

# D-アミノ酸で評価する太陽紫外線による皮膚タンパク質の損傷と老化

京都大学原子炉実験所

藤井 紀子

We previously reported that biologically uncommon D-aspartyl residues are present in sun-damaged skin from elderly people, possibly in elastin. Here, we report the kinetics of Asp racemization in model peptides corresponding to elastin sequences from exons 6 and 26A. We estimated the activation energy (E) of racemization of Asp residues, the racemization rates (RR) at 37°C and the time (t) required for the D/L ratio of Asp to approximate to 1.0 (D/L ratio of Asp=0.99) at 37°C. For an exon 6 peptide, E=29.0 kcal/mol, RR=2.59 × 10<sup>2</sup>/yr and t=101.0 yr. For an exon 26A peptide E=26.2 kcal/mol, RR=4.27 × 10<sup>2</sup>/yr and t=61.3 yr; and for a second exon 26A peptide E=25.7kcal/mol, RR=5.55 × 10<sup>2</sup>/yr and t=47.0 yr. These results suggest that racemization of Asp residues in elastin could occur within a human life span. We propose that D-Asp could be a useful molecular indicator of aging.

## 1. はじめに

生体を構成するタンパク質はすべてL-アミノ酸から構成されているが、近年、老化に伴って眼の水晶体 [1,2]、脳 [3,4]、動脈壁 [5]、歯 [6]、軟骨 [7]、皮膚等 [8,9] の代謝の遅い組織のタンパク質中で、本来生体内には存在しないはずのD-アスパラギン酸 (D-Asp) が増加することが明らかとなってきた。L-アミノ酸から構成されているタンパク質中でL-アミノ酸の光学異性体であるD-アミノ酸が生成されれば、タンパク質の立体構造は大きく変化し、不溶化、凝集が生じ、機能低下を引き起こすと考えられる。上記の組織ではこの様な一連の変化によって白内障、アルツハイマー病、動脈硬化が惹起されたものと考えられている。筆者らは水晶体主要構成成分である $\alpha$ -クリスタリン中でAsp残基が著しくD-体化し、同時に異性化( $\alpha$ -Asp →  $\beta$ -Asp)している部位を発見し、この反転反応がなぜ、生じるのかを詳細に検討した。その結果、1) タンパク質中のAspの隣接残基が立体障害の少ないアミノ酸であるとき、Asp残基が5員環イミドを経由して反転する。2) タンパク質自身の立体構造がD-Aspを誘導する反応場を形成しているという機構が明らかとなった [10]。これは従来の生体内でのD-アミノ酸生成反応は体温における単純なラセミ化反応の結果であるという考えとは一線を画するものであり、条件さえ整えば容易に他の組織でもD-アミノ酸が生成されることを示している。申請者らはFig. 1に示すように、老化した皮膚に、D- $\beta$ -Aspが多量に蓄積され、紫外

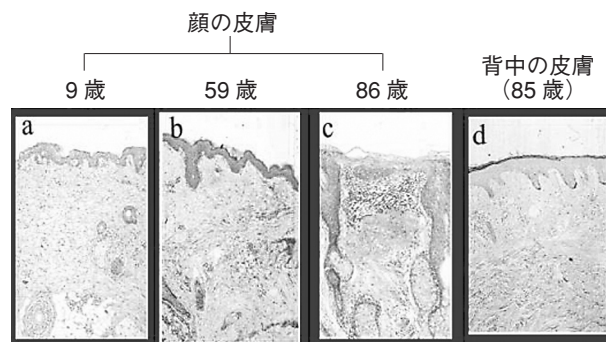


Fig. 1 ヒトの皮膚に存在するD-beta-Asp含有蛋白質(赤色部分)

線照射部位で特にその傾向が著しいことを見いだした [8]。

さらに、老人の顔の皮膚よりD- $\beta$ -Asp含有タンパク質を抽出し、D- $\beta$ -Asp含有タンパク質を特異的に認識する抗体を用いて2次元電気泳動によりWestern blottingを行ったところ、本タンパク質はエラスチンと考えられたので、本研究ではエラスチン中に含まれるAsp残基周辺と同一配列のペプチドを3種類合成し、そのペプチドを用いてAsp残基のラセミ化反応のキネティクスを解析した。

## 2. 実験

### 2-1 サンプル

合成したペプチドは下記の通りである。

- 1) Exson 6 : GVADAAAA,
- 2) Exson 26-1 : REGDPSSS,
- 3) Exson 26-2 : AGADEGVR

これらのペプチドを50, 60, 70, 80, 90°Cで32日間保温した。8日間ごとに各温度でのAspのD/L比を調べ、上記試料における各温度でのAspのラセミ化反応速度定数(k)を求めた。各温度の速度定数(k)からArrhenius式を用い各試料でのAspのラセミ化反応の活性化エネルギーを求め、体温(37°C)でAspのD/L比が1.0に達する時間を求めた。



The evaluation of for sun-damaged skin by D-amino acid

Noriko Fujii

Research Reactor Institute, Kyoto University

## 2-2 アミノ酸の D/L 比の分析

コンタミネーションを防ぐため、全てのガラス器具を 500℃で4時間加熱処理した後、使用した。加水分解は Pico Tag Work Station (Waters Tokyo) を用いて 6 N-HCl、108℃で7時間加熱することによって気相加水分解をおこなった。次いで、加水分解物の試料に 0.13M borate buffer (pH 10.3) を加え、この溶液に o-phthalaldehyde (OPA) と N-tert-butoxycarbonyl-L-cysteine (Boc-L-Cys) を反応させ、ジアステレオマーを形成させた。このジアステレオマーを、Nova-Pak ODS, 3.9×300mm (Waters Tokyo) のカラムを使用した RP-HPLC (Shimazu, LC-10A) で分析し、蛍光検出計 (励起波長 344nm、蛍光波長 433nm) でそれぞれ検出した。溶媒は 0.1M acetate buffer / 3% tetrahydrofuran / acetonitrile を用い、acetonitrile の濃度が 7–47% の linear gradient になるように流速 0.8 ml/min、30℃で分析し、D/L 比はピーク面積の比によって求めた [11]。

## 2-3 ラセミ化反応速度

ペプチド中のアスパラギン酸のラセミ化は可逆的な一次平衡反応で次のように示すことが出来る。

$$-d[L]/dt = k[L] - k[D] \quad (1)$$

[L] と [D] は、それぞれ L-Asp と D-Asp の濃度を表しており、k はラセミ化反応の速度定数を表している。この式を積分により解くと以下のような数式が得られる。

$$\ln [(1+D/L)/(1-D/L)] = 2kt + \ln [(1+D/L)/(1-D/L)]_{t_0} \quad (2)$$

t は反応時間をあらわし、 $t_0$  は  $t = 0$  を表している。この  $t_0$  時のラセミ化は酸による加水分解によって引き起こされたものである。

本研究では、測定した D/L 比とこの (2) 式を用いて、3つのペプチド (Exon 6, 26A-1, 26A-2) 中に存在する Asp 残基のラセミ化反応速度定数を、各温度 (50℃、60℃、70℃、80℃、90℃) ごとに算出した。

他方、Arrhenius の式 (3) を用いて、各ペプチドにおいて Asp がラセミ化反応する活性化エネルギーを算出した。

$$\ln k = \ln A - E/RT \quad (3)$$

E は活性化エネルギー、R は気体定数、A は頻度因子、T は絶対温度を表している。

## 3. 結果

例として 60℃の結果を Fig. 2 に示した。(2) 式の左辺を縦軸に、時間 t を横軸にとり、60℃で、8日間ごとに測定した各ペプチド中に存在する Asp の D/L 比を縦軸 ( $\ln [(1+D/L)/(1-D/L)]$ ) に適用した値を Fig. 2 のようにプロットした。プロットから得られた近似直線は、3つのペプチドとも高い直線性を示しており ( $r^2 = 0.971 \sim 0.999$ )、このことから合成ペプチドのラセミ化反応は、可逆一次反応であることがいえる。さらに (2) 式から、各温度でのペ

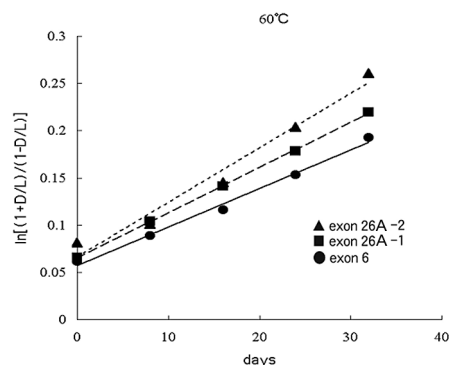


Fig. 2 60℃における Exon 6, 26A-1, 26A-2 中の Asp 残基のラセミ化反応

Table 1 Comparison of racemization constants(k) of elastin mimic peptides at 50℃~90℃

t °C	k × 10 <sup>2</sup> day <sup>-1</sup>		
	Exon 6	Exon 26A-1	Exon 26A-2
50	0.05	0.07	0.09
60	0.21	0.24	0.29
70	0.68	0.56	0.75
80	1.78	1.87	2.33
90	7.72	7.04	7.47

プチド中の Asp のラセミ化反応速度定数 k は、Fig. 2 における近似直線の傾きの 1/2 に相当することがわかる。このことから、60℃での exon 6 中の Asp ラセミ化反応速度定数  $k_{60}$  は  $0.21 \times 10^2 \text{ day}^{-1}$ 、exon 26A-1 の  $k_{60}$  は  $0.24 \times 10^2 \text{ day}^{-1}$ 、exon 26A-2 の  $k_{60}$  は  $0.29 \times 10^2 \text{ day}^{-1}$  であることがわかった。この結果は、exon 26A-2 中の Asp 残基が最もラセミ化しやすく、exon 6 中の Asp 残基が最もラセミ化しにくいことを示している。

同様に、50℃、70℃、80℃、90℃の全ての温度で、各ペプチド中の Asp 残基のラセミ化反応速度定数を算出した。その結果を Table 1 に示した。

3つのペプチドのラセミ化反応速度定数が温度に依存していることから Arrhenius の式を用い、ラセミ化反応の活性化エネルギーを算出した。

次に Table 1 に示した各温度でのラセミ化反応速度定数と Arrhenius の式を用い、各ペプチド中の Asp がラセミ化反応する活性化エネルギーを算出した。

(3) 式  $\ln k = \ln A - E/RT$  から、 $\ln k$  を縦軸に、 $1/T$  (絶対温度の逆数をとったもの) を横軸にとり、各温度 (50℃~90℃) のラセミ化反応速度定数 k の自然対数をとった値をそれぞれプロットした。

Fig. 3 に示すように、各ペプチドのプロットから得られた近似直線は高い直線性を示しており ( $r^2 = 0.991 \sim 0.998$ )、この近似直線の傾きが  $-E/R$  に相当することがわかる。このことから、exon 6 (GVADAAAA) の活性化エネルギー E は 29.0kcal/mol、exon 26A-1 (REGDPSSS)

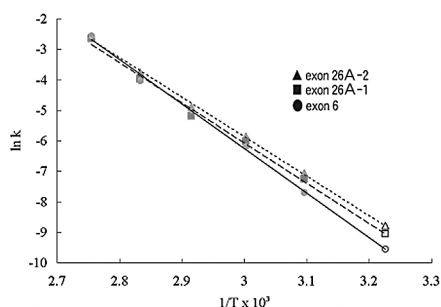


Fig. 3 exon6, 26A-1, 26A-2 中の Asp のラセミ化反応速度定数の Arrhenius plots

は 26.2kcal/mol、exon 26A-2 (AGADEGVR) は 25.7kcal/mol と算出され、exon 26A-2 の活性化エネルギーが最も低く、ラセミ化反応が起こりやすいことが明らかとなった (Table 2)。

前述したように、本研究では exon 6 (GVADAAAA)、exon 26A-1 (REGDPSSS)、exon 26A-2 (AGADEGVR) の 3 つのペプチドを合成し、加熱実験によってこれらのペプチド中に存在する Asp のラセミ化反応速度定数と活性化エネルギーを求めた。さらに、Arrhenius の式を用いてヒトの体温 (37°C) における各ペプチド中の Asp のラセミ化反応速度定数  $k_{37}$  を求め、各ペプチド中の Asp の D/L 比が 1.0 (0.99) に達するのにかかる時間を算出した。その結果を以下に示す。

Table 2 に示すように、ヒトの体温での速度定数  $k_{37}$  は exon 6 では  $0.71 \times 10^4 \text{ day}^{-1}$ 、exon 26A-1 では  $1.17 \times 10^4 \text{ day}^{-1}$ 、exon 26A-2 では  $1.52 \times 10^4 \text{ day}^{-1}$  と算出され、exon 26A-2 での速度定数  $k_{37}$  は exon 6 での速度定数  $k_{37}$  の約 2 倍の値を示した。さらに、各ペプチド中での Asp 残基の D/L 比がヒトの体温 (37°C) で 1.0 (0.99) に達する時間は、exon 6 で 101 年、exon 26A-1 で約 61 年、exon 26A-2 で 47 年かかることが明らかになった。仮に皮膚中のエラスチンに存在する Asp のラセミ化反応が、本研究の合成ペプチドと同じように起こっているのならば、エラスチン中の Asp 残基は、ヒトの一生の間にラセミ化反応を起こしうるのに十分な反応速度を有していることになる。

#### 4. 結論

本研究において、3 つのペプチド (GVADAAAA、REGDPSSS、AGADEGVR) での Asp ラセミ化反応は可逆的な一次平衡反応であることが確認できた。さらに、これらのペプチド間での違いは小さく、ペプチド中に存在するアスパラギン酸の D/L 比が 1.0 (0.99) に達する時間は約 50 年から 100 年であることが分かった。このことからエラスチン中の全てのアスパラギン酸が、ヒトの一生の間で非常にラセミ化反応を起こしやすいということが示唆された。

Table 3 に本研究の結果とすでに報告されている結果をまとめた。エラスチン中のアスパラギン酸のラセミ化は、

Table 2 Summary of racemization of Asp residues in elastin mimic peptide

Peptide	E (kcal/mol)	$k_{37} \times 10^4 \text{ (day}^{-1}\text{)}$	Year <sub>37</sub>
Exon 6	29.0	0.71	101.0
Exon 26A-1	26.2	1.17	61.3
Exon 26A-2	25.7	1.52	47.0

E : activation energy

$k_{37}$  : racemization constant at 37°C

Year<sub>37</sub> : time to approximate a D/L ratio of 1.0 (0.99)

Exon 6 : GVADAAAA

Exon 26A-1 : REGDPSSS

Exon 26A-2 : AGADEGVR

Table 3 他組織の結果との比較

		$k_{37} \text{ year}^{-1}$
本研究の結果 [12]	Exon 6	$2.59 \times 10^{-2}$
	皮膚のエラスチン	$4.27 \times 10^{-2}$
	Exon 26A-2	$5.55 \times 10^{-2}$
Ritz-Timme et al. の結果	皮膚のエラスチン [9]	$3.6 \times 10^{-3}$
	黄色靭帯 [7]	$4.1 \times 10^{-3}$
Powel et al. の結果	動脈壁 [5]	$1.14 \times 10^{-3}$
	Shapiro et al. の結果	
肺気腫 [13]	8-9Asx * の平均	$1.76 \times 10^{-3}$

\* Asp と Asn の総称

ヒトの皮膚、黄色靭帯、動脈、肺気腫のような様々な組織で報告されており、このことからエラスチン中のアスパラギン酸のラセミ化反応は非常に起こりやすいと考えることができる。また、エラスチン中で D-Asp の量が増加し老化皮膚中に蓄積されるのは、エラスチンの代謝が非常に遅いためであると予想することができる。

Table 3 の Ritz-Timme らの結果は、本研究の結果と比べて一桁低い値を示しているが、これは彼らの結果が、全 Asp の平均として表されているのに対し、我々の示した値は部位特異的なラセミ化を扱っているためと考えられる。Ritz-Timme らの値は 4-5Asx 残基の平均値であるので、部特異的なラセミ化が存在するならば、本研究の結果と比べて Ritz-Timme らの値は非常に良い一致を示しているといえる。D-β-Asp 含有タンパク質は異常なタンパク質で有り、その光学的性質のために酵素が認識できず、組織中に蓄積されるのではないかと考えられる。また、D-β-Asp 含有タンパク質は紫外線によっても増加し蓄積され、エラスチン抗体とも交叉反応を示した。この結果は、皮膚のエラスチン中における D-β-Asp の形成が、老化だけでなく紫外線とも密接な関係にあることを示している。

以上のことから、我々は、D-β-Asp が老化や紫外線による皮膚のダメージを知る上での分子マーカー (指標) と

して応用できるのではないかと考えている。

#### 謝辞

本研究を遂行するに当たり、ご支援を頂きました(財)コスメトロジー研究振興財団及び共同研究者に深く感謝いたします。

#### (References)

- 1) Fujii N, Satoh K, Harada K, Ishibashi Y. Simultaneous stereoinversion and isomerization at specific aspartic acid residues in alpha A-crystallin from aged human lens. *J Biochem* 1994;116:663-9.
- 2) Fujii N, Ishibashi Y, Satoh K, Fujino M, Harada K. Simultaneous racemization and isomerization at specific aspartic acid residues in alpha B-crystallin from the aged human lens. *Biochim Biophys Acta* 1994;1204(2):157-63.
- 3) Fisher GH, Garcia NM, Payan IL, Cadilla-Perezrios R, Sheremata WA, H. ME. D-aspartic acid in purified myelin and myelin basic protein. *Biochem Biophys Res Commun* 1986;135:683-7.
- 4) Roher AE, Lowenson JD, Clarke S, Wolkow C, Wang R, Cotter RJ, Reardon IM, Zurcher-Neely HA, Heinrikson RL, Ball MJ, 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* 1993;268(5):3072-83.
- 5) Powell JT, Vine N, Crossman M. On the accumulation of D-aspartate in elastin and other proteins of the ageing aorta. *Atherosclerosis* 1992;97(2-3):201-8.
- 6) Helfman PM, Bada JL. Aspartic acid racemisation in dentine as a measure of ageing. *Nature* 1976;262(5566):279-81.
- 7) Ritz-Timme S, Laumeier I, Collins M. Age estimation based on aspartic acid racemization in elastin from the yellow ligaments. *Int J Legal Med* 2003;117(2):96-101.
- 8) Fujii N, Tajima S, Tanaka N, Fujimoto N, Takata T, Shimo-Oka T. 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* 2002;294(5):1047-51.
- 9) Ritz-Timme S, Laumeier I, Collins MJ. Aspartic acid racemization: evidence for marked longevity of elastin in human skin. *Br J Dermatol* 2003;149(5):951-9.
- 10) Fujii N, Harada K, Momose Y, Ishii N, Akaboshi M. D-amino acid formation induced by a chiral field within a human lens protein during aging. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;263(2):322-6.
- 11) Hashimoto A, Nishikawa T, Takahashi K, Hayashi T. Determination of free amino acid enantiomers in rat brain and serum by high-performance liquid chromatography after derivatization with N-tert.-butyl-oxycarbonyl-L-cysteine and o-phthaldialdehyde. *J Chromatogr* 1992;582:41-8.
- 12) Kuge K, Fujii N, Miura Y, Tajima S, Saito T. Kinetic study of racemization of aspartyl residues in synthetic elastin peptides. *Amino Acids* 2004;27(2):193-7.
- 13) Shapiro SD, Endicott SK, Province MA, Pierce JA, Campbell EJ. Marked longevity of human lung parenchymal elastic fibers deduced from prevalence of D-aspartate and nuclear weapons-related radiocarbon. *J Clin Invest* 1991;87(5):1828-34.