

|             |                                                                   |
|-------------|-------------------------------------------------------------------|
| 氏 名         | く げ かつ のり<br>久 下 勝 規                                              |
| 学位(専攻分野)    | 博 士 (理 学)                                                         |
| 学 位 記 番 号   | 理 博 第 3148 号                                                      |
| 学位授与の日付     | 平 成 19 年 3 月 23 日                                                 |
| 学位授与の要件     | 学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当                                           |
| 研 究 科 ・ 専 攻 | 理 学 研 究 科 化 学 専 攻                                                 |
| 学 位 論 文 題 目 | 皮 膚 タ ン パ ク 質 中 の ア ミ ノ 酸 の ラ セ ミ 化 と ラ セ ミ 化 反 応 機 構 に 関 す る 研 究 |

論文調査委員 (主 査) 教 授 藤 井 紀 子 教 授 杉 山 弘 教 授 三 木 邦 夫

### 論 文 内 容 の 要 旨

生体を構成するタンパク質のアミノ酸は全て L-アミノ酸のみであると考えられてきたが、近年様々な組織中で D-アミノ酸が見つかり、疾患との関連が指摘されている。本研究では、ヒトの皮膚の表皮および真皮タンパク質中に D-β-Asp 残基が存在することを見出し、表皮中の D-β-Asp 含有タンパク質についてはその同定を行った。また真皮中の D-β-Asp 含有タンパク質については、Asp 残基のラセミ化反応速度の検討を行い、その反応機構について詳細な研究をおこなった。

#### [1] 表皮の D-β-Asp 含有タンパク質の網羅的解析

ヒトの顔の表皮タンパク質を二次元電気泳動で分離し、D-β-Asp 含有タンパク質を特異的に認識する抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った。その結果、複数の陽性スポットを得たので、これらのタンパク質をゲル内で酵素(トリプシン)処理することにより抽出し、得られたペプチド断片を質量分析後、タンパク質データベースによって同定した。その結果、表皮内で Asp 残基が D-β-体化しているタンパク質は keratin10, keratin1, keratin5, keratin14 であることがわかった。

#### [2] エラスチンペプチド中での Asp 残基のラセミ化反応速度の検討

ヒトの顔の真皮タンパク質中ではエラスチン線維中に D-β-Asp 含有タンパク質が存在することが明らかとなっている。本研究ではエラスチン中に存在する3つの Asp 残基を含むペプチドと同一配列のペプチド、No1:GVADAAAA, No2:REGDPSSS, No3:AGADEGVR を合成した。これらのペプチド中での Asp 残基のラセミ化反応の活性化エネルギーを求めたところ、No1, No2, No3の各ペプチド中で、それぞれ、29.0 kcal/mol, 26.2 kcal/mol, 25.7 kcal/mol と算出された。また、各ペプチド中での Asp 残基の D/L 比が37°C で1.0 (0.99) に達する時間は、No1では101年、No2では約61年、No3で47年であった。これらの結果からエラスチン中の Asp 残基はヒトの一生の間にラセミ化反応を起こしうるのに十分な反応速度を有していることが示された。

#### [3] タンパク質中の Asp 残基のラセミ化反応と二次構造との関連に関する研究

タンパク質中での D-Asp 残基の存在が報告されているにも関わらず、現在まで D-Asp 生成に及ぼすタンパク質の高次構造の影響についての研究は皆無であった。そこで本研究では、ラセミ化反応機構と二次構造との関連を調べるために、αヘリックス構造をとるペプチド (Leu-Asp-Asp-Leu)<sub>8</sub>-Asp と β シート構造をとるペプチド (Asp-Leu)<sub>15</sub> を用いて、Asp 残基のラセミ化反応速度について検討をおこなった。その結果、37°C での反応速度定数は α-ヘリックス構造を有するペプチド中に存在する Asp 残基の方が、β-シート構造を有するペプチド中の Asp 残基よりも10倍近く大きく、α-ヘリックス中の Asp 残基の方が、はるかにラセミ化反応が起こりやすいことが初めて明らかになった。

### 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

生体を構成するタンパク質中のアミノ酸は全て L-アミノ酸のみであると考えられてきたが、近年、加齢や紫外線被曝に

伴って様々な老化組織のタンパク質中で D-アスパラギン酸 (D-Asp) が蓄積, 増加していることが明らかになってきた。タンパク質中の Asp 残基は 5 員環イミドを中間体としてラセミ化し, イミド体の開環時に Asp 残基と隣接残基の結合が  $\alpha$  結合から  $\beta$  結合へと異性化することも過去の研究で見いだされた。本研究ではこうした背景をふまえて, 80 歳のヒトの顔の皮膚の表皮に新たに D- $\beta$ -Asp 含有タンパク質を発見し, そのタンパク質の同定をプロテオーム解析により行った。その結果, 表皮内で Asp 残基が D- $\beta$  体化しているタンパク質は keratin10, keratin1, keratin5, keratin14 であることがわかった。従来, タンパク質中でのアミノ酸のラセミ化は代謝の不活発な部位でしか起こらないとされていたが, 本研究によって初めて表皮のような代謝の活発な組織でも起こることが明らかとなった。生体内での皮膚中の Asp 残基のラセミ化は, 紫外線や加齢による影響によってさらに促進されると考えられる。本研究の結果は D- $\beta$ -Asp が皮膚への紫外線照射や老化の影響を知る上での分子マーカーとして有用であることを明確に示したものであり, 当該分野への貢献は極めて大きい。

一方, 真皮タンパク質中ではエラスチン線維中に D- $\beta$ -Asp 含有タンパク質が存在することが知られていた。エラスチンは難溶性のタンパク質であるので, 上記と同様なプロテオーム解析は困難であった。そこでエラスチン中に存在する 3 つの Asp 残基を含むペプチドと同一配列のペプチドを 3 種類合成し, これらのペプチド中での Asp 残基のラセミ化反応のキネティクス研究を行った。その結果, 37°C でこれらすべてのペプチド中での Asp 残基の D/L 比が 1.0 に達する年数は 50-100 年と算出され, エラスチン中の Asp 残基はヒトの一生の間にラセミ化反応を起こすのに十分な反応速度を有していることが明らかとなった。すでに動脈壁や靱帯のエラスチン中に D-Asp の存在は報告されているが, 本研究の結果は反応速度論的観点からもこれらの報告を強く支持した。

次いで, 申請者は Asp 残基のラセミ化反応とタンパク質, ペプチドの二次構造との関係についての研究を行った。現在まで D-Asp 生成に及ぼすタンパク質の高次構造の影響についての研究は全くない。結果として,  $\alpha$ -ヘリックス中に存在する Asp 残基の方が,  $\beta$ -シート中の Asp 残基よりもはるかにラセミ化反応が起こりやすいことが明らかとなった。本研究は, ペプチド中の Asp 残基のラセミ化が一次構造だけではなく二次構造にも大きく依存することを示した初めての研究である。これは, タンパク質中のどのような部位に Asp 残基のラセミ化が生じるかの予見に繋がり, 今後の当該分野の研究の発展に寄与するものと強く期待される。

以上により, 本論文は博士 (理学) の学位論文として十分に価値あるものと判断し, 口頭試問の結果, 合格として認めたものである。