

宇宙環境下における眼や皮膚組織中の蛋白質の構造変化

京都大学原子炉実験所 藤井 紀子、森本幸生、渡邊正己、杉山正明、木野内忠稔、齊藤毅
 福岡工業大学工学部 三田 肇
 筑波大学臨床医学系眼科 加治 優一

Structure and function alteration on proteins of skin and lenses in space environment

Noriko Fujii, Yukio Morimoto, Masami Watanabe, Masaaki Sugiyama, Tadatoshi Kinouchi, Takeshi Sato

Research Reactor Institute, Kyoto University

2 Asashironishi Kumatori, Sennan, Osaka 590-0494

Hajime Mita

3-30-1 Wajiro-higashi Higashiku Fukuoka 811-0295

Fukuoka Institute of Technology

Yuichi Kaji

Department of Ophthalmology, University of Tsukuba Institute of Clinical Medicine

Tennoudai 1-1-1 Tsukuba, Ibaraki 305-8575

e-mail:nfujii@rri.kyoto-u.ac.jp

Abstract: Estimation of influence of cosmic ray on protein structure and function is very important for the human space activity. We have found that racemization, isomerization, glycation and oxidation of amino acids in protein by oxidative stress and aging. Therefore, our proposal is the determination of racemization, glycation and oxidation of amino acids, those are indicators of structure and function alteration on protein induced by cosmic ray.

Keywords: Cosmic ray, UV irradiation, Higher structure of protein, Racemization, Oxidation, Glycation, α -Crystallin, Eye, Skin, Aging

【研究の背景】 人類は宇宙空間での活動領域を広げる上で、地上では体験しえなかったような様々な線質の宇宙放射線を大線量被曝することになる。現在までに、宇宙放射線が生体に与える影響について、DNA 損傷や細胞死に着目した研究が多く行われているが、タンパク質の構造変化の誘起とそれに伴う機能障害や疾患の誘発に着目した研究はほとんどない。それはタンパク質への影響を測定する適切な分子指標がなかったからと考えられる。しかしながら、近年のプロテオミクス研究の進歩により、タンパク質を構成するアミノ酸の酸化が質量分析などで、容易にできるようになると、メチオニン、システイン、トリプトファン、ヒスチジン、リジンなどのアミノ酸は非常に酸化の影響を受けやすいアミノ酸であることが判明してきた。一方、我々は、これ

までに加齢に伴って眼の水晶体に存在する主要タンパク質である α -クリスタリンの特定部位の Asp 残基が著く異性化(L 体から D 体への反転ならびに α 結合から β 結合への異性化)することを見いだした。タンパク質中でアスパラギン酸(Asp)残基が L 体から D 体へ反転するとペプチド平面に対し側鎖の向きが反対になるのでペプチド結合は不安定となる。さらに α 結合から β 結合へ異性化すると主鎖が長くなるのでこれもペプチド結合に歪みをもたらすと考えられる。それゆえ、これらの変化がタンパク質の二次構造及び高次構造を変化させ、そのためにタンパク質の機能が著しく低下すると考えられる。事実、Asp 残基の著しい反転が生じている α -クリスタリンは異常凝集を引き起こし、 α -クリスタリンの機能であるシャペロン活性(水晶体中の他のクリスタリン

分子の凝集を抑制する機能)が著しく低下していた。従って、一次構造上に生じたアミノ酸の異性化反応が引き金となり、高次構造変化、機能低下を引き起こし、白内障を惹起するのではないかと考えられる。我々はさらに、皮膚、血管壁などの結合組織のタンパク質中にも酸化ストレス、加齢に伴ってD-Asp 残基が増加していることを見いだしている。つまり、このような反応は酸化ストレスに伴い体内のどこにでも普遍的に生じていると考えられる。これは、DNA 損傷によるタンパク質の発現異常に依らない、物理・化学ストレスによるタンパク質の構造変化と、それに伴う機能障害・疾患の誘発に着目した新しい研究である。

[研究の準備状況] 我々はこれまでに主に水晶体に放射線照射や紫外線照射を行い、アミノ酸のラセミ化反応や酸化反応が進行することを報告してきた。本年度は水晶体のみならず、マウスの皮膚に紫外線照射し、その結合組織のタンパク質中の Asp 残基のラセミ化が増加するとともに酸化ストレスのマーカーと考えられている非酵素的糖鎖付加 (AGE 化) がラセミ化部位と同一部位に生じていることを免疫組織染色および免疫蛍光染色によって確認した。現在、紫外線曝露部位にのみ生じるラセミ化と AGE 化が同時に生じている蛋白質の同定とそのアミノ酸の修飾部位を決定しているところである。

[本研究チームの特性] タンパク質中のアミノ酸のラセミ化研究は本グループがパイオニアであり、当該分野をリードしているため、独創性の高い研究が遂行できる。さらに本チームは生化学者、タンパ

ク質構造解析研究者、放射線生物学者、医師で構成されているため、タンパク質の一次構造から高次構造変化、疾患に至るまでの過程を統一的に理解することが可能である。また、本研究チーム代表者の所属する京都大学原子炉実験所では平成 22 年度より原子炉の運転再開が予定されており、紫外線照射に加えて中性子線照射が可能である。宇宙環境下における放射線被曝を想定し、紫外線、ガンマ線、中性子線照射実験を行うことが可能でありタンパク質やアミノ酸の修飾に着目したユニークな宇宙放射線生物影響研究の遂行が可能である。

[本年度研究チームの会合の成果] 本年度研究チームの会合で下記の実験を行うことを検討した。

1) 京都大学原子炉実験所にて生体への中性子線照射の準備実験として、マウス皮膚に紫外線照射をおこない、蛋白質を抽出した。この蛋白質の二次元電気泳動を行い、申請者らの開発した D-Asp 含有抗体と市販の AGE 抗体で Western blot を行う。両抗体に陽性のスポットをゲル内消化し、質量分析によりこれらの蛋白質の同定を試みる。次いでアミノ酸のラセミ化、酸化が生じているタンパク質の同定を行い、ラセミ化、酸化部位を特定する。

2) このような修飾を受けたタンパク質の 4 次構造変化について X 線小角散乱などで追跡する。

[今後の予定] 宇宙環境を長期間経験した哺乳類の水晶体や皮膚組織中の D-アミノ酸やアミノ酸の AGE 化の蓄積を解析することにより、宇宙放射線の人体への影響に関する基礎データを収集し、宇宙飛行士の酸化ストレス予防などに貢献していきたい。

