

京都大学	博士（理 学）	氏名	安岐 健三
論文題目	加齢や紫外線によって生ずるアスパラギン酸の異性化とそのキネティクス		
(論文内容の要旨)			
タンパク質は L-アミノ酸のみの片手構造で成り、そのホモキラリテイは生命活動をしている限り安定であると信じられてきた。しかし近年、眼の水晶体、脳、皮膚、動脈壁などの様々な老化組織のタンパク質中で D-β-アスパラギン酸 (D-β-Asp) が検出され、その量が加齢に伴って増加することが明らかになってきた。タンパク質中でこのような異性体が生じると側鎖の反転や主鎖の伸長が生じるため、タンパク質の立体構造に大きな影響を及ぼし不溶化や機能低下を招く。それゆえ、異性体生成が種々の加齢性疾患を引き起こす原因になると考えられている。紫外線曝露はこのような反応を促進するリスクファクターの一つであるが D-β-Asp 化のみならず、リジン(Lys)などへの非酵素的糖化(最終産物：Nε-carboxymethyllysine(CML))も促進することが知られている。両者は共通の組織に検出されているが、その関連性は不明である。そこで、本研究ではマウスの皮膚に UVB を照射し、CML と D-β-Asp 化が共に増加するタンパク質をそれぞれの抗体を用いてプロテオミクスの手法で同定した。その結果、CML と D-β-Asp 化が同時に生じているタンパク質は表皮のケラチンであることが初めて判明した。次いで Lys の CML 化が Asp の異性化と直接関連するのかどうかを確認するために Lys と Asp 残基を含むペプチドを合成し Lys を CML 化したのち、加熱実験により Asp 残基のラセミ化率を CML 化していないペプチド中での Asp のラセミ化率と比較した。その結果、両ペプチド中での Asp のラセミ化率に差異はなかった。この結果から紫外線曝露の皮膚では CML 化が直接的に Asp のラセミ化を促進するのではなく、紫外線照射後の炎症により局所的に生じた pH 変化などが CML 化と Asp のラセミ化を同時に惹起したのではないかと考えられた。 次に、本研究で用いた抗 D-β-Asp 含有ペプチド抗体の性質について種々の異性体ペプチドを合成し、本抗体の反応性を詳細に検討した。その結果、本抗体は D-β-Asp-Ala という配列を持つペプチド又はタンパク質を特異的に検出することが明らかとなった。生体内での D-β-Asp 含有タンパク質は Asp の隣接残基が Ala であることが多いので本抗体の有用性が示された。 最後にペプチド中の Asp の異性化反応の速度論的解析を行った。タンパク質中の L-α-Asp はスクシンイミド中間体を経て容易に L-β、D-α、D-β の 3 種の異性体へと変化する。本研究では白内障水晶体中で著しい異性化が生じている αA-クリスタリンの Asp58 周辺と同一配列のペプチド (TVLD⁵⁸SGISEVR) を選択し Asp58 を上記の 4 種の異性体に置換して合成した。これを用いてキネティクス実験を行いそれぞれの各異性体の速度定数を算出した。その結果、β 体は α 体より 4～5 倍程度、D 体は L 体に比べ 2 倍程度安定であった。また、ヒトの寿命範囲内での Asp58 の異性化の経時変化の計算を行った結果、L-β-Asp の相対量は 5 歳前後で 80%程度まで増加しそれ以降は減少すること、D-β-Asp は徐々に増加し 50 歳前後で主成分になることがわかった。これらの結果は実際の 80 歳ヒト水晶体中での Asp 異性体量の実測値と合致しており、本研究で行ったシミュレーションの有用性が確認できた。			

(論文審査の結果の要旨)

タンパク質構成アミノ酸はすべて L-体であるが、白内障やアルツハイマー病等の原因タンパク質中には D-β-アスパラギン酸 (D-β-Asp) が検出されている。タンパク質中でこのような異性体が生じると側鎖の反転や主鎖の伸長が生じるため、タンパク質の立体構造に大きな影響を及ぼし不溶化や機能低下を招く。それゆえ、これらの異性体生成が種々の加齢性疾患を引き起こす原因になると考えられている。紫外線曝露は Asp 異性化反応を促進するリスクファクターの一つとして知られている。申請者は本論文で次の 3 項目について研究し、タンパク質中での Asp 異性化反応の機構解明に大きく貢献した。1) 皮膚への紫外線曝露による D-β-Asp 化と非酵素的糖化の関連性、2) 抗 D-β-Asp 含有ペプチド抗体の性質、3) Asp 異性化反応の速度論的解析

1) 皮膚への紫外線曝露: 皮膚への紫外線曝露は D-β-Asp 化のみならず、リジン(Lys) などへの非酵素的糖化(最終産物: Nε-carboxymethyllysine(CML))も促進することが知られているが、その関連性は不明であった。そこで、申請者はマウスの皮膚に UVB を照射し、CML と D-β-Asp 化が共に増加するタンパク質をプロテオミクスの手法で同定し、それが表皮のケラチンであることを初めて明らかにした。さらに CML と D-β-Asp を含むペプチドを合成し、Lys の CML 化が直接 D-β-Asp 化に関与するかどうかを検討したが、直接の関与ではないことを明らかにした。この結果から皮膚で CML 化と Asp の D-β-化が共通してみられる理由は UVB 照射で生じた炎症による局所的な pH 変化によるものではないかという重要な示唆がなされた。

2) 抗 D-β-Asp 含有ペプチド抗体の性質: 本研究で用いた抗 D-β-Asp 含有ペプチド抗体の詳細な性質を調べるために種々の配列の異なる異性体ペプチドを合成し、本抗体の反応性を ELISA で検討した。その結果、本抗体は D-β-Asp-Ala という配列を特異的に検出することが明らかとなった。生体内での D-β-Asp 含有タンパク質は Asp の隣接残基が Ala であることが多いので本抗体の有用性が示された。

3) ペプチド中の Asp 異性化反応の速度論的解析: タンパク質中の L-α-Asp はスクシンイミド中間体を経て容易に L-β、D-α、D-β の 3 種の異性体へと変化する。本研究では白内障水晶体中で著しい異性化が生じている αA-クリスタリンの Asp58 周辺と同一配列のペプチド (TVLD⁵⁸SGISEVR) で Asp58 を上記の 4 種の異性体に置換したペプチドを合成し、キネティクス実験を行い、各異性体の速度定数を算出した。その結果、β 体は α 体より 4~5 倍程度、D 体は L 体に比べ 2 倍程度安定であることが初めてわかった。この結果は実際の老化組織で D-β-Asp 異性体含有蛋白質が蓄積されている理由をよく説明している。さらにヒトの寿命範囲内での Asp58 の異性化の経時変化の計算を行った。申請者は L-β-Asp の相対量が 5 歳前後で 80% 程度まで増加しそれ以降は減少すること、D-β-Asp は徐々に増加し 50 歳前後で主成分になることを明確に示した。これは生体内での異性体の相対量と合致しており、シミュレーションが有効であることを示している。このような研究は従来、全く行われておらず、本研究が初めてであり、当該分野の研究の発展に大きく貢献した。

よって、本論文は博士 (理学) の学位論文として価値あるものと認める。また、平成 25 年 1 月 16 日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った。その結果合格と認めた。

要旨公開可能日: 年 月 日以降