

老化による蛋白質中の D- アミノ酸生成と加齢性疾患

藤井 紀子*

1. 生命の起原とキラリティ

我々の生命活動に重要な役割を果たしている蛋白質や核酸はアミノ酸や糖が構成ユニットで、生体内で合成されている。しかし、生命発生前の原始地球上では放射線、紫外線など様々なエネルギーが原始地球大気に付与されることにより無生物的にアミノ酸や糖などの有機物が合成されていたと考えられている。アミノ酸や糖には鏡像異性体 (L 体, D 体) が存在するので、無生物的に合成されたアミノ酸や糖はラセミ体として合成された可能性が高い。アミノ酸は互いに縮重合して高分子化し原始蛋白質へと進化していくが、ポリペプチドが高次構造を形成するためには L 体, D 体のどちらか一方の片手構造でなければならない。L, D-アミノ酸が混在したポリペプチドでは膨大な数のジアステレオマーが生成されてしまい、立体構造の形成が難しいからである。地球誕生は 45 億年前、最初の生命体の出現が 38 億年前とされているが、この間にアミノ酸は L 体, 糖は D 体を選択された。鏡像異性体の物理的、化学的性質は同じなので、なぜ、L-アミノ酸と D 糖のセットが選択されたのか、なぜ、D-アミノ酸と L 糖のキラリティは選択されなかったのか? などの数々の疑問は未解決のままになっている。理由は不明であるが、生命誕生以前にアミノ酸は L 体, 糖は D 体を選択され、すべての生命体の蛋白質は完全なる L-アミノ酸ポリマーであり、DNA や RNA の構成成分であるデオキシリボース、リボースは D 糖の完全片手構造世界が樹立した。従って、生命体の中ではこのホモキラリティが変化することはないと考えられていた。

2. 高等生物中の D- アミノ酸

前項で述べたように地球上のすべての生命体は進化の過程で完全なる L-アミノ酸ホモキラリティの成立によって生まれた。従って生命体にとっては D-アミノ酸は無縁なものであると定義され、バクテリアの細胞壁¹⁾ や抗生物質中の D-アミノ酸²⁾ 以外、ほとんど、研究対象になっていなかった。しかし、近年、遊離型の D-セリン (D-Ser) が哺乳類の脳内³⁾ に、遊離型の D-アスパラギン酸 (D-Asp) が哺乳類の脳や精巣⁴⁾ などに存在し、重要な機能 (NMDA 受容体への結合など) を担っていることが明らかとなってきた。脳内では D-Ser や D-Asp の濃度が減少すると NMDA 受容体が機能不全を引き起こし、統合失調症の発症に関与すると考えられている。さらに、D-Ser や D-Asp はその代謝と合成に関与する酵素^{5,6)} が存在し、それらの酵素によって D-Ser や D-Asp の量がコントロールされているなど、L-アミノ酸ワールドにおける D-アミノ酸の機能やその生理的意義が続々と解明されている。

3. 老化によって生じる蛋白質構成アミノ酸のホモキラリティの破綻

前述したように生命体は長い進化の過程で L-アミノ酸のホモキラリティが確立して誕生した。従って地球上のすべての生物の体内で合成される蛋白質はすべて L-アミノ酸から構成されている。L-アミノ酸ホモキラリティは蛋白質のフォールディング形成、機能にとってきわめて重要であり、生命体が生きている限り、維持されており、生きている間に D-アミノ酸へと反転することはないと考えられてきた。しかし、近年、眼の水晶

*京都大学原子炉実験所・放射線生命科学部門・基礎老化研究部門 (寄附研究部門) 客員教授

表 1. 種々の蛋白質中に含まれる D-Asp と関連疾患

組織	蛋白質	D-Asp の部位	関連疾患
水晶体	α A-クリスタリン	Asp 58, 76, 84, 151	加齢性白内障
水晶体	α B-クリスタリン	Asp 36, 62, 96	加齢性白内障
水晶体	β B2-クリスタリン	Asp 4	加齢性白内障
網膜	?	?	加齢性黄斑変性症
結膜	?	?	瞼裂斑
角膜	?	?	角膜変性症
歯	フォスフォフォリン	?	?
骨	I型コラーゲンC末端テロペプチド	Asp 1211	ペーチェット病? 骨粗鬆症?
動脈	エラスチン?	?	動脈硬化
靭帯	エラスチン?	?	?
脳	ミエリン	Asp 23, 34, 48, 145	多発性硬化症
脳	β -アミロイド	Asp 1, 7, 23	アルツハイマー病
脳	ヒストン H2B	Asn 25	?
皮膚	エラスチン	?	皮膚硬化
皮膚	コラーゲン	?	皮膚硬化

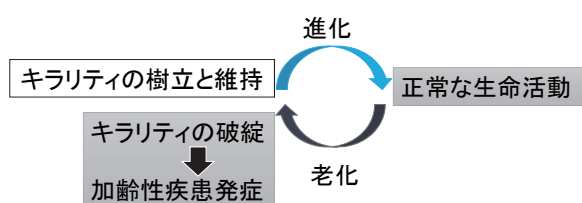


図 1. キラリティから見た進化と老化

体⁷⁻¹⁰, 歯¹¹, 骨¹², 動脈壁¹³, 靭帯¹⁴, 脳^{15, 16}, 皮膚^{17, 18}などの老化組織でD-アスパラギン酸(D-Asp)が加齢に伴って増加し, 白内障, 加齢性黄斑変性症, 動脈硬化, アルツハイマー病, 等と関連することが明らかになってきた(表1). これは生命の起原と進化の過程で獲得したアミノ酸のホモキラリティが, 一個体の老化の過程で失われているという驚くべき事実を示しており, 進化と老化の関連は図1のように表すこともできる. 生命体におけるD-アミノ酸の存在は生命科学研究にパラダイムシフトをもたらしている. 本総説では筆者らが研究対象としてきた(i)水晶体蛋白質中のD-Aspの局在, (ii)水晶体蛋白質中におけるAsp異性体生成機構, (iii)Asp残基の異性化による蛋白質の構造機能変化, (iv)最近の結合型D-アミノ酸の分析法の開発について述べる.

4. 水晶体蛋白質中のD-Aspの局在の決定

ヒトの水晶体は主に α -, β -, γ -クリスタリンという蛋白質で構成されている. α -クリスタリンは α A-, α B-クリスタリンという2種類のサブユニッ

ト(分子量:約20,000)から成り40量体という大きなヘテロポリマー形成し, β -, γ -クリスタリンと弱い相互作用をすることにより水晶体の透明性を保持していると考えられている.しかし,加齢に伴い,これらクリスタリン中に変化が生じ,凝集を引き起こし,水晶体が濁り白内障に至ると考えられている.一方で水晶体中では加齢に伴ってD-Asp残基が増加することが報告されていた¹⁹.D-Asp残基の増加は蛋白質の構造変化を誘起するので,蛋白質の凝集と関連する.しかし水晶体中のどの蛋白質のAsp残基が異性化しているのか?水晶体中に含まれるすべてのAsp残基が異性化しているのか,あるいは特定のAsp残基がD-体化されているのかについては不明で,D-アミノ酸生成機構も未解明であった.筆者らはまず,水晶体の主要構成成分であるクリスタリンを単離精製し,トリプシンで処理し,得られたペプチド断片を分取し,質量分析によってペプチドマッピングを行った後,加水分解し,得られたアミノ酸をジアステレオマー誘導体にして,HPLCでアミノ酸のD-体化率を求めた.その結果, α A-クリスタリンのAsp-58, Asp-151残基⁷,と α B-クリスタリン中のAsp-36, Asp-62残基⁸のみが部位特異的に著しくD-体化していることが初めて明らかになった. α A-, α B-クリスタリン中にはそれぞれAsp/Asn残基が10数残基含まれているが,他のAsp/Asn残基はほとんどD-体

化していなかった。同時に、L-Asp 残基から D-Asp 残基への反転反応は隣接アミノ酸残基との結合が α 結合から β 結合へと異性化 (β -Asp 化) する反応を伴っていることが明らかになった。 β -Asp 体はエドマン分解レジスタントであるという性質を利用してプロテインシーケンサーで分析した^{7,8)}。

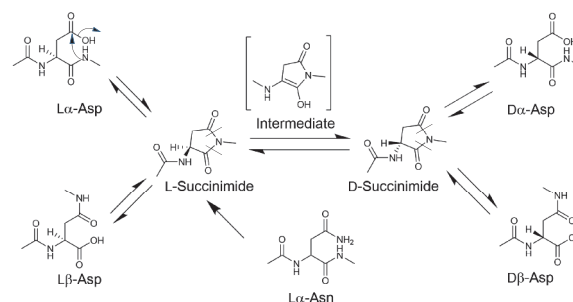


図2. 蛋白質中での Asp/Asn 残基の異性化機構

5. Asp 異性体生成機構の解明

L-Asp 残基から D-Asp 残基への反転反応は隣接アミノ酸残基との結合が α 結合から β 結合へと異性化 (β -Asp 化) する反応を伴っているという実験結果から蛋白質中での Asp 残基の異性化機構は図2に示すように L α -Asp 残基から5員環イミド体を経て L β -, D α -, D β -Asp へと反転, 異性化することが明らかとなった。Asp 残基の異性化は5員環イミドを中間体として進行するので, 5員環イミドの生成のしやすさが, 本反応のドライビングフォースとなる。5員環イミドは, Asp 残基のC端側の隣接残基の立体障害が小さいときに生じやすいので, 隣接残基がグリシン, セリン, アラニンなどのアミノ酸の時に形成されやすい。 α A-クリスタリン中の Asp-58, Asp-151 残基の隣はセリン, アラニンなので, 本条件を満たしていると

いうことも分かった。

6. D-アミノ酸生成がもたらすクリスタリンの凝集, 解離, 機能変化

蛋白質中に一か所でも D-体が生成すると側鎖が反転し, β -体化によって主鎖が伸長するため, L β -, D α -, D β -Asp 体の生成は蛋白質の構造に大きな変化をもたらす。そのため, 本来, 可溶性であるクリスタリンは不溶化し, 凝集化すると考えられる。事実, 図3に示すように80歳代のヒト不溶性 (WI) 画分中の α A-クリスタリン中の Asp-58, 76, 84, Asp-151 残基, α B-クリスタリン中の Asp-36, 62, 96 残基の異性化率は可溶性 (WS) 画分中のこれらの残基よりも著しく高かった¹⁰⁾。また, 異常凝集化した80歳代のヒトの α -クリスタリン会合体は著しく大きく, 不均一であり, α -ク

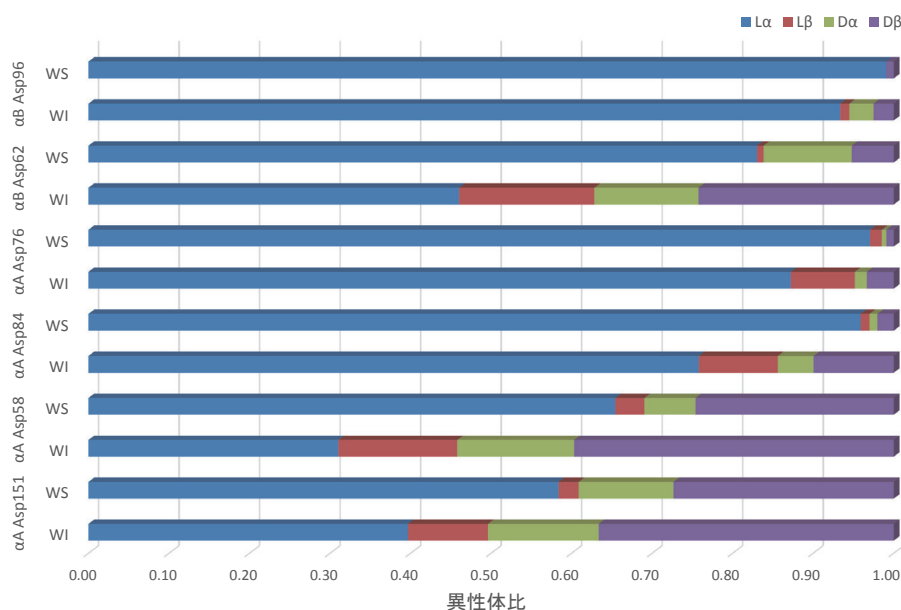


図3. ヒト水晶体不溶性 (WI), 可溶性 (WS) 画分中の α A-, α B-クリスタリン中の Asp 残基の異性体率

リスタリン会合体が有するシャペロン活性（他のクリスタリンの凝集を抑制する機能）は正常な α -クリスタリンのシャペロン活性の40%ほどの活性しかないことも分かった²⁰⁾。さらに、最近、 α A-, α B-クリスタリン中のAsp残基の異性化は α -クリスタリン会合体の解離も惹起することが明らかとなった^{21, 22)}。これらの結果からAsp残基の異性化は α -クリスタリン会合体の凝集や解離を引き起こし、会合体としての安定性が失われ、不溶化し、白内障に至るものと考えられた。

7. 結合型D-アミノ酸分析の進歩

蛋白質中のD-アミノ酸の分析は容易ではない。組織中に多数存在する蛋白質を抽出し、一個一個の蛋白質をすべて単離精製し、これらすべての蛋白質を酵素処理してペプチドに断片化し、それを分離、分取後、ペプチドを特定しながら、並行してこれらのペプチドを加水分解し、4項で述べた方法でD-アミノ酸分析を行なわなければならない。膨大な時間を要するという欠点があった。我々はこの問題を解決するために試料を精製することなく、酵素処理を行ったペプチドを液体クロマトグラフィー質量分析(LC-MS/MS)法によって分析することにした。本法は蛋白質中のアミノ酸の酸化、脱アミド化、リン酸化などの翻訳後修飾分析に広く用いられている。これらの翻訳後修飾は何も生じていない部位と比較すると質量に差があるので、LC-MS/MSでは容易に検出できる。一方、Asp残基の異性体を含むペプチドは質量に差がない。そのため、質量分析装置ではアミノ酸の異性体分析は不可能と思われていた。しかし、我々は以前の研究においてAsp異性体を含むペプチドはそれぞれLC上で分離することを見出していた²³⁾。これを応用すれば、同一質量、同一配列のペプチドがLC上で複数のピークに分離していれば、そのペプチドがAsp異性体を含むペプチドということになる。老人の水晶体の α A-クリスタリンのAsp58残基は従来のジアステレオマー誘導体法により著しく異性化していることは

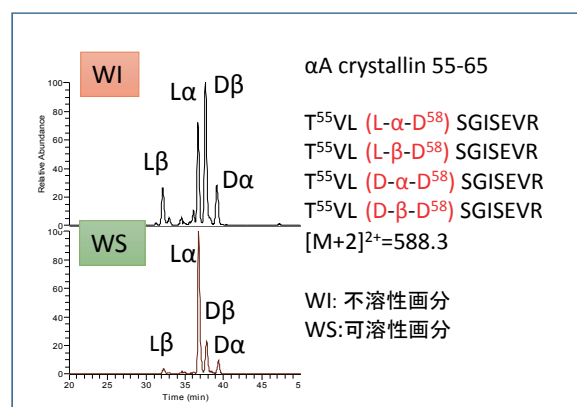


図4. LC-MS/MSを用いた新規のAsp異性体探索・同定法

わかっていた(表1)ので、まずAsp58残基を含む α A-クリスタリンの tryptic peptide, すなわち、 $T^{55}VL D^{58}SGISEVR^{65}$ ($[M+2]^{2+}=588.3$) について、横軸を時間、縦軸を目的のペプチドの質量の強度でプロットした(図4)。このようなマスクロマトグラムでは、ペプチドの質量で、ピークを選択するため、本来、一つの質量を有するペプチドについては一本のピークしか得られないはずであるが、このペプチド中ではAsp58残基が異性化し、4種の異なった異性体を含んでいるため、4本のピークとして検出された(図4)。これにより、マスクロマトグラムで複数のピークを有するペプチドが異性体含有ペプチドであることが明確となり、このマスクロマトグラム法により蛋白質中の異性体部位と異性体比が決定できるようになった。異性体の種類の特定は4種類の異性体を含む標品ペプチドを合成し、LC上で試料ペプチドと標品ペプチドの溶離時間の比較で行った。図4から明らかのように α A-クリスタリンのAsp58残基の異性化はWS画分より、WI画分の方が著しく進んでおり、その異性体はD β -Aspが最も多く、つづいて、L β -、D α -体が多く、これらの異常異性体の合計は本来のL α 体よりも多くなっていることが分かった¹⁰⁾。これは従来法の分析結果と合致していた^{7, 8)}。本法により分析時間は大幅に短縮された。

8. 終わりに

地球上のすべての生物由来のアミノ酸はL-アミノ酸のみから成るとするのはこれまでの生命科学の常識であった。しかし、本稿で示したように、D-アミノ酸は遊離型、結合型（ペプチド、蛋白質中のアミノ酸）を問わず、生物に広く存在していることが明らかになってきた。生命科学分野におけるキラル化学が進展しなかった理由は、そもそも生物試料にD-アミノ酸は存在しないという思い込みと、L-アミノ酸とD-アミノ酸の物理化学的性質は全く同じなので、微量D-アミノ酸を検出する簡便な分析法が存在しなかったことにある。しかし、近年のD-アミノ酸分析法の著しい進歩により微量D-アミノ酸が検出されるようになり、D-アミノ酸研究は従来の概念を打破し、長足の進歩を遂げている。遊離型のD-アミノ酸とL-アミノ酸の物理化学的性質は同じであるが、蛋白質や糖などのキラル物質と反応すると、両者は全く異なる相互作用を示す。身近な例では、我々の味覚はD-アミノ酸とL-アミノ酸の味を見分けている。一般に、D-アミノ酸の方がL-アミノ酸より甘味を呈することが分かっている。ペプチド中では一残基のD-アミノ酸がそのペプチドになくってはならない生理活性をもたらしている¹⁾。蛋

白質中のD-アミノ酸は加齢の過程で非酵素的に自然に生じ、異常凝集化して疾患を引き起こしている（図5）。ペプチド結合中でD-アミノ酸が生じると周辺の立体構造の変化や他の蛋白質との相互作用が異なるためである。L-アミノ酸から成るホモキラルな生命世界においても一方の鏡像異性体であるD-アミノ酸を考慮した研究を行うことは、まさに「鏡」に映すかのごとく、今まで不明であった生命現象の一端が理解可能となることを示している。

9. 参考文献

- 1) Ollivaux C., Soyeyz D. and Toullec J. Y.: Biogenesis of d-amino acid containing peptides/proteins: where, when and how? *J Pept Sci*, **20**: 595-612, 2014.
- 2) Gause G. F.: Gramicidin S. *Lancet*, **2**: 46-47, 1946.
- 3) Nishikawa T.: [Metabolism and functions of brain D-serine in mammals: relevance to neuropsychiatric disorders]. *Seikagaku*, **80**: 267-276, 2008.
- 4) Homma H.: [Biochemical behavior and function of free D-aspartate in the

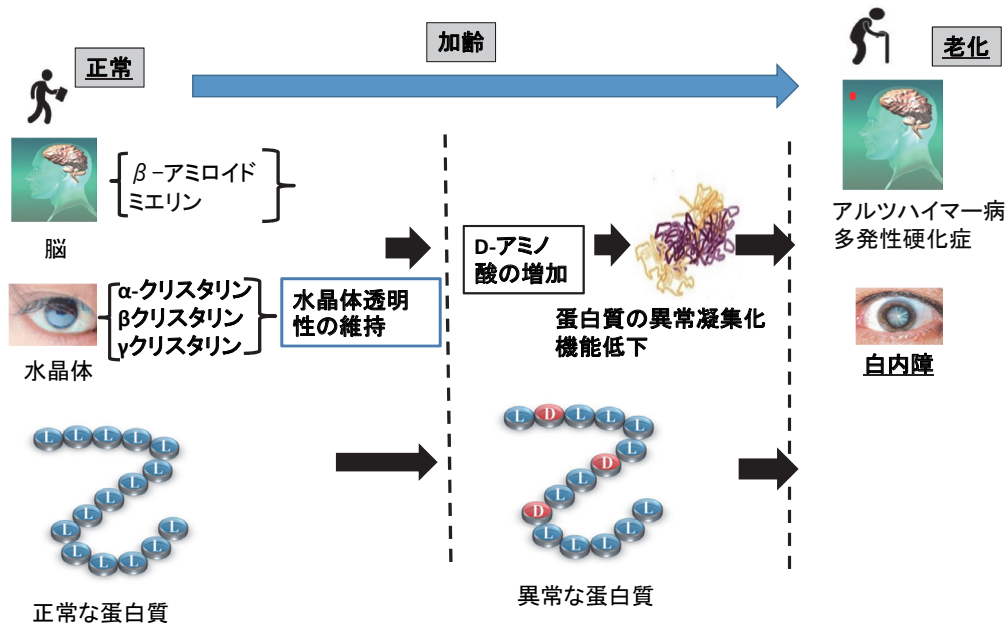


図5. キラリティから見た加齢とその疾患群

- mammalian body]. *Seikagaku*, **80**: 277–286, 2008.
- 5) Fukui K.: [Disease-oriented enzymology in D-amino acid metabolism]. *Seikagaku*, **80**: 344–351, 2008.
 - 6) Yoshimura T.: [Structure and function of amino acid racemases]. *Seikagaku*, **80**: 324–330, 2008.
 - 7) Fujii N., Satoh K., Harada K., et al.: Simultaneous stereoinversion and isomerization at specific aspartic acid residues in alpha A-crystallin from aged human lens. *J. Biochem*, **116**: 663–669, 1994.
 - 8) Fujii N., Ishibashi Y., Satoh K., et al.: Simultaneous racemization and isomerization at specific aspartic acid residues in alpha B-crystallin from the aged human lens. *Biochim Biophys Acta*, **1204**: 157–163, 1994.
 - 9) Fujii N., Kawaguchi T. and Sasaki H.: Simultaneous stereoinversion and isomerization at the Asp-4 residue in betaB2-crystallin from the aged human eye lenses. *Biochemistry*, **50**: 8628–8635, 2011.
 - 10) Fujii N., Sakaue H., Sasaki H., et al.: A rapid, comprehensive liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS)-based survey of the Asp isomers in crystallins from human cataract lenses. *J Biol Chem*, **287**: 39992–40002, 2012.
 - 11) Masters P. M.: Stereochemically altered noncollagenous protein from human dentin. *Calcif Tissue Int*, **35**: 43–47, 1983.
 - 12) Cloos P. A., Fledelius C.: Collagen fragments in urine derived from bone resorption are highly racemized and isomerized: a biological clock of protein aging with clinical potential. *Biochem J*, **345 Pt 3**: 473–480, 2000.
 - 13) Powell J. T., Vine N. and Crossman M.: On the accumulation of D-aspartate in elastin and other proteins of the ageing aorta. *Atherosclerosis*, **97**: 201–208, 1992.
 - 14) Ritz-Timme S., Laumeier I. and Collins M.: Age estimation based on aspartic acid racemization in elastin from the yellow ligaments. *Int J Legal Med*, **117**: 96–101, 2003.
 - 15) Roher A. E., Lowenson J. D., Clarke S., et al.: Structural alterations in the peptide backbone of beta-amyloid core protein may account for its deposition and stability in Alzheimer's disease. *J Biol Chem*, **268**: 3072–3083, 1993.
 - 16) Friedrich M. G., Hancock S. E., Raftery M. J., et al.: Isoaspartic acid is present at specific sites in myelin basic protein from multiple sclerosis patients: could this represent a trigger for disease onset? *Acta Neuropathol Commun*, **4**: 83, 2016.
 - 17) Fujii N., Tajima S., Tanaka N., et al.: The presence of D-beta-aspartic acid-containing peptides in elastic fibers of sun-damaged skin: a potent marker for ultraviolet-induced skin aging. *Biochem Biophys Res Commun*, **294**: 1047–1051, 2002.
 - 18) Ritz-Timme S., Laumeier I. and Collins M. J.: Aspartic acid racemization: evidence for marked longevity of elastin in human skin. *Br J Dermatol*, **149**: 951–959, 2003.
 - 19) Masters P. M., Bada J. L. and Zigler J. S., Jr.: Aspartic acid racemisation in the human lens during ageing and in cataract formation. *Nature*, **268**: 71–73, 1977.
 - 20) Fujii N., Shimmyo Y., Sakai M., et al.: Age-related changes of alpha-crystallin aggregate in human lens. *Amino Acids*, **32**: 87–94, 2007.
 - 21) Sakaue H., Takata T., Fujii N., et al.: Alpha B- and betaA3-crystallins containing d-Aspartic acids exist in a monomeric state.

Biochim Biophys Acta, **1854**: 1–9, 2015.

- 22) Takata T. Fujii N.: Isomerization of Asp residues plays an important role in alphaA-crystallin dissociation. *FEBS J*, **283**: 850–859, 2016.
- 23) Fujii N., Fujii N., Kida M., et al.: Influence of Lbeta-, Dalpha- and Dbeta-Asp isomers of the Asp-76 residue on the properties of alphaA-crystallin 70–88 peptide. *Amino Acids*, **39**: 1393–1399, 2010.