

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008-2010

課題番号：20570132

研究課題名(和文) カルノシンによる哺乳類の恒常性維持の分子機構とカルノシン分解酵素 CNDP2 の解析

研究課題名(英文) Analyses of molecular mechanisms of homeostasis by carnosine in mammals and carnosine-hydrolyzing enzyme, CNDP2

研究代表者

奥村 宣明 (OKUMURA NOBUAKI)

大阪大学・蛋白質研究所・准教授

研究者番号：20224173

研究成果の概要(和文): カルノシン(β-アラニル-L-ヒスチジン)は哺乳類の筋肉や脳などに高濃度で存在するジペプチドで、抗酸化作用などがあるといわれているが、生理機能は不明の点が多い。また、生合成、分解に関する酵素類についても最近まで明らかではなかった。本研究では、カルノシンの機能の一端を明らかにする目的で、最近我々が見出したカルノシン分解酵素 CNDP2 の立体構造、生化学的性質、生体内分布の解析を行った。まず、X線解析などにより CNDP2 の立体構造を決定し、その構造的特徴を明らかにした。さらに、視床下部のヒスタミンニューロンに高濃度で存在することを明らかにし、カルノシンの CNDP2 による分解がヒスタミン合成の基質の供給に寄与している可能性を示した。

研究成果の概要(英文): Carnosine (beta-alanyl-L-histidine) is a dipeptide present at high concentrations in mammalian muscles and brain. Carnosine has been suggested to be act as an antioxidant, but its function as well as the enzymes responsible for its synthesis and degradation has not well been understood. We have previously found an enzyme that can hydrolyze carnosine (CNDP2), and then in the present study, we have analyzed the structure, function and distribution of CNDP2. We have determined the crystal structure of CNDP2 and revealed its structural features. In addition, we have found that it is highly expressed in the histaminergic neurons in the hypothalamus, raising a possibility that carnosine and CNDP2 may contribute the production of substrate for histamine synthesis.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：ペプチド、ペプチダーゼ、立体構造、ホメオスタシス

1. 研究開始当初の背景

生物を取り巻く環境は常に変化しており、環境変化に適応して体内環境の恒常性を維持することは生存のために不可欠である。動物では自律神経系と内分泌系(ホルモン)が

恒常性維持において中心的な役割を果たしており、それらの機能を視床下部が統合している。恒常性維持は肥満や糖尿病をはじめとする生活習慣病の成因とも直接関連しており、現代社会において取り組むべき重要な課

題のひとつであると考えられる。

カルノシン(-alanyl-L-histidine)は古くから知られたジペプチドで、脳や筋肉に比較的高濃度で存在し、効酸化作用、亜鉛をキレートする作用、神経細胞の生存維持作用などがあるといわれているが、実際の生理機能は確立されていない。我々は、カルノシンを脳室内に投与すると自律神経の活動が変化すること、さらにその効果がヒスタミン H3 ブロッカーによって抑制されることなどからこれが脳内ヒスタミン神経系に作用することを見出し(Nagai et al. 2003)、カルノシンが全身の恒常性維持機構に重要な役割をしていることが示唆された。

カルノシンは生体内で、 β -アラニンと L-ヒスチジンから酵素的に合成され、別の酵素によってそれぞれのアミノ酸に分解される。前者はカルノシン合成酵素、後者はカルノシン分解酵素と呼ばれるが、いずれも最近までクローニングされていなかった。我々は、フランスの Tafel らと独立に、カルノシンを分解するマウスの酵素(CNDP2)をクローニングすることに成功した(Otani et al. 2005)。この酵素は、活性発現にマンガンが必要とする M20 ファミリーの金属ペプチダーゼであった。この酵素の発見により、これまで未知であったカルノシンの分解系がより詳細に解析され、カルノシンの生理的役割がより明確になるのではないかと考えられた。

2. 研究の目的

本研究課題では、カルノシンの生理機能の分子的基盤を明らかにすることを目的として、カルノシン分解酵素 CNDP2 を中心に以下のような解析を行う。

- (1) CNDP2 の脳内分布と発現調節について検討し、ヒスタミンとの関連、絶食などにおける発現誘導の可能性等について検討する。
- (2) CNDP2 の酵素反応と活性調節における Lid ドメインの役割を明らかにする。
- (3) CNDP2 の活性調節に關与する Cys 残基を同定し、その活性調節の分子機構とその生理的意義を解析する。
- (4) CNDP2 の各種金属イオンとの親和性を明らかにし、金属イオンによる活性化機構について考察する。

3. 研究の方法

- (1) 免疫組織化学による CNDP2 の脳内分布と発現調節の解析

我々は既に、免疫組織化学染色にも使用可能な CNDP2 に対する抗体を作成し、ウエスタンブロットにより脳をはじめいくつかの組織で高レベルで発現していることを確認している。これを用いて、脳内での局在を詳細に検討するとともに、他の脳特異的タンパク質、とくにヒスタミン合成系の酵素(ヒスチ

ジン脱炭酸酵素)との二重染色により共局在するタンパク質を探索する。また、絶食等によりその量や分布が変化するか否かを検討する。

- (2) CNDP2 の X 線結晶構造解析と、Lid ドメインの生化学的解析

我々は既に CNDP2 の阻害剤ベスタチンとの複合体の X 線結晶解析に成功し、その構造の詳細を解析中である。CNDP2 の構造の一つの特徴は、活性部位に覆いかぶさるような形で存在する Lid ドメインの存在で、これが活性調節や基質特異性に關与するものと考えられる。そこで、基質非存在下での X 線結晶構造解析、Lid ドメインと關連するミュータントの作成とその生化学的解析により、Lid ドメインの酵素反応における機能を明らかにする。

- (3) CNDP2 のシステイン残基の機能解析

CNDP2 は、活性に DTT の存在が必要であり、システイン残基が活性に何らかの機能を果たすと考えられてきたが、結晶構造解析の結果からはいずれのシステインも活性部位付近にはないことが判明し、活性に間接的に作用すると考えられた。しかし、構造からはその分子機構が予想できないため、システインをひとつずつセリンに変えたミュータントを作成し、活性化に必要なシステインを同定する。

- (4) CNDP2 の金属イオン親和性の解析

CNDP2 は反応液中に Mn^{2+} イオンを入れておかなければ活性がなく、なぜそのようなことになるのか、生体内でどのようにして活性化しているのかは不明である。そこで、各種の金属との親和性について、質量分析計を用いて測定する。

4. 研究成果

- (1) CNDP2 の脳内分布と発現調節

マウス脳における CNDP2 の局在を免疫組織化学的に解析した結果、以前我々が報告したように、結節乳頭核(TMN)をはじめとするいくつかの神経核で高レベルで発現することを確認した。TMN は大きく分けて二つの領域があるが、そのいずれにも発現しており、TMN の全領域にわたって存在すると考えられた。

TMN は、脳内で唯一ヒスタミンニューロンの神経細胞体が存在する部位であり、ヒスタミン合成に關する酵素(ヒスチジン脱炭酸酵素、HDC)を発現している。そこで、CNDP2 と HDC の蛍光に 2 重染色を試みたところ、両者が同一のニューロンに存在することが明らかになった(Otani et al. 2008)。

ヒスタミンはヒスチジンを前駆体として HDC により合成されるが、CNDP2 はカルノシンを分解してヒスチジンを生成すること、カルノシンは脳内では主にグリアで産生さ

れること、などを考え合わせると、これらの結果は、グリア細胞で合成されたカルノシンが TMN でヒスタミン産生の基質として利用されることを示唆する。

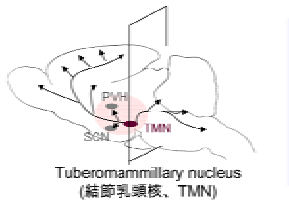
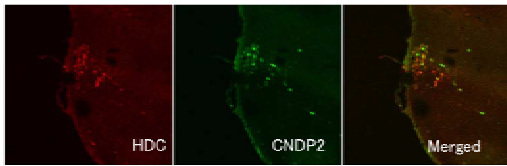


図 1、CNDP2 と HDC の視床下部ヒスタミンニューロンにおける共局在

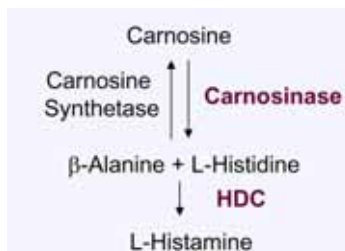


図 2、考えられるカルノシンのヒスタミンニューロンにおける機能

(2) CNDP2 の酵素反応と活性調節における Lid ドメインの役割

CNDP2 の X 線結晶構造解析の結果、CNDP2 は結晶中でダイマーの構造をしており、それぞれのサブユニットは触媒ドメインと Lid ドメインからなることが明らかになった。Lid ドメインは、もう一方の触媒ドメインの活性部位と相互作用しており、詳細な解析の結果からは、単なる「ふた(Lid)」ではなく、触媒部位と相互作用することにより直接酵素反応に関与することが考えられた。そこで、ミュータントを作成して解析を行った結果、Lid ドメインの H228 が活性に必須であることが判明した。

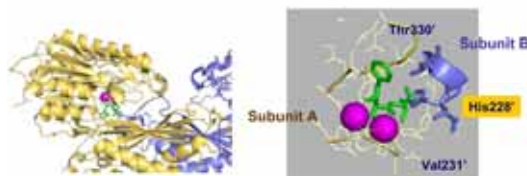


図 3、CNDP2 のダイマー間の相互作用

この反応機構は、活性の発現にダイマー形

成を必要とするユニークなものであるが、His228 は、他のさまざまな M20 ファミリーのメタロプロテインにおいて保存されており、このファミリーのタンパク質に共通の触媒機構と考えられた。現在さらにこの反応機構の解析を行っている。

(3) CNDP2 のシステイン残基の機能解析

マウス CNDP2 には 8 個のシステインがあるが、立体構造からは活性との関連が予想できないため、それぞれのシステインをセリンに換えたミュータント 8 種類を作成し、それぞれの組換え体タンパク質の活性と DTT 依存性について解析した。しかし、単独のシステインの置換では明らかな性質の変化は見られなかった。そこで、システインを端から順にセリンに置換していったところ、8 個中 5 個までは活性に影響がないことが判明した。残る 3 個は活性に影響する可能性があるが、単純にそれらのひとつが活性に必要というわけではなく、単純な解釈では結論は出せないため、現在さらに検討を進めている。

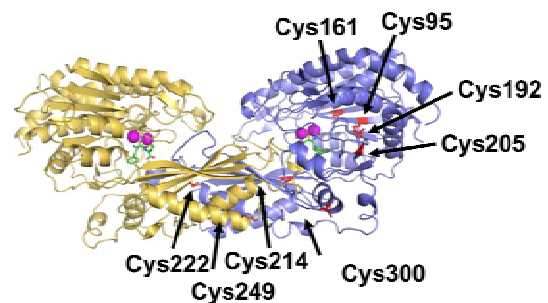


図 4、システインの位置と活性部位

(4) CNDP2 の金属イオン親和性の解析

CNDP2 と金属との親和性に関しては、活性の測定により Mn の Kd を推定したところ、数十 μM という値が得られた。この値は比較的高く、親和性が弱いために結合が不安定で、溶液中に Mn を加えておかなければならないのはそのためであると考えられる。一方、Zn は配位はするが、活性は得られないことも明らかになった。生体内でこの酵素が活性を持つためには、Mn をこの酵素に与える何らかの機構が存在しなければならないことを示唆しており、今後更なる検討が必要と考えられる。現在、他の測定法を用いてさらに継続して解析を行っている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 10 件)

(原著)

(1) Kishi S, Shimoke K, Nakatani Y, Shimada T, Okumura N, Nagai K, Shin-Ya K, Ikeuchi T. Nerve growth factor attenuates 2-deoxy-d-glucose-triggered endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis via enhanced expression of GRP78. *Neurosci Res.* 66, 14-21(2010)

(2) Kawaguchi C, Isojima Y, Shintani N, Hatanaka M, Guo X, Okumura N, Nagai K, Hashimoto H, Baba A. PACAP-deficient mice exhibit light parameter-dependent abnormalities on nonvisual photoreception and early activity onset. *PLoS One.* Feb 18;5(2):e9286 (2010)

(3) Unno, H., Yamashita, T., Ujita, S., Okumura, N., Otani, H., Okumura, A., Nagai, K. and Kusunoki, M. (2008). Structural basis for substrate recognition and hydrolysis by mouse carnosinase CN2. *J Biol Chem* 283, 27289-99.

(4) Otani, H., Okumura, A., Nagai, K. and Okumura, N. (2008). Colocalization of a carnosine-splitting enzyme, tissue carnosinase (CN2)/cytosolic non-specific dipeptidase 2 (CNDP2), with histidine decarboxylase in the tuberomammillary nucleus of the hypothalamus. *Neurosci Lett* 445, 166-9.

(5) Okumura, A., Nagai, K. and Okumura, N. (2008). Interaction of alpha1-syntrophin with multiple isoforms of heterotrimeric G protein alpha subunits. *FEBS J* 275, 22-33.

(6) Gotoh, H., Okumura, A., Nagai, K. and Okumura, N. (2008). Localization of phospho-tyrosine489-beta-adducin immunoreactivity in the hypothalamic tanycytes and its involvement in energy homeostasis. *Brain Res* 1228, 97-106.

(総説)

(1) 奥村宣明、須藤浩三、高尾敏文 「尿のペプチドミクス」日本腎臓学会誌 52, 485-488 (2010)

(2) Coordinated regulation of circadian rhythms and homeostasis by the suprachiasmatic nucleus. Nakagawa H, Okumura N. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 86, 391-409 (2010)

(3) 永井克也、谷田守、新島旭、奥村宣明「筋

肉からの代謝・自律神経ネットワークを介した血圧調節」*血圧* 17、854-859 (2010)

(4) 永井克也、谷田守、福島洋一、山野俊彦、新島旭、前田景子、奥村宣明、堀井裕子、沈嬌、「乳酸菌の腸内投与による自律神経活動と生理機能の変化」*腸内細菌学雑誌* 23、209-216 (2009)

〔学会発表〕(計2件)

(1) Requirement of dimer formation for enzymatic reaction of mouse carnosine dipeptidase 2 (CNDP2) Okumura N, Kusunoki M, Takao T. 第33回日本分子生物学会・第83回日本生化学会合同大会 2010年12月7-10日

(2) バイオマーカー探索のための尿のペプチドミクス 奥村宣明、高尾敏文 日本ヒトプロテオーム機構第7回大会、2009年7月29日、東京

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.protein.osaka-u.ac.jp/metabolism>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

奥村 宣明 (オクムラ ノブアキ)

大阪大学・蛋白質研究所・准教授

研究者番号：20224173