

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 13 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21590069

研究課題名（和文） 異性化タンパク質修復酵素 PIMT の活性調節機構の解析

研究課題名（英文） Analysis of regulatory mechanisms of Protein L-isopartyl (D-aspartyl) *O*-methyltransferase (PIMT) gene expression.

研究代表者

古地 壯光 (FURUCHI TAKEMITSU)

北里大学・薬学部・准教授

研究者番号：00302167

研究成果の概要（和文）：

異性化タンパク質修復酵素 PIMT の発現調節機構の解明を目的として、部分的に欠損あるいは点変異させた各種プロモーターを用いたレポーター遺伝子アッセイにより転写調節部位の特定を行い、プロモーター活性に必要な最小領域を同定した。また本領域に結合するタンパク質を簡便に精製し、LC-MS/MS により転写因子候補の同定を試みた結果、転写因子 NRF1 の同定に成功した。さらに、NRF1 が実際に本プロモーター部位に結合することを、ゲルシフトアッセイおよびクロマチン免疫沈降法を用いて確認した。

研究成果の概要（英文）：

In order to clarify the transcriptional regulatory mechanisms of PIMT, isomerized protein repair enzyme, we cloned and functionally characterized the 5'-flanking (promoter) region of the gene. The putative promoter activity was confirmed using dual luciferase reporter gene assay system. The minimal region required for basal activity of the promoter was determined by generating a series of deletion and point mutation constructs. The binding protein(s) to the minimal region was briefly purified using biotin-labeled DNA probe, and subsequently LC-MS/MS analysis was performed and a transcriptional factor, NRF1, was identified. Binding activity of NRF1 to the minimal region was confirmed using electrophoretic mobility shift assay and chromatin immunoprecipitation assay.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 薬学・生物系薬学

キーワード： 分子生物学

1. 研究開始当初の背景

タンパク質中のアスパラギン酸残基 (L-Asp) またはアスパラギン残基 (L-Asn) は、生理的条件下で自発的に異性化またはラセミ化し、L, D-isoAsp や D-Asp へと変換され、その結果、タンパク質の立体構造に変化をもたらす、そのタンパク質の機能に影響を及ぼすことが知られている。一方、生体内には L-isoAsp および D-Asp を L-Asp へ修復する反応を促進する酵素である Protein L-isoaspartyl (D-aspartyl) O-methyltransferase (PIMT) が存在する。PIMT は、異性化したタンパク質を特異的に認識し、S-adenosyl-L-methionine (AdoMet) から L-isoAsp あるいは D-Asp へメチル基転移を行い、L-Asp への修復反応を促進する酵素である。本酵素の欠損マウスは脳の肥大化および致死性の癲癇発作を生じる事、癲癇患者の海馬中では PIMT の酵素量が約 50% にまで落ちている事などが報告されており、PIMT の発現量低下による isoAsp の蓄積とてんかん症状発症との関連性が示唆されている。したがって、PIMT の発現調節機構を解明することは、抗てんかん薬の開発の手掛かりとなることが予想され、大変興味深い。また、アルツハイマー病患者脳老人斑に認められる不溶性アミロイドβタンパク質 (Aβ) 中において、異性化およびラセミ化をおこしたアスパラギン酸残基が高頻度で検出されること、実際に IsoAsp あるいは D-Asp 含有 Aβ ペプチドは凝集活性が亢進していること等が報告され、老化などに伴い自発的に生じるタンパク質中のアスパラギン酸残基の異性化ないしラセミ化とタンパク質修復系酵素としての PIMT の重要性が注目されて始めている。おそらく PIMT の欠損は、異性化等の変性を受けたタンパク質の蓄積を生じ、その結果、細胞機能に障害をもたらすものと考えられる。しかしながら、PIMT が生体内においてどのような発現および活性調節を受けているか依然として不明な点が多いのが現状である。

2. 研究の目的

本研究では PIMT の発現ならびに活性調節機構の解明を目的とし、その転写調節に関わるプロモーター領域の解析ならびに転写因子の同定を試みた。

3. 研究の方法

(1). レポータープラスミドの作製

ホタルルシフェラーゼレポーターベクター

pGL3-basic に PIMT プロモーター上流約 1kbp 領域を組み込んだプラスミドを制限酵素処理により、あるいは、それを鋳型 DNA として、各種フォワードプライマーおよびリバースプライマーを用いて PCR 反応を行い、プロモーター領域を部分的に欠損させた各種変異体を作成した。得られた PCR 産物をシーケンシングで確認した。

(2). 細胞培養

ヒト胎児腎由来細胞株 (HEK293) をダルベッコ改良イーグル培地に終濃度 10% のウシ胎児血清を添加した培地を用いて、5%CO₂ 存在下、37°C の条件で培養した。

(3). レポータージーンアッセイ

PIMT プロモーター活性の測定には Dual-Luciferase® Reporter Assay System を用いた。HEK293 細胞を 1.0 x 10⁵ cells/well になるように 24 well プレートに播種し、1 晩培養後、TransIT293 を用いたリポフェクション法により、構築したレポータープラスミド pGL3-basic および内部標準ウミシイタケルシフェラーゼレポーターベクター pRL-TK を共導入し、更に 24 時間培養した後、細胞に Passive Lysis Buffer を加えて細胞ライセートを調製した。ライセートを 20 μL とり 96 well プレートに移し、Luciferase Assay Reagent II を 100 μL 加えてホタルルシフェラーゼ活性を測定した。続けて、Stop & Glo Reagent を 100 μL 加えてウミシイタケルシフェラーゼ活性を測定した。ウミシイタケルシフェラーゼ活性を用いて細胞間の遺伝子導入効率を補正し、各種 PIMT プロモーター活性を評価した。

(4). LC-MS/MS 解析

サンプル調製には、In Solution Tryptic Digestion and Guanidination Kit を用いた。ビオチン標識したプローブ DNA 約 200 bp に核抽出液を加えてタンパク質を結合させた後、Dynabeads® M-280 streptavidin を用いて目的のタンパク質を精製し、得られた試料に Digestion Buffer と Reducing Buffer を加えて、95°C で 5 分間インキュベートした。Alkylation Buffer、Activated Trypsin を加えて 37°C、3hr インキュベートした後、Ammonium Hydroxide と Guanidination Reagent を加えて 65°C、12 min インキュベートし、TFA により反応を停止させた。そのサンプルを LC-MS/MS により解析した。

(5). ゲルシフトアッセイ

ビオチン標識したプローブ DNA に対するタンパク質の結合は、LightShift™ Chemiluminescent EMSA Kit を用いた。ビオチン標識したプローブ DNA (0.2 pmol/μL) を核抽出液と混合し、20 min 室温放置した。Native PAGE (100 V, 1 hr) にて各サンプルを分離後、ゲル中のビオチン標識 DNA をメンブレンに転写した (380 mA, 30 min)。メンブレンに UV 照射して DNA を架橋させた後、ブロッキング、Streptavidin-HRP Conjugate 処理ならびに洗浄処理を行った後、Luminol Enhancer Solution と Stable Peroxide Solution 添加により得られる発光を Lumi-Film Chemiluminescent Detection Film を用いて検出した。

(6). クロマチン免疫沈降法

細胞レベルにおけるタンパク質の DNA への結合性の評価は、SimpleChIP™ Enzymatic Chromatin IP Kit を用いて行った。15 cm dish 5 枚に 90%コンフルエントな状態まで培養した細胞に、37%ホルムアルデヒドを加えて DNA とタンパク質をクロスリンクさせた。Cell Lysis Buffer を加えて細胞ライセートを調製し、超音波処理機を用いて核膜を破碎した。micrococcal nuclease 処理により DNA を断片化させた後、抗体(Normal Rabbit IgG, Anti-Histone H3 XP Rabbit mAb あるいは Anti-NRF1 Rabbit pAb) を加え、ChIP Grade Protein G 磁気ビーズにより目的の DNA-タンパク質を精製した。得られたサンプルからタンパク質を取り除き、特異的プライマー4 種による PCR 反応を行い、増幅されるバンドを確認した。

4. 研究成果

(1). PIMT プロモーター活性必須領域の同定と結合タンパク質の探索

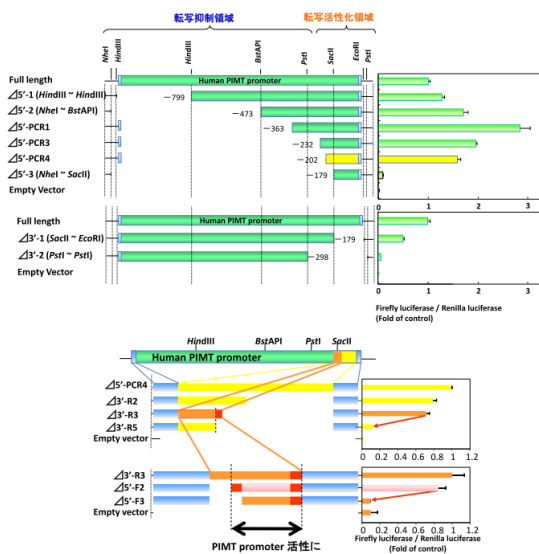


Fig. 1. 各種欠損プロモーターの活性

まず、部分的に欠損させた各種プロモーターを用いたレポータージーンアッセイを行うことにより、活性に必要な最小領域を同定した (Fig. 1)。そこで、ビオチン標識したプライマーを用いて PCR を行うことで、本領域を含んだ DNA プローブを作製し、これを用いて結合タンパク質を精製し、LC-MS/MS にて解析を試みたところ、複数のタンパク質が同定された。同定された候補タンパク質中に、転写因子 nuclear respiratory factor 1 (NRF1) が再現性よく見いだされ、その結合配列と類似した配列が上記の最小必要領域内に存在していたことから、特にこの NRF1 に着目し、当該領域への結合性について解析を行った。

(2). ゲルシフトアッセイを用いてのプロモーター活性必須領域への NRF1 の結合性の検討

ゲルシフトアッセイを用いて NRF1 の in vitro での結合性について解析を行った。その結果、ビオチン標識した最小必要領域の配列を含むプローブ DNA に核抽出液を加えるとタンパク質の結合によりシフトしたバンドが観察され、さらに本バンドは NRF1 抗体添加によりスーパーシフトすることから、本プローブへの NRF1 の結合が確認された (Fig. 2 右図右端列)。次に、NRF1 の結合部位を特定する目的で競合 DNA 添加実験を行ったところ、競合 DNA①、②あるいは③添加時ではプローブ DNA とタンパク質の結合が阻害されるが、競合 DNA④添加時では阻害されなかった。これらの結果から、NRF1 結合部位は競合 DNA①、②および③に共通する配列 15 bp 内に存在することが明らかとなり、またその部位は NRF1 結合配列と類似した配列が存在する箇所と一致した (Fig.2)。

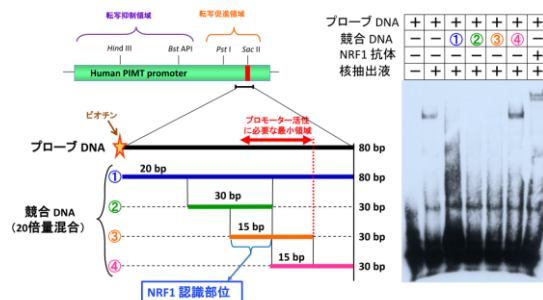


Fig. 2. ゲルシフトアッセイによる解析

(3). クロマチン免疫沈降法を用いてのプロモーター活性必須領域への NRF1 の結合性の検討

クロマチン免疫沈降法を用いて細胞レベルでの結合性を解析した。その結果、NRF1 抗体による免疫沈降を行ったサンプルにおいて NRF1 結合領域と思われる部位を挟み込む Primer set 1 から順に Primer set 2,

Primer set 3, Primer set 4 とプライマーがアニールする位置が離れるほど、PCR 反応により増幅されるバンドが薄くなっていくことが確認された (Fig.3)。なお Normal rabbit IgG 抗体はネガティブコントロールとして、Histone H3 抗体はポジティブコントロールとして用いている。以上の結果から、NRF1 は細胞レベルにおいても転写活性に必要な最小領域に結合することが明らかとなった。

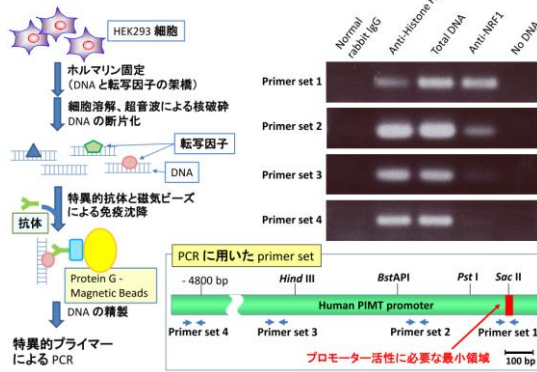


Fig. 3. ChIP アッセイによる NRF1 結合活性の細胞レベルでの解析

(4). 考察と展望

PIMT は、その欠損大腸菌が熱や過酸化水素に対して感受性を示すこと等が報告されており、酸化ストレス応答に関与していると考えられている NRF1 が PIMT の転写因子の候補として見いだされたことは、PIMT の発現調節を考える上で大変興味深い。今後は、NRF1 のノックダウンやドミナントネガティブ体の過剰発現もしくは NRF1 の過剰発現細胞を作製した後、RT-PCR やウエスタンブロッティングなどで PIMT の発現強度を確認することにより、実際に内因性の PIMT が NRF1 による発現制御を受けているか確認を行っていく予定である。

また今回データは示していないが、プロモーター領域の点変異体を用いた詳細な解析より、PIMT 転写活性に必要な最小領域を介したプロモーター活性に NRF1 以外の転写因子が必要であることを明らかにしている。そこで今後は、LC-MS/MS を用いた更なる解析により、本活性に必要な NRF1 以外のタンパク質を同定していく事も重要な検討課題であると思われる。

更に本研究室では、PCR1 の上流のプロモーター領域において領域を細かく削るに従い徐々にプロモーター活性が上昇するという結果も得られており、プロモーター領域の立体構造の変化など転写因子以外の要因が転写に影響している可能性も否定できない。この点に関して更なる検討が必要であると思われる。

タンパク質中に生じた L-isoAsp や D-Asp に関してはその同定が難しく、未だごく一部のタンパク質においてのみその存在が確認

されているにすぎない。タンパク質の異性化やラセミ化は自発的に生じる反応であり、我々の体内でも常に起きている反応であることは容易に想像できる。従って、細胞の正常な機能を維持していくメカニズムを考える上で必須の研究テーマであると思われる。本研究が進展すれば、タンパク質研究に新たな一ページが開かれることが期待される。また PIMT の発現および活性調節機構並びにその発現抑制により生じる影響を解明できれば、癲癇性発作の発症機構の解明や、癲癇やアルツハイマー病の予防薬の開発にもつながる可能性を秘めており重要な検討課題であると思われる。

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 6 件)

- ① Spatiotemporal localization of D-amino acid oxidase and D-aspartate oxidases during development in *Caenorhabditis elegans*. Saitoh Y, Katane M, Kawata T, Maeda K, Sekine M, Furuchi T, Kobuna H, Sakamoto T, Inoue T, Arai H, Nakagawa Y, Homma H. *Mol Cell Biol.* 32(10):1967-1983. (2012) 査読有 DOI: 10.1128/MCB.06513-11
- ② Thiolactomycin inhibits D-aspartate oxidase: a novel approach to probing the active site environment. Katane M, Saitoh Y, Hanai T, Sekine M, Furuchi T, Koyama N, Nakagome I, Tomoda H, Hirono S, Homma H. *Biochimie.* 92(10):1371-1378. (2010) 査読有 DOI: 10.1016/j.biochi.2010.06.021
- ③ Role of the active site residues arginine-216 and arginine-237 in the substrate specificity of mammalian D-aspartate oxidase. Katane M, Saitoh Y, Maeda K, Hanai T, Sekine M, Furuchi T, Homma H. *Amino Acids.* 40(2):467-476. (2011) 査読有 DOI: 10.1007/s00726-010-0658-4
- ④ Comparative characterization of three D-aspartate oxidases and one D-amino acid oxidase from *Caenorhabditis elegans*. Katane M, Saitoh Y, Seida Y, Sekine M, Furuchi T, Homma H. *Chem Biodivers.* 7(6):1424-1434. (2010) 査読有 DOI: 10.1002/cbdv.200900294
- ⑤ The role of protein

L-isoaspartyl/D-aspartyl
O-methyltransferase (PIMT) in
intracellular signal transduction.
Furuchi T, Sakurako K, Katane M, Sekine
M, Homma H. Chem Biodivers.
7(6):1337-1348. (2010) 査読有 Review.
DOI: 10.1002/cbdv.200900273

- ⑥ Apoptotic inducers activate the release of D-aspartate through a hypotonic stimulus-triggered mechanism in PC12 cells. Furuchi T, Suzuki T, Sekine M, Katane M, Homma H. Arch Biochem Biophys. 490(2):118-128. (2009) 査読有 DOI: 10.1016/j.abb.2009.08.017

[学会発表] (計 10 件)

- ① Takemitsu Furuchi, Sakurako Kosugi, Satoru Harada, Masumi Katane, Masae Sekine, Hiroshi Homma Analysis of mechanisms of EDF-triggered hyperactivation of ERK in L-isoaspartyl/D-aspartyl O-methyltransferase (PIMT)-knockdown cells. The first international conference of D-amino acid research (Awaji, Hyogo) 2009. 7. 2.
- ② Yukari Shimizu, Takemitsu Furuchi, Sakurako Kosugi, Masumi Katane, Masae Sekine, Hiroshi Homma Characterization of the promoter region of the protein L-isoaspartyl/D-aspartyl O-methyltransferase (PIMT) gene. The first international conference of D-amino acid research (Awaji, Hyogo) 2009. 7. 3.
- ③ Takemitsu Furuchi, Sakurako Kosugi, Tsukasa Egawa, Keiko Ohno, Masae, Sekine, Masumi Katane, Hiroshi Homma Simple high-performance liquid chromatography-fluorescence detection method to measure protein L-isoaspartyl/D-aspartyl O-methyltransferase activity in cell lysates. 21th IUBMB and 12th FAOBMB International congress of biochemistry and molecular biology (Shanghai, China) 2009. 8. 3-4.
- ④ 清水由香里、古地壯光、原田 怜、小杉桜子、片根真澄、関根正恵、本間 浩 Protein L-isoaspartyl/D-aspartyl methyltransferase (PIMT) プロモーターの転写制御に関わる転写因子の探索 第5

3 回 日本薬学会関東支部大会 (坂戸)
2009. 10. 3.

- ⑤ 原田 怜、古地壯光、清水由香里、片根真澄、関根正恵、本間 浩 Protein L-isoaspartyl/D-aspartyl-o-methyltransferase (PIMT) の転写活性化に必須な領域の同定 日本薬学会第 130 年会 (岡山) 2010. 3. 28.
- ⑥ 原田 怜、古地壯光、清水由香里、伊藤耕平、片根真澄、関根正恵、太田安隆、本間 浩 異性化タンパク質修復酵素 PIMT の転写調節因子の検索 第 6 回 D-アミノ酸研究会学術講演会 (富山) 2010. 9. 18.
- ⑦ 伊藤耕平、古地壯光、原田 怜、清水由香里、片根真澄、関根正恵、太田安隆、本間 浩 Protein L-isoaspartyl (D-aspartyl) O-methyltransferase (PIMT) の転写調節に関わる因子の探索 第 8 3 回 日本生化学会大会 (神戸) 2010. 12. 7.
- ⑧ Takemitsu Furuchi, Satoru Harada, Kohei Ito, Shimizu Yukari, Masumi Katane, Masae Sekine, Yasutaka Ohta, Hiroshi Homma Identification of the transcription factor(s) responsible for Protein L-isoaspartyl (D-aspartyl) O-methyltransferase (PIMT) gene expression 23rd Biennial Joint Meeting of the International Society for Neurochemistry (ISN) and the European Society for Neurochemistry (ESN) (Athens, Greece) 2011. 8. 29.
- ⑨ 立石 秀樹、古地壯光、原田 怜、清水由香里、伊藤耕平、片根真澄、関根正恵、太田安隆、本間 浩 異性化タンパク質修復酵素 PIMT の転写因子の同定 第 7 回 D-アミノ酸研究会学術講演会 (東京) 2011. 9. 9.
- ⑩ 古地壯光、本間 浩 Protein L-isoaspartyl/D-aspartyl-o-methyltransferase (PIMT) の転写調節機構の解析 第 8 4 回 日本生化学会大会 (京都) シンポジウム「D-アミノ酸の生化学 -飛躍する新領域-」 2011. 9. 24.

[その他]

ホームページ等

<http://www.pharm.kitasato-u.ac.jp/ac/SeitaiHP/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古地 壯光 (FURUCHI TAKEMITSU)

北里大学・薬学部・准教授

研究者番号 : 00302167

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :