

D-アミノ酸で測る老化の研究

京都大学原子炉実験所 藤井 紀子

はじめに

世の中はアミノ酸ブームである。サプリメントやスポーツ飲料に添加されているアミノ酸は我々の身体の20%を占めるタンパク質の材料である。肉や魚など食事から得たタンパク質は胃の中でタンパク分解酵素によって分解されてアミノ酸となる。分解されたアミノ酸は小腸で吸収され、肝臓に運ばれ、代謝されてエネルギーとして使われる。また、分解されたアミノ酸からヒトに固有のタンパク質が合成される。タンパク質は酵素（生体内の化学反応の制御）、酸素の運搬、筋肉収縮、細胞支持体、抗体、など、様々な機能を有しているため、生命活動にとってなくてはならないものである。

タンパク質は遺伝子の指示に従ってアミノ酸が結合して合成されるが、タンパク質の性質はこのアミノ酸のつながりや、それに基づいて生成される立体構造で決まる。タンパク質構成アミノ酸は20種類あるが、グリシンを除いてすべてのアミノ酸には左手構造（L-アミノ酸）と右手構造（D-アミノ酸）の2種類が存在する。L-アミノ酸とD-アミノ酸は左手と右手に手としての機能に差がないのと同様、アミノ酸としての化学的、物理的性質は同じである。アミノ酸を化学合成すると何か特別なことをしない限り、L-アミノ酸とD-アミノ酸は1：1の割合で等量合成される。しかし、我々の身体の中で合成されるタンパク質のアミノ酸はすべてL-アミノ酸のみの片手構造からできているのである。生命の発生以前の原始地球上では前述の化学合成と同様にL-アミノ酸とD-アミノ酸は等量合成されたと考えられている。しかし、

その後の化学進化の過程でD-アミノ酸は排除され、L-アミノ酸のみがペプチドとなり、原始タンパク質となって、生命が出現した。なぜ、D-アミノ酸が排除されたのかは諸説あるものの、未だに生命の起原の大きな謎の一つである。したがって、我々の地球上の生物界では微生物から高等生物に至るまで生命を構成するアミノ酸はすべて左手構造のアミノ酸（L-アミノ酸）からできており、生命体が活着している限り、D-アミノ酸が体内に存在することはあり得ないと考えられてきた。しかし、最近になって、種々の老化組織（眼、脳、動脈、皮膚、歯、骨など）でアミノ酸の一つであるアスパラギン酸（Asp）が加齢に伴ってD-体化し、白内障、アルツハイマー病、動脈硬化等と関連することが明らかになってきた。D-Aspは長期間にわたる加齢の過程で、非酵素的にラセミ化反応によって生じたものと考えられている。上記の組織ではD-Aspの増加がタンパク質の高次構造や機能に変化をもたらし、疾病に関与していると考えられている。

組織	タンパク質	D-アミノ酸	病態
水晶体	α A, α B-クリスタリン	D-アスパラギン酸	白内障
脳	β アミロイド蛋白	D-アスパラギン酸	アルツハイマー病
動脈壁	エラスチン	D-アスパラギン酸	動脈硬化
皮膚	エラスチン?	D-アスパラギン酸	皮膚硬化

水晶体中タンパク質中のD-アスパラギン酸残基の部位の決定

ヒトの水晶体中にD-Aspが存在し、加齢と共にその量が増加することは以前に報告されていた¹⁾。しかし、水晶体中のすべてのタンパク質中

の Asp 残基が一様にラセミ化し D-体化するのか、あるいは水晶体中の特定タンパク質の特定の部位に D-Asp が局在するのかは不明であった。そこで、我々はまず、80 歳のヒトの水晶体をホモジェナイズし、その可溶性タンパク質を電気泳動にかけ、すべてのバンドを切り出し、電気溶出し、どのタンパク質に D-Asp が存在するのかを網羅的に解析した。タンパク質中のアミノ酸の光学異性体分析はタンパク質を 6N HCL で 7 h、108 °C で加水分解した後、*n-tert*-butyloxycarbonyl-L-cysteine (Boc-L-Cys) と *o*-phthalaldehyde (OPA) で誘導化し、逆相クロマトグラフによってアミノ酸の D/L 比を決定した。本方法を用いることによりアミノ酸の光学異性体分析は p mole レベルで正確に求めることができる。この方法により、水晶体で D-Asp を含むタンパク質は水晶体の主要成分である α A-クリスタリンと α B-クリスタリンであることが明らかとなった。 α A-クリスタリンは 173 残基、 α B-クリスタリンは 175 残基のアミノ酸からなる分子量約 20 kDa のタンパク質で水晶体中では互いに会合して 40-50 量体の安定した会合体を形成している。 α A-クリスタリン中には 15 個の Asp 残基と 2 個のアスパラギン (Asn) 残基が、 α B-クリスタリン中には 11 個の Asp 残基と 2 個の Asn 残基が含まれている。この内、どの部位の Asp/Asn 残基が D-体に変化しているのかを明らかにするために、まず α A-、 α B-クリスタリンをそれぞれトリプシン処理し、得られたペプチド断片を逆相クロマトグラフィ (RP-HPLC) で分離し、質量分析装置及び、プロテインシーケンサーにより各ペプチド断片を同定した。次いでこれらを加水分解し、上記で述べた方法によりアミノ酸の D/L 比を決定した。この方法により、 α A-及び α B-クリスタリンに含まれるすべての Asp 残基の個々の D/L 比を決定することができた。その結果、80 歳のヒト α A-クリスタリンでは Asp-151 残基の D/L 比が 5.7、Asp-58 残基の D/L 比が 3.1²⁾、 α B-クリスタリン中では Asp-36 と Asp-62 残基がそれぞれ、0.92 及び 0.57 と著しくラセミ化していることが明らかとなった

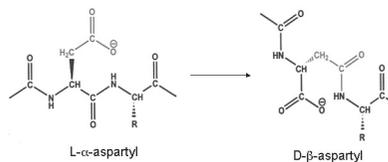


図1 L- α -Asp 残基と D- β -Asp 残基

3)。また、これらの Asp 残基の L-体から D-体への反転は例外なく、Asp と隣接残基の結合が α -結合から β -結合に異性化していることも明らかとなった。

タンパク質中でこのような反応が起こるとどうなるであろうか？ 図1に示すように D-Asp の側鎖はペプチド結合主鎖のアミド平面に対し逆向きに配置される。通常、L-アミノ酸の側鎖の官能基はアミド平面に対し、上方、下方、上方、下方と交互に配置するので、ポリペプチド鎖上に D-アミノ酸が出現すると D-アミノ酸の側鎖と隣接 L-アミノ酸残基の側鎖はペプチド平面に対し、同じ方向に配置されるので、ペプチド結合にひずみが生じると考えられる。

また、ペプチド結合が β 結合になると主鎖の長さが α 結合より長くなる (図1) ので、これもポリペプチドの構造に大きな変化をもたらすものと考えられる。これらのことを考えると Asp の 1 残基の反転異性化でもタンパク質自体の立体構造に大きな変化をもたらされることが予測できる。

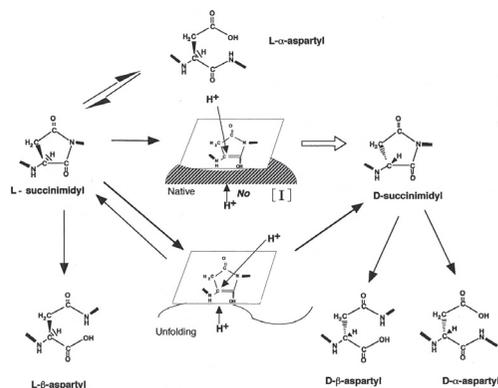


図2 タンパク質中での Asp 残基の反転異性化機構

タンパク質中での D-β-Asp 生成機構

では、どのようにして上記のような反応が起こるのであろうか？その反応機構は図2に示す。

タンパク質中での正常な L-α-Asp 残基は Asp の C 末端側アミノ酸残基の主鎖窒素原子による求核攻撃により脱水縮合し五員環イミドを形成する。L-体から D-体への反転はこの中間体を經由して生じ、次いで加水分解によりイミド体が開環し、L-イミド体からは L-β-Asp と L-α-Asp 残基が、D-イミド体から D-β-Asp 残基と D-α-Asp 残基の4種類の異性体が生成されることが考えられた⁴⁾。

本反応はイミド形成が引き金となるので、イミド形成の起こり易さが異性化反応の起こり易さを反映している。イミド形成には Asp の隣接残基が立体障害の小さなアミノ酸、つまり、グリシン、アラニン、セリンなどのような側鎖の小さなアミノ酸であるときに生じやすいことが一つの条件と考えられる。因みにヒト水晶体 αA-クリスタリンの Asp58 残基、Asp151 残基の隣接残基はそれぞれ、セリン、アラニンである。従って一次構造上では上記の条件に当てはまると言える。それに加えて Asp 残基周辺の立体構造もこの様な反応を誘導する反応場を形成しているのではないかとということが示唆された。いづれにしても、タンパク質中での Asp 残基のラセミ化や異性化は、当初、考えられていたように、決して起こりにくい反応ではなく、どこにでも普遍的に起こりうる反応であることが判明した⁴⁾。

皮膚タンパク質中の D-Asp と紫外線照射

老人の水晶体に D-Asp が多量に存在していること、D-Asp 生成は条件さえ整えばどのようなタンパク質中でも生じることが明らかとなった。水晶体は常時太陽紫外線に曝露されている器官である。加齢変化に加えて、紫外線影響があるのではないかと考え、正常なマウスの水晶体に紫外線照射をしたところ、予測通り、αA-クリスタリン

の Asp-151 残基だけが特異的にラセミ化することがわかった。そこで、紫外線の影響を受けている皮膚にも D-Asp 含有タンパク質が存在するのではないかと考え、D-β-Asp を含むペプチドを合成し、これに対する抗体を調製し、免疫組織染色によって皮膚の D-β-Asp 含有タンパク質を探すことにした。その結果、老人の顔の皮膚に D-β-Asp 含有タンパク質を見出した。しかし、幼児の顔の皮膚や同じ老人の皮膚でも腹や胸などの紫外線被曝影響の少ない皮膚では、顔の皮膚と比較してその量が著しく少ないということが明らかとなり、本反応は加齢によって増加し紫外線照射が促進するということが示唆された⁵⁾。マウス皮膚に紫外線を照射すると線量依存的に D-β-Asp 含有タンパク質が増加することも明らかになってきた。これらの結果は加齢-紫外線-タンパク質中の D-β-Asp 生成が密接に関係していることを示している。

参考文献

- 1) Masters P. M., *et al.*, Nature, 268, 71 (1977).
- 2) Fujii N., *et al.*, J.Biochem., 116, 663 (1994).
- 3) Fujii N., *et al.*, Biochim Biophys Acta, 1204, 157 (1994).
- 4) Fujii N., *et al.*, Biochem Biophys Res Commun, 263, 322 (1999).
- 5) Fujii N., *et al.*, Biochem Biophys Res Commun, 294, 1047 (2002).