

Award Accounts

第 12 回 D-アミノ酸学会奨励賞

**アスパラギン残基およびグルタミン残基における
脱アミド化反応の解析****加藤 紘一**

湘南医療大学

**Analysis of Deamidation Reactions on Asparagine
and Glutamine Residues****Koichi KATO**

Shonan University of Medical Sciences

1. はじめに

タンパク質を構成するアミノ酸残基が非酵素的な反応により生理的な条件下で立体反転し、D 体のアミノ酸がタンパク質中に生成されることがある。その反応として、アスパラギン残基やグルタミン残基の脱アミド化が知られている。アスパラギン残基の脱アミド化は、C 末端側の主鎖アミド窒素が側鎖のアミド炭素に求核攻撃し、これにより形成される環状のスクシンイミド中間体を介して進行する¹⁾。アスパラギン残基の脱アミド化により L- α -Asn から L- α -Asp, L- β -Asp, D- α -Asp, D- β -Asp が生成される。グルタミン残基の脱アミド化においても同様に環状中間体を介して進行するため、D 体のアミノ酸が形成されることがあり、L- α -Gln から L- α -Glu, L- γ -Glu, D- α -Glu, D- γ -Glu が生成される。また、側鎖のアミド窒素が主鎖のアミド炭素に求核攻撃することにより反応が進行した場合、C 末端側のペプチド結合が切断されて末端の L- α -Asn,

L- β -Asn, D- α -Asn, D- β -Asn に変換される。タンパク質中に非天然のアミノ酸が生成されるため、その変性や凝集を引き起こすことがあり、加齢性疾患や抗体医薬品の品質低下の原因になると考えられている^{2,3)}。そのため、アスパラギン残基やグルタミン残基における脱アミド化の詳細な反応機構を解明することは、これらの反応を制御する方法の開発に繋がり、如いては白内障などの加齢性疾患の治療法開発に繋がると考えられる。本稿では、著者らが脱アミド化反応について計算化学的手法を用いて解析した結果を概説する。

2. アスパラギン残基の脱アミド化

アスパラギン残基における脱アミド化の反応速度は、タンパク質構造の影響を受けて変化すると言われている。ペプチドを用いた実験では一次構造の影響を受けやすいことが示されており、C 末端側隣接残基がグリシン残基などの側鎖が小さいアミノ酸残基であるほど反応が進行しやすく、イソロイシン残基な

【責任著者/Corresponding Author】

加藤 紘一 湘南医療大学 〒220-0024 神奈川県横浜市戸塚区上品濃 16-28 TEL: 045-821-2300
Koichi KATO Shonan University of Medical Science
16-48, Kamishinano, Totsuka-ku, Yokohama, Kanagawa 220-0024, Japan TEL: 81-45-821-2300
E-mail: koichi.kato@sums.ac.jp

どの側鎖が嵩高いアミノ酸残基であるほど脱アミド化速度が遅いと考えられている⁴⁾。一方で、タンパク質中では必ずしもこの条件に当てはまらない場合がある。水晶体タンパク質の γ Sクリスタリンには5つのアスパラギン残基が存在するが、Asn14, Asn53 および Asn143 においては、Asn37 や Asn76 と比較して脱アミド化率が高いという報告例がある⁵⁾。しかし、これら比較的脱アミド化率が高いアスパラギン残基のC末端側隣接残基はフェニルアラニン残基やチロシン残基であり、本来は脱アミド化が進行しにくいと考えられる環境に置かれている。一方で、脱アミド化率の低い Asn37 の隣接残基はセリン残基、Asn76 の隣接残基はアスパラギン酸残基であり、比較的側鎖は小さい。そのため、タンパク質中における脱アミド化速度に関しては一概に一次構造が重要とは言い難く、主鎖構造などの立体構造の影響がより重要である可能性がある。そこで著者らは、Asn14, Asn53 および Asn143 において脱アミド化率が大きい理由を三次構造から予想した。まず γ Sクリスタリンの分子動力学シミュレーションを行い、それぞれのアスパラギン残基について動的な構造の特徴を調べた⁶⁾。2000 ns のシミュレーションを実施し、収束した最終10 ns における構造について、脱アミド化率が高いアスパラギン残基における共通点を調べた。その結果、Asn14, Asn53 および Asn143 においては、 α 水素とアミド窒素の水素が95%以上の構造において syn-periplanar の関係にあることがわかった。それに対し、Asn37 および Asn76 では syn-periplanar の構造を形成することはなく、50%以上の構造において anti-periplanar の構造を形成していた。そこで、syn-periplanar 構造および anti-periplanar 構造のモデルを作成し、量子化学計算を用いてスクシンイミド形成過程の詳細を解析した。その結果、いずれの構造においても反応機構に違いはないにも関わらず、syn-periplanar 構造における活性化障壁が anti-periplanar 構造と比較して低いことが明らかとなった。特にリン酸二水素イオンが触媒とし

て働いた場合、anti-periplanar 構造における活性化障壁は 111 kJ mol^{-1} であったのに対し、syn-periplanar 構造における活性化障壁は 89.3 kJ mol^{-1} であり、 20 kJ mol^{-1} 以上の差があった。また、syn-periplanar 構造における活性化障壁は実験で報告されている値の範囲内であった ($80\text{--}100 \text{ kJ mol}^{-1}$)^{7,8)}。反応の進行に伴う構造変化にも違いが見られた。リン酸二水素イオンが触媒として働いた時、syn-periplanar 構造におけるN末端側主鎖二面角 ϕ は殆どが55度付近で維持されており、C末端側主鎖二面角 ψ は環化反応の遷移状態構造形成時に31度程度変化した。一方 anti-periplanar 構造においては、環化反応の遷移状態構造形成時に ϕ は28度、 ψ は87度変化していた。このことから anti-periplanar 構造で脱アミド化が進行するには主鎖構造の大きな変化が必要であることが示唆された。これらのことから、活性化障壁および反応に伴う構造変化のいずれから判断しても syn-periplanar 構造を形成しているアスパラギン残基において脱アミド化が進行しやすいと考えられた。したがって、タンパク質中においてアスパラギン残基の脱アミド化が進行しやすい構造を特定することができた。また、いずれの構造においてもリン酸二水素イオンや炭酸イオンが触媒として働くことで活性化障壁が低下することが示された。その活性化障壁は酢酸が触媒として働いた場合の活性化障壁 (113 kJ mol^{-1}) よりも低かった⁹⁾。したがって、生体内におけるこれらのイオン濃度の変化が脱アミド化の進行に重要であることが示唆された。

3. アスパラギン残基の主鎖における脱アミド化 (C末端ペプチド結合の切断反応)

アスパラギン残基におけるC末端ペプチド結合切断反応は側鎖の脱アミド化と比較して数十倍から数百倍遅いとされており、生体内での頻度も少なくその報告例はわずかである。これまでに、アクアポリン0のAsn246や α AクリスタリンのAsn101において起きることが

報告されている^{10,11)}。アクアポリン 0 の Asn246 は、特定の立体構造を形成しにくいフレキシブルな C 末端付近に位置しており、また、C 末端側の隣接残基はグリシン残基である。一方で、 α A クリスタリンの Asn101 は β シート上に存在しており、C 末端側の隣接残基はグルタミン酸残基である。これらのアスパラギン残基について、脱アミド化で見られたような立体構造の共通点は見られなかった。ただし、いずれも *syn-periplanar* 構造のようなコンフォメーションではなく、比較的直鎖状の構造を形成しやすいと考えられた。そのため、直鎖状の最安定型のモデル化合物を初期構造として反応計算を行い、まずはスクシンイミド形成過程の詳細な反応機構について調べた¹²⁾。また、最も単純な系として C 末端側の隣接残基はグリシン残基とした。これまでの研究で、水分子が触媒とした働いた場合の反応計算は行われているが、その活性化障壁は 199 kJ mol^{-1} であったため¹³⁾、別の分子が触媒として働くと考えられた。その触媒として、生体内に存在するリン酸二水素イオンまたは炭酸イオンが働く想定し、計算を実施した。その結果、得られた活性化障壁は $110 \sim 125 \text{ kJ mol}^{-1}$ であった。実験的手法により求めた活性化障壁は報告されていないが、脱アミド化よりも数十倍から数百倍遅いことから考えると妥当な値であると考えられた。それぞれの触媒が仲介するプロトンリレーに大きな違いは見られなかったが、反応に伴う構造変化には違いが見られた。リン酸二水素イオンが触媒として働いた場合は C 末端側の主鎖二面角 ψ が 49 度変化し、炭酸イオンが触媒として働いた場合は 19 度変化した。いずれの場合においても、C 末端側の主鎖における構造柔軟性が反応の進行に必要であると考えられた。また、リン酸二水素イオンが触媒として働く場合と炭酸イオンが触媒として働く場合において、初期構造の ψ が 29 度異なっていた。このことから、タンパク質の立体構造が反応の起こりやすさに与える影響は、触媒分子の種類によ通じて ϕ はほとんど変化しなかったが、 ψ は環

って変化することが示唆された。この研究により、アスパラギン残基における C 末端ペプチド結合切断反応についての詳細が示された。

4. グルタミン残基の脱アミド化

グルタミン残基の脱アミド化は、アスパラギン残基の脱アミド化と同様に C 末端側の隣接残基の側鎖が小さいほど進行しやすいと考えられている⁴⁾。 γ S クリスタリンにはグルタミン残基が 9 残基存在するが、そのうち Gln120 が最も脱アミド化率が高いことが報告されている⁵⁾。その他には、Gln16, Gln63 および Gln92 が他の残基と比較すると脱アミド化率が高い。これらの残基はいずれも *anti-periplanar* 構造を形成している傾向が見られた。また、C 末端側の隣接残基については、2 つの残基はグリシン残基であり、残り 2 つはチロシン残基とフェニルアラニン残基であった。これらを踏まえ、*anti-periplanar* 構造を持つモデル化合物 ($\text{CH}_3\text{CO-Gln-NHCH}_3$) を用いて反応計算を行った¹⁴⁾。さらに、隣接残基がグリシン残基である場合の影響を調べるため $\text{CH}_3\text{CO-Gln-Gly-NHCH}_3$ のジペプチドをモデルとした反応計算も実行した¹⁵⁾。その結果、ジペプチドの場合は触媒分子との相互作用様式が多様であり、初期構造によって活性化障壁が異なることが示された。 $\text{CH}_3\text{CO-Gln-NHCH}_3$ をモデル化合物としては場合では、リン酸二水素イオンが触媒として働いた場合の活性化障壁が 96.8 kJ mol^{-1} であった。一方で、 $\text{CH}_3\text{CO-Gln-Gly-NHCH}_3$ のジペプチドをモデルとした場合はリン酸二水素イオンが触媒として働いた場合に活性化障壁が 85.4 kJ mol^{-1} であり、 $\text{CH}_3\text{CO-Gln-NHCH}_3$ を用いた場合よりも活性化障壁が 11.4 kJ/mol 低かった。この活性化障壁が低下した理由を最適化構造から考えると、隣接残基の主鎖と触媒との水素結合形成によって遷移状態構造が安定化されたためであると考えられた。反応に伴う構造変化については、いずれのモデル化合物を用いた場合でも同様であった。反応を化反応の遷移状態構造形成時に 40 度近く変化

した。したがって、C 末端側の主鎖構造の変化が生じると考えられた。この研究により、グルタミン残基の脱アミド化が隣接残基の影響で促進される機構を示すことができた。

5. おわりに

アスパラギン残基やグルタミン残基の脱アミド化の反応機構を計算化学的手法を用いて解析した結果について概説した。いずれも主鎖構造や触媒分子が反応に大きく影響することが示唆された。同じ脱アミド化であっても、アスパラギン残基とグルタミン残基では進行しやすい条件が異なることが示唆された。また、図 1 に各反応における相違点と共通点を示した。アスパラギン残基の脱アミド化では環化反応の遷移状態構造形成時に N 末端側および C 末端側の双方で構造変化が起きたが、グルタミン残基の脱アミド化では C 末端側の主鎖構造でのみ構造変化が観察された。結果としてグルタミン残基の脱アミド化の方が、その残基周辺で大きなねじれが生じることが

反応が進行しにくい一つの理由であると考えられた。触媒と主鎖原子との水素結合にも違いが見られ、反応の開始に必要な複合体形成の容易さも異なると考えられた。アスパラギン残基の脱アミド化と比較して、ペプチド結合切断やグルタミン残基の脱アミド化の方が C 末端側の主鎖構造が重要であることが示唆された。本稿で紹介した脱アミド化反応は、生体内のタンパク質中における D-アミノ酸の形成に関わる反応であり、その制御法の開発は加齢性疾患の予防法開発に繋がると期待される。これまでの結果では、C 末端側に芳香族アミノ酸残基が隣接しているアスパラギン残基やグルタミン残基で脱アミド化率が高い理由は明らかとなっていない。今後はそれらの詳細を含め、脱アミド化を進行させない方法の開発に向けて研究を広げていきたい。その結果は、抗体医薬品やペプチド性医薬品を開発する際に脱アミド化が進行しやすい配列や構造を避けた設計を可能にすると期待される。

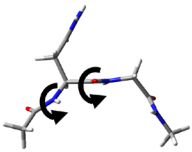
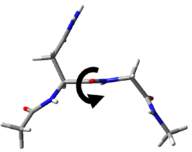

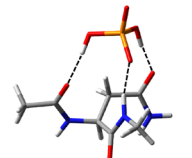
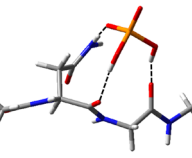
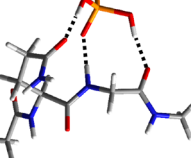
	Asn 脱アミド化	Asn ペプチド結合切断	Gln 脱アミド化
構造変化	 N末端側とC末端側の 双方で多少の構造変化	 C末端側で構造変化	 C末端側で構造変化
触媒との 水素結合	 N末端側主鎖酸素原子 と水素結合	 C末端側主鎖酸素原子 と水素結合	 C末端側主鎖酸素原子 と水素結合
反応の起点	触媒による窒素原子からのプロトンの引き抜き		
律速段階	環化反応		

図 1. 各反応における相違点と共通点

反応に伴う構造変化や触媒との相互作用については、アスパラギン残基の脱アミド化において N 末端側の主鎖が関与する。一方、反応がプロトンの引き抜きから開始されることや律速段階が環化反応であることは共通している。

参考文献

- 1) Patel K, Borchardt RT: Chemical pathways of peptide degradation. II. Kinetics of deamidation of an asparaginyl residue in a model hexapeptide. *Pharm. Res.* 7, 703–711, 1990
- 2) Kaji Y, Oshika T, Takazawa Y, Fukayama M, Fujii N. Accumulation of D-aspartic acid-containing proteins in age-related ocular diseases. *Chem. Biodivers.* 7, 1364–1370, 2010
- 3) Du Y, Walsh A, Ehrick R, Xu W, May K, Liu H. Chromatographic analysis of the acidic and basic species of recombinant monoclonal antibodies. *mAbs* 4, 578–585, 2012
- 4) Robinson NE, Robinson ZW, Robinson BR, Robinson AL, Robinson JA, Robinson ML, Robinson AB. Structure-dependent nonenzymatic deamidation of glutaminyl and asparaginyl pentapeptides. *J. Pept. Res.* 63, 426–436, 2004
- 5) Lapko VN, Purkiss AG, Smith DL, Smith JB. Deamidation in human gamma S-crystallin from cataractous lenses is influenced by surface exposure. *Biochemistry* 41, 8638–8648, 2002
- 6) Kato K, Nakayoshi T, Kurimoto E, Oda A. Mechanisms of deamidation of asparagine residues and effects of main-chain conformation on activation energy. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 7035, 2020
- 7) Connolly BD, Tran B, Moore JMR, Sharma VK, Kosky A. Specific catalysis of asparaginyl deamidation by carboxylic acids: Kinetic, thermodynamic, and quantitative structure-property relationship analyses. *Mol. Pharm.* 11, 1345–1358, 2014
- 8) Patel K, Borchardt RT. Chemical pathways of peptide degradation. II. Kinetics of deamidation of an asparaginyl residue in a model hexapeptide. *Pharm. Res.* 7, 703–711, 1990
- 9) Nakayoshi T, Wanita K, Kato K, Kurimoto E, Oda A. Computational analysis of nonenzymatic deamidation of asparagine residues catalysed by acetic acid. *Mol. Phys.* 119, e1827176, 2020
- 10) Ball LE, Garland DL, Crouch RK, Schey KL. Posttranslational modifications of aquaporin 0 (AQP0) in the normal human lens: spatial and temporal occurrence. *Biochemistry* 43, 9856–9865, 2004
- 11) Voorter CE, de Haard-Hoekman WA, van den Oetelaar PJ, Bloemendal H, de Jong WW. Spontaneous peptide bond cleavage in aging alpha-crystallin through a succinimide intermediate. *J. Biol. Chem.* 263, 19020–19023, 1988
- 12) Kato K, Nakayoshi T, Kurimoto E, Oda A. Computational analysis of the mechanism of nonenzymatic peptide bond cleavage at the C-terminal side of an asparagine residue. *ACS Omega* 6, 30078–30084, 2021
- 13) Catak S, Monard G, Aviyente V, Ruiz-López MF. Computational study on nonenzymatic peptide bond cleavage at asparagine and aspartic acid. *J. Phys. Chem. A* 112, 8752–8761, 2008
- 14) Kato K, Nakayoshi T, Kurimoto E, Oda A. Computational studies on the non-enzymatic deamidation mechanisms of Glutamine residues. *ACS Omega* 4, 3508–3513, 2019
- 15) Asai H, Kato K, Nakayoshi T, Ishikawa Y, Kurimoto E, Oda A, Fukuishi N. Nonenzymatic Deamidation Mechanism on a glutamine residue with a C-terminal adjacent glycine residue: A computational mechanistic study. *AppliedChem* 1, 142–155, 2021



略歴

- 2008–2014 名城大学薬学部
 2014–2018 名城大学大学院薬学研究科博士課程
 博士（薬学）
 2017–2021 金城学院大学薬学部 助教
 2021–現在 湘南医療大学薬学部 講師