

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570164

研究課題名(和文)哺乳類におけるヒスチジン含有ジペプチド、カルノシンの代謝とその生理機能の解明

研究課題名(英文)Function and metabolism of a histidine-containing dipeptide, carnosine, in mammals

研究代表者

奥村 宣明 (Okumura, Nobuaki)

大阪大学・たんぱく質研究所・准教授

研究者番号：20224173

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円、(間接経費) 1,290,000円

研究成果の概要(和文)：カルノシン(-alanyl-L-Histidine)は、ヒスチジン含有ジペプチドと呼ばれるペプチドの代表的なもので、哺乳類の脳および骨格筋に高濃度で存在しており、抗酸化作用、pH緩衝作用、栄養学的作用など様々な機能を果たすと考えられている。カルノシンの合成、分解に関与する酵素は、我々を含めたいくつかのグループによって比較的最近同定されたが、不明の点が多く残されている。我々は、本研究課題において、カルノシン代謝に関連する酵素、特にカルノシンジペプチダーゼ2(CN2)を中心として、組織分布、細胞内分布、基質特異性などを明らかにし、そのペプチド代謝における生理的意義について新たな知見を得た。

研究成果の概要(英文)：Carnosine is a histidine-containing dipeptides present at high concentrations in mammalian skeletal muscles and the brain. It has been proposed that they have a variety of biological functions including anti-oxidant, pH-buffering and nutritional activities. Recently, we and other groups have identified the enzymes responsible for carnosine synthesis and degradation, but the function of these enzymes are still to be investigated. In this study, in order to clarify the functional roles of these enzymes, we have analyzed the enzymatic characteristics and cellular distribution of these enzymes, especially focusing on a carnosine-degrading enzyme, carnosine dipeptidase II (CN2).

研究分野：生化学

科研費の分科・細目：機能生物化学

キーワード：ペプチド代謝 ジペプチダーゼ 金属プロテアーゼ 骨格筋 脳

1. 研究開始当初の背景

カルノシン(γ-アラニル-L-ヒスチジン)は、哺乳類の生体内に存在するジペプチドで、骨格筋に数十 mM、脳にも数 mM 存在する。これまでに、アルデヒドやフリーラジカルのスカベンジャーとして作用すること、培養細胞や精製蛋白質に対して効酸化作用を示すことなどが報告されているが、その生理機能は十分解明されているとは言えない。我々はカルノシンが自律神経を介して血糖、血圧などの調節に関与すること、またその作用に脳内ヒスタミン神経系が関与することを見出し、視床下部-自律神経系を介した恒常性維持機構に関与すると考えて研究を進めている。

カルノシンは多くのペプチダーゼでは分解されないため、比較的安定に生体内に存在することができる。これは一般的なジペプチドとは対照的であり、カルノシンの固有の機能と密接に関連していると考えられる。一方、以前より、ある種の組織中、ならびに血液中にカルノシンを分解する酵素活性が検出されており、それぞれの酵素は組織カルノシナーゼ、血清カルノシナーゼと呼ばれていたが、これらの酵素は最近まで同定されていなかった。我々、及び Taufel らは、M20 ファミリーに属する金属ペプチダーゼ CN1 (CN1)、CN2 (CN2) がカルノシンを分解することを見出し、これらがカルノシナーゼと呼ばれていた酵素であることが明らかにした。(なお、最近の MEROPS プロテアーゼデータベースでは、それぞれカルノシンジペプチダーゼ 1 (CN1)、同 2 (CN2) と呼んでいる。)

我々はさらに、CN2 と競合阻害剤ベスタチンとの複合体の X 線結晶構造解析に成功した。その結果、この酵素はダイマーで安定に存在し、それぞれのモノマーは触媒ドメインと「ふた」ドメインからなっており、ダイマー形成とふたドメインのはたらきが必須であることなどが明らかになった。また、以前より活性に必要とされていた Mn^{2+} 、DTT などが構造上どのような機能を果たすかについて検討を行った。次の段階としては、これらの知見からどのような生物学的な意義を導き出せるかが重要と考えられる。

また、最近、カルノシンをアラニンとヒスチジンから合成する酵素のひとつが同定された。これによって、今後さらにカルノシンに関する研究が進展するものと考えられる。

2. 研究の目的

本研究課題では、カルノシンの細胞や組織における機能を明らかにすることを目的として、以下の実験を行う。

(1) カルノシンジペプチダーゼ CN1、CN2 (CN2) の組織分布を免疫組織化学的手法によって明らかにする。特に小腸、腎臓、胃

粘膜ヒスタミン産生細胞、脳のヒスタミン神経系などに注目して、ジペプチドの消化、吸収と腎臓における再吸収、またヒスタミンの生合成などに関与する可能性について検討する。また、発現調節機構について検討する。

(2) カルノシンジペプチダーゼ CN2 の酵素的性質、ならびに活性調節機構について、細胞内代謝産物との関連について検討する。特に、CN2 の活性に必須なことが判明している還元剤(グルタチオンなど)や、金属イオン(Mn^{2+}) について解析し、それらの生理的役割について検討する。

(3) カルノシン合成酵素について、組織分布をウエスタンブロット、ならび免疫組織化学によって調べる。また、ATP_grasp ファミリーの他の酵素について、カルノシン合成活性の有無を検討する。

(4) カルノシンの細胞に対する効果を検討する。特に、ヒスチジン要求性に対する効果を、S6K のリン酸化や蛋白質の発現と分解の変化の側面から解析する。

(5) これらの結果から、カルノシンの機能、特に、ヒスチジン代謝、ヒスタミン合成などにおける役割を考察する。

3. 研究の方法

1) カルノシン分解酵素の発現と精製

マウスのカルノシンジペプチダーゼ 2 (CN2) は、pGEX-6P3 ベクターに遺伝子をクローニングし、大腸菌 BL21(DE3) をトランスフォームし、1 mM IPTG で 18 16 時間誘導した。その後、集菌し、凍結・融解の後、超音波で破碎し、遠心上清をグルタチオンセファロースとインキュベートした。樹脂を洗浄後、PreScission Protease (GE healthcare) でタグを切断し、さらに陰イオン交換カラム Q-sepharose で精製した。カルノシンジペプチダーゼ 1 は、pET28b ベクターにクローニングし、大腸菌で発現誘導を行った。

2) CN1、CN2 の抗体の調整

CN2 の抗体は、精製した CN2 を抗原としてウサギに免疫、抗血清を得た後、CN2 抗原カラムを作成してアフィニティー精製を行った。CN1 は、大腸菌のインクルージョンボディから SDS-PAGE で分離して溶出し、これを抗原としてウサギに免疫し、抗血清を得た。

3) カルノシン分解酵素のウエスタンブロットと免疫組織染色

ウエスタンブロットは、抗 CN1、または抗 CN2 抗体を一次抗体、HRP 標識抗ウサギ IgG を二次抗体として化学発光法で検出した。

免疫組織染色は、腎臓、および消化管のパラフィン包埋切片を pH7.4 のトリスバッファ中で 30 分間煮沸し、その後ブロッキング、一次抗体、HRP 標識二次抗体とのイン

キュベーションの後、3-3'ジアミノベンチジンの発色によって検出した。

4) CN2 の活性測定

基質のジペプチドは受託合成により作成し、10 mM の水溶液として調整した。活性測定は 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 0.1 mM MnCl₂ 存在下で、37 °C、30 分間インキュベーションを行い、アルカリ条件下で o-フタルアルデヒドと反応して、ヒスチジン特異的な反応産物による発色 (OD310) を測定した。

5) CN2 の L6 細胞における発現

マウス CN2 の cDNA を pCMV-3Tag1 ベクターに入れてマウス筋芽細胞由来細胞株である L6 細胞に発現させ、G418 で安定発現株を選択した。

4. 研究成果

1) CN1, CN2 の末梢組織における免疫組織化学的解析

われわれはこれまでに、CN2 がマウス脳においていくつかの特定の領域で高い発現量が見られることを明らかにしたが、本研究において、各種の末梢組織の免疫組織染色による解析を行った。その結果、ウエスタンブロットでは多くの組織に存在するが、いくつかの細胞において特に高い発現が見られることが明らかになった。

マウスの消化管においては、小腸微絨毛の上皮細胞で特に発現量が高いことが判明した。小腸上皮細胞は、消化管で分解されたアミノ酸やペプチドを吸収する場所であり、ペプチドの一部は吸収されたのち分解されると考えられている。したがって、CN2 は小腸上皮細胞において、消化されたの最終的なアミノ酸への分解を行うと考えられた。

また、腎臓において、近位尿細管の上皮細胞に発現量が高いことが判明した。近位尿細管は、糸球体でろ過された蛋白質やペプチドが再吸収される場所であり、再吸収されたペプチドは分解されてアミノ酸になると考えられる。したがって、CN2 は、腎臓において、再吸収されたペプチドを分解する機能を果たしていると考えられる。

われわれはさらに、もう一つのタイプのカルノシン分解酵素である CN1 の抗体を作成した。CN1 は CN2 と異なり、フォールドした活性のある酵素を大腸菌発現系で得るのが困難で、抗体作成はインクルージョンボディから精製することにより抗原を得て、これを用いて抗血清を得た。現在、これを用いて組織分布の検討を行っている。

2) CN2 の活性化状態を構成するダイマー形成、ならびに金属との複合体の形成の解析

CN2 は X 線結晶解析により、ダイマーを形成していること、また酵素活性にダイマー同士の相互作用が必要であることが示唆され

た。そこで、CN2 の溶液中での構造と酵素反応機構を解析するために、質量分析計 (ESI-TOF MS) によるネイティブな蛋白質複合体の解析を試みた。その結果、CN2 の native な複合体の検出に成功した。そこで、CN2 の種々のミュータントを大腸菌を用いて作成し、CN2 の複合体形成の解析を行い、CN2 のダイマー形成が酵素反応に必要なことなどを明らかにした。また、各種金属の親和性の解析を行い、Zn²⁺、Mn²⁺、Cu²⁺ など各種の遷移金属の 2 価イオンとの親和性を明らかにした。また、この親和性と活性の関連について解析を行った。

一方、CN1 については、大腸菌では種々の発現システムを試したが、前述のように、ネイティブな立体構造での発現が困難で、酵素活性の詳細な解析を行うことができなかった。今後、大腸菌以外の発現系を用いて発現、精製を試みる予定である。

3) CN2 の基質特異性の解析

CN2 は Mn²⁺ 存在下でカルノシンを分解することがわかっているが、他にも CN2 の基質となるペプチドが存在すること、また、細胞内で Mn²⁺ との複合体が形成されているか否かが明らかではないことなどから、CN2 の生理機能を明らかにするためには、基質特異性についての正しい情報を得ることが必要である。そこで、CN2 の基質特異性について、種々の条件下で再検討を行った。その結果、測定条件によって基質特異性が非常に狭くなる場合と、かなり広がる場合があることが判明した。どちらが実際の CN2 の生理機能を反映しているかは不明であるが、これを明らかにするためには、in vitro の実験のみならず、細胞内での分解活性を測定する何らかの方法を考える必要があると考えられた。そこで、さらに細胞内での CN2 の活性について検討した (次項)。

4) CN2 の細胞内におけるカルノシンの分解と、ヒスチジン代謝における意義についての解析

CN2 の細胞内での基質特異性を解析することは重要と考えられるが、基質はジペプチドという非常に小さい分子であり、プロテアーゼでよく行われているように N 末か C 末に発色団などを結合させると、基質特異性そのものが変化する可能性があるため、別の方法を考える必要がある。そこで、CN2 を L6 細胞に強制発現させ、ヒスチジンを含まない培地にかえてヒスチジンジペプチドの添加により生存が維持されるか検討した。生存できればそのヒスチジンジペプチドは分解されてヒスチジンが生成したと考えられる。

その結果、CN2 発現細胞のみならず、コントロール細胞においてもヒスチジンジペプチドによる生存の維持が確認された。このことから、哺乳類の培養細胞では、ヒスチジンがカルノシンの分解によっても供給され得

ることが明らかになった。しかし、CN2 の強制発現の効果は明らかではなく、細胞内でのカルノシン分解における CN2 の寄与は明らかにはならなかった。細胞内にはもともと少量の CN2 が存在することから、別の種類の細胞を使うなどの方法により、さらに検討をする必要があると考えられた。

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4件)

1. Role of L-carnosine in the control of blood glucose, blood pressure, thermogenesis, and lipolysis by autonomic nerves in rats: involvement of the circadian clock and histamine. Nagai K, Tanida M, Nijjima A, Tsuruoka N, Kiso Y, Horii Y, Shen J, Okumura N. Amino Acids. 43, 97-109 (2012).

Diversity in protein profiles of individual calcium oxalate kidney stones. Okumura N, Tsujihata M, Momohara C, Yoshioka I, Suto K, Nonomura N, Okuyama A, Takao T, PLoS One 8: e68624 (2013).

Identification of cargo proteins specific for importin-beta with importin-alpha applying a stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC)-based in vitro transport system. Kimura M, Okumura N, Kose S, Takao T, Imamoto N, J Biol Chem 288: 24540-24549 (2013).

Identification of cargo proteins specific for the nucleocytoplasmic transport carrier transportin by combination of an in vitro transport system and stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC)-based quantitative proteomics. Kimura M, Kose S, Okumura N, Imai K, Furuta M, Sakiyama N, Tomii K, Horton P, Takao T, Imamoto N, Mol Cell Proteomics 12: 145-157 (2013).

[学会発表](計2件)

Requirement of dimer formation for carnosine-hydrolyzing activity of carnosinase CNDP2. Okumura N., Kusunoki, M., Okumura A., Nagai, K., Takao T. Poster presentation at International congress on carnosine in exercise and disease, Belgium, 2011年7月

ESI-TOF MS を用いたカルノシンジペプチダ

ーゼ2 (CNDP2) のダイマー形成の解析 奥村宣明、田村淳、高尾敏文 第59回質量分析討論会、2011年9月13-15日、大阪

[図書](計2件)

Carnosine and the blood glucose. Okumura N. Tanida M, Nijjima A, Tsuruoka N, Kiso Y, Horii Y, Nagai K. in Food and Nutritional Components in Focus. RSC publishing (London) (分担執筆、編集)

Carnosine dipeptidase II Okumura N. in Handbook of Proteolytic Enzymes, pp. 1597-1600, (2012) Academic Press (Waltham, MA) (分担執筆)

[その他]

ホームページ等

www.protein.osaka-u.ac.jp/metabolism/tanishita.html

6 . 研究組織

(1)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