

特集：D-アミノ酸制御システムのニューバイオロジー：
Frontier Science in Amino Acid and Protein Research

加齢性疾患におけるタンパク質中の アスパラギン酸残基のラセミ化

藤井紀子¹⁾, 加治優一²⁾

生体を構成するタンパク質はL体のみのアミノ酸から成り、我々の身体の中でL体からD体に変化することはないと考えられてきた。しかし、近年、眼、脳、皮膚、歯、骨、動脈壁、靭帯など種々の組織で加齢に伴ってD-アスパラギン酸 (D-Asp) が増加し、蓄積していることがあきらかとなってきた。これらは白内障、加齢性黄斑変性症、アルツハイマー病、動脈硬化、皮膚硬化など、タンパク質の異常凝集を伴う加齢性疾患と関連している。本稿ではこれらについて述べるとともに、なぜタンパク質中で Asp 残基だけが D 体化しやすいのか、また、どのような部位の Asp 残基が D 体化しやすいのかその生成機構について述べる。

1. はじめに

タンパク質は20種類のそれぞれ性質の異なるアミノ酸が重合し固有の立体構造を有し生体内で多様な機能を担っている。グリシンを除いた19種類のアミノ酸にはL体とD体の光学異性体が存在する。L体、D体のアミノ酸は光学的性質を除き物理的・化学的性質は全く同じである。アミノ酸の化学合成では不斉合成をしない限り、L体、D体の等量から成るラセミ混合物が得られる。同様に生命の発生前の原始地球上でもL体、D体のアミノ酸は等量生成されたと考えられている。原始地球上でL体、D体のアミノ酸はそれぞれ縮重合しL-ポリペプチド、D-ポリペプチド、

LD-ポリペプチドが形成されたと考えられるが、化学進化の過程でL-ポリペプチドのみがタンパク質となり、今日の生命世界が生まれた。LD-ポリペプチドは無数のジアステレオマーが形成されてしまうので、立体構造形成が不利でありタンパク質へと進化できずに消滅したと考えられる。しかし、D-ポリペプチドは、L-ポリペプチドと同様ホモキラルなペプチドであり、立体構造形成になんら不都合なことではない。それゆえ、なぜ、L-ポリペプチドが選択されてD-ポリペプチドが排除されたのかは全くわかっておらず、生命の起原の最大の謎の一つとされている。

原始地球上でL-アミノ酸のみが選択された理由は不明であるが、L-アミノ酸は重合しL-ポリペプチドとなり、タンパク質へと進化し、L-アミノ酸ワールドが成立して生命が誕生した。従ってこのL-アミノ酸のみによる片手構造の維持はタンパク質のフォールディング、機能など生命活動にとってきわめて重要である。それゆえ、生命活動が維持されている限りタンパク質中のアミノ酸がL体からD体に変わることはない、長い間信じられてきた。しかし近年、表1に示すように種々の老化組織(眼¹⁻³⁾、脳⁴⁻⁶⁾、皮膚⁷⁾、歯⁸⁾、骨^{9,10)}、動脈¹¹⁾、靭帯¹²⁾など)でD-アスパラギン酸 (D-Asp) が加齢に伴って増加し、白内障、加齢性黄斑変性、アルツハイマー病、動脈硬化、皮膚硬化等と関連す

¹⁾ 京都大学原子炉実験所放射線生命科学部門 (〒590-0494 大阪府泉南郡熊取町朝代西2)

²⁾ 筑波大学臨床医学系眼科 (〒305-8575 つくば市天王台1-1-1)

Racemization of aspartyl residues of proteins in age-related disease

¹⁾ Noriko Fujii (Research Reactor Institute, Kyoto University, Kumatori, Sennan, Osaka 590-0494, Japan)

²⁾ Yuichi Kaji (Department of Ophthalmology, Tsukuba University Institute of Clinical Medicine, Tennoudai 1-1-1, Tsukuba, Ibaraki 305-8575, Japan)

表1 種々のタンパク質中に含まれる D-アミノ酸

組織	タンパク質	アミノ酸	関連疾病	D-アミノ酸の部位	文献
水晶体	αA-クリスタリン	D-Asp	白内障	Asp58, Asp151	1
水晶体	αB-クリスタリン	D-Asp	白内障	Asp36, Asp62	2
網膜	?	D-Asp	加齢性黄斑変性症	?	3
結膜	?	D-Asp	瞼裂斑	?	3
角膜	?	D-Asp	角膜変性症	?	3
脳	ミエリン	D-Asp	?	?	4
脳	β-アミロイド	D-Asp	アルツハイマー病	Asp1, Asp7, Asp23	5
脳	β-アミロイド	D-Ser	アルツハイマー病	Ser 8, 26	6
皮膚	エラスチン?	D-Asp	皮膚硬化	?	7
歯	ホスホホリン	D-Asp	?	?	8
骨	オステオカルシン	D-Asp	?	?	9
骨	I型コラーゲンC末端テロペプチド	D-Asp	ベーチェット病?骨粗鬆症?	Asp 1211	10
動脈	エラスチン?	D-Asp	動脈硬化	?	11
靭帯	エラスチン?	D-Asp	?	?	12

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。また、D-アミノ酸が混入したタンパク質では分解系の酵素も反応しないと考えられる。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す、疾病に関与していると考えられている。

2. 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

我々は老化したヒトの水晶体のタンパク質中にD-Asp残基が存在することを見だし、D-Asp残基を含むタンパク質が水晶体中のどのタンパク質であるかを生化学的に追跡した。すなわち、水晶体のタンパク質を分画し、それぞれの画分で得られたタンパク質を加水分解し、Asp残基の光学異性体分析を行った。その結果、D-Aspを含んでいるタンパク質はα-クリスタリンのサブユニットであるαA-クリスタリンとαB-クリスタリンであることがわかった。水晶体のタンパク質は主としてα、β、γの3種類のクリスタリンから成るがβ、γ-クリスタリンにはD-Aspは見いだ

表2 ヒト水晶体αA、αB-クリスタリン中のAsp残基の反転・異性化の局在と隣接残基

クリスタリン	Asp	Asp (D/L比)		隣接残基との結合		隣接残基
		80歳代	0歳代	80歳代	0歳代	
αA	Asp-58	3.10	0.00	β	α	Ser-59
αA	Asp-151	5.70	0.00	β	α	Ala-151
αB	Asp-36	0.92	0.00	β	α	Leu-37
αB	Asp-62	0.57	0.00	β	α	Thr-63

せなかった。αA-クリスタリンは173残基、αB-クリスタリンは175残基のアミノ酸からなる分子量約20kDaのタンパク質である。αA-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、αB-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。これらのうち、どのAsp/Asn残基がD体化しているのかを明らかにするため、αA-クリスタリン、αB-クリスタリンをそれぞれトリプシンで処理し、得られたペプチド断片をHPLCで分離、分取し、質量分析とアミノ酸配列分析によってこれらのペプチド断片を同定した。トリプシン処理で得られたペプチドは1, 2の例外を除き、そのペプチド断片中に1個のAsp/Asn残基しか含まないので、ペプチドの同定後加水分解してアミノ酸の光学異性体分析を行えば、タンパク質中のすべてのAsp/Asn残基の一つ一つの部位に対してD/L比を求めることができる。このような手法により、αA-クリスタリン、αB-クリスタリン中の個々のAsp残基のD/L比をすべて決定した。その結果、80歳代のヒトαA-クリスタリン中のAsp-58, Asp-151残基¹⁾、αB-クリスタリン中のAsp-36, Asp-62残基のみが著しくD体化しており²⁾、他のAsp/Asn残基に変化はないということが初めて明らかになった(表2)。中でも特筆すべきことは80歳のヒトαA-クリスタリンのAsp-151残基のD/L比が5.7、Asp-58残基のD/L比が3.1と、D体の比率が本来のL体より著しく大きいということであった。Asp残基のD/L比が1.0を越す大きい値が得られているのは、いまのところヒトαA-クリスタリンのみである。また、αA-, αB-クリスタリン中では、L-Asp残基からD-Asp残基への反転反応は隣接アミノ酸残基との結合がα結合からβ結合へと異性化(β-Asp化)する反応を伴っていることが明らかになった。これらの結果からAsp残基は五員環イミド体を中間体として、ラセミ化することが明確となった¹³⁾。次の項でその機構について詳細に述べる。

3. タンパク質中では、なぜアスパラギン酸残基だけがD体に変化するのか?

前述したようにタンパク質中でAsp残基のL体からD体への反転とα結合からβ結合への異性化が同時に生じていた。この結果からこれらの反応は図1に示すようにL-α-

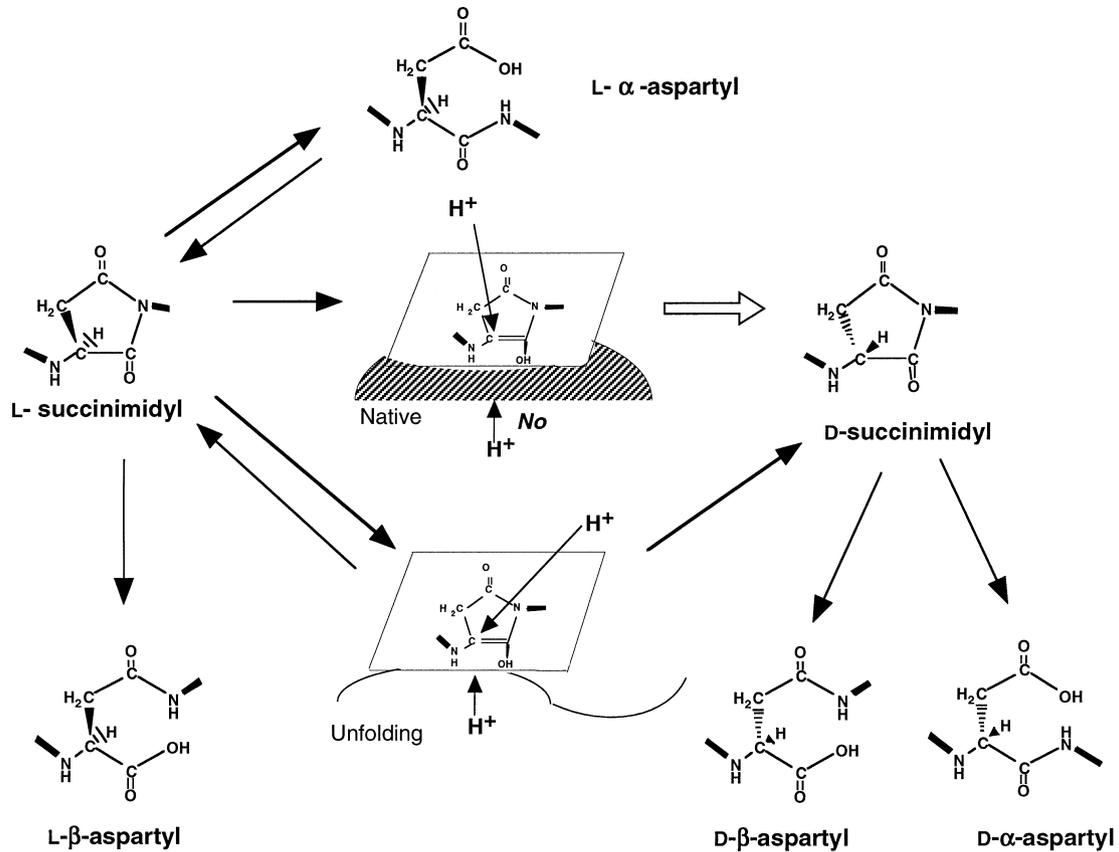


図1 タンパク質中での Asp 残基の反転・異性化の機構

Asp 残基が C 末端側隣接アミノ酸残基の主鎖の窒素原子による求核攻撃により脱水縮合して五員環イミドを形成し、イミド上で反転しその後の開環時に α 結合と β 結合が生じ、D-イミド体から D- α -Asp 残基、D- β -Asp 残基、L-イミド体から L- α -Asp、L- β -Asp 残基の計 4 種の異性体が生成されることが判明した。生体内のタンパク質中で見だされている D-アミノ酸が主として Asp 残基であるのは、Asp 残基がカルボキシル基を有するため、図 1 に示すように五員環イミド体を形成してイミド上で簡単に反転が生じるためであると考えられる。他のアミノ酸が L 体から D 体へラセミ化するためには不斉炭素に結合している H が脱離しなければならないが、生体内のような温和な環境では起こりにくいと思われる。しかし、Asp 残基の場合は上述したように側鎖の特殊性のために、図 1 に示すような経緯で容易に反転と異性化が生じると考えられた。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。事実、反転が生じていたヒト α A-クリスタリン中の Asp-58、Asp-151 残基の隣接残基はそれぞれ Ser-59、Ala-

152 で Asp 残基にイミドを形成させやすいアミノ酸であり、それゆえ、Asp-58、Asp-151 残基は反転が生じやすい環境にあると言える。しかし、 α B-クリスタリン中の Asp-36、Asp-62 残基の隣接残基はそれぞれスレオニンとロイシンといういずれも嵩高いアミノ酸であり、Asp 残基のイミド形成には寄与しにくいと考えられる。しかも α B-クリスタリン中には他に Asp140-Gly、Asn146-Gly というイミド形成に最も都合の良い配列がありながら、これらの残基にはラセミ化や異性化が全く生じていなかった²⁾。それ故、反転反応は Asp の隣接残基の影響だけに依存しているのではなく Asp 残基周辺の立体構造の寄与も大きいと考えられた。

また、 α A-クリスタリン中の Asp-151、Asp-58 の D/L 比が 1.0 を上回る高い値を示したのは、図 1 に示したように中間体 [I] の下方にプロトンの攻撃ができないような反応場が存在し、プロトンの付加が上方からだけに制約されているがゆえに D-イミド体が優先的に形成されるためであるということがわかった¹³⁾。この結果はタンパク質の立体構造がアミノ酸の立体配置を決定しているという明確な証拠であり、タンパク質化学的にも興味深い例といえる。これらの結果は、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

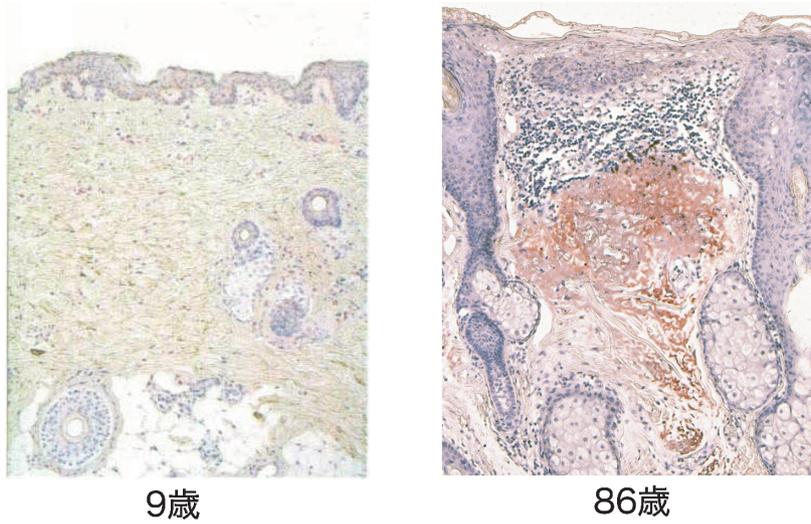


図2 老人の顔の皮膚に存在する D-β-Asp 含有タンパク質 (赤色部位)

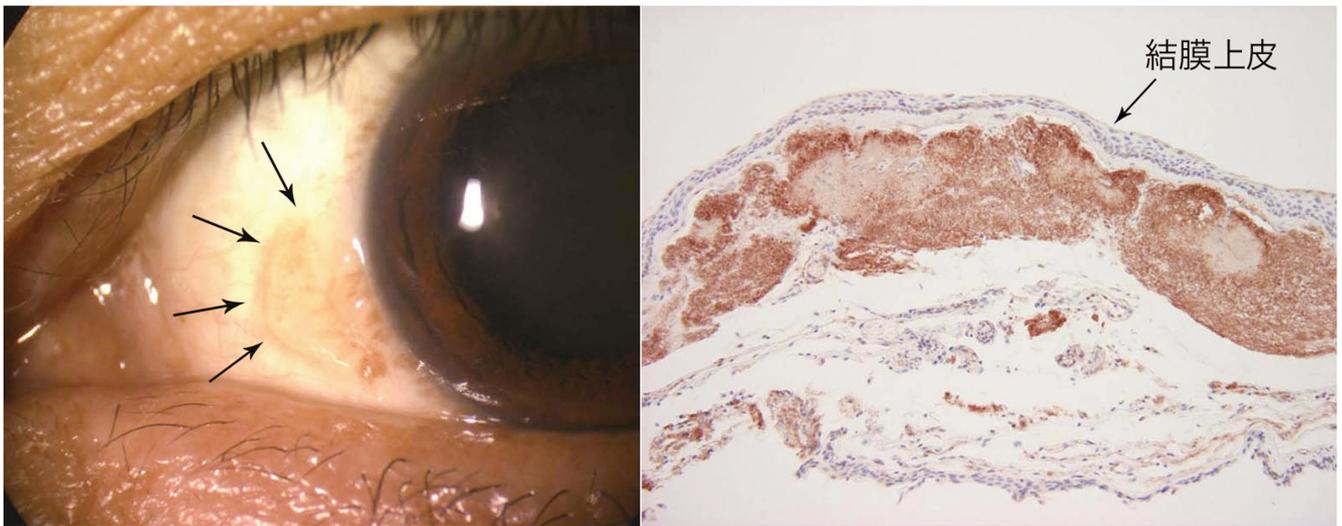


図3 瞼裂斑における D-β-Asp 含有タンパク質の局在

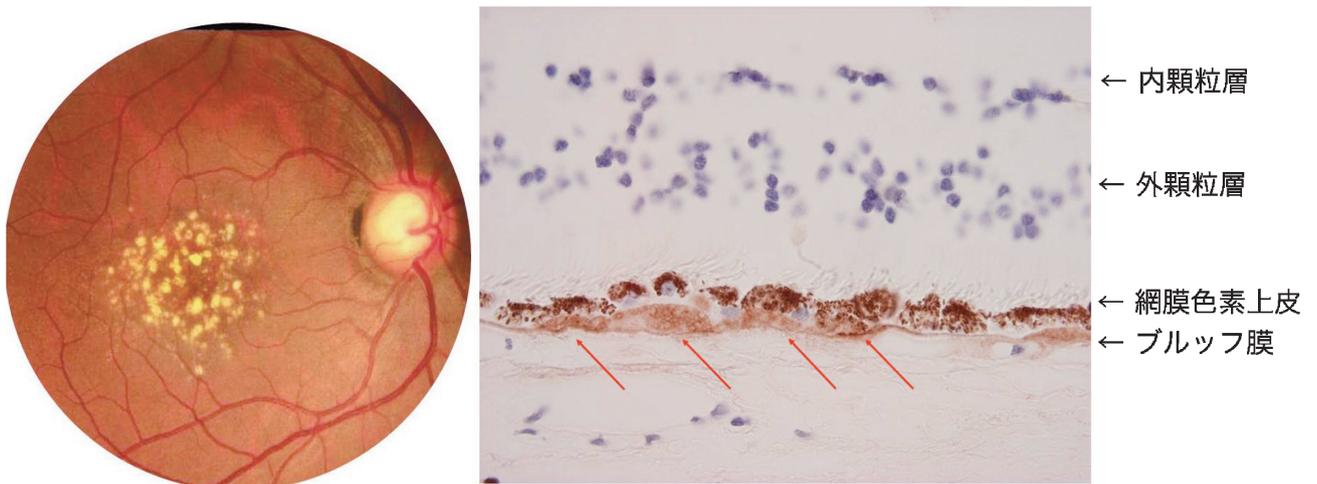


図4 加齢性黄斑変性における D-β-Asp 含有タンパク質の局在

反応ではなく、上記のような条件さえ整えばどこにでも容易に起こりうることを示している。さらに α A-クリスタリン中の Asp-151 残基はヒト水晶体だけでなく、マウス、ウシ、ウマの水晶体など種を超えて加齢や紫外線照射に伴って部位特異的に反転異性化することがわかった。 α A-クリスタリン中の Asp-151 残基周辺は種によって配列が若干異なるにも関わらず、この残基は反転しやすいということが明らかとなった。

4. D- β -Asp 含有タンパク質特異抗体の調製

そこで我々はヒト α A-クリスタリン中の Asp-151 残基周辺と同一配列で 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種々の組織から D- β -Asp 含有タンパク質を探索することにした。得られた抗体は Asp 残基の 4 種類の異性体のうち D- β -Asp 含有タンパク質のみと特異的に反応した¹⁴⁾。

5. 種々の組織における D- β -Asp 含有タンパク質の免疫組織染色による探索

5-1 皮膚

水晶体は常時太陽紫外線に曝露されている器官である。水晶体タンパク質中でのアミノ酸のラセミ化は加齢変化と紫外線照射の両方の影響によって促進されるのではないかと考えられた。そこで、加齢変化に加えて紫外線影響を受けている皮膚に対して、上述した抗体を用いて免疫組織染色を行った。その結果、図 2 に示すように 80 歳代の老人の顔の皮膚に D- β -Asp 含有タンパク質を見いだした。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った⁷⁾。この結果はタンパク質中での D- β -Asp 生成が老化によって増加し、紫外線照射が促進するというを示している。また、ウエスタンブロットによって、皮膚中の D- β -Asp 含有タンパク質は約 50kDa のエラスチンの断片であると示唆された⁷⁾。

5-2 加齢に伴って生じる水晶体以外の眼組織の D- β -Asp 含有タンパク質

我々は加齢の進んだ眼において 4 の項で述べた D- β -Asp 含有タンパク質抗体を用いて免疫組織染色を行った。その結果、40 代以上の眼において水晶体の核、強膜、結膜における瞼裂斑 (図 3)、脈絡膜毛細血管板、ブルッフ膜、網膜内境界膜、網膜血管基底膜、加齢黄斑変性症の原因となるドルーゼン (図 4)、角膜変性疾患 (spheroid degeneration) において D- β -Asp 含有タンパク質が沈着していることが明らかとなった³⁾。加齢性黄斑変性、角膜変性疾患はともに失明を惹起する深刻な疾患である。また、瞼裂斑は老人の眼に見られる黒目と白目の境の黄色く盛り上がった

原因不明の沈着物である。これらの疾患における沈着物が何であるのかは不明であったが、D- β -Asp 含有タンパク質がこの沈着物中に存在することがはじめてわかった。上記の組織では D- β -Asp 含有タンパク質はいずれも加齢に伴って生じた沈着物の中に存在するというところに共通点があった。

6. D- β -Asp 残基はタンパク質の異常凝集を惹起する

タンパク質の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。従ってアミノ酸の立体配置の反転はペプチド結合の安定性を著しく脅かすものと考えられ、異常凝集を誘導するものと考えられる。また、図 1 に示したように Asp 残基の反転は隣のアミノ酸残基との結合が α 結合から β 結合へと変化してしまう異性化をもたらす。これによって主鎖の距離が長くなり、これもタンパク質の立体構造に大きなひずみをもたらすと考えられる。これらの変異がタンパク質の異常凝集の引き金となると考えられる。D-Asp が見いだされている α -クリスタリン、 β -アミロイドタンパク質、エラスチンなどはいずれも β シート構造に富むタンパク質 (一般に β シート構造に富むタンパク質はストランド間での水素結合が生じ会合体をとりやすい) が多く、異常凝集体を形成し、深刻な疾病を引き起こしている。

7. 脳のタンパク質中に存在する D-アスパラギン酸

脳内のミエリン塩基性タンパク質⁴⁾や老人斑中の β -アミロイドタンパク質中⁵⁾に、D-Asp および D-セリン (D-Ser) がそれぞれ数%存在することが報告されている。Rohr⁵⁾らはアルツハイマー病患者の脳から得た β -アミロイドタンパク質 (42 アミノ酸残基) 中の Asp-1, Asp-7, Asp-23 残基がラセミ化および異性化していることを明らかにした。そのラセミ化率は水晶体よりかなり低く、ラセミ化よりはむしろ異性化 (L- β -Asp 化) の方が進行している。その後、これらの生理作用を解明するために各種 D-Asp 含有 β -アミロイドタンパク質のアナログが合成され、Asp-23 を D 体に変換した β -アミロイドタンパク質 1-35 β (1-35) は正常の L 体の β (1-35) より凝集性が高く、神経細胞障害活性が高いことが示唆された¹⁵⁾。また、清水らは β -アミロイド中の 23 番目の Asp 残基の L- β -Asp 化が線維や老人斑形成を促進させ (7 番目の Asp の異性化は線維形成とは無関係)、アルツハイマー病に関連すると指摘した¹⁶⁾。さらに、金子らは Ser-26 が D 体に置換された β -アミロイド (1-40) は微小線維形成能を持たないこと、Ser-26 がラセミ化されると β -アミロイドタンパク質は可溶性になり老人斑より漏出し、断片化し、老人斑蓄積部位から遠く離れた海馬の

神経細胞に障害を与えると示唆している⁶⁾。

8. 歯, 骨, 動脈壁, 靭帯のタンパク質中に存在する D-アスパラギン酸

歯のタンパク質中に D-Asp が存在し, その量が加齢と共に増加するという報告は古くから知られていた. その後 Masuda ら⁸⁾によって歯の D-Asp 含有タンパク質はホスホホリンであることが示唆された.

骨を構成する I 型コラーゲンはその C 末端にコラーゲン独特のヘリックスを形成しないテロペプチド CTx を持つが, これは分解されて尿中に見いだされる. 最近, この CTx ((AHDGGR¹²⁰⁹⁻¹²¹⁴)) 中の Asp-1211 がラセミ化, 異性化されていることが報告され, ベーチェット病患者や骨粗鬆患者の尿中 CTx の Asp-1211 のラセミ化は正常のヒトのそれより高いことが示された¹⁰⁾. また, 動脈壁¹¹⁾や靭帯を形成するエラスチン中に D-Asp が存在することも報告されている¹²⁾.

9. エラスチン中で Asp 残基はラセミ化するか?

D-Asp 含有タンパク質が見いだされた皮膚, 眼の強膜とブルッフ膜, 靭帯, 血管壁は皆エラスチンに富むタンパク質である. エラスチンは結合組織の主要タンパク質で弾性を保持するタンパク質である. エラスチン中で Asp 残基はラセミ化するであろうか? エラスチンは抽出が困難なタンパク質であるので, 我々は皮膚エラスチン中に存在する Asp を含むペプチドと同一配列のペプチドを化学合成し, この合成ペプチド中における Asp 残基のラセミ化反応速度と活性化エネルギーを求めることによって, エラスチン中の Asp 残基のラセミ化と加齢との関係について検討した¹⁷⁾. エラスチン中にはエキソン 6 に一つ, エキソン 26A に二つの Asp 残基が存在している. 本研究で我々は, エキソン 6, 26A に存在する Asp 残基を含むペプチド, 1) GVADAAAA, 2) REGDPSSS, 3) AGADEGVR をそれぞれ合成した. これらの加熱実験によって各ペプチド中の Asp 残基の D/L 比を測定し, Asp 残基のラセミ化反応速度定数を算出した. さらに各ペプチド中での Asp のラ

表 3 エラスチン合成ペプチド中での Asp 残基のラセミ化反応の解析

ペプチド	アミノ酸配列	E (kcal/mol)	$k_{37} \times 10^2$ (/年)	Y_{37}
エキソン 6	GVADAAAA	29.0	2.59	101.0
エキソン 26A-1	REGDPSSS	26.2	4.27	61.3
エキソン 26A-2	AGADEGVR	25.7	5.55	47.0

E: 活性化エネルギー, k_{37} : 37°C での Asp 残基のラセミ化反応速度定数

Y_{37} : 37°C でエラスチン中で Asp の D/L 比が 1.0 (0.99) に到達する年数

セミ化反応に対する活性化エネルギーを算出し, ヒトの体温 (37°C) において Asp 残基の D/L 比が 1.0 (0.99) に達するまでの時間を求めた (表 3). 三つのペプチド間において, 3) のペプチド中の Asp 残基が最もラセミ化を受けやすく, 1) のペプチド中の Asp 残基が最もラセミ化を受けにくいという結果が得られたが, ラセミ化反応の活性化エネルギーに顕著な差はみられなかった. またヒトの体温 (37°C) において, エラスチン中に存在する Asp の残基 D/L 比が 1.0 (0.99) に達する時間は約 50 年~100 年であることがわかり, ヒトの皮膚中に存在するエラスチンの Asp 残基は一生の間に非常にラセミ化を起こしやすいということが明らかになった¹⁷⁾.

10. おわりに

従来, 生体内のような穏和な条件下ではタンパク質中のアミノ酸残基の反転異性化はあり得ないとされており, 十分な研究の蓄積はなかった. しかし, 本稿で示したようにタンパク質中の Asp 残基は当初考えていたよりも, ずっと容易に反転異性化することが明らかとなった. 水晶体ではその主要成分である α A-クリスタリンと α B-クリスタリンが互いに相互作用して四十量体の高次会合体を形成しているが, 加齢とともにこの会合体はさらに大きな異常凝集体を形成し, 機能低下する. この理由は今まで不明であったが, Asp 残基の反転異性化が引き金になっているのではないだろうか. また, 水晶体以外の様々な組織でも沈着物や凝集体の存在するところに D-Asp 含有タンパク質が存在していることが明らかになってきた. このような反応がタンパク質の立体構造に影響し, 機能を低下させ様々な疾病を引き起こすものと考えられる. 現在のところ, L- β -Asp 含有タンパク質の修復酵素として PIMT (protein L-isoaspartyl methyltransferase)¹⁸⁾が, D- α -Asp 含有タンパク質の分解酵素として DAEP (D-aspartyl endopeptidase)¹⁹⁾などが知られている. これら防御機構研究の発展がタンパク質機能不全の修復や疾病の予防に貢献するものと期待される.

文 献

- 1) Fujii, N., Satoh, K., Harada, K., & Ishibashi, Y. (1994) *J. Biochem.*, **116**, 663-669.
- 2) Fujii, N., Ishibashi, Y., Satoh, K., Fujino, M., & Harada, K. (1994) *Biochim. Biophys. Acta*, **1204**, 157-163.
- 3) Kaji, Y., Oshika, T., Takazawa, Y., Fukayama, M., Takata, T., & Fujii, N. (2007) *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **48**, 3923-3927.
- 4) Fisher, G.H., Garcia, N.M., Payan, I.L., Cadilla-Perezrios, R., Sheremata, W.A., & Man, E.H. (1986) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **135**, 683-687.
- 5) Roher, A.E., Lowenson, J.D., Clarke, S., Wolkow, C., Wang,

- R., Cotter, R.J., Reardon, I.M., Zurcher-Neely, H.A., Heinrikson, R.L., Ball, M.J., & Greenberg, B.D. (1993) *J. Biol. Chem.*, **268**, 3072-3083.
- 6) Kaneko, I., Yamada, N., Sakuraba, Y., Kamenosono, M., & Tutumi, S. (1995) *J. Neurochem.*, **65**, 2585-2593.
- 7) Fujii, N., Tajima, S., Tanaka, N., Fujimoto, N., Takata, T., & Shimo-Oka, T. (2002) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **294**, 1047-1051.
- 8) Masuda, W., Nouse, C., Kitamura, C., Terashita, M., & Noguchi, T. (2002) *Arch. Oral. Biol.*, **47**, 47757-47762.
- 9) Ritz, S., Turzynski, A., Schutz, H.W., Hollmann, A., & Rochholz, G. (1996) *Forensic Sci. Int.*, **77**, 13-26.
- 10) Cloos, P.A. & Fledelius, C. (2000) *Biochem. J.*, **345**, 473-480.
- 11) Powell, J.T., Vine, N., & Crossman, M. (1992) *Atherosclerosis*, **97**, 201-208.
- 12) Ritz-Timme, S., Laumeier, I., & Collins, M. (2003) *Int. J. Legal Med.*, **117**, 96-101.
- 13) Fujii, N., Harada, K., Momose, Y., Ishii, N., & Akaboshi, M. (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **263**, 322-326.
- 14) Fujii, N., Shimo-oka, T., Ogiso, M., Momose, Y., Kodama, M., & Akaboshi, M., (2000) *Mol. Vis.*, **6**, 1-5.
- 15) Tomiyama, T., Asano, S., Furiya, Y., Shirasawa, T., Endo, N., & Mori, H. (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 10205-10208.
- 16) Shimizu, T., Fukuda, H., Murayama, S., Izumiyama, N., & Shirasawa, T. (2002) *Neurosci. Res.*, **70**, 451-461.
- 17) Kuge, K., Fujii, N., Miura, Y., Tajima, S., & Saito, T. (2004) *Amino Acids*, **27**, 193-197.
- 18) McFadden, P.N. & Clarke, S. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 2460-2464.
- 19) Kinouchi, T., Ishiura, S., Mabuchi, Y., Urakami-Manaka, Y., Nishio, H., Nishiuchi, Y., Tsunemi, M., Takada, K., Watanabe, M., Ikeda, M., Matsui, H., Tomioka, S., Kawahara, H., Hamamoto, T., Suzuki, K., & Kagawa, Y. (2004) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **314**, 730-736.
-