

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：25301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590683

研究課題名(和文)ADMA化タンパク質代謝系を標的とする脳神経疾患関連因子の探索と作用機構の解明

研究課題名(英文)Searching for neurodegenerative disease-related factors in the metabolic systems of ADMA-containing protein and the elucidation of the functional mechanism

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：中枢神経系における非対称性ジメチルアルギニン(ADMA)代謝系の役割を明らかにするために、ADMA代謝関連酵素ならびにnNOSのラット脳組織における局在性について精査した。その結果、各脳領域において、PRMT1とDDAH1の共局在性が示され、大脳と視床においてはnNOSとの共存が観察された。さらに、ADMA化されたタンパク質を網羅的に検索し、運動ニューロンの変性に関連するフルクトース ビスフォスフェイト アルドラーゼCを新規なアルギニンメチル化タンパク質として同定した。以上の結果は、PRMT/DDAH/NOS 軸が脳機能の恒常性維持の一端を担っていることを示唆するものである。

研究成果の概要(英文)：To demonstrate the physiological significance of the metabolic pathways for asymmetric dimethylarginine (ADMA) in central nervous system, we examined the immunohistochemical localization of ADMA metabolizing enzymes, PRMT1 and DDAH1 and nNOS in the rat spinal cord and the other brain regions. Western blot analyses showed that PRMT1 and DDAH1 were widely distributed. The immunohistochemical analyses showed that these enzymes colocalized in a lot of neurons. In the cortex and hypothalamus, almost all nNOS neurons had PRMT1 and DDAH1. Additionally, we surveyed unknown arginine methylated proteins from rat brain by proteomic analysis and identified fructose 1,6-bisphosphate aldolase C (FBAC) as a novel ADMA-containing protein. These findings suggest that the PRMT/DDAH/NOS axis is play a part of homeostatic function in central nervous system.

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：翻訳後修飾 アルギニンメチル化タンパク質 中枢神経系 ADMA PRMT DDAH 一酸化窒素

1. 研究開始当初の背景

生体分子のメチル化修飾は様々な生命現象に広く関わっていることが推察されているが、初めてヒトの尿中にアルギニンやリジンのメチル化誘導体が見いだされた当時は、その生理的意義については不明であった。その後、アルギニンメチル化タンパク質の合成経路については、Paik WK らの研究グループが、遊離型メチル化アルギニン類の分解経路については研究代表者らのグループがその実体を明らかにした。これらの代謝系の全体像を図1に示した。それから20年を経た現在では、ヒストンならびに非ヒストンタンパク質のアルギニンメチル化反応を触媒するメチル基転移酵素 (PRMTs: PRMT1-11 isoforms) が複数同定され、アルギニン残基のメチル化がシグナル伝達や RNA プロセッシング、転写制御や DNA 修復等、多岐にわたる細胞機能に関与し、結果として癌や糖尿病さらには神経変性疾患等との関連性について論じられ始めている。一方、遊離型 N^G, N^G -dimethylarginine (asymmetric dimethylarginine: ADMA) の病態生理学的役割に関する研究は、NO 研究の発展とともに深化してきたものと理解できる。特に、「血中 ADMA レベルの上昇が動脈硬化症のリスクファクターとなる」ことが発表されて以来、動脈硬化症を起源とする様々な病態における ADMA の病因メカニズムの解明が進んでいる。この分野の研究は、研究代表者とともに共同研究を続けている国内外の研究グループが中心となって成果を上げてきた。また、我々は平成 20~22 年度の科学研究費補助金の交付を受けて進めた研究により、血中 ADMA レベルを制御するメカニズムの一つとして、赤血球における ADMA の代謝系が重要な役割を果たしていることを見いだした。このように、ADMA の代謝系と多様な病態の関わりを長年追究してきた研究過程において、脳神経細胞の分化制御やアルツハイマー病発症に ADMA 代謝系の関与が示唆される結果も得られているが、そのメカニズムは未解明のままである。

2. 研究の目的

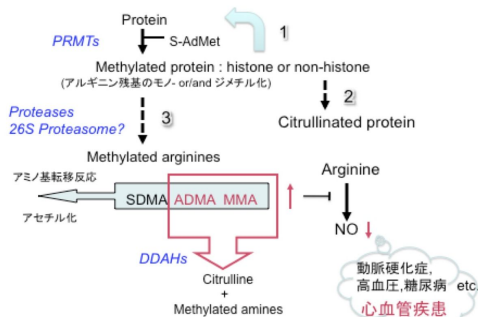


図 1. ADMA の代謝系と病態との関わり

図 1 に示したように、哺乳動物細胞には ADMA の他に構造的に異なる 2 種類のメチ

ル化アルギニン、 N^G, N^G -dimethylarginine (symmetric dimethylarginine: SDMA) および N^G -monomethylarginine (MMA) が存在する。これらは、いずれもタンパク質の翻訳後修飾によって生成され、ついでメチル化タンパク質の代謝回転に伴って体液中に遊離される。そして、そのまま、あるいはアセチル体となって尿中に排泄される。これら構造異性体のうち、ADMA と MMA は dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH) によって加水分解され、また両者は NOS の内因性阻害剤として働く。一方、SDMA は DDAH の基質でなく、NOS の阻害剤としても働かない。すなわち、DDAH の発現や活性制御系は NO 産生に大きく影響を与える結果となる。しかし、体内の ADMA 濃度を決定するのは DDAH の働きだけでなく、上流のタンパク質アルギニンメチル化活性、ならびにそれに続くメチル化タンパク質分解活性に因るところも無視できない。この点を明らかにするためには、図 1 に示した経路 1、経路 2、経路 3 の実体ならびに制御系の解析が必須課題となる。我々は先行研究において、脳組織では他の組織に比べて DDAH 活性が極めて高値であること、視覚末梢神経破壊動物の脳において DDAH の過剰発現が見られたことなどを報告した。本研究においては、脳神経系における ADMA 代謝系の全体像を明らかにし、アルギニンメチル化修飾と脳機能との新たな関連性を見いだすことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 免疫組織化学的解析のためのラット脳組織の調製

体重が約 400 g の SD 系雄ラットを麻酔下で左心室より少量の PBS を注入、灌流し、その後 4% PFA で固定を行った。ラットから全脳を採り出し、固定液に 4 にて 6 時間浸した。引き続き PBS で希釈した 10, 15, 20% スクロース溶液にそれぞれ 6 時間以上浸漬し、完全に液置換を行った。

(2) ウェスタンブロット解析のためのラット脳組織の調製

上記と同じラットを麻酔下で心臓採血によりと殺し、全脳を採り出し、各領域 (解剖学的に嗅球、前脳、大脳皮質、海馬、視床下部、小脳、脳幹、下垂体、脊髄) に分け、それぞれの細胞質画分を調製した。

(3) 免疫組織化学的解析

固定した脳を O.C.T. Compound で包埋し、 -30°C で凍結保存した。凍結組織をクライオスタット (LEICA CM 3050S) を用いて、50 μm の厚さで連続的に切断した。作製した矢状断脳切片ならびに冠状断脳切片は 0.1 M リン酸緩衝液 / 0.05% アジ化ナトリウムで保存し、免疫化学的検出に用いた。

(4) 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。

(5) 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。

(6) 未知タンパク質の MALDI-TOF MS 分析による構造解析

目的のスポットをゲルから切り出し、トリプシンによりゲル内消化を行った。消化産物は MALDI-TOF 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。

4. 研究成果

(1) ラット脳組織における ADMA 代謝関連酵素の局在性の検証

ラット脳を各領域 (解剖学的に嗅球、前脳、大脳皮質、海馬 etc.) に分け、まずこれらの細胞質画分を調製し、ウエスタンブロット解析により PRMTs および DDAH1 の発現状況を精査した。さらに、各領域の組織切片を用いて、免疫組織染色法により、これら酵素の検出を行い、その局在性 (細胞の種類、細胞内小器官について) を明らかにした。

ウエスタンブロットの結果から、タンパク質分子上のアルギニン残基を ADMA 化する PRMT1 と DDAH1 の局在性は類似しており、脊髄を含むすべての脳領域にほぼ均一に存在した。一方、タンパク質分子上のアルギニン残基を SDMA 化する PRMT5 は肝臓や腎臓など他の組織に比べて、脳に高発現していた。このことは、脳においては、タンパク質のアルギニンメチル化システムが豊富に備わっていることを示すものである。さらに、これらタンパク質に加えて神経型 NOS (nNOS) の組織化学的解析を行い、以下の結果を得た。

ラット脊髄切片の ABC-DAB による単染色活性は、PRMT1, PRMT5 および DDAH1 が脊髄後角第 I, 第 II, 第 IX 層の神経細胞体に強く、nNOS は神経細胞体ならびに近位樹状突起に強かった (図 2)。

また、神経細胞体と近位樹状突起のマーカーである MAP-2 を用いた蛍光二重染色の結果、PRMT1 と DDAH1 は運動ニューロンと介在ニューロンを含むすべての神経細胞に共局在し、PRMT5 は介在ニューロンではなく運動ニューロンに存在した (図 3)。これらタンパク質の細胞内分布については、

PRMTs が細胞質および核内に、DDAH1 は核を除く細胞体に発現していることが明らかとなった (図 3)。

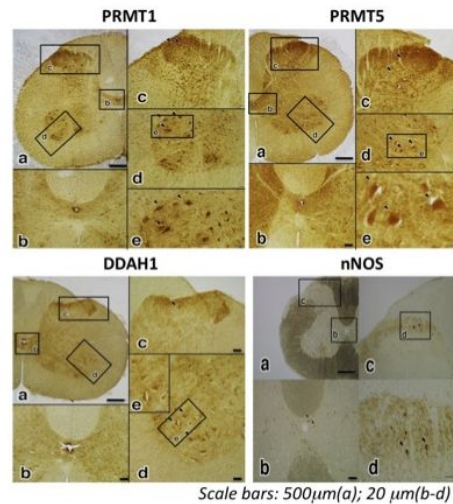


図 2 脊髄における単染色

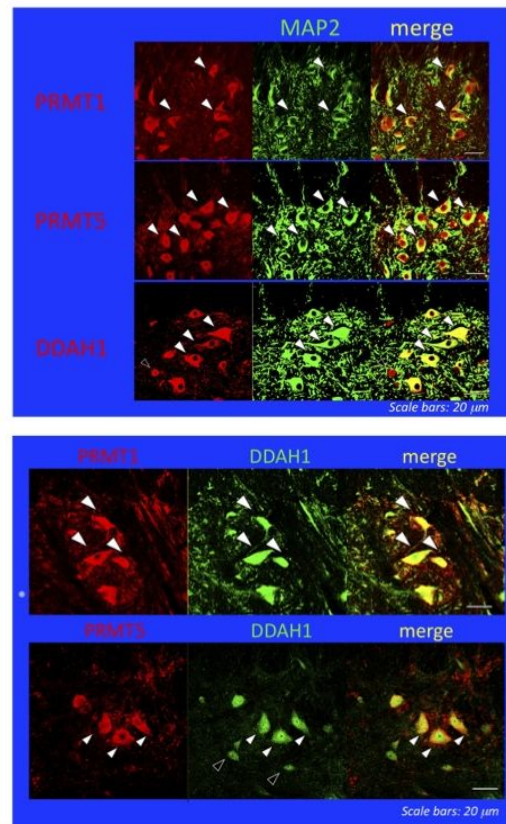


図 3 脊髄における二重染色

次いで、ラット脳の他の領域 (大脳皮質、海馬、視床、視床下部) における PRMT1, DDAH1 および nNOS の局在性について、神経細胞のマーカーである Neu N との蛍光二重染色により検討した。表 1 および表 2 はその結果をまとめたものである。PRMT1 は、これら 4 領域すべてにおいて 8 割以上の Neu N 陽性神経細胞に発現がみられ、海馬においてはすべての Neu N 陽性神経細胞に発現が認められた。また、nNOS 陽性細

胞における PRMT1 の発現も高い頻度で観察された(表1)．一方,DDAH1 は Neu N 陽性神経細胞の約 7 割が大脳皮質と視床において,約 3 割が海馬と視床下部において発現していた．このように,DDAH1 は各領域による異なる発現分布を示した．nNOS 陽性細胞における DDAH1 の発現は大脳皮質と視床においてほぼ 100%の割合を示し

表 1 Neu N, nNOS陽性細胞におけるPRMT1, DDAH1の発現割合(%)

	PRMT1/Neu N	PRMT1/nNOS
大脳皮質	83.5 ± 7.8	88.8 ± 20.1
海馬	100.0 ± 0.0	80.6 ± 17.3
視床	89.8 ± 9.8	100.0 ± 0.0
視床下部	96.5 ± 2.4	87.8 ± 13.0

	DDAH1/Neu N	DDAH1/nNOS
大脳皮質	66.6 ± 10.4	94.4 ± 9.6
海馬	33.1 ± 22.2	39.3 ± 12.9
視床	70.2 ± 13.6	100.0 ± 0.0
視床下部	33.0 ± 6.6	58.8 ± 21.2

表 2 PRMT1とDDAH1の共存率(%)

	DDAH1/PRMT1	PRMT1/DDAH1
大脳皮質	73.3 ± 8.1	94.4 ± 6.6
海馬	30.1 ± 9.6	86.2 ± 8.0
視床	93.8 ± 5.4	94.0 ± 5.6
視床下部	84.7 ± 5.7	88.9 ± 3.9

表 2 に示すように,PRMT1 はこれら 4 領域すべてにおいて DDAH1 陽性細胞の 9 割の高頻度で発現がみられた．一方,DDAH1 は視床ならびに視床下部において PRMT1 陽性細胞の 9 割の高頻度で発現がみられた．このような結果は,4 領域の中でも視床,視床下部における PRMT1 と DDAH1 の共存性を明らかに示すものである．

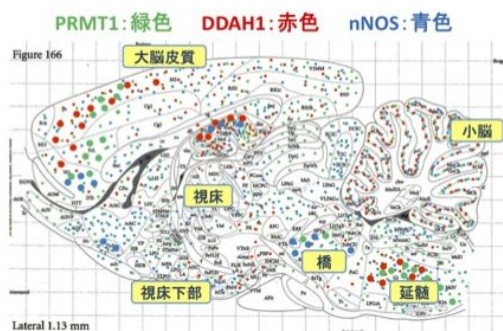


図 4 ラット脳矢状断における陽性細胞分布

以上の所見を含めたラット矢状断における各タンパク質の発現パターンを George Paxinos と Charles Watson の The Rat Brain アトラス上にまとめたのが図 4 である．PRMT1 陽性細胞は大脳皮質,海馬,視床,視床下部をはじめ脳の各領域に広く存在した．特に大脳皮質,橋,延髄では強い陽性反応を示す細胞や密集した陽性細胞が確認された．DDAH1 は大脳皮質,海馬,

視床,視床下部,小脳,延髄,橋に局在した．特に大脳皮質,海馬,延髄では強い陽性反応を示す細胞や密集した陽性細胞が確認された．nNOS 陽性細胞は大脳皮質,海馬,視床,視床下部をはじめ,脳の各領域に広く存在した．特に橋では強い陽性反応を示す細胞が確認され,延髄では密集した陽性細胞が確認された．

2) 脳組織におけるアルギニンメチル化タンパク質の同定

まず 1) で用いた各脳領域サンプルを SDS-PAGE に供し,それぞれ特異抗体,ASYM24 あるいは SYM10 を用いて ADMA を含むあるいは SDMA を含むタンパク質の検出を行った．

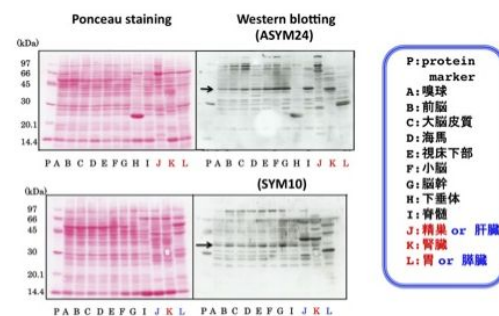


図 5 アルギニンメチル化タンパク質の検索

その結果,図 5 に示したように多数の陽性バンドが観察された．その中でも脳組織において,主要なバンドとして検出された矢印で示した 39-kDa ペプチド(ADMA 結合型タンパク質)と 35-kDa ペプチド(SDMA 結合型タンパク質)に焦点をあて,さらに解析を進めた．両者は,ともに脳組織全体に広く分布していることから全脳粗抽出液を等電電気泳動/SDS-PAGE(二次元電気泳動)に供し,ウエスタンブロットによる陽性スポットの特定を行った．

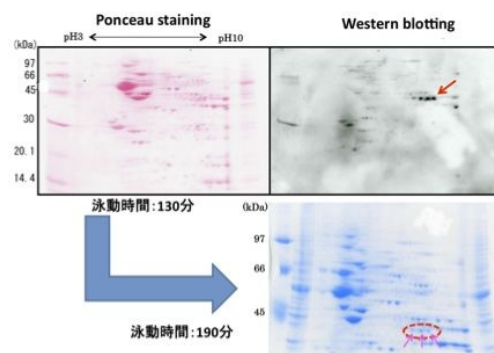


図 6 ADMA 結合型タンパク質の特定

図 6 のウエスタンブロットの結果から,等電点の微妙に異なる 3 個のスポットが検出され,これらが 39-kDa ペプチドに由来するものと考えられた．これらのうち真ん中のスポットをゲルから切り出し,トリプシン消化後,MALDI-TOF MS 分析によりタンパク質の同定を行った．得られた解析結果から,

39-kDa ペプチドは fructose bisphosphate aldolase C であると同定された。

次いで、SDMA 結合型タンパク質の可能性のある 35-kDa ペプチドの解析を進め、以下の結果を得た。図 8 において、抗体との反応が陽性であるスポットは複数認められたが、点線で囲んだ 44 kDa, 35 kDa, 28 kDa のペプチドが鮮明なシグナルを与えた。その中でも 35-kDa ペプチドは、CBB 染色では確認が難しいため銀染色を行い、独立したスポットとして確認できた真ん中のスポットをゲルから切り出し、トリプシン消化後、MALDI-TOF MS 分析によりタンパク質の同定を行った。

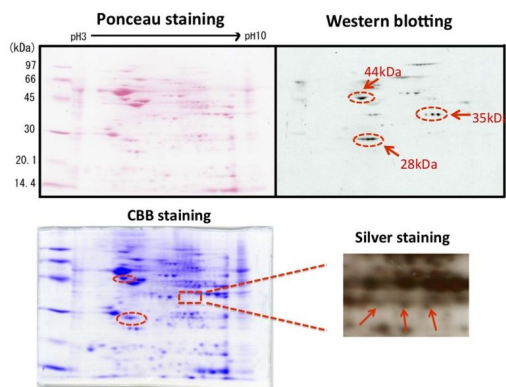


図 8 SDMA 結合型タンパク質の特定

得られた解析結果から、35-kDa ペプチドは ribose-phosphate pyrophosphokinase 1 であると同定された。

ラット脳の各領域を用いたウエスタンブロットならびに免疫組織化学的解析の結果、ADMA の産生・分解に係る酵素類が脳の各領域に広く発現していることが確認された。また、ADMA によって制御を受ける nNOS も同様に広い分布を示した。PRMT1 は nNOS 陽性細胞中に存在する割合が各領域で異なるものの比較的高く、特に視床では完全な共存を認めた。これらの結果は、脳の広い領域の nNOS 発現細胞において MMA あるいは ADMA を含むタンパク質の合成が行われていることを示唆する。これらメチル化タンパク質の代謝回転にしたがって生成される遊離型 MMA および ADMA は DDAH1 により分解されるが、nNOS 陽性細胞中における DDAH1 の存在割合は大脳皮質と視床において特に高く、本結果は nNOS と DDAH1 の共存を裏付けるものである。これらの脳領域においては、PRMT1 と DDAH1 の酵素連関とそれによる NO 産生調節がなされていることが示唆される。以上の結果から、PRMT/DDAH/NOS axis が脳機能の恒常性維持の一端を担っていることが考えられる。DDAH1 の発現が確認されなかった下丘や終脳、海馬の錐体細胞層では、他の調節機構によって NO 産生が調節されているのかも知れない。しかし、nNOS 陽性細胞が観察されなかった領域にも PRMT1 や DDAH1 の発現が確認された

ことから、脳におけるこれらのタンパク質は NO 産生調節以外の重要な役割のあることが推察できる。その一つに、PRMTs が関係する細胞内タンパク質のアルギニン残基のメチル化が神経突起伸長に關与するとの報告もあるが、神経細胞におけるタンパク質のメチル化の生理的意義についての研究は緒に就いたところである。このような研究の遅れは、神経細胞におけるメチル化タンパク質の網羅的解析がなされていないことが上げられる。我々は本研究において、脳の各領域に広く分布するアルギニンメチル化タンパク質として fructose-bisphosphate aldolase C (ADMA を含む) および ribose-phosphate pyrophosphokinase 1 (SDMA を含む) を同定した。fructose-bisphosphate aldolase C はグルコースを利用する細胞に存在する代表的な解糖系酵素であり、脳に優位に発現している aldolase アイソフォームである。本タンパク質は、解糖系酵素としての働きのほか他の分子との相互作用によって多機能性を有することが明らかにされつつある。例えば、大脳皮質に局在している fructose-bisphosphate aldolase C が light neuro filament (NF-L) mRNA と結合し、NF-L mRNA の安定性を変化させる可能性が示唆されている。また、NF-L mRNA の不安定性が NF-L タンパク質の凝集に關係して運動ニューロンの変性を引き起こす可能性についても論じられている。脳内でメチル化を受けているタンパク質の多くが RNA 結合タンパク質であるとする報告を信じるならば、本研究で得た結果は、これに矛盾することなく fructose bisphosphate aldolase C のような RNA 結合タンパク質のアルギニンメチル化が脳機能と密接に關係するのではないかと仮説を提示するものである。これにより、今後の研究の方向性を明確に示すことができた。すなわち、fructose-bisphosphate aldolase C のアルギニンメチル化のメカニズムを解明し、脳機能との関連性を見いだすことである。

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 8 件)

Hasegawa K, Wakino S, Kimoto M, Minakuchi H, Fujimura K, Komatsu M, Kaneko Y, Kanda T, Tokuyama H, Hayashi K, Itoh H. The hydrolase DDAH2 enhances pancreatic insulin secretion by transcriptional regulation of secretagogin through a Sirt1-dependent mechanism in mice. *FASEB J.*, 27, 2301-2315 (2013), 査読有
Yokoro M, Suzuki M, Murota K, Otsuka C, Yamashita H, Takahashi Y, Tsuji H, and Kimoto M. Asymmetric dimethyl-arginine, an endogenous NOS inhibitor,

is actively metabolized in rat erythrocytes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 76(7), 1334-1342 (2012), 査読有

Yokoro M, Suzuki M, Yatani M, Yamashita H, Takahashi Y, Tsuji H, and Kimoto M. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay system for the determination of asymmetric dimethylarginine using a specific monoclonal antibody. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 76(2), 400-403 (2012), 査読有

Kunimoto A, Yokoro M, Murota K, Yamanishi R, Suzuki-Yamamoto T, Suzuki M, Yutani C, Doi S, Hiemori M, Yamashita H, Takahashi Y, Tsuji H, Kimoto M. Gastrointestinal digestion and absorption of Pen j 1, a major allergen from kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 75(7), 1249-1258 (2011), 査読有

[学会発表](計 21 件)

森本亮祐, 大森由香子, 鈴木麻希子, 野村奈央, 山本登志子, 山下広美, 高橋吉孝, 辻英明, 木本眞順美. 40S リボソームタンパク質サブユニット 2(RPS2)はラット組織における主要なアルギニンメチル化タンパク質である 第 68 回日本栄養・食糧学会大会, 2014 年 5 月 30 日~6 月 1 日, 酪農学園大学.

Kimoto M, Hatakenaka H, Suzuki-Yamamoto T, Suzuki M, Ito A, Yokoro M, Yamashita H, Takahashi Y. Proteomic analysis of arginine methylated proteins in rat brain. 20th International Congress of Nutrition, 2013 年 9 月 15 日~20 日, Spain, Granada

鈴木麻希子, 守谷智恵, 山下広美, 高橋吉孝, 辻英明, 木本眞順美. マウス海馬におけるタンパク質の非対称性アルギニンメチル化に及ぼす加齢と高脂肪食の影響 第 67 回日本栄養・食糧学会大会, 2013 年 5 月 24 日~26 日, 名古屋大学.
山本登志子, 伊藤有沙, 横路三有紀, 鈴木麻希子, 木本眞順美, ラット脊髄における PRMT1 と DDAH1 の免疫組織化学的解析, 第 85 回日本生化学会大会, 2012 年 12 月 14 日~16 日, 福岡国際会議場.

Suzuki-Yamamoto T, Ito A, Yokoro M, Suzuki M, Kimoto M. Immunohistochemical localization of nNOS, PRMT and DDAH in the rat central nervous system. The 7th International Conference on the Biology, Chemistry and Therapeutic Application of Nitric Oxide, 2012 年 9 月 15 日~20 日, Edinburgh, Scotland.

鈴木麻希子, 横路三有紀, 山本登志子,

山下広美, 高橋吉孝, 辻英明, 木本眞順美, 海馬における proteasome subunit alpha type-2 の ADMA 化に及ぼす加齢の影響, 第 66 回日本栄養・食糧学会大会, 2012 年 5 月 18 日~20 日, 東北大学.
池田丈太, 畠中瞳, 山本登志子, 横路三有紀, 鈴木麻希子, 山下広美, 辻英明, 木本眞順美, ラット脳におけるメチル化アルギニン代謝系の生理的役割に関する研究, 第 65 回日本栄養・食糧学会大会, 2011 年 5 月 13 日~15 日, お茶の水女子大学.

6. 研究組織

(1)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

(2)研究分担者

高橋 吉孝 (TAKAHASHI YOSHITAKA)

岡山県立大学・保健福祉学部・教授

研究者番号: 10236333

山本登志子 (YAMAMOTO TOSHIKO)

岡山県立大学・保健福祉学部・准教授

研究者番号: 60301313

(3)連携研究者

鈴木 麻紀子 (SUZUKI MAKIKO)

高知県立大学・健康栄養学部・准教授

研究者番号: 60437001