

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：32511

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293083

研究課題名(和文) M1アミノペプチダーゼ機能異常と自己免疫疾患病態の分子機構

研究課題名(英文) Pathophysiological roles of M1 aminopeptidases

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) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：小胞体アミノペプチダーゼ(ERAP1)の分泌機構を解析した。その結果、感染により複数のサイトカインがマクロファージに発現誘導され、それらが相乗的に作用することによることが明らかになった。また分泌されたERAP1は一酸化窒素の産生を個体レベルで誘導することが、ノックアウトマウスを用いた検討の結果明らかとなった。したがってERAP1が生体防御において重要であるとともに、エンドトキシンショックのメディエーターとも成りうる可能性が示唆された。

またERAP1の阻害剤を検索した結果、良好なIC50値を有する候補化合物の同定に成功した。今後本化合物をリードとして検討していく予定である。

研究成果の概要(英文)：Endoplasmic reticulum aminopeptidase (ERAP)1 was secreted under infectious conditions. When analyzed the mechanism, several cytokines were expressed in macrophages in response to LPS and IFN-gamma and their synergistic action caused the secretion via induction of calcium mobilization. Then we found that ERAP1 contributed to the NO production in vivo when analyzed by employing ERAP1-knockout mice.

In the serum of knockout mice, decrease in free arginine level was observed, suggesting that ERAP1 caused the cleavage of N-terminal arginine of substrate peptides and thus increased NO production. Further works are now in progress to elucidate the pathophysiological roles of ERAP1.

By molecular modeling, we elucidated the characteristic features of the substrate pocket of M1 aminopeptidases. Based on these results, we screened the inhibitor of ERAP1 and found a candidate. After optimization, we will develop a therapeutically useful inhibitor to pathological conditions caused by ERAP1.

研究分野：生化学

キーワード：M1アミノペプチダーゼ 小胞体アミノペプチダーゼ ノックアウトマウス 一酸化窒素

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。

本酵素が抗原提示に関与することは、本酵素が自己免疫疾患の発症にも関与していることを示している。実際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自己免疫疾患を含めた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、現在までに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)- γ 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た。この結果は 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唆しており、ERAP1 研究に新たな展開をもたらすものである。私たちの報告を踏まえてさらに本酵素がマクロファージ以外にも T 細胞や NK 細胞の機能を制御することが報告されている。

一方私たちは ERAP1 の基質特異性を決定しているアミノ酸残基を同定したことをきっかけに、M1 アミノペプチダーゼの基質ポケットのモデリングを行ってきた。さらに ERAP1&2 や APA の結晶構造が報告されている。これらにより ERAP1 の阻害剤探索が可能になってきている。

2. 研究の目的

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、本酵素の新規機能の同定を目指した。さらに本酵素を含む M1 アミノペプチダーゼの基質ポケットのモデリングをおこない、基質ポケットに親和性を示す低分子有機化合物の探索により、本酵素のクサ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目的とした。

3. 研究の方法

ERAP1 の分泌には IFN- γ /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。

基質ポケットのモデリングには CueMol プログラムを使用した。また低分子有機化合物のスクリーニングは市販のケミカルバンクに依った。

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- γ /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- γ 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- β ）の産生が亢進されることから、IFN- β 役割を検討した。IFN- β 受容体ノックアウトマウスでは、IFN- γ /LPS 処理による ERAP1 の分泌は認められなかった。その他 TNF- α 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- β や TNF- α 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- β 、TNF- α および IFN- γ 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- γ /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- γ /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。

(2)ERAP1 による一酸化窒素産生亢進

私たちは IFN- γ /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)細胞を抑制すると報告している。従って分泌された ERAP1 は自然免疫系の制御に関与することが考えられ、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生体防御に関わる ERAP1 の生理活性についてさらに検索した。

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由来マクロファージの 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できる結果が得られた。

細胞レベルで見られた NO 産生が個体レベルでも認められるかを ERAP1 ノックアウトマウスを用いて検討した。LPS を投与すると野生型マウスの血中に

ERAP1の分泌が見られたが、ノックアウトマウスでは確認できなかった。この時特に12時間目において野生型マウスとノックアウトマウスのNO産生量に差が認められた。この時期はERAP1の分泌時期と一致することから、NO産生量の増加課程にERAP1の関与が考えられた。アルギニンがNOの材料になることからLPS投与後の血中の遊離アミノ酸量を測定するとアルギニン量に野生型、ノックアウト型で差が認められた。これらの差はNO産生に関連しないプロリンでは認められなかった。従ってLPS投与により分泌されたERAP1がNO産生に関与すること、およびERAP1がエンドトキシンショックのメディエーターと成りうる可能性が示唆できたと考えられる。

(3) ERAP1 ノックアウトマウスの表現型

抗原提示におけるERAP1及びSNPバリエーション機能的相違を検討するためノックアウトマウスを作製したが、その過程でノックアウトマウスが興味深い表現型を示すことがわかった。ERAP1の生理機能におけるその新規性から早急な対応が必要と判断されたためノックアウトマウスの表現型を薬理的測定法を用いて検討した。その結果ノックアウトマウスは野生型に比べ、1)活動性が低下していること、2)不安レベルが亢進していること、3)社会性が低下していること、などが観察された。このことはノックアウトマウスが精神疾患様症状を呈することを示している。またノックアウトマウスでは脳内セロトニン含量の顕著な増加が観察された。これらの結果はERAP1ノックアウトマウスが有望なうつ病状態のモデル動物となりうる可能性を示している。ERAP1の脳内基質の同定を含めて、今後さらに詳細に検討していく予定である。

(4) 分子モデリングによるM1アミノペプチダーゼ基質ポケットの構造解析

阻害剤検索に資するためM1酵素の基質ポケットの構造解析を試みた。アミノペプチダーゼB(APB)は塩基性アミノ酸特異的な酵素であり、かつ大腸菌により容易に発現/精製できることから検討対象とした。私たちはこれまでにERAP1、APAを用いてM1酵素の基質特異性を決定しているアミノ酸残基を同定している。APBにおいて当該残基(Gln169)を改変すると、特異性の変化ではなく、むしろ反応性の低下およびクロライドアニオンに対する感受性の低下が観察された。モデリングによりGln169はクロライドアニオンを介して基質のN-末端アミノ酸と直線的に並ぶことが示された。他のアミノ酸に変換するとこの直線性が失われ、その結果効率的な酵素活性の発現が抑制されるものと推察された。またM1酵素の共通配列であるGXMENモチーフ近傍のPhe297を変換しても酵素活性の低下とクロライドアニオン感受性の低下が観察された。モデリングによりPhe297はGln169とクロライドアニオンが正しく配向するために重要であることが考えられた(図1)。

さらにERAP1の基質ポケットにフィットする化合物を市販のケミカルバンクからピックアップし、その阻害活性を測定した。その結果IC₅₀が10 μ M程度の新規骨格を有する化合物を同定した(図2)。本化合物はAPB阻害活性は示さないことから有望なERAP1阻害剤候補となりうると考えられた。現在詳細なデータの収集中である。今後は本化合物をリードとして阻害剤の最適化を試みていく予定である。

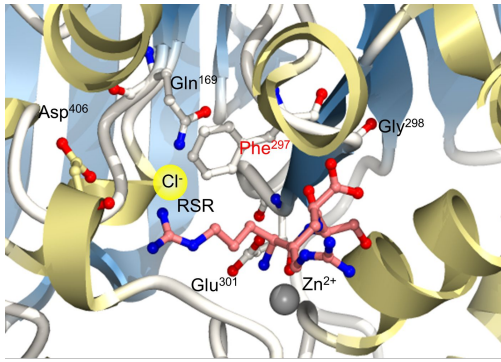


図1: APB 基質ポケットのモデリング

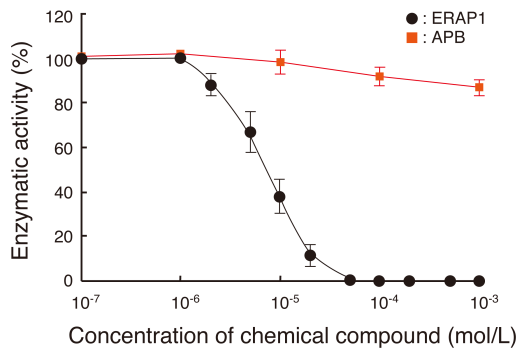


図2: ERAP1 阻害分子の探索

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5件)

Ohnishi, A., Watanabe, J., Ogawa Y., Goto, Y., Hattori, A. and Tsujimoto, M. “Involvement of phenylalanine 297 in the construction of the substrate pocket of human aminopeptidase B” *Biochemistry* 54(39), 6062-6070, 2015, 査読有 DOI:10.1021/acs.biochem.5b00964

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

Ogawa, Y., Ohnishi, A., Goto, Y., Sakuma, Y., Watanabe, J., Hattori, A. and Tsujimoto, M. “Role of glutamine-168 in the substrate recognition of human aminopeptidase B” *Biochim. Biophys. Acta* 1840, 1872-1881, 2014, 査読有

DOI:org.10.1016/j.bbagen.2014.01002

Goto, Y., Ogawa, K., Hattori, A. and Tsujimoto, M. “TLR-mediated secretion of endoplasmic reticulum aminopeptidase 1 from macrophages” *J. Immunol.* 192, 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

〔学会発表〕(計4件)

後藤芳邦, 小川健司, 中村孝博, 青嶋瑞樹, 荒俣晃貴, 高田 慧, 町田綾乃, 吉野僚太, 服部 明, 辻本雅文: 細菌感染に伴い血中に分泌された ERAP1 は血中アミノ酸や一酸化窒素濃度を調節する; 第38回日本分子生物学会年会 第88回日本生化学会大会 合同大会、「神戸ポートピアホテル(兵庫県、神戸市)」2015年12月3日

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

〔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

高須 清誠 (TAKASU, Kiyosei)
京都大学・薬学研究院・教授
研究者番号：10302168

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

小川 裕子 (OGAWA, Yuko)
帝京平成大学・薬学部・准教授
研究者番号：30267330

後藤 芳邦 (GOTO, Yoshikuni)
帝京平成大学・薬学部・講師
研究者番号：90455345

小川 健司 (OGAWA, Kenji)
独立行政法人理化学研究所・専任研究員
研究者番号：50251418