

機関番号：25301  
 研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2008～2010  
 課題番号：20590582  
 研究課題名（和文）心血管疾患のリスクファクター、ADMA の代謝機構の解明と病態生理的役割  
 研究課題名（英文）Metabolism of ADMA, a novel risk factor of cardiovascular diseases and its pathophysiological role  
 研究代表者  
 木本 眞順美（KIMOTO MASUMI）  
 岡山県立大学・保健福祉学部・教授  
 研究者番号：40108866

研究成果の概要（和文）：心血管疾患のリスクファクターである非対称性ジメチルアルギニン（ADMA）の血中レベルを調節する機構を解明するために、血球細胞における本アミノ酸の代謝系について精査した。赤血球において、ADMA の代謝系が活発に働いていること、ならびに産生と分解に関わる酵素として PRMT1 および DDAH1 の存在を立証し、それらの部分精製品の酵素学的性質を明らかにした。また、ADMA を含むタンパク質としてカタラーゼを同定し、PRMT1 のターゲットタンパク質であることを立証した。このように、赤血球における ADMA の全体像を明らかにしたのは本研究が初めてである。

研究成果の概要（英文）：We investigated the metabolic pathways of asymmetric dimethylarginine (ADMA) in blood cells to elucidate the regulatory mechanism of elevation of plasma ADMA, a novel risk factor of cardiovascular diseases. We found for the first time that ADMA was actively metabolized by PRMT1 and DDAH1 in erythrocytes and identified catalase that contains ADMA residue and interacts with PRMT1. These findings suggest that catalase is a potential target for methylation by PRMT1 in erythrocytes and may be a source of plasma ADMA.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
20 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
21 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
22 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：非対称性メチル化アルギニン，ADMA，DDAH，一酸化窒素，内因性 NOS 阻害剤，動脈硬化症，タンパク質アルギニンメチル化修飾，心血管疾患リスクファクター

## 1. 研究開始当初の背景

国を問わず、世界的に心血管疾患による死亡率は高値を示し、欧米諸国では全死亡者の 50 % 以上を占める。本疾患は多くの場合、動脈硬化症の重症化の結果として捉えられており、その予防・治療法（薬）開発のため

に、バイオマーカーとなり得るリスクファクターの検索が盛んに行われ、ADMA（非対称性ジメチルアルギニン）が新しく同定され注目されている。その作用機作については、ADMA の代謝障害が体内の ADMA の蓄積を招き、血管内皮細胞からの NO 産生が障害さ

れた結果、動脈硬化症が進展し、本疾患の発症に繋がるとの論理から、これを証明する研究報告が蓄積されている。これらの研究の中では、ADMA の体内蓄積の原因はこれを加水分解する酵素、ジメチルアルギニンジメチルアミノヒドロラーゼ (DDAH) の活性抑制に依るものと一義的に考えられており、図 1 に

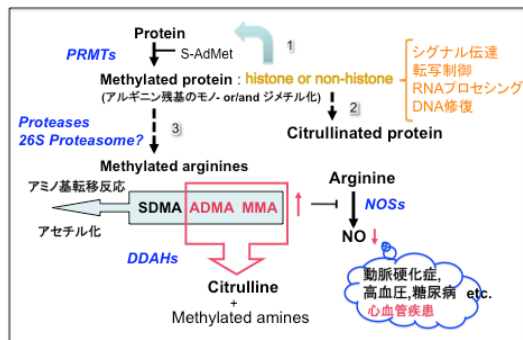


図 1. メチル化アルギニン代謝系と生理的役割

示したように、タンパク質の翻訳後修飾 (タンパク分子上のアルギニンメチル化) から始まり、メチル化タンパク質の分解というタンパク質の代謝回転による ADMA の産生系 (未解明の部分が多い) については、触れられていない。ADMA の代謝障害が本疾患の病因となり、これを取り除くことが治療の一環と考えるのであれば、ADMA の産生系を含む代謝系全体を解明する必要がある。このことは、本疾患予防のためのターゲットを正確に捉えることができ、病態改善への道を拓くことに繋がる重要な課題である。

## 2. 研究の目的

本研究は 3 年間の実施計画で進めたので、以下に年度ごとの目的を示した。

(1) 血漿 ADMA 濃度がどのように調節されているのか解明するために、①ADMA 代謝の担当細胞の特定と②その血液細胞における ADMA 含有タンパク質 (ADMA 代謝の初発反応による) の同定を行う。

(2) 次に、同定された ADMA 含有タンパク質のアルギニンメチル化機構を解析する。

①生体成分から精製された目的の ADMA 含有タンパク質分子中、メチル化されたアルギニン残基をタンパク質化学的手法を用いて同定する。

②タンパク質 ADMA 化反応の測定系を確立する。

(3) 生体内でタンパク質アルギニンメチル化反応を触媒する主要な酵素、PRMT1 を血球細胞から精製し、その酵素化学的性質を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) 血液細胞の分画

体重が約 400 g の SD 系雄ラットから、抗凝固剤としてヘパリンを用い、心臓採血した。血液細胞の分画は、Histopaque-1083 を用い、添付のマニュアルに従って行った。

### (2) 血液細胞画分からの全 RNA の調製ならびに RT-PCR

得られた網状赤血球、白血球および血小板画分に ISOGEN-LS を添加し、常法にしたがい全 RNA を調製した。これを用いて、ADMA 代謝関連酵素である PRMT1, DDAH1 および DDAH2 の RT-PCR により mRNA 発現量を測定した。

### (3) SDS-PAGE およびウエスタンブロット

試料中のタンパク質は、SDS-PAGE により分離した後、ニトロセルロース膜上に転写し、それぞれのタンパク質に特異的な抗体を用いたウエスタンブロット法により検出した。

### (4) 二次元電気泳動

未同定タンパク質の解析用試料を得るために、二次元電気泳動を行った。一次元目には、Immobiline DryStrip pH3-10, 7 cm を用いた等電点電気泳動を施し、二次元目に SDS-PAGE を行った。

### (5) 赤血球粗抽出液からの ADMA 化タンパク質の調製

赤血球画分に 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH8.0) を加え超音波処理後、遠心分離してその上清を粗抽出液とした。これを、DEAE-Sepharose カラムクロマトグラフィーに供し、分画した。各フラクションの一部を SDS-PAGE にて分離後、タンパク質分子上の ADMA 残基に特異的な抗体 ASYM24 を用いたウエスタンブロットにより目的とするタンパク質が含まれるフラクションを検索した。陽性フラクションを限外濾過にて濃縮し、その試料を二次元電気泳動 (2 枚) に供し、1 枚は上記と同様にウエスタンブロットを行い、目的とするペプチドのスポットを特定した。他の 1 枚は、ポリアクリルアミドゲルをタンパク質染色した後、特定されたペプチドのスポットをゲルから切り出し、トリプシンによるゲル内消化に供した。

### (6) 未知タンパク質の LC/MS/MS 分析による構造解析

上記のゲル内消化産物は、LC/MS/MS 分析に供し、得られたデータの解析は、Mascot sequence database-searching software を用いて、タンパク質データベース (NCBI) と照合し、同定を行った。

#### (7) 組換え型タンパク質の発現系の構築

①大腸菌発現系：発現ベクターpGEX-6P-1に、目的とするタンパク質（あるいはペプチド）のDNAを導入し、組換え発現ベクターを構築した。本法により、組換え型タンパク質はGSTとの融合タンパク質として得られる。

②無細胞発現系：昆虫培養細胞抽出液を用いた無細胞発現に適したpTD1ベクターに目的とするタンパク質のDNAを導入し、組換えベクターを得た。これを鋳型として、ScriptMax Thermo T7 Transcription kitによってmRNAを合成した。ついで、得られたmRNAと昆虫培養細胞抽出液（島津製作所）により、添付マニュアルにしたがってタンパク質を合成した。

#### (8) ヒト赤血球カタラーゼのADMA残基の同定

リジルエンドペプチダーゼ（Lys-C）を用いてヒト赤血球由来カタラーゼを消化した。消化産物をトリシン-SDS-PAGE（小ペプチド分析用）に供し、ASYM24抗体を用いたウエスタンブロットを行った。反応陽性であったペプチド断片をN末端アミノ酸配列分析に供し、ADMA残基を含むペプチド断片の同定を行った。

#### (9) タンパク質アルギニンメチル化（PRMT）活性測定

PRMT1の良好な基質となるグリシン-アルギニンリッチ（GAR）モチーフを含む17残基のペプチドをGST融合タンパク質として合成した。GST-GARペプチドを基質、S-アデノシル-L-[<sup>3</sup>H-メチル]メチオニンを補基質として用い、酵素源とともに37℃にて2時間インキュベートし、反応を行った。反応液と等量の10%TCAを添加し、反応停止した。その後、遠心分離によって得られた沈殿物に5%TCAを加え、洗浄した後、再度遠心分離して沈殿物を得た。ついで、沈殿物を少量の緩衝液で懸濁溶解し、液体シンチレーションカウンターにより、<sup>3</sup>Hを計測した。

#### (10) ラット赤血球よりPRMT1の分離・精製

8頭のラットから赤血球粗抽出液を調製し、これを最初の酵素源として、DEAE-Sepharose column, Sephacryl S-300 column, Hydroxyapatite columnの順番で活性画分のクロマトグラフィーを行った。活性画分の検出は、PRMT1に対する抗体を用いたウエスタンブロットおよび上述したPRMT活性測定法により行った。

### 4. 研究成果

#### (1) ADMA代謝の担当細胞の特定

血漿ADMA濃度がどのように調節されて

いるのか解明するために、まず分画した赤血球、白血球、血小板の粗抽出液をSDS-PAGE、ウエスタンブロットに供した結果、すべての画分においてPRMT1およびDDAH1のタンパク質発現が認められた（図2）。一方、DDAH2については検出されなかった。これらタンパク質のmRNA発現についても検討したが、同様な結果を得た。以上の結果は、試験した血液細胞すべてにおいてADMAの代謝（合成・分解系）が活発に行われていることが示唆され、中でも生体内における存在量の面から考えると赤血球が中心的な役割を担っていることが示唆された。

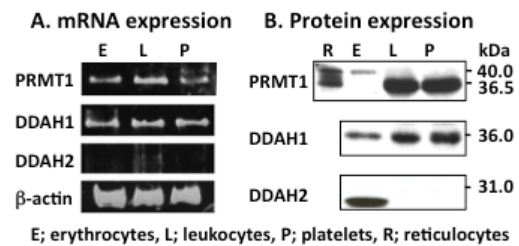


図2. 血球細胞におけるADMA代謝関連酵素の発現

#### (2) 赤血球に存在するADMA化タンパク質の同定

赤血球粗抽出液をSDS-PAGE分析に供した結果（図3A）、ASYM24抗体と反応するタンパク質バンドが59 kDaと30 kDaの位置に検出された。一方、同じ試料をDEAE-Sepharose columnにより分離すると、素通り部分と溶出部分にそれぞれ1つの活性画分が出現した（図3B）。そこで、フラクションNo. 43を濃縮後、二次元電気泳動にてウエスタンブロット分析した結果（図3C）、矢印で示したように強い鮮明なスポットが認められた。同様に二次元電気泳動したポリアクリルアミドゲル上のスポットを切り出し、LC/MS/MS分析した結果、59 kDaペプチドはラットのカタラーゼ（sequence coverageは44%であった）と同定された（データ未掲載）。

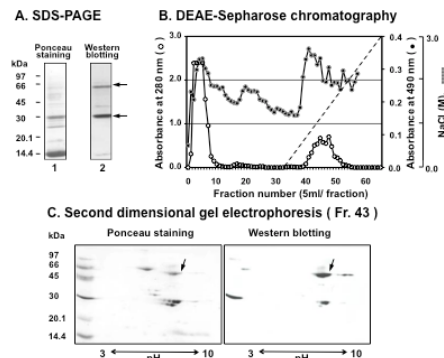


図3. 赤血球に存在するADMA化タンパク質の特定

これと同操作にて30 kDaペプチドの解析

を行った結果、カーボニックアンヒドラーゼと同定された（データ未掲載）。

### (3) 赤血球カタラーゼのアルギニンメチル化サイトの決定

ヒト赤血球カタラーゼを Lys-C にて消化した結果、16 kDa ペプチドの他に 6~7 個のペプチドが産物として得られた（図 4）。これらのうち、ASYM24 抗体と交差性を示したのは、16 kDa ペプチドのみであったことから、本ペプチドを N 末端アミノ酸配列分析に供し、350 番目のメチオニンから始まる MLQGRLFAYPDTHRH の配列データを得た。本結果と、タンパク質アルギニンメチル化サイトを予測する公開プログラムの利用から、365 番目のアルギニン残基が ADMA 化されている可能性を見いだした。

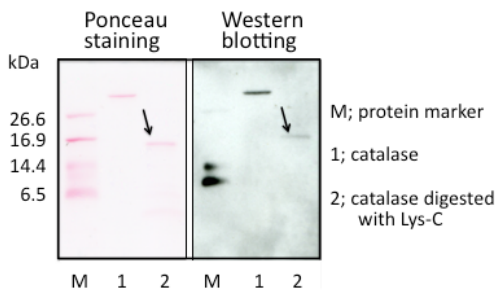


図 4. ヒトカタラーゼの Lys-C による消化産物

### (4) In vitro における PRMT1 とカタラーゼの結合性

カタラーゼ (rCatalase) と PRMT1 (GST-PRMT1) の結合性を GST-pull down 法を用いて検討した結果を図 5 に示した。アデノシルメチオニン (AdoMet) の存在、非存在下にかかわらず、カタラーゼは PRMT1 と結合し得ることが明らかとなった。

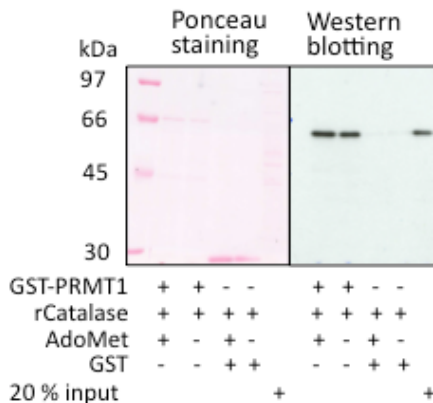


図 5. PRMT1 とカタラーゼの結合性

### (5) ラット赤血球 PRMT1 の精製と酵素学的性質

これまでの研究において、PRMT1 は生体

内に広く分布していることが報告されているものの、天然型タンパク質としては精製されておらず、その構造と酵素活性との関連性についても明らかにされていない。そこで、ラット赤血球から PRMT1 を部分精製し、構造と活性発現との関連性について解析した。

表 1. 赤血球 PRMT1 の精製

Purification step	Total protein (mg)	Total activity (x 10 <sup>-5</sup> dpm)	Specific activity (dpm/mg)	Yield (%)	Purification factor (-fold)
Crude extract	4841	5.08	105	100	1
DEAE-Sepharose	29	3.35	11377	66	108
Sephacryl S-300	11	3.29	31117	65	296
Hydroxyapatite	3	2.34	90927	46	866

表 1. に示されているように、本酵素は赤血球粗抽出液から 3 ステップの操作を経て、46% の収率で、866 倍にまで部分精製された。得られた最終標品の銀染色のデータ（未掲載）から概算すると、精製された PRMT1 の比活性は、さらに 10<sup>3</sup> 倍程度上昇するものと考えられる。SDS-PAGE および Native PAGE による分析の結果は、赤血球 PRMT1 の単量体は約 40 kDa であり、生体内では 8~10 量体からなる複合体を形成していることが示された。同時に、精製度が上昇するにしたがって複数の複合体が形成された（図 6）。

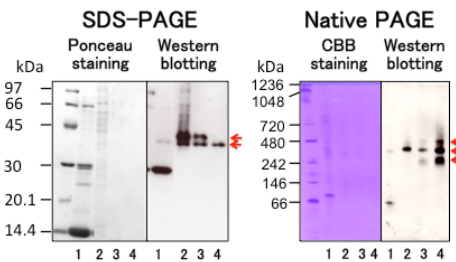


図 6. 赤血球 PRMT1 の複合体形成

さらに、天然型ならびに組換え型 PRMT1 の構造的特徴を Native PAGE と FPLC を用いたゲルろ過により解析した（図 7）。無細胞発現系に合成した rPRMT1（図 7-2）および大腸菌にて発現させた rPRMT1（図 7-3）の挙動は、これら組換え型 PRMT1 が、さらに高分子領域の凝集体を形成していることを示した。一方、これら 3 者の PRMT 活性を方法の項に述べたようにして測定するとその比活性は、天然型：無細胞発現系：大腸菌発現系 PRMT1=9：2：1 であった。

以上の研究成果は、赤血球において、ADMA の産生と分解を含む代謝系が存在することを示し、その代謝産物である ADMA が血中に放出され NOS の阻害剤として働く可能性を示唆するだけでなく、赤血球の酸化状態を維持するカタラーゼがその重要な



供給源となり得るという新規な知見を与えるものである。

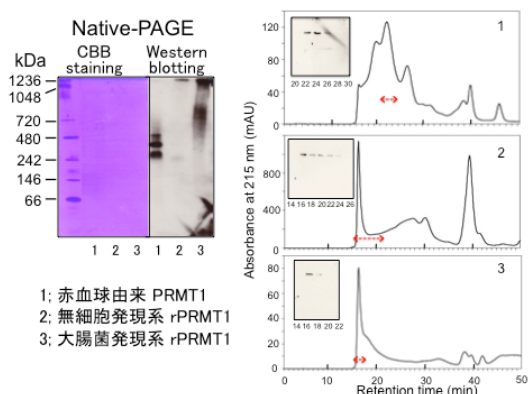


図 7. 天然型ならびに組換え型 PRMT1 の構造的特徴

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Rodionov RN, Dayoub H, Lynch CM, Wilson KM, Stevens JW, Murry DJ, Kimoto M, Arning E, Bottiglieri T, Cooke JP, Baumbach GL, Faraci FM, Lentz SR. Overexpression of dimethyl arginine dimethylaminohydrolase protects against cerebral vascular effects of hyperhomocysteinemia. *Circulation Res.*, 106(3), 551-558 (2010), 査読有
- ② Hu X, Xu X, Zhu G, Atzler D, Kimoto M, Chen J, Schwedhelm E, Luneburg N, Boger RH, Zhang P, Chen Y. Vascular endothelial-specific dimethylarginine dimethylaminohydrolase-1-deficient mice reveal that vascular endothelium plays an important role in removing asymmetric dimethylarginine. *Circulation*, 120(22), 2222-2229 (2009), 査読有

[学会発表] (計 7 件)

- ① 横路三有紀, 鈴木麻希子, 新垣友加里, 大塚智恵, 高橋吉孝, 山下広美, 辻英明, 木本真順美. タンパク質アルギニンメチル化転移酵素 PRMT1 の高次構造と酵素機能の解析 日本農芸化学会 2011 年度大会, 2011 年 3 月 25 日~28 日, 京都.
- ② 横路三有紀, 鈴木麻希子, 室田佳恵子, 大塚智恵, 高橋吉孝, 山下広美, 辻英明, 木本真順美. 赤血球カタラーゼは PRMT1 によるメチル化の主要な標的タンパク質である. 第 33 回日本分子生物学会年会, 第 83 回日本生化学会大会合同大会, 2010 年 12 月 7 日~10 日, 神戸.
- ③ Yokoro M, Suzuki M, Takahashi Y,

Yamashita H, Hiemori M, Tsuji H, Kimoto M, ADMA, an endogenous NOS inhibitor is metabolized activity in rat erythrocytes. 10th International Symposium on Mechanism of Vasodilatation. June 1 – 3, 2009, Miyagi, Japan

- ④ 木本真順美, 鈴木麻希子, 高橋吉孝, 横路三有紀, 山下広美, 比江森美樹, 辻英明, 内因性 NOS 阻害剤 ADMA の分解酵素, DDAHs の機能解析 日本農芸化学会 2009 年度大会, 2009 年 3 月 27 日 ~ 29 日, 福岡

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

木本 真順美 (KIMOTO MASUMI)  
岡山県立大学・保健福祉学部・教授  
研究者番号: 40108866

### (2) 研究分担者

脇野 修 (WAKINO SYU)  
慶應義塾大学・医学部・講師  
研究者番号: 50265823  
山西 倫太郎 (YAMANISHI RINTARO)  
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授  
研究者番号: 30253206

### (3) 連携研究者

山下 広美 (YAMASHITA HIROMI)  
岡山県立大学・保健福祉学部・教授  
研究者番号: 70254563

### (4) 研究協力者

横路 三有紀 (YOKORO MIYUKI)  
岡山県立大学大学院保健福祉科学専攻  
博士後期課程 2 年