

加齢によるタンパク質ホモキラリティーの破れ

藤井紀子

京都大学原子炉実験所
〒590-0494 大阪府泉南郡熊取町朝代西 2

(Received: 17, August, 2016 Accepted: 17, August, 2016)

Abstract

Homochirality of proteins is essential for the development and maintenance of life. For a long time, it was considered that D-amino acids were excluded from living systems. However, recently D-aspartate (Asp) residues have been widely detected in proteins obtained from various tissues of elderly individuals. The presence of D-Asp in aged tissues of living organisms is a result of the spontaneous racemization of Asp residues during aging. This review deals with 1) the presence of D-Asp residues in protein of living tissues, 2) the mechanism of D-Asp formation in protein under physiological conditions, 3) the influence of D-Asp on protein structure and function 4) recent advances in D-amino acid analysis in protein.

1. はじめに

タンパク質は 20 種類の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。生命の発生以前の原始地球上では L-体、D-体のアミノ酸が等量生成され、それぞれ重合し、L-, D-, LD-アミノ酸ポリペプチドが形成された可能性が高い。ポリペプチドが高次構造を形成するためにはキラリティーが重要な要素であり、どちらか一方の片手構造でなければ高次構造を形成できない。LD-アミノ酸が混在したポリペプチドでは膨大な数のジアステレオマーが生成されてしまうからである。L-体、D-体のアミノ酸の物理学的、化学的性質は同一であるため、D-アミノ酸ペプチドがあってもよいはずであるが、なぜか D-アミノ酸が排除され、L-体が選択され、地球上のすべての生命は L-アミノ酸ワールドが成立することにより誕生した。その理由は不明である。そのため、生命体では遊離、結合型にかかわらず L-アミノ酸しか合成されず、ホモキラリティーは生命体が生きている限り維持されているはずであると長い間信じられてきた。したがって生命科学の研究領域では、D-アミノ酸は「生体には無縁なもの-非天然型アミノ酸」と定義され、ほとんど研究対象にはならなかった。しかし、最近、種々の高等動物の組織で遊離型、結合型を問わず D-アミノ酸が続々と発見され、生体内で様々な生理機能を担っていることが明らかになってきた。

すなわち、遊離型の D-アミノ酸は神経回路網の活動調節[1]、ホルモンの合成、分泌の調節などを行うこと[2]、また、ペプチドでは D-アミノ酸がその生理活性に必須であるペプチドが発見されている。また、遊離のアミノ酸の合成、代謝などに関与する酵素についての研究も盛んである[3-5]。これらについては 2008 年の生化学誌第 80 巻 4 号に優れた総説が特集号として出版されているのでそちらを参照して頂き、本稿ではタンパク質中の D-アミノ酸について述べる。

タンパク質中の D-アミノ酸は眼の水晶体[6-9]、網膜、結膜、角膜[10]や脳[11, 12]、歯[13, 14]、骨[15]、動脈壁[16]、靭帯[17]、皮膚[18-21]、体液[22]など種々の組織に検出されている。

発見されている D-アミノ酸は、ほぼ、アスパラギン酸 (Asp) 残基であるが、Asp 残基には他のアミノ酸より異性化しやすい理由があり、それについて後述する。Asp は加齢に伴い生体内でラセミ化反応により D-体化し、D-Asp を含んだタンパク質が表 1 に示すように種々の組織に蓄積し、タンパク質の異常凝集を引き起こし白内障、加齢性黄斑変性症、アルツハイマー病、動脈硬化、皮膚硬化等の様々な加齢性疾患の発症に関連することが明らかになってきた。

これは生命の起原と進化の過程で獲得したアミノ酸のホモキラリティーが生きている限り保持されているわけではなく、一個体の老化の過程で失われているという驚くべき事実を示している。本総説では筆者らが研究対象としてきた 1) 水晶体タンパク質中の D-Asp の局在、2) その生成機構と反応速度、3) Asp 残基の異性化によるタンパク質の構造機能変化、4) 結合型 D-アミノ酸の分析法について述べる。

2. 白内障患者の水晶体のクリスタリン中の D-Asp 残基部位の決定

ヒトの水晶体は主に α -、 β -、 γ -クリスタリンというタンパク質で構成されている。 α -クリスタリンは αA -、 αB -クリスタリンという 2 種類のサブユニット (分子量:約 20,000) が存在し 40 量体という大きなヘテロポリマー形成している。 β -クリスタリンにはそれぞれ 6 種類のサブユニット (分子量:約 2-30,000) が存在し 2-6 量体を構成している。 γ -クリスタリ

ンは6種類のサブユニットが存在し、これらは分子量約20,000の単量体である。α-クリスタリンはβ-, γ-クリスタリンと弱い相互作用をすることにより水晶体の透明性を保持していると考えられている。しかし、加齢に伴い、これらクリスタリン中に変化が生じ、凝集を引き起こし、水晶体が濁り白内障に至ると考えられている。我々は老化したヒトの水晶体

のタンパク質中のAsp残基が著しくD-体化していることを見いだした。その方法を図1に示した。

すなわち、ヒト水晶体をホモジェナイズし、遠心分離後、上清画分をゲル濾過クロマトグラフィーによりα-, β-, γ-クリスタリンに分離し、さらに逆相クロマトグラフィー(RP-HPLC)によりそれぞれのサブユニット

Table 1 The presence of D-aspartic acid in protein from various tissues

Tissue	Protein	Amino acid	Related disease	Specific sites
lens	αA-crystallin	D-Asp	Cataract	Asp 58,76,84,151
lens	αB-crystallin	D-Asp	Cataract	Asp 36, 62,96
lens	βB2-crystallin		Cataract	Asp 4
retina	?		AMD	?
conjutiva	?		Pinguecula	?
cornea	?		CDK	?
tooth	phosphophoryn	D-Asp	?	?
bone	osteocalcin	D-Asp	?	?
bone	type I collagen C-terminal telopeptide	D-Asp	Osteoporosis of Paget's disease	Asp 1211
aorta	elastin	D-Asp	Arteriosclelosis	?
ligament	elastin	D-Asp	?	?
brain	myelin	D-Asp	?	?
brain	β-amyloid	D-Asp	Alzheimer	Asp1,7, 23
brain	histone H2B	D-Asp	?	Asn 25
skin	elastin	D-Asp	?	?
skin	kelatin	D-Asp	?	?
body fluid	lysozyme	D-Asp	?	Asn 127

AMD:age related macular degeneration. CDK:climatic droplet keratopathy.
 CA: Conventional analysis by GC or LC. LC-MS: Liquid chromaogarith mass analysis, IH:
 ?: not determined

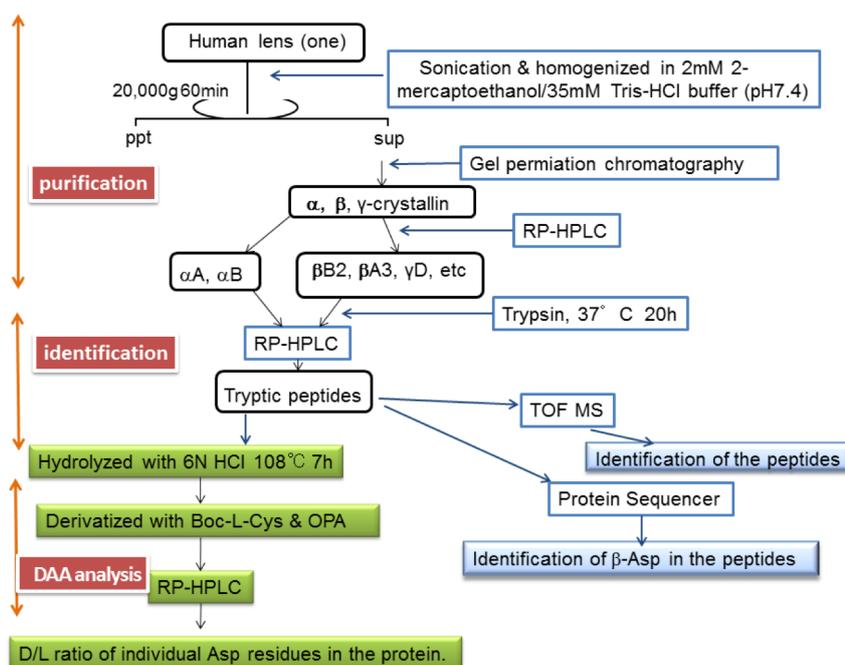


Fig 1 Identification of lens proteins which contain Asp isomers

Table 2 Specific Dβ-Asp sites in various crystallins from lens soluble fractions of elderly donors

Crystallin	Number of total amino acids	Number of Asp	Number of Asn	Dβ-Asp site	Next residue of the Dβ-Asp	D/L of β-Asp	Linkage	Structure around the Dβ-Asp
αA	173	15	2	Asp-58	Ser-59	3.10	β	nd
				Asp-151	Ala-152	5.70	β	flexible
αB	175	11	2	Asp-36	Leu-37	0.92	β	nd
				Asp-62	Thr-63	0.57	β	nd
βB	204	11	8	Asp-4	His-5	3.00	β	flexible
γC, D, F	about 200			ND				

に分離精製した。それらのクリスタリンをトリプシン酵素によって、ペプチドに断片化し、RP-HPLCで分離、分取後、質量分析により、ペプチドを同定した。次いで、これらのペプチドを加水分解し、ジアステレオマーに誘導体化したのち、個々のAsp残基のD/L比をRP-HPLCで分析した。これらの方法により、各クリスタリンを構成している個々のアミノ酸残基すべての光学異性体分析を行った。その結果、表2に示した。αA-クリスタリンは173残基のアミノ酸から成り15個のAsp残基と2個のアスパラギン(Asn)残基を、αB-クリスタリンは175残基のアミノ酸で構成されAspを11残基、Asnを2残基含んでいる。このうち、80歳代のヒトαA-クリスタリン中ではAsp-58、Asp-151残基[6]、αB-クリスタリン中のAsp-36、Asp-62残基[7]が部位特異的に著しくD-体化していることが明らかとなった。また、βB2-クリスタリンは204残基のアミノ酸から成りAsp 11残基、Asn 8残基を含んでいるが、80歳代のヒトβB2-クリスタリン中のAsp-4残基が著しくD-体化していること[9]、γ-クリスタリン中ではAsp残基に異性化が生じていないことが明らかとなっ

た[23]。このように多数のAsp/Asn残基がありながら、特定の部位のAsp残基のみにD-体化が生じ、他のAsp/Asn残基は正常のL-体であった。これらの結果は、Asp残基の反転はすべてのAsp残基で一様に生じるのではなく、反転が生じ易いところと生じにくいところがあることを明確に示している。また、これらの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。このことからタンパク質中でのAsp残基の異性化機構が明らかとなった。

3. タンパク質中でのAsp残基の異性化機構

図3に示すようにL-Asp残基はAsp残基のC末端側隣接アミノ酸残基の主鎖窒素原子による求核攻撃により脱水縮合し五員環イミドを形成する。L-体からD-体への反転はこの中間体を経由して生じるために容易に異性化が起こる。次いでイミド体は加水分解により開環し、L-イミド体からはL-β-AspとL-α-Asp残基が、D-イミド体からD-β-Asp残基と

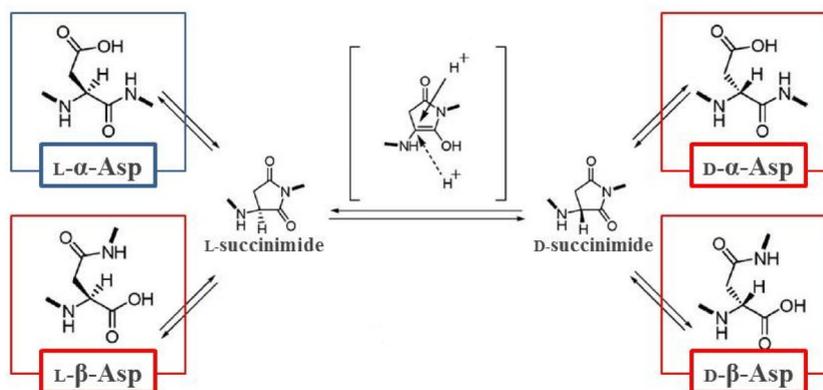


Figure 2 Mechanism of isomerization of Asp residues in a protein under the physiological conditions.

D- α -Asp 残基の 4 種類の異性体が生成される [24]。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。イミド形成には 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。表 2 に示すように α A - クリスタリン中の Asp-58、Asp-151 残基はそれぞれ、Ser, Ala 残基であり、図 3 のメカニズムに従って、異性化反応が生じていることが明らかとなった。しかし、 α B - クリスタリン、 β B2 - クリスタリンの隣接残基はすべて嵩高いアミノ酸 (表 2) であり、五員環イミドの形成には適していない。 β B2 - クリスタリンの Asp 4 残基周辺が立体構造的にフレキシブルであることは報告されている [25]。また、最近、 α A、 α B - クリスタリン中の D-Asp 反転部位周辺の立体構造がフレキシブルな領域であることも明らかとなった [26]。これらの結果から、Asp 残基の反転は隣接残基アミノ酸の側鎖が小さいという条件および Asp 残基周辺の立体構造がフレキシブルであるときに生じ易いことが判明した。したがってこれらの条件を満たさない Asp 残基は、同じ Asp 残基であっても反転しないと考えられた。

4. Asp 残基の異性化によるタンパク質の凝集

図 2 に示すように Asp 残基は D-体化により側鎖が反転し、 β 体化により主鎖の伸張をもたらすので、タンパク質の構造に直接的な変化をもたらす。われわれはこのような変化を受けた α -クリスタリンのサイズが不均一で異常に大きな凝集体を形成していること、また、

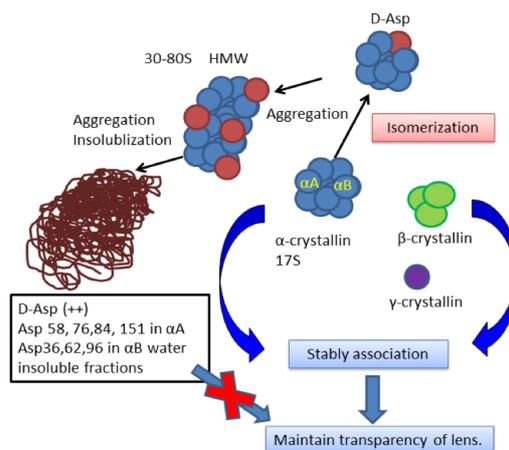


Figure 3. D-Asp induces to insolubilize and aggregate

そのシャペロン機能が若齢者の 40% しかないことを見出した [27]。図 3 に水晶体タンパク質中の α A -、 α B - クリスタリン中の Asp 残基が異性化することにより、凝集が進み、それとともに不溶化するイメージを示した。

タンパク質中での Asp の反転異性化は前項で述べたように隣接アミノ酸残基がグリシン、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と Asp 残基がそのタンパク質内でフレキシブルな構造に位置しているときに生じているので、そのような条件を満たすタンパク質は水晶体のクリスタリン以外にも複数存在するはずである。事実、加齢性黄斑変性症、瞼裂斑などの加齢性眼疾患の原因タンパク質 [10] や皮膚 [18-21]、脳 [11, 12] など生体内の種々の加齢組織に沈着している不溶タンパク質中に生じており、それがタン

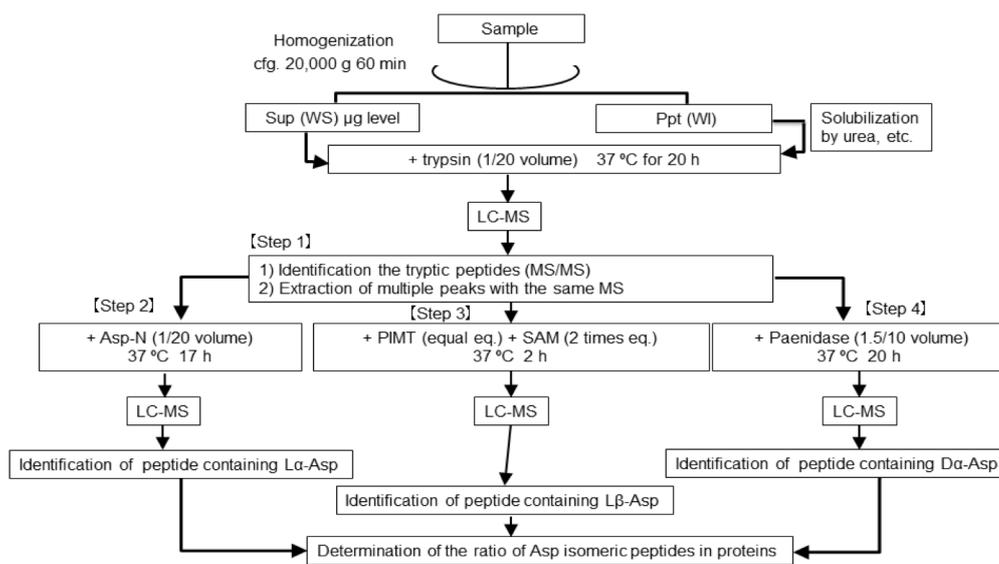


Figure 4 Determination of the ratio of Asp isomers in proteins by LC/MS/MS

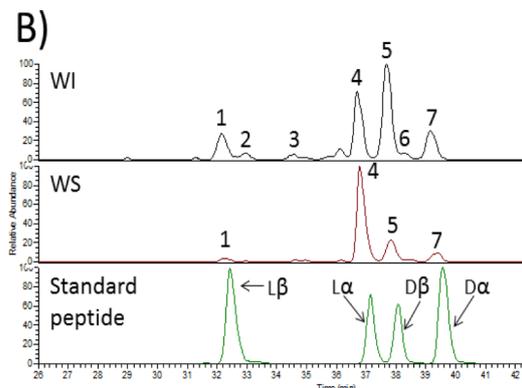


Figure 5 LC-MS chromatogram of α A-crystallin 55-65 (TVLD⁵⁸SGISEVR, [M+2H]²⁺=588.3) from the WI and WS fractions of lens of an elderly donor. The bottom shows the LC-MS chromatograms of the synthetic peptides of α A-crystallin 55-65.

パク質のコンフォーメーション病の発症と関連していると考えられているので、これらの Asp 残基の局在を決定することは、原因不明のコンフォーメーション病発症の解明の糸口を掴むことができると考えられる。

5.タンパク質中の D-アスパラギン酸 (Asp) 残基の検出法

前項で述べた様に Asp 残基の異性化がタンパク質の凝集や解離、機能不全をもたらすことなどを明らかにしてきた。このような現象は他の加齢性疾患のタンパク質中에서도生じていることが予測されるが、従来の結合型の D-アミノ酸分析は煩雑で、異分野の研究者には参入しにくいところがあった。そこで、筆者らは最近、この欠点を解消するために高速液体クロマトグラフ-タンデム質量分析計 (LC-MS/MS) による微量、簡便、迅速な新規結合型アミノ酸異性体分析法を開発した (Fig 4)。本法では従来法と異なり、煩雑な試料精製を必要とせず、試料をトリプシン処理後に、

LC-MS に導入するだけで短時間で多数の試料を分析できる。すなわち、トリプシンペプチドの MS/MS 分析から、ペプチドの同定を行う。この過程で質量差を伴う、酸化、脱アミド化などの翻訳後修飾分析も可能である。質量が同一である異性体 Asp 含有ペプチドは LC 上で分離するので、得られた LC-MS のデータを用いて横軸を時間、縦軸を目的のペプチドの質量の強度でプロット (マスクロマトグラム) すると、複数のピークとして検出できる。これが異性体含有ペプチドである。一例として Fig 5 に水晶体をトリプシン処理して得られた α A-クリスタリンの 55-65 番目の部分ペプチド (TVLD⁵⁸SGISEVR) のマスクロマトグラムを示した [8]。本ペプチドは 58 番目の Asp 残基が 4 種類の異性体に変化しているため、主ピークが 4 本のピークに分離している。これらのピークのうち、ピークがどの Asp 残基の異性体なのかは標準ペプチドを合成し分離時間との比較で行うか [8]、Asp 異性体を特異的に認識する市販酵素を用いることで決定できる [28]。Fig 5 においてピーク 1, 4, 5, 7 はそれぞれ 58 番目の Asp 残基が L- β , L- α , D- β , D- α 体である α A-crystallin 55-65 の TVLD⁵⁸SGISEVR ペプチドであることが判明した。さらに、Asp58 残基の異性化は不溶性 (WI) 画分のクリスタリンの方が可溶性 (WS) 画分のクリスタリンよりも高い割合で進んでいることがわかった (表 3)。また、この傾向は他のどの Asp 残基においても同様の結果を示し、クリスタリンの不溶化は Asp 残基の異性化と密接に関連していることが明らかとなった [8]。

6. 終わりに

蛋白質中での Asp の反転異性化は表 1 に示したように種々の加齢組織に生じており、蛋白質のコンフォーメーション病発症との関連が示唆されているが、定性的な分析にとどまっている例が多く、今後、本法の活用により、定量分析がなされれば疾患の進行との関連も明らかになると考えられる。タンパク質中の Asp 残基の異性体分析で問題となっていた微

Table 3 The relative amounts of Asp isomers at α A-crystallin Asp-58, 76, -84, and 151 and α B-crystallin Asp-62 and 96 from the WI and WS fractions of lens from 64 -old donors.

	WI				WS			
	L- α	L- β	D- α	D- β	L- α	L- β	D- α	D- β
α A Asp151	39.67	9.94	13.74	36.65	58.39	2.48	11.77	27.36
α A Asp58	31.03	14.76	14.52	39.69	65.43	3.61	6.35	24.62
α A Asp84	75.79	9.80	4.45	9.96	95.89	1.10	0.98	2.03
α A Asp76	87.24	7.93	1.49	3.34	97.06	1.46	0.57	0.91
α B Asp62	46.04	16.79	12.92	24.25	83.03	0.81	10.95	5.22
α B Asp96	93.35	1.14	3.00	2.52	99.05	ND	ND	0.95

量、多検体、迅速さが大幅に改善されたことにより、疾患の予測やステージの判別にも適用できると考えられる。また、白内障のみならず他の加齢性疾患に沈着する異常凝集蛋白質の同定とその異性体部位の決定にも適用が可能となった。

D-アミノ酸を含んだ蛋白質の代謝は不明である。現在のところ、L-β-Asp 含有蛋白質の修復酵素として PIMT (protein L-isoaspartyl methyltransferase) [29]が、D-α-Asp 含有蛋白質の分解酵素として DAEP(D-aspartyl endopeptidase) [30]、paenidase[31]が知られているものの、Asp 異性体の中で最も含量の多い D-β-Asp 含有蛋白質を分解又は修復する酵素は見つかっていない。

本研究により進化の過程で獲得したタンパク質のホモキラリティーは一個体の老化の過程で破たんしていることが明確になった。これを利用して加齢性疾患に至る過程も明らかにすることができると思われる。今後の生命科学においては、もう一方の鏡像異性体を考慮したパラキラリティーの概念を導入することができるものと考えられる。パラキラリティーの概念は生命科学におけるパラダイムと考えられる。

謝辞

本研究は生命の起原及び進化学会にてその着想を得ました。恩師の故原田馨先生、本研究をともに推進した京大原子炉実験所の学生、ならびに多くの共同研究者の皆様には謝意を表したいと思います。

参考文献

- Nishikawa, T. [Metabolism and functions of brain D-serine in mammals: relevance to neuropsychiatric disorders]. *Seikagaku*. *80*, 267-276 (2008).
- Homma, H. [Biochemical behavior and function of free D-aspartate in the mammalian body]. *Seikagaku*. *80*, 277-286 (2008).
- Konno, R. [Mutant mouse lacking D-amino-acid oxidase activity]. *Seikagaku*. *80*, 337-343 (2008).
- Fukui, K. [Disease-oriented enzymology in D-amino acid metabolism]. *Seikagaku*. *80*, 344-351 (2008).
- Yoshimura, T. [Structure and function of amino acid racemases]. *Seikagaku*. *80*, 324-330 (2008).
- Fujii, N., Satoh, K., Harada, K., and Ishibashi, Y. Simultaneous stereoinversion and isomerization at specific aspartic acid residues in alpha A-crystallin from aged human lens. *J. Biochem* *116*, 663-669 (1994).
- Fujii, N., Ishibashi, Y., Satoh, K., Fujino, M., and Harada, K. 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).
- Fujii, N., Sakaue, H., Sasaki, H., and Fujii, N. 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).
- Fujii, N., Kawaguchi, T., and Sasaki, H. Simultaneous stereoinversion and isomerization at the Asp-4 residue in betaB2-crystallin from the aged human eye lenses. *Biochemistry (Mosc)*. *50*, 8628-8635 (2011).
- Kaji, Y., Oshika, T., Takazawa, Y., Fukayama, M., Takata, T., and Fujii, N. Localization of D-beta-aspartic acid-containing proteins in human eyes. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *48*, 3923-3927 (2007).
- Fisher, G.H., Garcia, N.M., Payan, I.L., Cadilla-Perezrios, R., Sheremata, W.A., and Man, E.H. D-aspartic acid in purified myelin and myelin basic protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *135*, 683-687 (1986).
- 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., 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.* *268*, 3072-3083 (1993).
- Helfman, P.M., and Bada, J.L. Aspartic acid racemization in tooth enamel from living humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *72*, 2891-2894 (1975).
- Ohtani, S., Yamamoto, T., Sugimoto, H., Sashima, M., and Satoh, M. Age-related changes in the D-aspartic acid content of the teeth of the senescence-accelerated mouse. *Arch. Oral Biol.* *45*, 13-18 (2000).
- Cloos, P.A., and Fledelius, C. Collagen fragments in urine derived from bone resorption are highly racemized and isomerized: a biological clock of protein aging with clinical potential. *Biochem. J.* *345 Pt 3*, 473-480 (2000).
- Powell, J.T., Vine, N., and Crossman, M. On the accumulation of D-aspartate in elastin and other proteins of the ageing aorta. *Atherosclerosis* *97*, 201-208 (1992).
- Ritz-Timme, S., Laumeier, I., and Collins, M. Age estimation based on aspartic acid racemization in elastin from the yellow ligaments. *Int. J. Legal Med.* *117*, 96-101 (2003).
- Fujii, N., Tajima, S., Tanaka, N., Fujimoto, N., Takata, T., and 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.* *294*, 1047-1051 (2002).
- Ritz-Timme, S., Laumeier, I., and Collins, M.J. Aspartic acid racemization: evidence for marked longevity of elastin in human skin. *Br. J. Dermatol.* *149*, 951-959 (2003).
- Miura, Y., Fujimoto, N., Komatsu, T., Tajima, S., Kawada, A., Saito, T., and Fujii, N. Immunohistochemical study of chronological and photo-induced aging skins using the antibody raised against D-aspartyl residue-containing peptide. *J. Cutan. Pathol.* *31*, 51-56 (2004).
- Mori, Y., Aki, K., Kuge, K., Tajima, S., Yamanaka, N., Kaji, Y., Yamamoto, N., Nagai, R., Yoshii, H., Fujii, N., et al. UV B-irradiation enhances the racemization and isomerization of aspartyl residues and production of Nepsilon-carboxymethyl lysine (CML) in keratin of skin. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* *879*, 3303-3309 (2011).
- Ueno, K., Ueda, T., Sakai, K., Abe, Y., Hamasaki, N., Okamoto, M., and Imoto, T. Evidence for a novel racemization process of an asparaginyl

- residue in mouse lysozyme under physiological conditions. *Cell. Mol. Life Sci.* *62*, 199-205 (2005).
23. Sakaue, H., Takata, T., Fujii, N., and Sasaki, H. Alpha B- and betaA3-crystallins containing d-Aspartic acids exist in a monomeric state. *Biochim. Biophys. Acta* *1854*, 1-9 (2015).
 24. Fujii, N., Harada, K., Momose, Y., Ishii, N., and Akaboshi, M. D-amino acid formation induced by a chiral field within a human lens protein during aging. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *263*, 322-326 (1999).
 25. Smith, M.A., Bateman, O.A., Jaenicke, R., and Slingsby, C. Mutation of interfaces in domain-swapped human betaB2-crystallin. *Protein Sci.* *16*, 615-625 (2007).
 26. Shimizu, K., Kita, A., Fujii, N., and Miki, K. Structural features of isomerizable aspartyl residues in human alpha-crystallins. *Mol. Vis.* *18*, 1823-1827 (2012).
 27. Fujii, N., Shimmyo, Y., Sakai, M., Sadakane, Y., Nakamura, T., Morimoto, Y., Kinouchi, T., Goto, Y., and Lampi, K. Age-related changes of alpha-crystallin aggregate in human lens. *Amino Acids* *32*, 87-94 (2007).
 28. Maeda, H., Takata, T., Fujii, N., Sakaue, H., Nirasawa, S., Takahashi, S., and Sasaki, H. Rapid survey of four Asp isomers in disease-related proteins by LC-MS combined with commercial enzymes. *Anal. Chem.* *87*, 561-568 (2015).
 29. McFadden, P.N., and Clarke, S. Methylation at D-aspartyl residues in erythrocytes: possible step in the repair of aged membrane proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *79*, 2460-2464 (1982).
 30. Kinouchi, T., Ishiura, S., Mabuchi, Y., Urakami-Manaka, Y., Nishio, H., Nishiuchi, Y., Tsunemi, M., Takada, K., Watanabe, M., Ikeda, M., et al. Mammalian D-aspartyl endopeptidase: a scavenger for noxious racemized proteins in aging. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *314*, 730-736 (2004).
 31. Takahashi, S., Ogasawara, H., Hiwatashi, K., Hori, K., Hata, K., Tachibana, T., Itoh, Y., and Sugiyama, T. Paenidase, a novel D-aspartyl endopeptidase from *Paenibacillus* sp. B38: purification and substrate specificity. *J Biochem* *139*, 197-202 (2006).