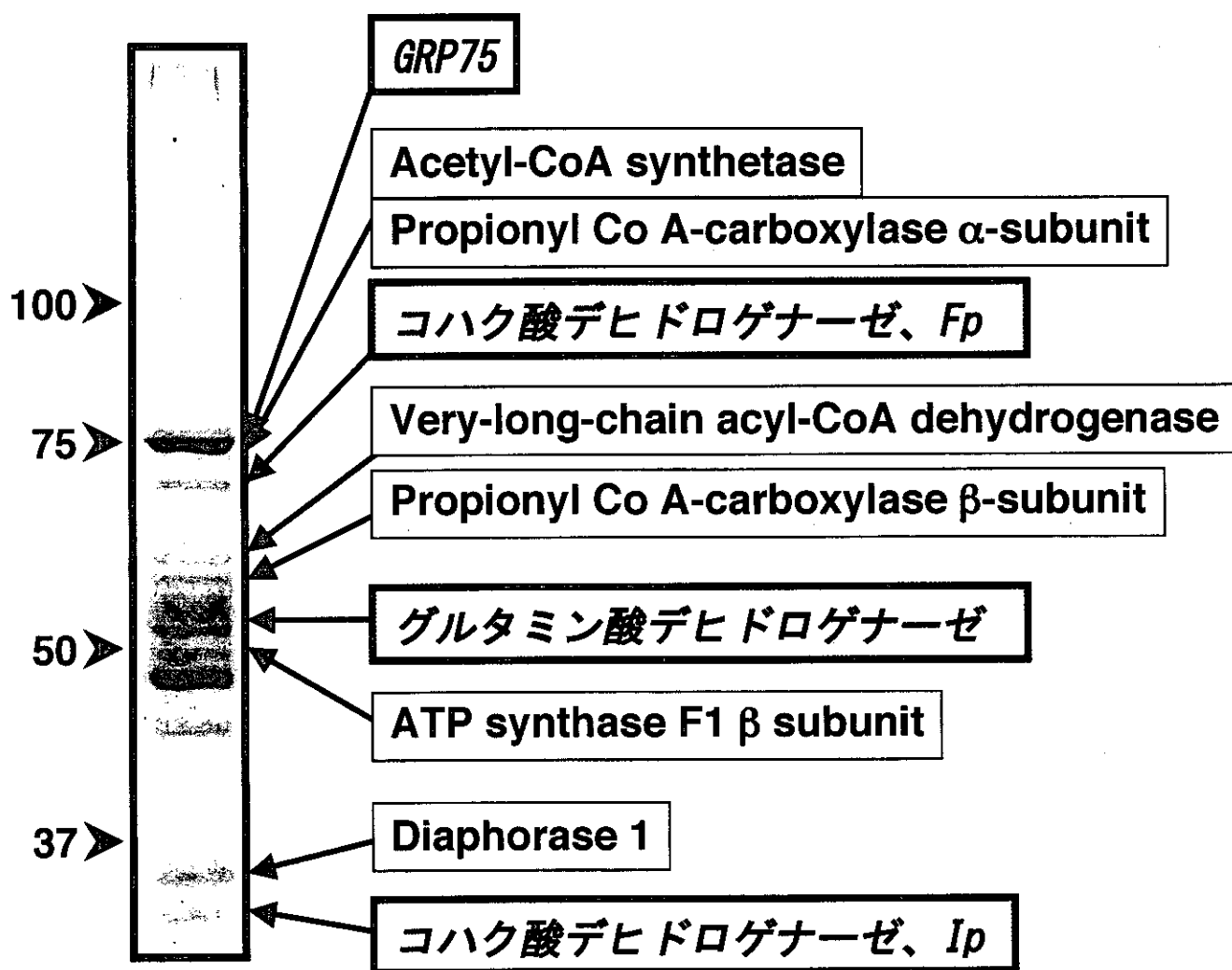


図4 : DAEPを構成する各成分のMALDI-TOF-MSIによる同定

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-MSIによって解析した。その結果、Very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase (極長鎖アシル Co A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  $E_9$ )、ATP synthase, F1  $\beta$  subunit、Propionyl Co A-carboxylase  $\alpha$ -subunit、Propionyl Co A-carboxylase  $\beta$ -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。



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 $\mu$ g	92%
	2 $\mu$ g	98%
抗グルタミン酸 デヒドロゲナーゼ抗体	8 $\mu$ g	60%
	2 $\mu$ g	78%
抗 GRP75 抗体	8 $\mu$ g	57%
	2 $\mu$ g	72%
抗 ATP synthase 抗体	8 $\mu$ g	60%
	2 $\mu$ g	81%
ヤギ IgG	8 $\mu$ g	93%
	2 $\mu$ g	92%
ウサギ IgG	8 $\mu$ g	98%
	2 $\mu$ g	98%
マウス IgG	8 $\mu$ g	100%
	2 $\mu$ g	96%
-		100%

**表 1 : 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。

### III. 研究に関わる生命倫理審議関連書類

1

協 力 研 究 員 委 嘱 状

浜 本 敏 郎 殿

東京都老人総合研究所協力研究員を委嘱します。

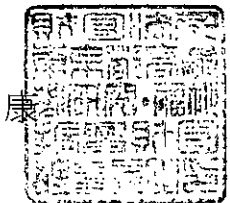
任 期 平成15年 4月 1日から

平成16年 3月31日まで

平成15年 4月 1日

財団法人 東京都高齢者研究・福祉振興財団

理事長 川 崎 裕





# 協 力 研 究 員 委 嘱 状

浜 本 敏 郎 殿

東京都老人総合研究所協力研究員を委嘱します。

任 期 平成 14 年 1 2 月 1 日 から

平成 15 年 3 月 31 日まで

平成 14 年 1 2 月 1 日

財団法人 東京都高齢者研究・福祉振興財団

理事長 川 崎 裕 康



様式第2号

## 協 力 研 究 員 委 嘱 状

木 野 内 忠 稔 殿

東京都老人総合研究所協力研究員を委嘱します。

任 期           平成15年 4月 1日から

平成16年 3月31日まで

平成15年 4月 1日

財団法人 東京都高齢者研究・福祉振興財団

理事長 川 崎 裕 康





# 協 力 研 究 員 委 嘱 状

木野内 忠 稔 殿

東京都老人総合研究所協力研究員を委嘱します。

任 期 平成 14 年 1 2 月 1 日 から

平成 15 年 3 月 31 日まで

平成 14 年 1 2 月 1 日

財団法人 東京都高齢者研究・福祉振興財団

理事長 川 崎 裕 康



様式第2 (1)

## 倫理問題審議結果通知書

平成15年/月27日

申請者

村山 繁雄 殿

東京都老人医療センター倫理委員会

委員長 林 泰



受付番号 110

課 題 名 脳内におけるD-アミノ酸含有蛋白質の動態とその特異的な分解酵素に関する研究

実施責任者 老化臨床神経科学研究グループ リーダー 村山繁雄

先に申請のあった上記課題についての審議結果を下記のとおり通知する。

### 記

審 議 結 果	本委員会に申請された上記課題については、倫理的に問題ないことを確認し承認とする。
------------------	--

倫理問題審議申請書

平成 14 年 12 月 1 日

東京都老人医療センター  
倫理委員会委員長 殿

申請者 都老人研老化臨床神経  
所 属 科学研究グループ  
職 グループリーダー

受付番号 \_\_\_\_\_

氏 名 村山繁雄 印

1 審議事項	医療	<input checked="" type="checkbox"/> 医学研究	医学教育	その他
2 課題名	脳内における D-アミノ酸含有蛋白質の動態とその特異的な分解酵素に関する研究			
3 実施責任者及び実施分担者	(1) 実施責任者 所属 都老人研老化臨床神経科学 職 リーダー 氏名 村山繁雄			
	(2) 分担者 (院内) 副院長 山之内 博	(3) 分担者 (院外) 自治医大医学部生化学 浜本敏郎、木野内忠稔		
4 研究の概要	(1) 目的 脳内において生成、沈着する D-アミノ酸含有蛋白質の動態について、その特異的な分解酵素の視点から研究し、関連疾患に対する治療法や早期診断法の開発を行う。			
	(2) 内容 老化の進行と共に様々な蛋白質に非酵素的な異性化が生じ、D-アミノ酸含有蛋白質が生成することが明らかになりつつある。特にストレスにさらされやすく、寿命の長い細胞が組織を形成している脳では、アミロイドβ蛋白質やタウ蛋白質などについて著しく異性化が起きていることが知られている。それらは、高次構造が変化し、さらに自己凝集して本来の機能を失い、細胞毒性を持つことが <i>in vitro</i> において確認されたことから、蛋白質の異性化は、疾病の新たな発症機構として注目されている。我々はこうした D-アミノ酸含有蛋白質に対する防御機構としての分解酵素、特に D-アスパラギン酸含有蛋白質に特異的な分解酵素を発見し、これまでにその酵素的性質等を検討してきた。本研究では、正常脳と疾患脳、特に AD 脳との間で、本酵素の活性・発現量の変化と D-アミノ酸含有蛋白質の生成・蓄積量について、その相関を調査し、あらたな D-アミノ酸含有蛋白質の発見や加齢との関係について研究するものである。			
	(3) 方法 (面接、アンケート、検体の採取等具体的に記入のこと) 当部門で解析し、Braak stage 4 以上の症例の AD 脳と正常脳の各部位 (frontal lobe、temporal lobe、parietal lobe、occipital lobe など) について組織抽出液を作成し、D-アミノ酸含有蛋白質の活性を測定する。また、同組織中における異性化蛋白質を TCA 沈殿により、遊離の D-アミノ酸と分離した後、HPLC-キラルカラムによる光学分割定量法により、その生成量を同定する。			



様式第1(2)

(4) 対象者及び対象者数	当施設で剖検に付されたBraak stage 4以上の症例のAD脳と正常脳の各部位（前頭・側頭・頭頂・後頭葉）の凍結保存試料を用いる。
(5) 期間	平成15年1月～平成16年3月31日
(6) 実施場所	都老人研老化臨床神経科学、自治医大生化学講座
5 医学上の貢献度の予測	これまでに哺乳類におけるD-アミノ酸含有蛋白質における系統的な調査は行われておらず、どのような蛋白質のどこのアミノ酸残基が異性化しやすいのか、と言った基本的な疑問も解決されていないままである。同時にその代謝系についても全く不明であった。本研究により、D-アミノ酸含有蛋白質の動態が明らかになることによって、関連疾患に対する治療法や早期診断法の開発に新たな道を開くものであると確信している。
6 倫理上の配慮	
(1) 対象者の人権擁護	剖検脳を用い、IDを抹消させるので、人権侵害の可能性はない。
(2) 対象者の不利益及び安全性	剖検脳を用いており、不利益、安全性の問題は生じない。
(3) 対象者への内容の説明と同意を得る方法（説明文書、同意書等がある場合は添付のこと）	老人医療センター剖検承諾書の範囲内である。
7 審議の緊急性及び特に審議を希望する点	特になし。
8 会議の非公開を希望する場合の理由	なし。
9 実施計画書	別紙参照
10 その他	都老人研倫理委員会提出済み。 浜本敏郎、木野内忠稔は老人研研究協力者、特に浜本敏郎は推薦者の基礎研究におけるコンサルタントの一人

(様式 4 号)

平成15年 1 月31日

申請者 老化臨床神経科学研究グループ

村山 繁雄 殿

倫理委員会委員長 高橋 龍太郎 印

平成14年度第3回倫理委員会（平成15年1月21日開催）において審査の結果、次のとおり判定したので、通知します。

受付番号 30

研究課題名	脳内におけるD-アミノ酸含有蛋白質の動態とその特異的な分解酵素に関する研究
研究責任者	老化臨床神経科学研究グループ 村山 繁雄
判定	<input checked="" type="radio"/> 承認      条件付承認      変更の勧告      不承認      非該当
条件、勧告 又は不承認 の理由等	

受付番号	
------	--

財団法人東京都老人総合研究所倫理審査申請書

倫理委員会委員長殿

年 月 日

申請者 所屬・職 老化臨床神経科学研究グループ  
氏 名 副参事研究員 印  
村山繁雄

所屬長の印	
-------	--

1 審査対象	1 研究計画の審査	2 論文等審査
2 研究課題名	脳内におけるD-アミノ酸含有蛋白質の動態とその特異的な分解酵素に関する研究	
3 研究責任者	村山繁雄	
4 研究期間	2003年2月1日 - 2004年3月31日	

5 研究の概要# (研究担当者、目的、対象者、期間、研究内容を簡潔に)

共同研究者： 東京都老人医療センター副院長： 山之内 博

自治医大医学部生化学： 浜本敏郎、木野内忠稔

目的：脳内において生成、沈着するD-アミノ酸含有蛋白質の動態について、その特異的な分解酵素の視点から研究し、関連疾患に対する治療法や早期診断法の開発を行う。

研究内容：老化の進行と共に様々な蛋白質に非酵素的な異性化が生じ、D-アミノ酸含有蛋白質が生成することが明らかになりつつある。特にストレスにさらされやすく、寿命の長い細胞が組織を形成している脳では、アミロイドβ蛋白質やタウ蛋白質などについて著しく異性化が起きていることが知られている。それらは、高次構造が変化し、さらに自己凝集して本来の機能を失い、細胞毒性を持つことが *in vitro* において確認されたことから、蛋白質の異性化は、疾病の新たな発症機構として注目されている。我々はこうしたD-アミノ酸含有蛋白質に対する防御機構としての分解酵素、特にD-アスパラギン酸含有蛋白質に特異的な分解酵素を発見し、これまでにその酵素的性質等を検討してきた。本研究では、正常脳と疾患脳、特にAD脳との間で、本酵素の活性・発現量の変化とD-アミノ酸含有蛋白質の生成・蓄積量について、その相関を調査し、あらたなD-アミノ酸含有蛋白質の発見や加齢との関係について研究するものである。

# 調査票、承諾書がある場合には、写しを1部添付して下さい。

審査対象が「論文等」の場合には、その写しを1部添付して下さい。

6 研究対象（年齢、性、地域住民・施設居住者、健常者・患者、謝礼の有無）

当部門で解析し、Braak stage 4以上の症例のAD脳と正常脳の各部位（frontal lobe、temporal lobe、parietal lobe、occipital lobeなど）について組織抽出液を作成し、D-アミノ酸含有蛋白質の活性を測定する。また、同組織中における異性化蛋白質をTCA沈殿により、遊離のD-アミノ酸と分離した後、HPLC-キラルカラムによる光学分割定量法により、その生成量を同定する。

7 研究方法等（郵送、面接、テスト、検体の採取、回数、直接の担当者）  
別紙参照