

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592836

研究課題名(和文) プロテアーゼの機能異常による慢性炎症の発症機序の解明

研究課題名(英文) Phylogenetic and biochemical approach for identifying the chronic proinflammatory proteins accumulated in protease-deficient species and individuals

研究代表者

西下 一久 (NISHISHITA, Kazuhisa)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・助教

研究者番号：20237697

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：アスパラギン酸プロテアーゼの比較遺伝学的解析と欠損マウス細胞の解析を行った。カテプシンE遺伝子を欠失している反芻動物等と、カテプシンEを発現している他の動物との生理学的相違点に着目すると、抗微生物ペプチド群の活性制御へのカテプシンEの関与が考えられた。生理的機能が明確でないナプシンでは、霊長類進化の過程で遺伝子重複、変異による酵素活性の減弱と偽遺伝子化が生じていると考えられた。カテプシンE欠損マウス由来マクロファージでオートファジーの低下と酸化ストレスの上昇が観察され、高脂肪食によって生じる欠損マウスの血中コレステロール高値と脂肪肝はマクロファージの白色脂肪への流入の減少との関連が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated the evolution and gene organization of the aspartic proteases, including cathepsin D, cathepsin E, pepsins, renin and napsins. Cathepsin E gene appears to be absent in Ruminants and Platypus. Human napsin B has been annotated as a pseudogene because it lacks an in-frame stop codon. napsin B orthologs are primarily distributed in primates, while napsin A orthologs are the only napsin genes in other species. Napsin B was duplicated from napsin A during the early stages of primate evolution, and the subsequent loss of napsin B function reflected ongoing human-specific napsin B pseudogenization. Cathepsin E deficiency causes autophagy impairment concomitantly with increased aberrant mitochondria as well as increased oxidative stress in macrophage. The impaired adipose tissue development in high fat diet-fed cathepsin E-deficient mice was probably due to reduced infiltration of macrophages and may lead to hepatomegaly accompanied by hepatic steatosis and hypercholesterolemia.

研究分野：歯科薬理学

キーワード：プロテアーゼ 分子進化 偽遺伝子

1. 研究開始当初の背景

我々はエンド・リソソーム性プロテアーゼの1つであるカテプシン E の欠損マウスにアトピー性皮膚炎が発症することを見出した。同様に、カテプシン C のヒト遺伝子異常は、Papillon-Lefevre 症候群と称され、歯周病により早期の歯牙喪失に至ることが示されている。これら2つの例から、プロテアーゼの欠損が内在性タンパク質の蓄積を引き起こし、それらによりパターン認識受容体を持続的に活性化することが慢性炎症の開始、進行、破綻に深く関与していると考えた。

2. 研究の目的

プロテアーゼの機能異常によって引き起こされる慢性炎症は内在性タンパク質の蓄積によるものであると解明することを目的とする。我々が長年研究してきたカテプシン E に関しては、ある種の蓄積タンパク質が多数あることを既に見出している。そこで、この蓄積タンパク質が慢性炎症を起こす内在性タンパク質として機能するかどうかを明らかにする。

また、すでに先行研究で内因性リガンドとして同定されたタンパク質が多数ある。これら既存のタンパク質がカテプシン欠損細胞に蓄積しているのかも解析する。

3. 研究の方法

(1) カテプシン E が属するアスパラギン酸プロテアーゼスーパーファミリーメンバーを遺伝子配列データベースから抽出して分子進化系統樹を作成し、比較遺伝学的アプローチにより、それらが特定の種でのみ発現し、種特異的な生理機能を有しているのか、あるいは脊椎動物種全てにおいて発現し、生存に必須であるのかを探った。そのうちナプシンについて、遺伝子重複、欠失、ヒト特異的な偽遺伝子化について分子進化的および生化学的な解析を行った。さらにカテプシンが欠失している動物種の生物学的特徴から、欠損すると蓄積する可能性のある内在性タンパク質の絞り込みを行った。さらにそれらの基質となる可能性のある内在性タンパク質を探った。

(2) カテプシン E ノックアウトマウスのマクロファージにおける酸化ストレスとオートファジー亢進について検討した。さらに同マウスを高脂肪食で飼育したときに生じる肝肥大について詳細に解析を行った。

4. 研究成果

(1) カテプシン E は、反芻動物とブタ、さらにカモノハシにおいて欠失していた。これらの動物種とカテプシン E を発現している他種との生理学的相違点に着目すると以下の2点が顕著であった。

反芻動物の第一胃では常在微生物による食物発酵が行われ、後胃で酸とペプシンにより微生物が分解・殺菌され、セルロースや微

生物産物を栄養として用いている。

カモノハシはカテプシン E やペプシン遺伝子群が欠失していると同時に解剖学的な胃を欠いている。一方で特有の抗微生物ペプチド群による感染防御機能が発達している。これら2点の特徴より、消化管粘膜における抗微生物ペプチド群の活性化・分解へのカテ

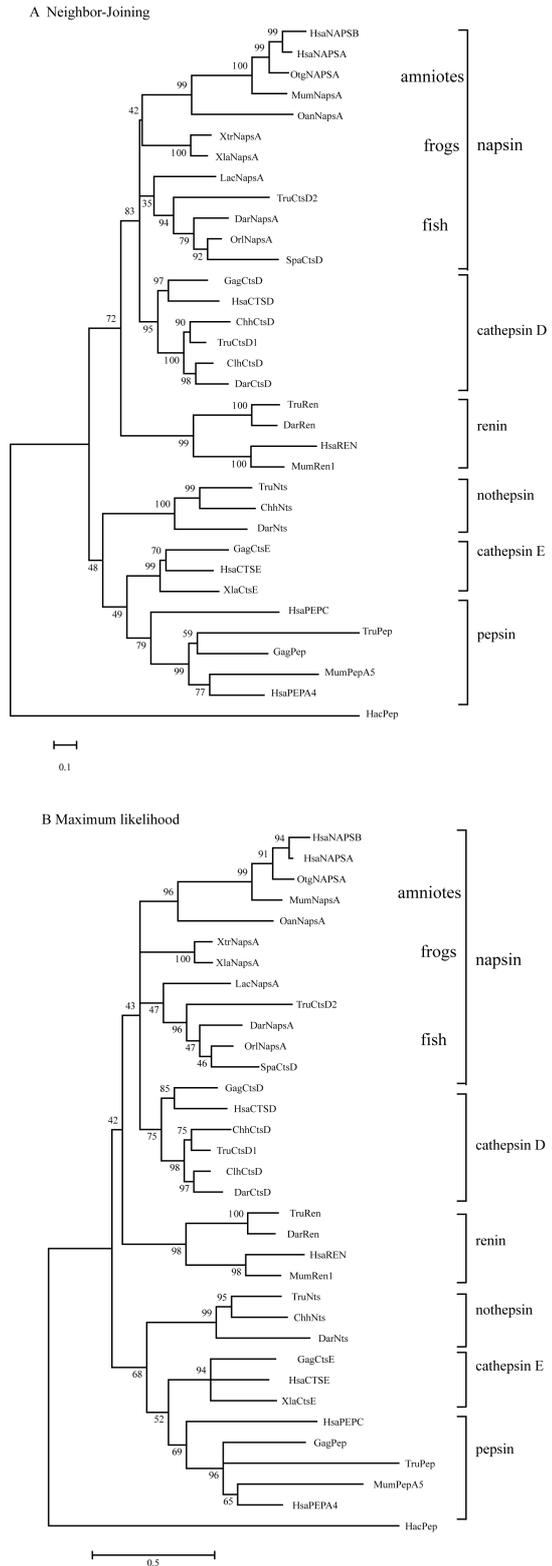


図1 NJ法 (A) と ML 法 (B) によるアスパラギン酸プロテアーゼの系統樹

プシンEの関与が示唆された。それら抗微生物ペプチドのうちサポシンはカテプシンEの過剰発現により減少することを見出した。(2) ヒトのナプシン遺伝子 Napsin A および Napsin B の核酸配列は 91.2% 相同である。前者は 420 アミノ酸をコードする一方、後者は終止コドンの無いままポリ A が付加されるため、偽遺伝子であるとされていた。ところが、チンパンジー Napsin B は終止コドン TGA を持ち、また HapMap プロジェクトで得られたデータでは、ヒト Napsin B の終止コドン位置には TGC/TGA の 2 種の allele が存在し、その頻度は 98% : 2% であった。NCBI および Ensembl データベース検索から抽出した各種のナプシンホモログの分子進化系統樹を作成したところ、ナプシンホモログは鳥類を除く脊椎動物に存在し、霊長類にのみ Napsin B ホモログが見出された(図1)。Neighbor-joining および Maximum likelihood 法により作成したいずれの系統樹においてもナプシンとカテプシンD のポリトミーが解消されず、ナプシンは分子進化的にカテプシンDと最も近縁であることが明確となった。魚類ナプシン(C)の遺伝子の並び(synteny)は四肢動物ナプシン(A, B)と全く異なり、一部の遺伝子はカテプシンD2と名付けられていた(図2)。すなわちナプシンオルソログは四肢動物のみに存在するプロテアーゼと考えられた。アミノ酸配列を比較したところ、ヒト Napsin B には Arg287 が、マカク Napsin B (MamNAPSB) の活性中心には D215H 変異があった。TGA TGC による終止コドンの消失はヒト NAPS B にユニークな変異であった。

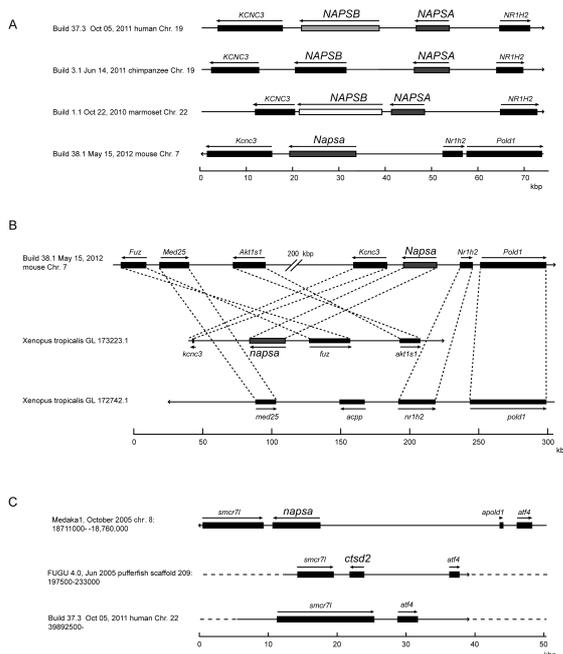


図2 各動物種におけるナプシン遺伝子近傍の遺伝子の並び

タンパク質コーディング領域に働いた正の自然選択を検出する解析を行ったところ、活

性中心に変異のあるマカク Napsin B は中立進化に近い d_n/d_s だったが、ヒト Napsin B (HsaNAPSBp) はよく保存されており、ヒト Napsin B の偽遺伝子化は新しいイベントであると考えられる。リコンビナント発現させたヒト Napsin B のプロテアーゼ活性は Napsin A のそれに比較して顕著に低く、活性部位近傍の塩基性アミノ酸 Arg287 の関与が大きいと考えられた。

ナプシン遺伝子は霊長類進化の過程で重複が生じて2つになり、ヒトでは Napsin B のプロテアーゼ活性の大部分が失われた後のイベントとして、終止コドン変異による偽遺伝子化がほぼ fix に近いレベルまで進んでいると考えられた。

(3) 我々はカテプシンE欠損マウスでリソソーム膜タンパク質が蓄積していることを見出していたが、欠損マウスのマクロファージでオートファジーマーカータンパク質の変化を観察すると LC3 と p62 が蓄積していた。蛍光顕微鏡観察で LC3 を含む小胞は野生型マクロファージでは酸性コンパートメントと一部マージしていたが、欠損マウスのマクロファージでは重なりが観察されず、オートファゴソームとリソソームの融合が阻害されていた。また、機能低下したミトコンドリアの蓄積と酸化ストレスマーカーの上昇が欠損マウスのマクロファージに観察された。カテプシンE欠損マウスに高脂肪食を与えると野生型マウスに比較して体重増加が少なく、組織の白色脂肪と褐色脂肪の蓄積がほとんど生じない一方で中性脂肪の蓄積による肝肥大がみられ、血中コレステロール値が高かった。欠損マウスでは白色脂肪組織に存在するマクロファージが顕著に少ないことにより脂肪代謝異常が引き起こされる可能性が示唆された。

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 3件)

Kadowaki T, Kido MA, Hatakeyama J, Okamoto K, Tsukuba T, Yamamoto K. Defective adipose tissue development associated with hepatomegaly in cathepsin E-deficient mice fed a high-fat diet. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 査読有 446(1):212-7. 2014 doi: 10.1016/j.bbrc.2014.02.089.

Tsukuba T, Yanagawa M, Kadowaki T, Takii R, Okamoto Y, Sakai E, Okamoto K, Yamamoto K. Cathepsin E deficiency impairs autophagic proteolysis in macrophages. *PLoS One.* 査読有 8(12):e82415. 2013 doi: 10.1371/journal.pone.0082415.

Nishishita K, Sakai E, Okamoto K, Tsukuba T. Structural and phylogenetic

comparison of napsin genes: the duplication, loss of function and human-specific pseudogenization of napsin B. Gene. 査読有 517(2), 147-57. 2013 doi: 10.1016/j.gene.2013.01.013.

〔学会発表〕(計 2件)

西下 一久、坂井 詠子、岡元 邦彰、筑波 隆幸 アスパラギン酸プロテアーゼナプシンの系統樹解析と生化学的解析 遺伝子重複、偽遺伝子化と機能喪失 第36回日本分子生物学会年会 2013年12月4日神戸ポートピアホテル(兵庫県・神戸市)

岡元 邦彰、岩田 淳一、坂井 詠子、西下 一久、山本 健二、筑波 隆幸 p53はカテプシンE遺伝子の発現を制御する 第85回日本生化学会大会合同大会、2012年12月16日 福岡国際会議場(福岡県・福岡市)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西下 一久(NISHISHITA, Kazuhisa)
長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・
助教
研究者番号：20237697

(2) 研究分担者

坂井 詠子(SAKAI, Eiko)
長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・
助教
研究者番号：10176612

岡元 邦彰(OKAMOTO, Kuniaki)
長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・
准教授
研究者番号：10311846

筑波 隆幸(TSUKUBA, Takayuki)
長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・
教授
研究者番号：30264055

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

福岡 裕(FUKUMA, Yutaka)

菅原 めぐみ(SUGAWARA, Megumi)