

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：32511

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659153

研究課題名(和文) アミノペプチダーゼの動脈硬化症への関与

研究課題名(英文) Role of aminopeptidases in atherosclerosis

## 研究代表者

辻本 雅文 (TSUJIMOTO, Masafumi)

帝京平成大学・薬学部・教授

研究者番号：00281668

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：小胞体アミノペプチダーゼ(ERAP1)はインターフェロン(IFN)- $\gamma$  およびリポ多糖(LPS)処理によりマクロファージから分泌される。このことは、分泌されたERAP1が血液中の血管作動性物質に作用し、血圧を調節している可能性を示している。

ERAP1の分泌機構を検討した結果、IFN- $\gamma$  およびLPS処理により発現誘導されるIFN- $\gamma$  等のサイトカインが細胞内カルシウム濃度を上昇させることが重要であることが示された。また分泌されたERAP1がアンジオテンシンII などN-末端にアルギニンを有するペプチドに作用し、一酸化窒素を産生することで血圧調節に関与していることも示された。

研究成果の概要(英文)：Endoplasmic reticulum aminopeptidase (ERAP) 1 is secreted from macrophages in response to IFN- $\gamma$  and LPS, suggesting that it can regulate blood pressure via cleavage of peptide hormones in the blood vessels and thus affect the formation of atherosclerosis.

In this study, we initially analyzed the secretion mechanism of ERAP1. We found that IFN- $\gamma$  /LPS treatment caused the expression of several cytokines in macrophages such as IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ . Synergistic action of these cytokines induced the mobilization of calcium in the cytosol to cause the ERAP1 secretion. We also found that secreted ERAP1 mediated NO production via cleavage of peptide hormones having N-terminal arginine. Taken together, our data suggest that ERAP1 was secreted via calcium mobilization in the cytosol in response to infectious states caused by either bacteria or virus infection and could regulate blood pressure via cleavage of peptide hormones and thus might play roles in the formation of atherosclerosis.

研究分野：生化学

キーワード：小胞体アミノペプチダーゼ マクロファージ インターフェロン LPS

## 1. 研究開始当初の背景

小胞体アミノペプチダーゼ(ERAP) 1は亜鉛を含有する M1 アミノペプチダーゼファミリー酵素の一員として、世界に先駆け私たちが同定/クローニングしたペプチド分解酵素である。本酵素の最も重要な特徴は、通常の状態では発現細胞から分泌されるはずのアミノ酸配列であるにも関わらず、小胞体に貯留され、そこに留まっていることである。その後の検討において、本酵素は小胞体内腔において、癌細胞やウイルス感染細胞の除去に際して発動される MHC クラス I を介した細胞傷害性 T 細胞の活性化に必要なペプチド抗原の最終プロセシング酵素であることが判明し、生体防御において重要な役割を果たしていることが、私たちの研究成果を含めて明らかになっている。

一方遺伝子多型の検討により、本酵素には数多くの変異体が存在し、それらの一部は、高血圧症や強直性脊椎炎・乾癬症等の自己免疫疾患など各種病態にリンクしていることが示されている。これらの結果は本酵素が幅広い病態の発現に関与していることを示すものとして注目を集めており、多くの研究成果が発表されるに至っている。

私たちはこれまでの研究で、ERAP1 がインターフェロン(IFN)- $\gamma$  やリポ多糖(LPS)処理されたマクロファージから分泌され、その貪食能を亢進することを明らかにしてきた。これらの結果は ERAP1 がウイルスやバクテリアによる感染に際し、細胞での存在領域を変化させて細胞外に現れ、感染症初期における生体防御機構として機能することを示しているとともに、アンジオテンシン II やカリジンなどの血液中の血圧調節ペプチドに作用し、血圧調節に関与できる可能性を示している。

本研究は ERAP1 が 1 ) 遺伝子多型の解析により高血圧症に関連するとされること、 2 ) 分泌された後、血液中のアンジオテンシン II

やカリジンなどの血圧調節ペプチドに作用する可能性があること、および 3 ) これらのペプチドの N-末端アミノ酸残基を遊離させる酵素活性を有することから、本酵素が種々の刺激により細胞外へ分泌され、血圧調節(さらには動脈硬化症の発症)に関与する可能性があることを想定し、その可能性について検討することを意図したものである。

## 2. 研究の目的

ERAP1 は小胞体内腔における抗原ペプチドの最終プロセシング酵素として、強直性脊椎炎などの自己免疫疾患の発症に重要な役割を果たしていることが想定されている。一方私たちは本酵素が感染症に関わる刺激により、マクロファージから分泌され、その活性化を介して生体防御に関与するとともに、血中に分泌された ERAP1 が血圧調節ペプチドに作用するに作用することで、血圧調節に関与する可能性を示した。本研究においては分泌型 ERAP1 に着目し、その分泌機構を解明するとともに、(特に血管系に関わる)新たな生理的/病理的機能を見出すことで、本酵素の高血圧症および動脈硬化症などの病態への関与、さらにはクスリの標的タンパク質としての可能性について検討することを主要な目的とした。

## 3. 研究の方法

ERAP1 の分泌には IFN- $\gamma$ /LPS 処理したマウス株化細胞 RAW264.7 細胞を主に用いた。分泌された ERAP1 および各種サイトカインの同定は主にウエスタンブロット法により行った。ERAP1 の酵素活性、一酸化窒素の測定は既存の方法に依った。

## 4. 研究成果

### (1) ERAP1 の分泌機構の解析

ERAP1 の分泌機構はマウス株化細胞 RAW264.7 細胞を用いて検討した。

IFN- $\gamma$ /LPS 処理した RAW264.7 細胞は ERAP1 を分泌した。この現象はポリミキ

シンBにより阻害されることから、ERAP1の分泌はLPSの受容体であるToll様受容体(TLR)4を介したものであることが明らかとなった。そこでTLR4の各種アゴニストを作用させたところ、TLR4結合タンパク質であるMyD88を介した情報伝達系が活性化された結果ERAP1が分泌されることが明らかとなった。またマウス腹腔マクロファージを用いた検討では、LPS単独処理でERAP1の分泌が観察された。従ってRAW264.7細胞におけるIFN- $\gamma$ は細胞の感作に必要であり、分泌作用の本体はLPSであると考えられた。TLR4およびMyD88の分泌における役割は、それらのノックアウトマウス由来のマクロファージでは分泌が観察されなかったことから確認された。

MyD88を介した情報伝達系により各種サイトカイン(特にIFN- $\beta$ )の産生が亢進されることから、IFN- $\beta$ 役割を検討した。IFN- $\beta$ 受容体ノックアウトマウスでは、IFN- $\gamma$ /LPS処理によるERAP1の分泌は認められなかった。その他TNF- $\alpha$ ノックアウトマウスを用いた場合にもERAP1の分泌は観察されなかった。これらの結果はMyD88を介して産生されたIFN- $\beta$ やTNF- $\alpha$ などのサイトカインがERAP1の分泌を誘導していることを示している。そこでIFN- $\beta$ 、TNF- $\alpha$ およびIFN- $\gamma$ の3種のサイトカインでRAW264.7細胞を処理したところ、3者による相乗効果が観察された。

以上のことからMyD88介在情報系による個々のサイトカインの発現量だけでは不十分であるが、3種のサイトカインが同時に発現され、局所に共存することで最大限の分泌亢進活性が発揮されるものと考えられた。

次にRAW264.7細胞をカルモジュリン阻害剤存在下でIFN- $\gamma$ /LPS処理すると

ERAP1の分泌は観察されなかった。3種のサイトカインは細胞質内へのカルシウムの流入を促進することから、この現象はIFN- $\gamma$ /LPS処理により各種サイトカインが発現誘導され、それらの相乗作用により細胞質内のカルシウム濃度が上昇し、その結果カルモジュリンが活性化されることで、ERAP1の分泌が誘導されるものと考えられた(図1)。

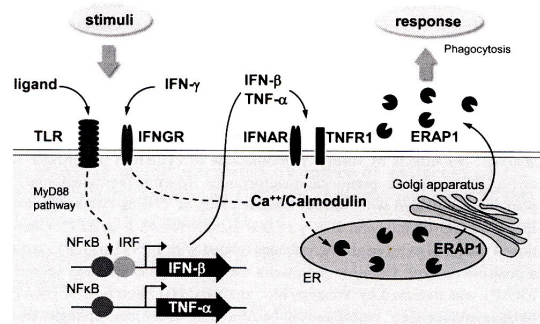


図1: ERAP1の分泌機構

ERAP1の分泌にはERAP1遺伝子のエクソン10が必要である。このことはエクソン10がコードするアミノ酸配列に結合するタンパク質の存在を想定させる。カルモジュリン(またはカルシウム)に依存したERAP1とその結合タンパク質の相互作用が感染症などの緊急時に解除され、小胞体からのERAP1の分泌が誘導されるものと考えられる(最近他グループによりエクソン10結合タンパク質の1つが同定された)。

## (2) ERAP1による一酸化窒素(NO)産生亢進

私たちはIFN- $\gamma$ /LPS処理したRAW264.7細胞がERAP1を分泌し、その貪食活性を亢進することを報告した。また他のグループはそのことを確認するとともに、ERAP1がナチュラルキラー(NK)細胞を活性化すると報告している。従って分泌されたERAP1は自然免疫系の活性化に関与することができると考えられ、他にも重要な生

理的機能を有することが期待される。そこで私たちは本研究において ERAP1 の血圧調節機能に関わる生理活性の有無について検討した。

RAW264.7 細胞をアンジオテンシン III 存在下で ERAP1 処理すると濃度依存的に NO の産生が観察された。このことはアンジオテンシン IV では観察されなかったことから、アンジオテンシン III の N-末端に存在するアルギニンが ERAP1 により遊離されることが重要であると結論された。ERAP1 の阻害剤存在下、野生型マウスと ERAP1 遺伝子が欠損したノックアウトマウスの NO 産生能を比較することから NO 産生における ERAP1 の寄与が推定できた。その結果各種アミノペプチダーゼが N-末端にアルギニンを有するペプチドに作用して NO の産生に寄与しうるものの、それらの中でも ERAP1 の寄与は大きいものと推定された。

NO 産生能の亢進は ERAP1 が実際に血圧調節に関与している可能性を高めるものである。さらに NO の生理的/病理的意義を考慮するならば、ERAP1 が血圧調節を介して動脈硬化の発症に対して抑制的に働いていることが期待される。今後は動脈硬化症のモデルマウス等を使用して個体レベルで、ERAP1 分泌の生理的/病理的意義を検討していきたいと考えている。

### (3) ERAP1 の阻害剤の検索

ERAP1 は抗原ペプチドのプロセシング酵素であることから、その阻害剤は自己免疫疾患の発症を抑制することが期待されている。私たちは公的機関の物質ライブラリーから ERAP1 の基質ポケットに親和性を有する化合物を選

択し、その酵素阻害能を検討した。その結果数種の化合物に阻害活性を見出した。今後その詳細について検討していく予定である。

近年、本研究を含め ERAP1 の重要性が認識されるようになってきたことから、ERAP1 に関する関心が高まっている。さらに本研究の過程で作成した ERAP1 遺伝子のノックアウトマウスにはこれまでは予期されてこなかった表現型が見出されている。今後これらについて詳細に検討し、ERAP1 の生体における生理的/病理的機能の全体像を明らかにしていきたいと考えている。

### 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4件)

Goto, Y., Ogawa, K., Nakamura, T.J.,  
Hattori, A. and Tsujimoto, M.

“Substrate-dependent nitric oxide synthesis by secreted endoplasmic reticulum aminopeptidase 1 in macrophages” J. Biochem.157(6), 439-449, 2015, 査読有  
DOI:10.1093/jb/mvv001

Goto, Y., Ogawa, K., Nakamura, T.J.,  
Hattori, A. and Tsujimoto, M.

“TLR-mediated secretion of endoplasmic reticulum aminopeptidase 1 from macrophages” J. Immunol. 192(9), 4443-4452, 2014, 査読有  
DOI:10.4049/jimmunol.1300935

Hattori, A. and Tsujimoto, M.

“Endoplasmic reticulum aminopeptidases: Biochemistry, physiology and pathology” J. Biochem. 154(3), 219-228, 2013, 査読有

DOI:10.1093/jb/mvt066

Hattori, A., Goto, Y. and Tsujimoto, M.

“Exon 10 coding sequence is important for endoplasmic reticulum retention of endoplasmic reticulum aminopeptidase 1” Biol. Pharm. Bull. 35, 601-605, 2012,  
査読有

DOI:10.1248/bpb.35.601

〔学会発表〕(計 4 件)

後藤芳邦、小川健司、中村孝博、服部 明、辻本雅文:小胞体アミノペプチダーゼ 1 遺伝子欠損に伴うマクロファージの Fcγ 受容体依存性貪食活性の低下;第 87 回日本生化学会大会、国立京都国際会館(京都府京都市)、2014 年 10 月 18 日

後藤芳邦、小川健司、中村孝博、服部 明、辻本雅文:マクロファージ古典的活性化に重要なトール様受容体を介した小胞体アミノペプチダーゼの分泌;第 86 回日本生化学会大会、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市) 2013 年 9 月 11 日

後藤芳邦、小川健司、中村孝博、服部 明、辻本雅文:分泌型小胞体アミノペプチダーゼ 1 による Arg 産生を介したマクロファージの NO 産生亢進;第 18 回日本病態プロテアーゼ学会学術集会、千里ライフサイエンスセンター(大阪府豊中市)、2013 年 8 月 21 日

後藤芳邦、小川健司、服部 明、辻本雅文:小胞体アミノペプチダーゼの分泌を介したマクロファージの NO 産生亢進;第 85 回日本生化学会大会、福岡国際会議場(福岡県福岡市)、2012 年 12 月 16 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

辻本 雅文(TSUJIMOTO, Masafumi)  
帝京平成大学・薬学部・教授  
研究者番号:00281668

(2)研究分担者

服部 明(HATTORI, Akira)  
京都大学・薬学研究院・准教授  
研究者番号:50300893

後藤 芳邦(GOTO, Yoshikuni)

帝京平成大学・薬学部・講師  
研究者番号:90455345