

機関番号：32511

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21780103

研究課題名 (和文) 脂肪細胞由来ロイシンアミノペプチダーゼの分泌を介した血圧調節機構の解明

研究課題名 (英文) Regulation of blood pressure by secreted adipocyte-derived leucine aminopeptidase

研究代表者

後藤 芳邦 (GOTO YOSHIKUNI)

帝京平成大学・薬学部・助教

研究者番号：90455345

研究成果の概要 (和文)：脂肪細胞由来ロイシンアミノペプチダーゼ (A-LAP) は、血圧調節に関与するとされている。本研究では、小胞体内腔に局在する本酵素が如何にして血圧を調節するのかについては明らかにすることを目的とした。マクロファージをインターフェロン- $\gamma$ およびリポ多糖で刺激すると A-LAP が細胞外へと分泌されることを発見した。そして、分泌型 A-LAP が細胞外でアンギオテンシン III などからアルギニンを遊離させ、降圧物質である一酸化窒素の原料として細胞に供給していることを示した。

研究成果の概要 (英文)：Adipocyte-derived leucine aminopeptidase (A-LAP) may play role in the blood pressure regulation. In this study, it is revealed that ER-retained A-LAP is secreted from macrophages in response to activation by treatment with lipopolysaccharide and interferon- $\gamma$ , and supply of arginine for nitric oxide synthesis from peptide to cells. These results suggest that secretion of A-LAP is important for hypertensive action.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：応用生物科学

科研費の分科・細目：動物生化学

キーワード：①アミノペプチダーゼ、②血圧調節、③マクロファージ、④一酸化窒素、⑤分泌、⑥インターフェロン、⑦リポ多糖

## 1. 研究開始当初の背景

近年、脂肪細胞由来ロイシンアミノペプチダーゼ (A-LAP) の特定の一塩基多型によって生じる変異と本態性高血圧症の罹患に高い相関が認められることが報告されている。また、筆者は上記変異が A-LAP 活性を著しく低下させることを見出した。これらのことから A-LAP は自身の酵素活性を介して血圧調節に寄与していると考えられるが、本酵素が小胞体内腔に局在していることが原因で、その

血圧調節機構については全く明らかにされていない。しかしながら最近、筆者は A-LAP が血管内皮細胞やマクロファージで細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の上昇に伴い分泌されることを見出し、これにより分泌された A-LAP が血圧を調節している可能性が示された。

## 2. 研究の目的

小胞体内腔に局在する A-LAP が如何にして血圧調節に寄与するのかについて明らかに

することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) A-LAP 分泌リガンドおよび分泌細胞の同定

各種細胞 (RAW264.7、HUVEC、Hela、PANC1、JEG3) に様々なリガンド分子 (IFN- $\gamma$ 、LPS、TNF- $\alpha$ 、IL-4 など) を添加することで、A-LAP を分泌する細胞とリガンドを探索した。

#### (2) A-LAP の分泌機構・経路の解明

各種 2nd メッセンジャー調節剤 (A231837、Thapsigargin、DBHQ、BT<sub>2</sub>-cAMP、3M3FBS) やシグナル伝達阻害剤 (BAPTA-AM、Verapamil、2-APB、W7、Cycloheximide、TIRAP inhibitory peptide) を細胞に処理した。

#### (3) 分泌型 A-LAP による血圧調節機構

分泌型 A-LAP のペプチドホルモン分解活性および A-LAP 処理した RAW264.7 細胞の NO 産生活性を測定した。

### 4. 研究成果

#### (1) A-LAP 分泌リガンドおよび分泌細胞の同定

RAW264.7 細胞や HUVEC、Hela 細胞などにサイトカインや血圧調節ホルモンなどを処理したところ、RAW264.7 細胞に IFN- $\gamma$  と LPS を添加した場合のみ培養上清中への A-LAP の分泌が認められた (図 1)。分泌された A-LAP の分子量は細胞内 A-LAP の分子量より 9kDa 程度高い値を示した。

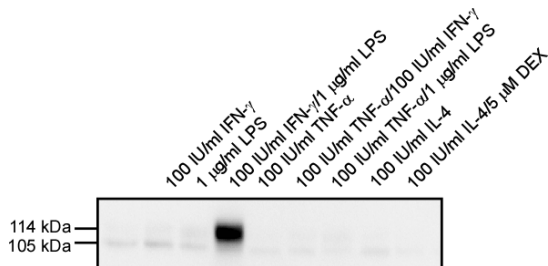


図 1 RAW264.7 細胞からの A-LAP の分泌  
RAW264.7 細胞に上記マクロファージ刺激因子を処理し 24 時間後の培養上清中に含まれる A-LAP をウエスタンブロットにより検出した。

培養上清中の Leu 遊離活性を人工基質 Leu-MCA を用いて検討したところ、IFN- $\gamma$  および LPS 刺激に伴い Leu 遊離活性が 1.5 倍上昇した。また、培養上清中の A-LAP を免疫沈降により単離し、その Leu 遊離活性を比較したところ、培養上清中には全く認められなかった A-LAP 活性が刺激に伴い著しく上昇することを明らかにした。以上のことから分泌型 A-LAP の酵素活性は保持されていることが明らかになった。また、刺激に伴う培養上清中の Leu 遊離活性の上昇分のほとんどが A-LAP 活性であることも明らかにした。

#### (2) A-LAP 分泌機構

Hela 細胞や HUVEC ではカルシウムイオンフォア刺激による細胞質 Ca<sup>2+</sup>濃度の一過的な上昇が A-LAP の分泌を引き起こすことを見出している。RAW264.7 細胞の場合も A231837 や Thapsigargin といった細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度を上昇させる薬剤の処理により A-LAP が分泌された。一方で、cAMP 濃度の上昇は A-LAP の分泌を引き起こさなかった。また、Thapsigargin および IFN- $\gamma$ /LPS 処理によって惹起される A-LAP の分泌は、BAPTA-AM や Verapamil、2-APB といった細胞内 Ca<sup>2+</sup>阻害剤により濃度依存的に抑制された。さらに、A-LAP 分泌を引き起こす全てのケースで A-LAP が分泌する直前に細胞内の STIM1 分子が細胞膜に移行する現象が認められた。STIM1 の膜移行はストア作動性 Ca<sup>2+</sup>流入を引き起こすことが知られている。すなわち、RAW264.7 細胞においても細胞質の Ca<sup>2+</sup>の一過的な上昇が A-LAP の分泌を惹起することが示された。また、カルモジュリン阻害剤である W7 の処理によっても A-LAP 分泌が抑制されたことから、A-LAP の分泌には細胞質の Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇、それにとまうカルモジュリンの活性化が重要であることも見出した。

#### (3) 分泌型 A-LAP による血圧調節機構

A-LAP は昇圧ホルモンであるアンジオテンシン (Ang) II の分解活性や降圧ホルモンであるブラジキニンをその前駆体ペプチドであるカリジンから生成する活性を有する。そのため、当初分泌型 A-LAP が細胞外で血管作動性ペプチドの生成・分解を介して血圧調節に寄与していると考えた。そこで IFN- $\gamma$  および LPS で刺激した細胞と未刺激の細胞から回収した培養上清の Ang II 分解活性を測定した。その結果、IFN- $\gamma$  および LPS 刺激により Ang II の分解活性は 3 倍程度上昇した。しかしながら、反応後 Ang II の分解産物として N 末端消化産物を見出すことができなかった。また、A-LAP 活性を阻害するアマスタチンを IFN- $\gamma$  および LPS と共処理しても Ang II 分解活性の低下は認められなかった。以上の結果から、Ang II の分解に分泌型 A-LAP はほとんど寄与しておらず、上昇した Ang II 分解活性は刺激により活性化されたエンドペプチダーゼかカルボキシルペプチダーゼなど他のプロテアーゼによるものと考えられた。

強力な血管弛緩効果を有する一酸化窒素 (NO) はマクロファージにおいて合成が盛んに行われている。NO 合成には NO の原料となる Arg の細胞内および細胞外での濃度が上昇することが重要である。A-LAP は Arg 遊離活性を有することから、分泌型 A-LAP が細胞外 Arg 濃度の上昇を介して NO 合成に関与すると考え、それを明らかにすべく以下の検討を行

った。組換え型 A-LAP を処理した RAW264.7 細胞を Ang III 存在下・非存在下 Arg フリーの RPMI1640 培地中で 24 時間培養した後、培養上清中に含まれる NO 量を定量した。その結果、Ang III 存在下では、組換え型 A-LAP 処理した場合培養上清中の NO 含量が上昇した (図 2)。これは Ang III のアミノ末端に位置する Arg 残基が遊離したことに起因する。一方で、アミノ末端に Arg 残基を持たない Ang II や Ang IV だと NO 濃度の上昇は認められなかった。また、細胞外環境に存在する A-LAP の NO 合成関連遺伝子発現に及ぼす影響を網羅的に検討したところ、A-LAP は一酸化窒素合成酵素や Arg トランスポーターの発現には影響を及ぼさなかった。以上のことから A-LAP は細胞外で Arg を生成することで NO 合成能を上昇させていることが示唆された。また、分泌型 A-LAP は培養上清中でもカリジンからブラジキニンへの変換活性を失っておらず、カリジン存在下では iNOS 発現を上昇させている可能性が示された。

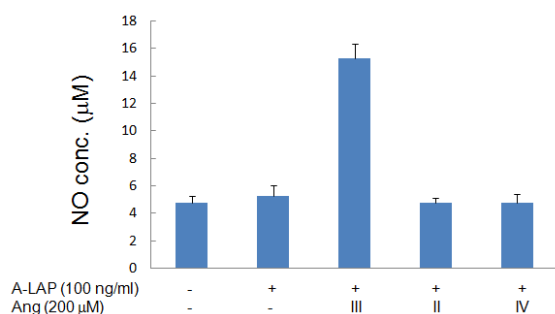


図 2 細胞外環境に存在する A-LAP の NO 合成への効果

組換え型 A-LAP で処理した RAW264.7 細胞を Arg フリーの RPMI1640 培地中種々のペプチド存在下・非存在下において 24 時間培養した。

#### 総括

マウスマクロファージにおいて A-LAP は、IFN- $\gamma$  および LPS 刺激が引き起こす細胞内  $Ca^{2+}$  の上昇がトリガーとなり、分泌されることが明らかになった。また、分泌された A-LAP はペプチド基質のアミノ末端から Arg 残基を遊離させることで、NO の原料を供給する役割を果たすことが示唆された。A-LAP の血圧調節機構についてはこれまで全く明らかになっておらず、今回の成果はその端緒を開くことができる可能性を示した。これまで、A-LAP をはじめとしていくつかのアミノペプチダーゼが血圧調節に関与することは既に明らかにされているが、一方でアミノペプチダーゼを標的とした降圧剤、昇圧剤については開発されていない。その原因のひとつとして、アミノペプチダーゼには活性中心が酷似し

た類縁酵素が多く、酵素反応を特異的に制御することが難しい点が挙げられる。この点、A-LAP をターゲットとした場合、分泌をコントロールすることで血圧を調節するという、新しい視点からの治療法の確立が期待できる。

#### 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 3 件)

① Goto Y, Ogawa K, Hattori A, Tsujimoto M.

Secretion of endoplasmic reticulum aminopeptidase 1 is involved in the activation of macrophages induced by lipopolysaccharide and interferon- $\gamma$ .

J Biol Chem. 2011 in press

査読有

② Evnouchidou I, Kamal RP, Seregin SS, Goto Y, Tsujimoto M, Hattori A, Voulgari PV, Drosos AA, Amalfitano A, York IA, Stratikos E.

Coding single nucleotide polymorphisms of endoplasmic reticulum aminopeptidase 1 can affect antigenic peptide generation in vitro by influencing basic enzymatic properties of the enzyme.

J Immunol. 2011 186, 1909-1913, 2011

査読有

③ Goto Y, Yoshioka R, Arisaka N, Hattori A, Tsujimoto M.

Involvement of glutamine-238 in the substrate specificity of human laeverin/aminopeptidase Q.

Biol Pharm Bull. 34, 24-27, 2011

査読有

[学会発表] (計 4 件)

① Yoshikuni Goto

Phagocytosis of macrophages is facilitated by secreted ER-aminopeptidase 1

BMB2010, 2010/12/10, 神戸ポートアイランド (神戸)

② Yoshikuni Goto

ERAP-1/A-LAP is secreted from macrophages treated with IFN- $\gamma$  and LPS

6th General meeting of International proteolysis society 2009 conference, 2009/10/28, Surfers Paradise QD Australia

③後藤 芳邦

マクロファージにおけるカルシウムを介した小胞体アミノペプチダーゼ-1の分泌  
第82回 日本生化学会大会, 2009/10/23,  
神戸ポートアイランド (神戸)

④後藤 芳邦

マクロファージにおける小胞体アミノペプチダーゼ-1の分泌  
第14回病態プロテアーゼ学会, 2009/8/21,  
千里ライフサイエンスセンター (吹田)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

後藤 芳邦 (GOTO YOSHIKUNI)  
帝京平成大学・薬学部・助教  
研究者番号: 90455345

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし