

氏 名	たか たくみ 高 田 匠
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	理 博 第 3027 号
学位授与の日付	平 成 18 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	水晶体中の D- β -アスパラギン酸含有蛋白質の発現に関する研究

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

論 文 内 容 の 要 旨

生体を構成するタンパク質はすべてL-体のアミノ酸から構成されているが、ヒトの水晶体ではその主成分である α A-クリスタリン中の Asp-58, 151 残基が加齢と共に著しくD-体に反転していることが報告されている。本反応はL-Asp から5員環イミドを経てラセミ化し開環するために、開環時にペプチド結合が α 結合から β 結合へと異性化する反応も同時に生じることが明らかとなっている。タンパク質中にD- β -Asp が生成すればタンパク質の立体構造に大きな影響を与え、タンパク質の不溶化や異常凝集、機能低下を招き、これが白内障の一因となる。当初、D- β -Asp は老人の α A-クリスタリン中で発見されたが、その後の詳細な分析により、1歳未満のヒト水晶体の α A-クリスタリン中にもD- β -Asp が微量に存在することが発見されるに至り、本反応は従来考えていたほど緩慢ではなく、比較的早い段階にて開始されているのではないかと、他のタンパク質中にも広く存在するのではないかという可能性が示唆された。

そこで、申請者は、水晶体の上皮細胞が繊維化する前の段階の代謝、分裂を繰り返している上皮細胞蛋白質中に、既にD- β -Asp 含有タンパク質が存在しているのではないかと考え、D- β -Asp 含有タンパク質を特異的に認識する抗体を作成し、これをプローブとし、ウサギ水晶体上皮由来の培養細胞(NN1003A)中に発現するタンパク質を二次元電気泳動で分離し、ウエスタンブロッティングを行った。その結果、ウエスタンブロッティングでポジティブなスポットが複数得られたので、これらをゲル内酵素消化、質量分析、タンパク質データベース解析によって同定した。その結果、Calponin H2, ラミン, エノラーゼ, α B-クリスタリンなど10種類のD- β -Asp 含有タンパク質が同定された。本研究により微量のD- β -Asp 含有タンパク質を同定する手法が確立した。

申請者はさらに本方法を用いて赤外線照射後のウサギ水晶体より得た可溶性タンパク質の Asp 残基のラセミ化の有無について検討した。赤外線は白内障を誘発する一つの要因であり、赤外線白内障は職業病として広く知られている。また、 α -クリスタリン中の Asp 残基のラセミ化反応に要する活性化エネルギーが、赤外線領域のエネルギーに相当するので、ウサギ水晶体にラセミ化反応の活性化エネルギーと等量のエネルギー量の赤外線を照射した。その結果、赤外線照射後のウサギ水晶体可溶性画分においては、複数のD- β -Asp 含有タンパク質の増加が確認できた。各タンパク質の同定を行った結果、9種類のD- β -Asp 含有タンパク質が確認でき、これらは主として、 β -, γ -, クリスタリンサブユニットであった。これらの β -, γ -クリスタリン family は哺乳類のレンズの主要なタンパク質構成要素であり、そのサブユニット間相互作用により、水晶体の透明性維持と屈折率の調節を担っている。

本研究において、赤外線照射後の外見的に変化のない(白濁の生じていない)タンパク質中でも Asp 残基のラセミ化、異性化が増加していたことから、Asp 残基のラセミ化、異性化は、透明性を保っている段階の水晶体中でも進行している事が示唆された。タンパク質中の Asp 残基のラセミ化、異性化がタンパク質の不溶化と関係している事が明らかになっているので、ラセミ化、異性化が、さらに進行すると水晶体の混濁が生じる可能性が高い。本研究により、微量のD- β -Asp 含有タンパク質の検出が白内障発症の予見に繋がると考えられた。

論文審査の結果の要旨

生体を構成するタンパク質はすべてL-体のアミノ酸から構成されているが、近年、眼の水晶体、脳、皮膚、動脈壁など様々な組織のタンパク質中で加齢にともないD- β -アスパラギン酸(D- β -Asp)が増加し、これらが白内障、アルツハイマー病、皮膚硬化、動脈硬化などの疾患を引き起こす可能性が示されている。従来、タンパク質中でのD- β -Asp生成は代謝の不活発な組織でのラセミ化反応の結果と考えられてきたが、最近、その反応は当初考えられていたような緩慢な反応ではなく、種々のタンパク質中にも生じているという可能性が示唆されてきた。しかし、微量のD- β 含有タンパク質を効率良く検出することは困難であり、これらの問題の解決には、D- β 含有タンパク質を簡便且つ正確に検出する手法の確立が急務であった。

申請者は本研究でまず、D- β -Asp含有タンパク質を特異的に認識する抗体を作成し、これをプローブとし、ウサギ水晶体上皮由来の培養細胞(N/N1003A)中に発現するタンパク質を二次元電気泳動にかけ、上記抗体によるウェスタンブロッティング後、そのポジティブスポットを取り、ゲル内酵素消化後、質量分析、タンパク質データベース解析によって10種類のD- β -Asp含有タンパク質を同定した。これらの各ステップでは様々な困難があったが、申請者は粘り強く問題と向き合い、それらを解決して成果を得た。申請者による微量のD- β -Asp含有タンパク質検出系の樹立はこの分野への貢献として極めて大きなものである。

次いで申請者は本D- β 含有タンパク質検出系により、赤外線照射後のウサギ水晶体から得た可溶性画分のラセミ化の有無について検討した。その結果、赤外線照射後のウサギ水晶体可溶性画分においては、主として、 β -、 γ -、クリスタリンサブユニットにD- β -Aspが存在することが明らかとなった。これらの β -、 γ -クリスタリン familyは哺乳類のレンズの主要なタンパク質構成要素であり、水晶体の透明性維持と屈折率の調節を担っている。本研究で、 β -、 γ -、クリスタリンサブユニットにD- β -Aspが見出されたことは、将来、水晶体の混濁が生じる可能性が高く、白内障発症の予見が期待できる。また、本実験系の樹立により、様々な細胞、組織での微量D- β -Asp含有タンパク質の網羅的解析が可能となる。それらの中で、すでに立体構造の報告されているタンパク質を比較し、Asp残基が生じやすい立体構造上の共通性が判明すればさらに興味深い成果が得られるものと考えられ、申請者の研究成果の意義は高い。

以上のように、本論文は、実験系の開発から有意義な成果を出し、本分野を大きな進展に導くものと評価される。よって、本論文は博士(理学)の学位論文として価値のあるものと認める。また、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。