

# 老化とD-アミノ酸 -白内障根絶へ向けて-

「場と反応」領域 藤井 紀子

## 1. 研究のねらい/目的

「生物の身体を構成しているタンパク質のアミノ酸はL-体で、それは生命活動をしている限り不変である。」というのが従来の生化学の常識であった。しかし、筆者は老化したヒトの水晶体ではその主要成分である $\alpha$  A,  $\alpha$  B-クリスタリン中に部位特異的にD-アスパラギン酸(Asp)が存在する事を見いだした。このような現象は若い正常の水晶体では見られない。水晶体では $\alpha$  A,  $\alpha$  B-クリスタリンが会合して $\alpha$ -クリスタリンと呼ばれる高次会合体を形成しており、 $\alpha$ -クリスタリンは他のクリスタリンと相互作用し、秩序だった高次構造を保持することによって水晶体の透明性を維持している。それゆえ、 $\alpha$  A,  $\alpha$  B-クリスタリン中のD-アミノ酸の存在はこれらのタンパク質の高次構造だけでなく、 $\alpha$ -クリスタリンの会合状態、及び他の水晶体タンパク質との相互作用にも影響を及ぼし、不溶化、凝集を招き、水晶体混濁の一因になると考えられる。本研究ではこのような反応の機構を解明し、反応を創出する場の制御を目指し、白内障治療への手がかりを探る事を目的とした。

## 2. 研究成果

### 2-1 タンパク質中でのAsp残基の反転/ラセミ化、異性化反応機構

#### (a)一次構造上での影響

$\alpha$  A-クリスタリン中ではAsp-151, Asp-58残基がD-体へと反転( $D/L > 1.0$ )、 $\alpha$  B-クリスタリン中ではAsp-36, Asp-62残基がラセミ化 ( $0 < D/L < 1.0$ ) していた。特に、タンパク質中のアミノ酸残基のD/L比が1.0を越える (D-体の割合がL-体よりが多くなる) 反転反応は $\alpha$  A-クリスタリンが初めての例であった。 $\alpha$  A,  $\alpha$  B-クリスタリン中のこれらのAsp残基は、D-アミノ酸生成と同時にペプチド結合が通常のア結合から $\beta$ 結合へと異性化が生じていた。この結果から、図1aに示すような5員環イミドを中間体とした反応機構が考えられた。すなわち、タンパク質、ペプチド中のAsp残基はL- $\alpha$ -Asp残基であるが、側鎖のカルボニル基が隣接残基のNの電子対に攻撃されることによって、L-スクシイミジル残基が形成される。次

いで、 $\alpha$ -炭素に結合していたプロトンが脱離し、中間体[I]のようなプロキラルな状態となる。中間体[I]は同一平面上にあり、次にプロトンが付加するとき、この平面の上から、プロトンが付加するとD-スクシイミジル基が、下からの付加ではL-スクシイミジル基が生成される。このとき、プロトンが上から付加する確率と下から付加する確率は同じなので、L-スクシイミジル基とD-スクシイミジル基は等量生成される。これがラセミ化反応である。これらのイミド体は不安定なのですぐに開環して $\alpha$ -型と $\beta$ -型の2種の異性体ができる。すなわち、D-イミド体からはD- $\alpha$ -Asp残基、D- $\beta$ -Asp残基が生成され、L-イミド体からはL- $\alpha$ -Asp残基、L- $\beta$ -Asp残基の計4種の異性体が生成される。以上のようにAsp残基のラセミ化はイミド上で起こるのであるから、D-Asp残基の生成はイミド形成の

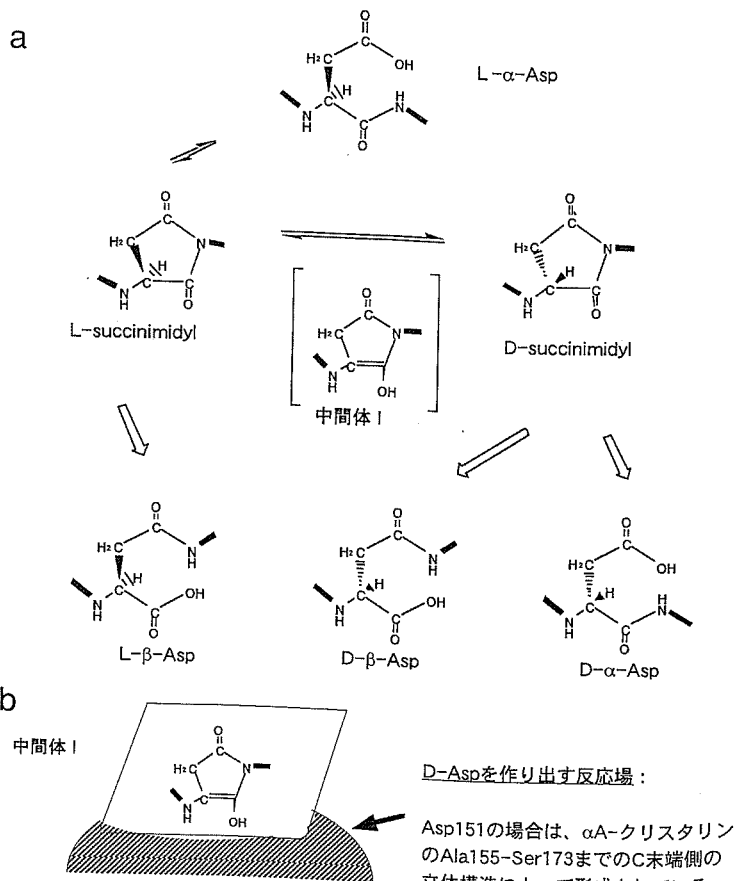


図1 タンパク質中のAsp残基の反転、ラセミ化、異性化の機構

表I ヒト水晶体の $\alpha$ A、 $\alpha$ B-クリスタリン中で反転、ラセミ化、異性化が見られたAsp残基周辺の配列

ペプチド	アミノ酸配列	AspのD/L比	結合
$\alpha$ A-T6	TVLD <sup>58</sup> SGISEVR	3.10	$\beta$
$\alpha$ A-T18	IQTGLD <sup>151</sup> ATHAER	5.70	$\beta$
$\alpha$ B-T3	LFDQFFGEHSDLF...	0.92	$\beta$
$\alpha$ B-T4	APSWFDTGLSEM(O)R	0.57	$\beta$
$\alpha$ B-T16	LSSDGVLT	0.01	$\alpha$
$\alpha$ B-T16'	VNGPR	0.02	$\alpha$

A: アラニン、D: アスパラギン酸、E: グルタミン酸、F: フェニルアラニン  
 G: グリシン、H: ヒスチジン、I: イソロイシン、K: リジン、L: ロイシン  
 M: メチオニン、N: アスパラギン、P: プロリン、Q: グルタミン  
 R: アルギニン、S: セリン、T: トレオニン、V: バリン、W: トリプトファン、  
 Y: チロシン

起こり易さに依存する。ではどの様な時にイミドが形成しやすいのであろうか？一つは Asp 残基の隣接残基の側鎖が小さいアミノ酸（グリシン(Gly)、アラニン(Ala)、セリン(Ser)など）の時にイミド形成が起こりやすい。表1に示すように  $\alpha$  A-クリスタリンでは Asp-151、Asp-58 残基の隣接残基がそれぞれ、Ala、Ser 残基で両方ともイミド形成には立体障害の少ないアミノ酸であり、この反応が起こりやすい環境下にあるといえる。これを確認するために、 $\alpha$  A-クリスタリン中の Asp-151 を含む T18 ペプチド、Asp-58 を含む T6 ペプチド、 $\alpha$  A-クリスタリン中では全くラセミ化していなかった Asp-84 を含む T10 ペプチド(コントロール) と同一配列の合成ペプチド（十数残基のアミノ酸から成る）を用いて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イクスについて検討したところ、ラセミ化の起こり易さはその一次構造に依存して  $\alpha$  A-クリスタリン中と同様に T18 > T6 > T10 の順で同じであった。

しかし、表1に示すように  $\alpha$  B-クリスタリン中でラセミ化が見いだされた Asp-62 残基と Asp-36 の隣接残基はそれぞれ、スレオニンとロイシンといういずれもかさ高いアミノ酸であり、Asp 残基のイミド形成には寄与しにくい。しかも  $\alpha$  B-クリスタリン中には他に Asp140-Gly, Asn146-Gly というイミド形成に最も都合の良い配列がありながら、これらの残基にはラセミ化や異性化が全く生じていなかった(表1)。それ故、反転やラセミ化反応が一次配列だけに依存して生じるとは考えにくい。 $\alpha$  B-クリスタリン中の Asp-62 残基は近傍の Met-68 が酸化されていることから、表面のフレキシブルなところに存在している可能性が高く、Asp 残基のラセミ化に及ぼす高次構造上の寄与は Asp 残基がタンパク質中のフレキシブルな場所に位置しているときに生じやすいのではないかと考えられた。

## (b) タンパク質中とペプチド中での D-Asp 生成機構の相違

さらに、本研究ではタンパク質中と上述の合成ペプチド中では D-Asp 生成反応に関して大きな相違があることを見いだした。合成ペプチド中ではどのように条件を設定しても、Asp 残基の D/L 比が 1.0 を越えることはなく（ラセミ化反応にとどまっている）、 $\alpha$  A-クリスタリン中で生じている Asp 残基の反転(D/L > 1.0)は見られなかった。この相違は次の様に説明できる。

反転反応は図 1a の L-イミド体  $\rightleftharpoons$  D-イミド体の平衡が D-体側に偏ったため、図 1b で示すように L-スクシイミジル基からプロトンが脱離した中間体 [I] へのプロトンの付加の方向が制御されているためと考えられる。すなわち、この平面の下方にはプロトンの攻撃が出来ないような場（図 1b 斜線部）が存在し、プロトンの付加が上方からだけに制約されている

ためD-イミド体が優位に合成され、その結果、D-Aspが生成されたと考えられる。図1b斜線部で示した反応場は $\alpha$  A-クリスタリン自身の立体構造によって形成されており、それゆえ、このような立体構造のない短い合成ペプチドでは反転が起こらず、ラセミ化反応にとどまったものと考えられる。

### (c)老人性白内障の $\alpha$ A-クリスタリン中に存在するAsp残基の反転を誘導する反応場

老人性白内障の水晶体から得た $\alpha$  A-クリスタリンはタンパク質化学的にnative（変性していない状態）に単離精製したものである。上述したD-Aspを誘導する反応場がnativeな $\alpha$  A-クリスタリンの立体構造の中に存在するとすれば、逆に $\alpha$  A-クリスタリンを変性条件下に曝したときにはAsp残基の反転は生じないはずである。そこで、 $\alpha$  A-クリスタリンを熱変性、及び6M尿素で変性させ、 $\alpha$  A-クリスタリンをランダムコイル状態にした後(CDスペクトルで確認)、Asp-151残基のD/L比を測定したところ、 $\beta$ 体に異性化したD-Asp残基はD/L比が著しく減少した（表2）。 $\alpha$ 体のAsp-151残基及び他のAsp残基ではD/L比の変化が見られなかった。この結果は老人性白内障の $\alpha$  A-クリスタリン中ではnativeな状態を保持するためには異性化したAsp-151、Asp-58残基がD-体である必要性があることを示唆している。

一方、老人性白内障の水晶体から得た $\alpha$  A-クリスタリンは様々な修飾（リン酸化、脱アミド化、酸化、ペプチド結合の切断など）を受けている。 $\alpha$  A-クリスタリンは173個のアミノ酸残基から成るが、今回新たに老人性白内障の水晶体から得た $\alpha$  A-クリスタリンはその内、約1/3が154番目のヒスチジン（His）残基と155番目のアラニン（Ala）残基の間で切断されていることがわかった。つまり、1-173の $\alpha$  A-クリスタリンと1-154の切断 $\alpha$  A-クリスタリンが混在しており、後者に含まれるAsp-151残基には1-173の $\alpha$  A-クリスタリン中に見られた反転がなく、わずかなラセミ化にとどまっていた（表2）。このことはAsp-151残基の反転には $\alpha$  A-クリスタリン中のAla-155以降の配列及び、この配列が作り出す $\alpha$  A-クリスタリンのnativeな構造が必要であることを示している。

表2 種々の状態における老人の $\alpha$  A-クリスタリン中のAsp-151残基のD/L比

$\alpha$ A-crystallin	Asp151 $\beta$	Asp151 $\alpha$
Native (1-173)	5.70	0.43
70°C denature (1-173)	2.17	0.43
Urea denature (1-173)	1.21	0.33
Truncated (1-154)	0.30	0.06

上記の変性実験の結果と合わせて考えると図1b斜線部で示した反応場は $\alpha$  A-クリスタリン自身が作り出すAla-155以降のC末端配列による立体構造によって形成されたものと考えられた。

## 2-2 4種類のAsp残基の異性体を含むT18 peptideのラマン散乱

$\alpha$  A-クリスタリンのT18 peptideと同一配列のpeptideをAsp残基の4種類の異性体(L- $\alpha$ -Asp, L- $\beta$ -Asp, D- $\alpha$ -Asp, D- $\beta$ -Asp)で合成し、2次構造がどのように変化するかをラマン散乱スペクトルで測定した。その結果、L- $\alpha$ -Aspを含むT18 peptideのみが $\beta$ シート構造をとっており、他はランダムとなることがわかった。

## 2-3 紫外線照射の影響

上述したようにタンパク質中のAsp残基は生体内の体温程度の低い温度で、老化という自然の過程で比較的容易にD-体へと反転、ラセミ化し、同時に異性化する事を示した。この反応はどのような環境因子と関わっているのでしょうか？筆者らは最近、紫外線照射がこの反応を促進し、白内障を誘発することを明らかにした。すなわち、6週令の若いラットの水晶体を組織培養し、これにUV-B(MAX 312nm)を照射(5J/cm<sup>2</sup>)すると透明なレンズが白濁し、この白濁したレンズから得られた $\alpha$  A-クリスタリンのAsp-151残基にのみ、ラセミ化と異性化が見られた。この結果は前項で述べた老化したヒト水晶体と同一部位での同一反応であり、UV-Bが若い透明な水晶体に白濁とAsp残基のラセミ化/異性化をもたらし、促進したと考えられる。UV-B照射によるタンパク質の高次構造の揺らぎが立体配置上不安定なAsp-151残基のラセミ化、異性化を誘導したものと考えられた。

## 3. 今後の展開

- 1)  $\alpha$  A-クリスタリン中でのD-Aspを誘導する立体構造情報を得るためにX線構造解析を行う。そのためには結晶化の条件検討に多量のサンプルを必要とするため、 $\alpha$  A-クリスタリンの大量発現系を構築する。
- 2) D-Aspを含むペプチドに特異的に反応する抗体を現在調製中であるが、抗体を得ることが出来たら水晶体内のD-Aspの分布を見る。
- 3)  $\alpha$ -クリスタリンには $\beta$ -、 $\gamma$ -クリスタリンの凝集を防ぐシャペロン機能があることが明らかとなっているが、 $\alpha$ -クリスタリン自身に本研究で示したような反転、ラセミ化、異

性化がある場合にそのシャペロン機能に影響はないか？この反応の制御は可能であろうか？この反応を元に戻す機構はないのか？等々…。まだ興味ある問題が未解決のまま残されている。21世紀の高齢化社会で、老後の"quality of life"を考える際には白内障の問題は避けて通れない。少しでも発症を遅らせることは出来ないであろうか？D-アミノ酸を分子指標として白内障発症のメカニズムを考えていきたい。

#### 4. 論文リスト

- 1) D-アミノ酸を通して生物を見るー老化、発生、生命の起源  
藤井紀子 化学 50, 286-291 (1995)
- 2) Kinetic Study of Racemization of Aspartyl Residues in Model Peptides of  $\alpha$  A-Crystallin.  
Fujii, N., Momose, Y. and Harada, K. Int. J. Pep. & Protein Res. 48, 118-122 (1996)
- 3) タンパク質中のアミノ酸残基の反転、ラセミ化、異性化とその機構  
-老化との関連 藤井紀子 生化学 68, 1641-1645 (1996)
- 4) The Racemization of the Asp-151 Residue in  $\alpha$  A-Crystallin is Induced by Ultraviolet-B Irradiation. Fujii, N., Momose, Y. and Exp. Eye Res. 63, Suppl 1 S.4-5 (1996)
- 5) The Specific Racemization and Isomerization of the Asp Residue of  $\alpha$  A-Crystallin Due to UV-B irradiation. Fujii, N., Momose, Y., Ishibashi, Y., Uemura, T., Takita, M. and Takehana, M. Exp. Eye Res. 65,99-104 (1997)
- 6) 白内障を化学する 藤井紀子 化学と生物 35, 346-350 (1997)
- 7) The Conformation Formed by the Domain after Alanine-155 Induces the Inversion of Aspartic Acid-151 of  $\alpha$  A-Crystallin from the Aged Human Lens. Fujii, N., Momose, Y., Yamagaki, Y., Uemura, T. Takita, M., Nakanishi, H. and Ishii, N. (1997) Biophys. Biochem. Res. Commun. (in press)
- 8) The Mechanisms of Simultaneous Stereoinversion, Racemization, and Isomerization at Specific Aspartyl Residues of Aged Lens Protein. Fujii, N., Momose, Y., Takita, M., and Ishii, N. (1997) The Mechanisms of Ageing and Development (in submitted).
- 9) The Racemization at a Specific Aspartyl Residue in  $\alpha$ A-Crystallin from Aged and Irradiated Mice. Fujii, N., Momose, Y., Yamagaki, Y., Takita, M., Nakanishi, H. and Kodama, T. (1997) Curr. Eye Res. (in submitted)
- 10) The Structure of the Vitreous Body. Kodama, M, Ogiso, M., Tateishi, T., Wang, B., Ojima, S., Fujii, N., Matsuura, T., Hara, Y., Saishin, M. and Yamauchi, A. (1997) (in submitted)
- 11) Structural Change of Human  $\alpha$  A-Crystallin Model Peptides Contained L-Aspartic acid or D-Aspartic acid Detected by Laser Raman Spectroscopy with CCD Detector. Mizuno, A., Shimo-oka, T. and Fujii, N. (1997) (in submitted)