

Award Accounts

第 14 回 D-アミノ酸学会奨励賞

アスパラギン酸残基の異性化を網羅的に解析する 新規キラルプロテオミクス

坂上 弘明

産業技術総合研究所 細胞分子工学研究部門

Comprehensive analysis of aspartic acid isomerization
using a novel chiral proteomics

Hiroaki SAKAUE

Cellular & Molecular Biotechnology Research Institute,
National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

1.はじめに

従来、タンパク質中のアミノ酸はすべて L 型であると言われていたが、分析技術の開発や機器の高感度化により、D-アミノ酸（特に D-アスパラギン酸:Asp）を含むタンパク質が発見されてきている。特に白内障^{1, 2)}やアルツハイマー病³⁾といった加齢性疾患の原因タンパク質で高頻度に検出されてきたこともあり、Asp の異性化は代謝回転の遅いタンパク質が長期的に生体内に留まることによって生じると考えられてきた。しかしながら近年、血中の IgG⁴⁾においても Asp 異性体が検出されることが報告されており、Asp 異性化は必ずしも長寿命タンパク質に限定されない可能性が示されている。

さらに、アルブミンにおける脱アミド化を伴う Asp 異性化がアルツハイマー病発症のバイオマーカーとなり得るとの報告⁵⁾や、製造された抗体医薬品においても Asp 異性化が確認されていることから、Asp 異性化は特定の疾患関連タンパク質に限らず、広範なタンパク質で生じる現象であることが示唆されている。

Asp 残基の異性化は、タンパク質の立体構造に顕著な影響を与え、機能を低下させることが知られている。これは、ペプチド中の L-ロイシンを D-ロイシンに置換した分子シミュレーションに

おいて、ダイナミックな構造変化が示唆されているほか⁶⁾、実験的にも確認されている。

筆者は以前、タンパク質ライゲーション法を用いて、組換えタンパク質と化学合成した Asp 異性体含有ペプチドを連結させることで、Asp 異性体を含む全長リボヌクレアーゼ A を作製した。その結果、活性部位に位置する 121 番目の Asp 残基を異性体に置換すると、リボヌクレアーゼ A の切断活性が劇的に低下することを明らかにした⁷⁾。さらに、抗 EGFR 抗体パニツムマブでも、相補性決定領域 (CDR) の Asp 残基に異性化が生じると細胞増殖阻害活性が低下することが報告されている。

このように、Asp 残基の異性化は疾患や老化のバイオマーカーとしての応用が見込みるとともに、医薬品の品質評価においても注目される修飾である。このような背景から、タンパク質中の異性化部位を正確かつ詳細に解析する技術の必要性は高まっている。

筆者らはこれまで、タンパク質中の Asp 異性化部位を詳細に決定する手法の開発に取り組んできており、スループット、感度、網羅性のいずれの面でも大きな進展を達成してきた。本稿では、これらの分析技術について概説する。

【責任著者/Corresponding Author】

坂上弘明 産業技術総合研究所 〒305-8565 茨城県つくば市東 1-1-1 中央事業所 5 群 TEL: 080-2216-2732
Hiroaki SAKAUE, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology
Central-5, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki, 305-8565, JAPAN
E-mail: h-sakaue@aist.go.jp

2. タンパク質中の Asp 残基の異性化機構

翻訳直後の Asp 残基はすべて L α -Asp であるが、Asp 残基は五員環構造であるスクシンイミド中間体を経由して、L β -Asp, D α -Asp, D β -Asp へと異性化することが知られている（図1）。安岐らは各変換反応の反応速度定数を算出し、スクシンイミドの開環が約 7:3 の比率で β -Asp 優位に進行することを報告した⁸⁾。これらの速度定数に基づき計算した異性化タイムコースでは、代謝が存在しないと仮定した場合、数年のうちに L α -Asp が一過的に L β -Asp に置換され、その後徐々に D α -Asp および D β -Asp に変換されていくことが示されている。しかし実際の生体内では、Asp 異性体に対する代謝・修復酵素が存在し、これらが異性体の蓄積

を制御している。L β -Asp は Protein L-isoaspartate O-methyltransferase (PIMT) によって特異的にメチルエステル化され、再びスクシンイミドへと変換される。スクシンイミドの開環は β -Asp 優位に進むものの、PIMT による修復サイクルが繰り返し作用することで、L β -Asp が L α -Asp へ徐々に修復されていく。

スクシンイミドはケト-エノール平衡により D 体に変換されることで D α -Asp と D β -Asp を生じる。D α -Asp 部位は D-アスパラギン酸エンドペプチダーゼ (DAEP) により選択的に切断されるのに対し、D β -Asp 部位を特異的に切断、もしくは修復する酵素はこれまでのところ知られていない。実際に生体試料を分析すると、D β -Asp を含むタンパク質が多く検出されることから、D β -Asp の代謝酵素の不在が、その蓄積をもたらす主要因であると考えられている。

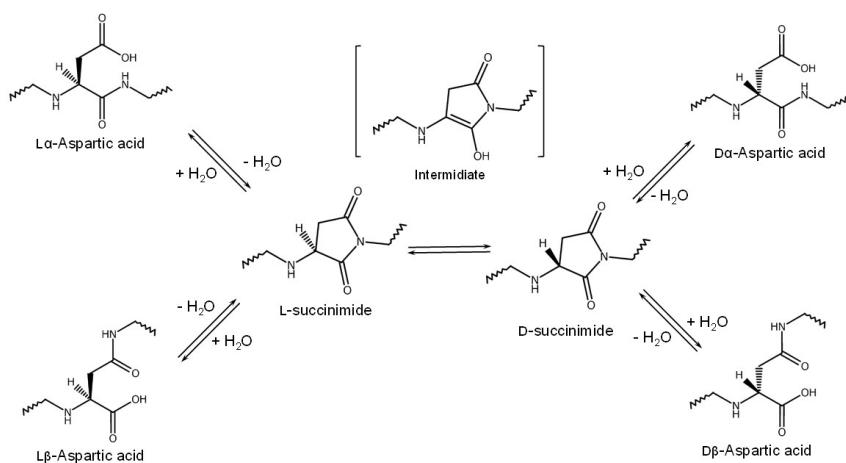


図 1 アスパラギン酸残基の異性化機構

3. ジアステレオマー誘導体化法を用いた異性化アスパラギン酸残基の同定

Asp 残基の異性化は、翻訳後に生じる化学的修飾であり、リン酸化やアセチル化などと同様に翻訳後修飾 (PTM) の一種として位置付けられる。一般的な PTM 解析では、タンパク質を酵素消化したのち、得られたペプチドを質量分析 (MS) で測定し、MS/MS スペクトルからペプチド配列と修飾の種類を同時に同定する。PTM が生じたアミノ酸残基には、修飾の種類に応じた特異的な質量変化が生じるため、理論質量との差異を利用して、「どの

タンパク質の」「どのアミノ酸残基に」「どの修飾が付加しているか」を決定することが可能となる。しかしながら、アミノ酸の異性化は分子量変化を伴わない点で他の PTM と決定的に異なる。このため、MS/MS スペクトルに異性体特有の質量差が現れず、従来のプロテオミクス的手法では異性化部位の直接的な同定は困難であった。

そのため従来は、目的タンパク質を高純度に精製した後、酵素消化によって得られたペプチドを質量分析により同定し、さらに酸加水分解によってアミノ酸へと分解したうえで、ジアステレオマー誘導体化およびクロマトグラフィー分離により D-Asp と L-Asp を区別す

る手法が用いられてきた。ペプチド中に Asp が 1 残基のみ存在する場合には、その位置に D-Asp が存在することを直接推定できる。

しかし、この従来法は多数の分離・精製ステップを含み、各段階において濃縮や溶媒置換の操作も必要となることから、サンプル調製から最終的な分析結果の取得まで通常 3~4 週間と非常に長い時間を要するという課題があった。

4. ショットガンプロテオミクスによる異性化 Asp 解析

液体クロマトグラフ tandem 質量分析装置 (LC-MS) は、液体クロマトグラフィー (LC) によるペプチド分離と質量分析 (MS) を連動させ、順次溶出されるペプチドの質量および MS/MS 情報を取得する分析手法である。前述の通り、Asp の異性化は分子量変化を伴わないため質量情報だけでは識別が困難であるが、Asp 異性体を含むペプチドは LC において互いに異なる保持時間を示すことが経験的に知られていた。

この特性に着目し、「同じ質量を持つにもかかわらず、LC 上で複数のピークとして検出されるペプチド」を探索する新規ショットガンプロテオミクス手法を開発した。分析対象のタンパク質を精製する必要はなく、サンプルを直接トリプシン消化し、LC-MS 測定後に特定の質量を抽出イオンクロマトグラム (XIC) として描画するだけで異性化ペプチドの候補

を簡便に検出できる。このアプローチにより、従来法と比較してスループットが飛躍的に向上した⁹⁾。

4 種類の Asp 異性体 ($L\alpha / L\beta / D\alpha / D\beta$) のうち、どの異性体が含まれるかを判定するには、以前は合成ペプチドを調製し溶出時間を比較する必要があった。しかし、特異的な酵素反応を組み合わせることで、合成標品を使わずに異性体の種類を推定する方法を確立した。これは、 $L\beta$ -Asp を特異的にメチルエステル化してスクシンイミドへ戻し、結果として $L\alpha$ -Asp に修復する PIMT、 $L\alpha$ -Asp の N 末端側ペプチド結合を切断する AspN、そして $D\alpha$ -Asp の C 末端側ペプチド結合を選択的に切断する DAEP という三つの酵素を組み合わせ、トリプシン消化後のクロマトグラムと比較することで、どの酵素処理でどのピークが消失するかを観察するという手法である (図 2)。PIMT で消失するピークは $L\beta$ -Asp を含み、AspN で消失するピークは $L\alpha$ -Asp を、DAEP によって消失するピークは $D\alpha$ -Asp を示している。 $D\beta$ -Asp については特異的に切断する酵素が存在しないため直接的な同定はできないものの、他の三つの挙動から消去法により推定が可能である。このように、酵素反応のパターンを利用することで合成標品を用いる必要がなくなり、異性体の同定はさらに迅速かつ効率的になった¹⁰⁾。

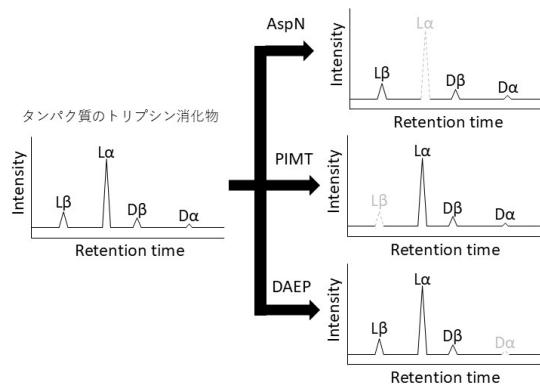


図 2 ショットガンプロテオミクスを用いた Asp 異性体分析報

トリプシン消化により得られたペプチド断片に対して、さらに追加で酵素消化を行う。AspN の添加によって消失するピークが $L\alpha$ -Asp を含むペプチド、PIMT の添加によって消失するピークが $L\beta$ -Asp を含むペプチド、DAEP の添加によって消失するピークが $D\alpha$ -Asp を含むペプチドであると判別できる。

本手法はショットガンプロテオミクスの形式を取るため、必要なサンプル量は 10 μg 程度と極めて少量で済む。これは、従来法が精製と濃縮を繰り返しながら 10~100 mg の大量の試料を必要としていたことを考慮すると、分析感度が 1,000~10,000 倍に向上したことを意味しており、異性化アミノ酸研究の実用化に向けた大きなブレークスルーであると言える。

5. イソアスパラギン酸残基の特異的ラベル化

上述のように、ジアステレオマー誘導体化を利用した従来法に比べ、ショットガンプロテオミクスを用いた手法は分析感度とスループットを大きく向上させた。しかし、異性体ペプチドの探索には質量を指定してマスクロマトグラムを描画する必要があるため、ター

ゲットが既知の場合には有効であるものの、試料中に存在する全タンパク質を対象としたノンターゲット解析には限界があった。そこで筆者らは、異性化 Asp を網羅的に探索可能とするノンターゲット型の新規手法の開発を進めた。

本手法の基盤となる PIMT は、前述の通り L β -Asp を特異的に認識して L α -Asp へ修復する酵素である。反応機構は、L β -Asp 側鎖カルボニル基のメチル化による求核性向上を介してスクシンイミド形成を促進させるというものである。その後スクシンイミドが加水分解されることで Asp 残基が再び生成される。スクシンイミド開裂の際には周囲の水分子が使用されるため、PIMT 反応を H₂¹⁸O 中で行うと、開裂の過程で側鎖の ¹⁶O が ¹⁸O に置換され、質量が+2 Da 増加することを見出した（図 3）。

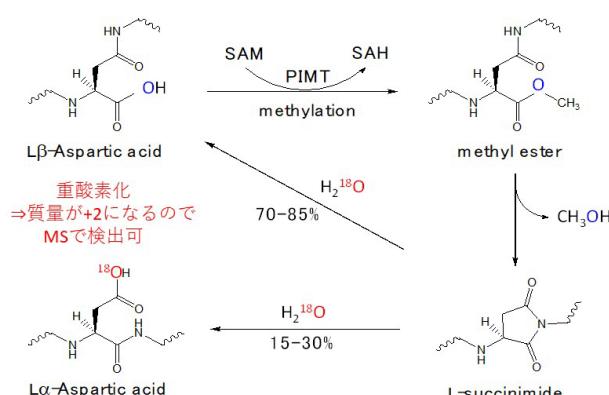


図 3 L β -Asp 残基の特異的ラベル化法

PIMT は L β -Asp 残基を特異的に認識し、側鎖をメチルエステル化することで、スクシンイミドの生成を促進させる。PIMT 反応を H₂¹⁸O 中で行うことにより、スクシンイミドが加水分解される際、¹⁸O を取り込むため、PIMT 反応を経由した Asp は 2 Da 質量が増加する。

すなわち、試料中に L β -Asp を含むペプチドが存在する場合、H₂¹⁸O 中で PIMT 反応を行うことで、L β -Asp を含む部位のみが特異的に ¹⁸O を取り込み、+2 Da の質量増加を伴う L α -Asp へと変換される。この質量変化を利用すれば、リン酸化やアセチル化と同様に、質量差を指標とした翻訳後修飾解析が可能となる。すなわち、+2 Da を有する Asp 残基をもつペプチドを網羅的に探索することで、異性化部位として特定できる。

実際のサンプルについてこの手法を適用すると、元来存在する L α -Asp ペプチドと、PIMT 反応によって+2 Da のラベルを獲得した L α -Asp ペプチド (L β -Asp ペプチド由来) が混在する。両者の物理化学的性質はほぼ同一であり、クロマトグラフィーで分離することができない。内

在性の L α -Asp ペプチドは最も豊富に生体内に存在することから、これが+2 Da シグナルの検出を妨げるため、分析前に内在性 L α -Asp を選択的に除去する工程が不可欠であった。

そこで、PIMT 反応に先立って AspN を作用させ、内在性 L α -Asp を含むペプチドを分解することで+2Da のシグナルを高感度に検出することが可能になった。また、AspN が残存すると、PIMT 反応により生成した+2 Da の L α -Asp ペプチドも分解されてしまうため、反応後速やかに AspN を除去する必要があった。この課題に対し、ヒスチジンタグを融合させた AspN とヒスタグ精製用磁気ビーズを用いた精製工程を組み込み、反応終了後に簡便かつ完全に AspN を除去できるワークフローを確立した¹¹⁾。

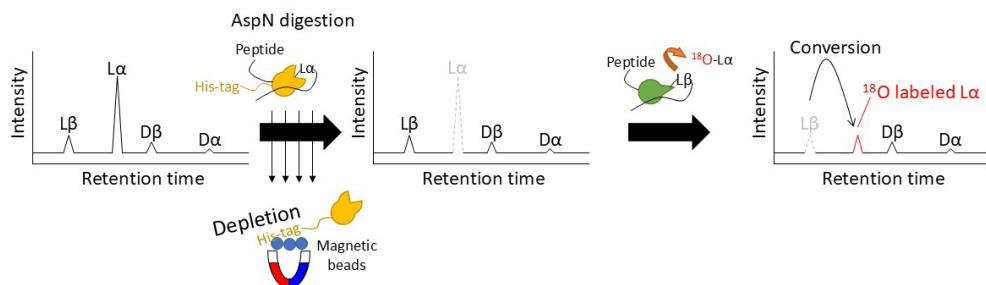


図 4 L_β-Asp 残基の特異的ラベル化法を用いた Asp 異性体の大規模解析法

L_α-Asp 残基を特異的に切断する AspN をトリプシン消化物に対して処理したのち、磁気ビーズを用いて AspN を取り除く。その後、H₂¹⁸O 中で PIMT 反応を行うことにより、L_β-Asp を含むペプチドを特異的にラベル化できる。

開発した技術をウシ水晶体由来の α -クリスタリンに適用した結果、従来より異性化が進行することが知られていた α A-クリスタリンの 58 番目および 151 番目を含む複数の Asp 残基において、ノンターゲットかつ網羅的に異性化部位を同定することに成功した。

本手法は L_β-Asp に特異的にラベルが導入されるため、直接的に D-Asp を検出する手法ではない。しかし、Asp 異性化は必ずスクシンイミドを経由し、その平衡は L_β-Asp に強く偏ることから、D-Asp に変換されたペプチドでは必ず L_β-Asp も生成する。実際、L_β-Asp が検出されたペプチドのマスクロマトグラムを詳細に解析すると、D_α-Asp および D_β-Asp 由来のピークも確認されており、本手法が Asp 異性化を網羅的に探索可能な技術であることが示されている。

6. おわりに

これまでに筆者は Asp 異性体の解析手法の開発を行ってきており、従来のジアステオマー誘導体化法と比べて、スループット、感度、網羅性のいずれの面においても飛躍的な進歩を遂げた。しかしながら、この大規模解析技術は Asp 異性体の分析のみに特化した技術であり、他のタンパク質構成アミノ酸の異性化を検出することはできない。実際ヒトにおいて、グルタミン酸やセリンの異性化が知られているほか、カモノハシや南アフリカアマガエルを始めとする毒を有する生物では生理活性ペプチドとして D-アミノ酸を含むペプチドを酵素的に生合成している。しかしながら、Asp 以外のアミノ酸異性体を含むペプチドを網羅的に探索するような技術は現在開発されて

いない。このような Asp 以外のアミノ酸が異性化したペプチドも含めた包括的な異性化分析技術の開発は、バイオ医薬品の品質管理や疾患・老化のバイオマーカー開発において重要な技術になるものと考えられる。

利益相反：無

【参考文献】

- 1) Fujii N, Satoh K, Harada K et al.: Simultaneous stereoinversion and isomerization at specific aspartic acid residues in alpha A-crystallin from human lens. *J Biochem.* **116**, 663-669, 1994
- 2) 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
- 3) Kaneko I, Morimoto K, Kubo T: Drastic neuronal loss in vivo by beta-amyloid racemized at Ser(26) residue: conversion of non-toxic [D-Ser(26)]beta-amyloid 1-40 to toxic and proteinase-resistant fragments. *Neuroscience.* **104**, 1003-1011, 2001
- 4) Ha S, Kinouchi T, Fujii N: Age-related isomerization of Asp in human immunoglobulin G kappa chain. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom.* **1868**, 140410, 2020
- 5) Wang J, Guo C, Meng Z et al.: Testing the link between isoaspartate and Alzheimer's disease etiology. *Alzheimers Dement.* **19**, 1491-1502, 2023

- 6) Gossler-Schofberger R, Hesser G, Reif M M et al.: A stereochemical switch in the aDrs model system, a candidate for a functional amyloid. *Arch Biochem Biophys.* **522**, 100-106, 2012
- 7) Sakaue H, Kinouchi T, Fujii N et al.: Isomeric Replacement of a Single Aspartic Acid Induces a Marked Change in Protein Function: The Example of Ribonuclease A. *ACS Omega.* **2**, 260-267, 2017
- 8) Aki K, Fujii N, Fujii N Kinetics of isomerization and inversion of aspartate 58 of alphaA-crystallin peptide mimics under physiological conditions. *PLoS One.* **8**, e58515, 2013
- 9) 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
- 10) Maeda H, Takata T, Fujii N et al.: Rapid survey of four Asp isomers in disease-related proteins by LC-MS combined with commercial enzymes. *Anal Chem.* **87**, 561-568, 2015
- 11) Sakaue H, Kuno A isoAsp-Quest: workflow development for isoAsp identification using database searches. *J Biochem.* **177**, 37-44, 2025

【ご略歴】



坂上 弘明（さかうえ ひろあき）氏

2009-2011 京都大学大学院理学研究科化学専攻 修士課程
2011-2014 京都大学大学院理学研究科化学専攻 博士後期課程
2014-2016 国際医療福祉大学薬学部 助手
2016-2017 国際医療福祉大学薬学部 助教
2017-2021 東京薬科大学薬学部 助教
2021-2026 産業技術総合研究所細胞分子工学研究部門 研究員
2026-現在 産業技術総合研究所生命工学領域研究企画主幹