

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09658

研究課題名(和文) アスパラギン残基の脱アミド化反応による慢性閉塞性肺疾患発症のメカニズムの解明

研究課題名(英文) The roles of deamidation of asparagine residues in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary diseases

研究代表者

小笠原 正人 (Ogasawara, Masahito)

岩手医科大学・歯学部・教授

研究者番号：00325367

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：Prohibitin(PHB1)アミノ酸配列にはAsn残基は加齢などで非酵素的翻訳後修飾によりAsp残基に変化しやすい2か所(N24, N226)存在する。PHB1蛋白質のこの2か所を変えたPHB1蛋白質(N24DおよびN226D)をA549細胞に過剰発現細胞株を作成した。変異型PHB1では直径の大きい脂肪滴の出現、6種類の脂肪滴形成関連分子の遺伝子発現のバランスの異常、断片化したミトコンドリアの形態、細胞増殖能の低下とEGF受容体刺激後の早期のEGF受容体チロシンキナーゼドメインの脱リン酸化が確認された。またN24D変異は加齢マウス肺でも確認で、肺疾患における加齢因子の一つと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではミトコンドリア蛋白質PHB1の非酵素的異性体化反応が肺で認められ、PHB1(N24D)の変化が増加し、慢性閉塞性肺疾患発症における加齢的因子の一つにミトコンドリア蛋白質異性体化の関与が確認され、慢性閉塞性肺疾患の発症におけるミトコンドリア機能の保護の重要性として禁煙の重要性の一つの根拠になると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Amino acid sequence of Prohibitin 1(PHB1) contains two sites (N24D and N226D) prone to be non-enzymatically modulated based on the propensity of deamidation. To test the effects of mutant PHB1 on mitochondrial structure, lipid droplets structure, cell growth, we generated stable A549 cell lines with WT-PHB1 or N24D-PHB1 or N226D-PHB1. The mutant PHB1 proteins affected the fragmentation of mitochondria, increased number of larger sized lipid droplets, delayed cell growth, and earlier dephosphorylation of EGFR tyrosine kinase domain. To investigate the amino acid changes of PHB1 from Asn to Asp, we generated monoclonal antibodies against N24D PHB1, which recognized the increased alteration of PHB1 in the lung tissues from aged mice. The increased ratio of N24D PHB1 protein to WT PHB1 protein suggested that aging process of lung tissues contains nonenzymatic alteration, presumably resulting in the failure of lipid droplets formation and cell cycle progression.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：ミトコンドリア 脱アミド化 加齢 脂肪滴 EGF受容体

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

慢性閉塞性肺疾患の発症に、喫煙などの酸化ストレスに加え、加齢性因子が指摘されていたが、その詳細は不明であった。肺の加齢性変化の分子基盤として、核酸、脂質、蛋白質などの構造・機能変化の蓄積が酸化ストレスに対する適応不全を起し、肺胞破壊へと進行することが考えられていたが、そのメカニズムの多くは不明であった。そこで、本研究では特に蛋白質の非酵素的アスパラギン残基の脱アミド化による翻訳後修飾によってアスパラギン酸残基への変化に注目した (図 1-a, 1-b)。この変化は活性酸素や加齢性要因によって中間体を経て L-アスパラギン酸残基へ移行するものである。さらに、この変化は、3種類の異性体アスパラギン酸残基 (L-isoAsp, D-Asp, D-isoAsp) へと変化していく。一部は修復酵素 PCMT1 によって L-Asp に戻されるが、その活性は十分ではなく、異性体化された蛋白質が蓄積していく。また、加齢のプロセスにミトコンドリアの機能異常の蓄積が報告されている。我々は、以前の研究でミトコンドリアの形態維持に重要な Prohibitin1(PHB1)蛋白質において PCMT1 遺伝子をノックダウンすることにより、アスパラギン酸残基の異性体化の存在を明らかにしてきた (Ogasawara M et al, Exp Lung Res 2016; 42(5):245-62)。また、アスパラギン酸残基異性体化 PHB1 はミトコンドリア形態にも異常をきたし、断片化したミトコンドリアの増加が認められた。ミトコンドリアは ATP 産生にも重要な細胞内小器官であるが、異性体化された PHB1 の増加した細胞では ATP の産生も低下していた。ミトコンドリアが効率よくエネルギー産生を行うには脂質との相互作用が重要で、脂質成分を取り込むことが必要となる。最近の研究では、ミトコンドリアはペルオキシゾームや脂肪滴と接し、代謝のための材料の供給を受けていることが考えられている。PHB1 はミトコンドリア形態・機能だけでなく、近接する細胞内小器官をも制御している可能性が考えられる。

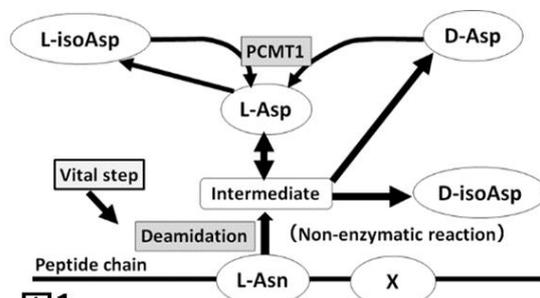


図 1-a

アスパラギン残基の異性体化の経路  
ペプチド中のアスパラギン残基は非酵素反応により脱アミド化されアスパラギン酸残基に変わる。その後はイソ体、D-アスパラギン酸残基へと変わっていく。

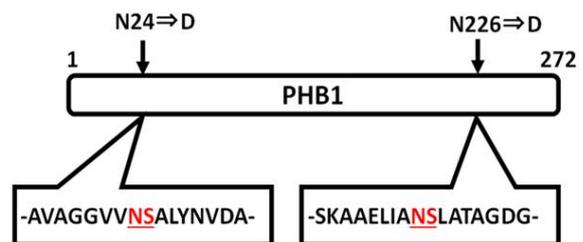


図 1-b

PHB1蛋白質のアスパラギン残基の脱アミド化部位  
アスパラギン残基のC末端側がセリン残基の時は非酵素的に脱アミド化反応が進行し、アスパラギン残基がアスパラギン酸残基に変わらう。

### 2. 研究の目的

本研究ではミトコンドリアの形態・機能維持に重要な Prohibitin1(PHB1)蛋白質に注目し、蛋白質のアスパラギン残基の非酵素的脱アミド化による翻訳後修飾によってミトコンドリアの形態および機能は変わるかを明らかにする。また、ミトコンドリアは ATP 産生によってエネルギーを供給しているが、その材料はミトコンドリアとほかの細胞内小器官との相互作用が重要である。最近の研究ではミトコンドリアと脂肪滴との直接的相互作用が電子顕微鏡レベルで確認されている。PHB1 蛋白質の主な細胞内局在はミトコンドリアであるが、細胞質、核内にもわずかながら存在することが示されている。そこで PHB1 蛋白質は脂肪滴の形成に関与するかを明らかにする。また、PHB1 異性体化蛋白質の発現は細胞増殖能に関与のかを明らかにする。さらに、実際に異性体化 PHB1 蛋白質が存在するかを検証するため、アスパラギン残基 (N24) をアスパラギン酸残基に変えた蛋白を作成し、モノクローナル抗体を作成し、加齢マウス肺での異

性体化 PHB1(N24D)の検討をする。

### 3. 研究の方法

ミトコンドリアの構造・機能維持に重要な PHB1 蛋白質のアミノ酸配列の中で、アスパラギン残基の脱アミド化しやすい特徴的な配列 (Asn-Gly または Asn-Ser) は 2 か所含まれている。そこでこれらのアスパラギン残基をアスパラギン酸残基に置換した PHB1 蛋白質を過剰発現させた。発現をモニターするためにベクター内に IRES 配列を持つものを選択し、変異型 PHB1 と GFP 蛋白質が同時に発現するようにした。安定細胞株を作成し、セルソーターで GFP 発現細胞を分離した。アミノ酸置換した部位は N24D, および N226D とした。併せて、コントロール (ベクターのみの導入)、WT (野生型 PHB1 の過剰発現)、N24D (N24D 変異型 PHB1 の過剰発現)、N226D (N226D 変異型 PHB1 の過剰発現) 細胞を用意した。

これらの細胞を用い、電子顕微鏡でのミトコンドリア形態の観察、オイルレッド染色による脂肪滴の形態の観察と大きさの評価、6 種類の脂肪滴形成関連分子 (perilipin1~6) の遺伝子発現、細胞増殖能の評価 (創傷治癒アッセイ)、および増殖因子受容体の蛋白質、および遺伝子レベルでの発現の検討を行った。受容体としてはチロシンリン酸化型受容体である EGF 受容体と 7 回膜貫通 G 蛋白共役型受容体としてヒスタミン H1, H2 受容体の検討をした。また、EGF 受容体に関しては EGF 刺激によるチロシンキナーゼドメインのリン酸化を指標に EGF 受容体機能の解析を行った。また、PHB1 の変異は実際に加齢マウスの肺で確認できるか確かめるため、N24D 変異を認識するモノクローナル抗体をラットで作成した。PHB1 アミノ酸配列はマウス、ラット、ヒトですべて同じで、マウスでの動物実験と同時にヒト検体についても検討できるようラットで作成した。16 週齢と 65 週齢のマウス肺を用い、PHB1 特異的抗体で免疫沈降後、N24D 特異的 PHB1 変異を認識するモノクローナル抗体でウエスタンブロット解析を行った。

### 4. 研究成果

(1) 野生型およびアスパラギン残基変異型 PHB1 過剰発現のミトコンドリアに対する効果、ミトコンドリアゲノムコピー数の変化

ミトコンドリアの電子顕微鏡写真では N24D-PHB1 発現細胞ではミトコンドリアのクリステ構造に変化がみられ、クリステ同士の間隔がまばらになり、また、膜構造の肥厚が認められた。ミトコンドリアゲノムのコピー数を核ゲノムのコピー数に対する割合でそれぞれの PCR 断片を定量化し評価した。WT-PHB1 ではミトコンドリアゲノムのコピー数が増加していたが、N24D-PHB1 発現細胞では有意なミトコンドリアゲノムコピー数が減少していた。

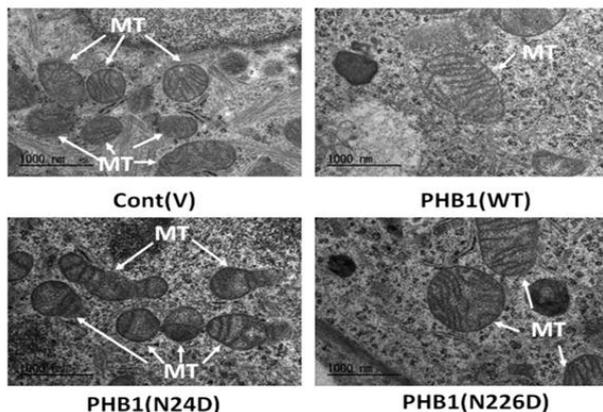


図2-a  
電子顕微鏡によるミトコンドリア形態の観察  
PHB1(N24D)発現細胞ではミトコンドリアのクリステ構造の乱れが観察される。

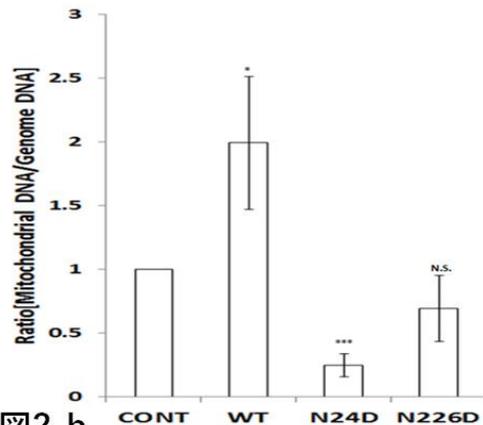


図2-b  
ミトコンドリアDNA/ゲノムDNAの相対比  
PHB1(WT)発現細胞ではミトコンドリアDNAコピー数は~2倍に増加した。一方、PHB1(N24D)発現細胞ではミトコンドリアDNAコピー数はおよそ30%程度に減少した。有意差はContのゲノムDNAに対するミトコンドリアDNAのコピー数の変化を比較検討した。p<0.05: \*, p<0.01: \*\*, p<0.001:\*\*\*

(2) 野生型およびアスパラギン残基変異型 PHB1 過剰発現の脂肪滴形態のオイルレッド染色による評価

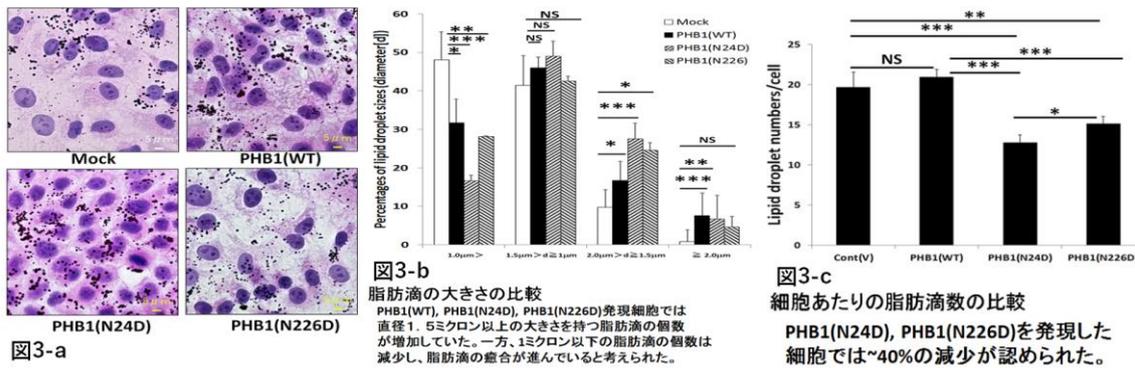
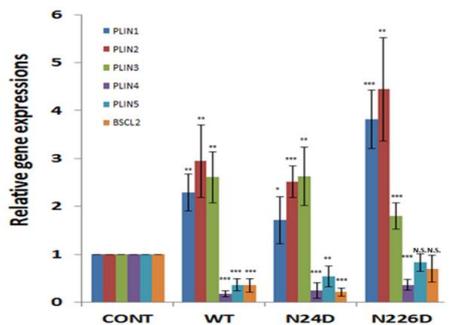


図 3-a にオイルレッド染色による脂肪滴の写真を示す。各細胞で脂肪滴を 10000 個以上数え、脂肪滴の割合を評価した。脂肪滴の形成はコントロール細胞に比較し、WT-PHB1, N24D-PHB1, N226D-PHB1 発現細胞いずれでも 1.5 ミクロン以上の直径を示す脂肪滴の増加が認められた。その中でも顕著なものは N24D-PHB1 発現細胞での大きい脂肪滴の増加が認められた。また、細胞当たりの脂肪滴の数は低下し、脂肪滴の癒合が進んでいることが示された。

(3) 脂肪滴形成関連分子の遺伝子発現

図 4 に脂肪滴形成に関連する分子 6 種類 (perilipin 1~6) に遺伝子発現を検討した。抗体での検討も行ったが、質の良い抗体は入手できず、遺伝子レベルでの発現を検討することとした。WT-PHB1 細胞、N24D-PHB1 細胞、N226D-PHB1 細胞では Perilipin 1~3 が有意に増加し、一方、perilipin 3~6 は有意な低下を示した。PHB1 の過剰発現は Perilipin 遺伝子発現に影響し、Perilipin の発現バランスの変化は脂肪滴の大きさ、成熟過程に関与することが示された。



(4) 創傷治癒アッセイによる細胞増殖能の評価

図 5-1, 図 5-2 に創傷治癒アッセイによる細胞増殖能の評価を行った。N24D-PHB1 細胞では細胞増殖能が低下していた。したがって、アミノ酸置換の N24D-PHB1 細胞では細胞周期に関連する仕組みと相互作用している可能性が示された。一方、アミノ酸置換でも N226D では有意な影響は示されなかった。

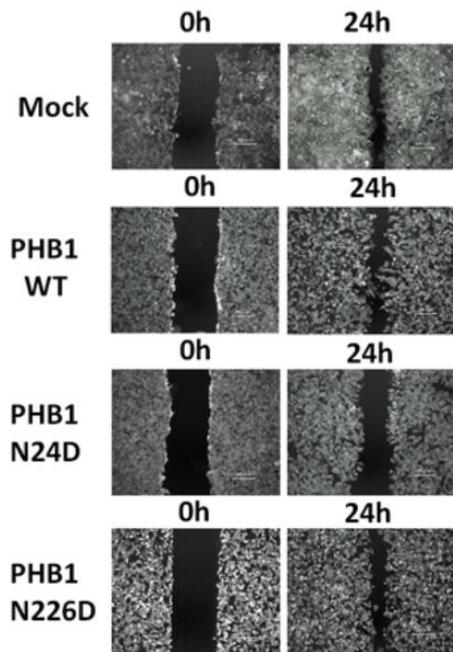


図5-1

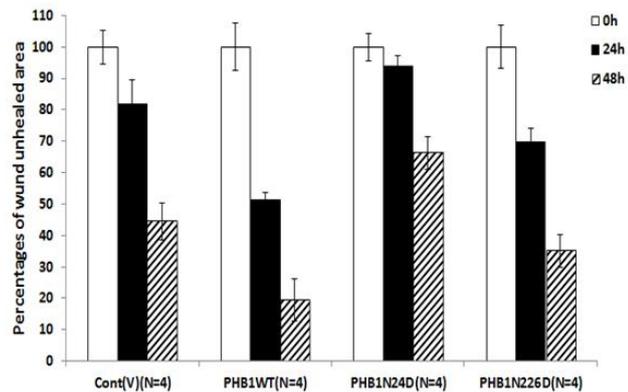


図5-2

(5) 野生型およびアスパラギン残基変異型 PHB1 過剰発現による細胞膜受容体の発現およびその機能に関する研究

図 6-1, 6-2 に EGF 受容体を EGF (10ng/ml) で刺激し、5 分、15 分、30 分、60 分、120 分での EGF 受容体のリン酸化レベルを解析した。N24D-PHB1 発現細胞は 30 分から脱リン酸化反応が起こり、EGF 受容体の機能低下が示唆された。これは創傷治癒アッセイで細胞増殖能低下の原因を説明できる要因と考えられた。

(6) N24D 変異型 PHB1 に対するモノクローナル抗体の作成と、加齢マウス肺での評価  
アスパラギン残基⇒アスパラギン酸残基への置換をした N24D-PHB1 蛋白質が加齢によって発現が増加するか明らかにするため、2 種類のペプチドを合成した (N24D:AGGVVDSALYNC, WT:AGGVVNSALYNC)。KLH でコンジュゲーションし、ラットの足底部に免疫を行った。追加免疫後、腸骨リンパ節よりリンパ球を単離し、ミエロマ細胞と融合させ、ハイブリドーマを作成した。また Eliza スクリーニングに BSA コンジュゲーションした 2 種類のペプチドを使用し、培養上清にて WT に対して N24D の誘導が認められるクローンを選択した。最終的に 5 種類のクローンを選択できた。これらの抗体を精製した。16 週齢および 65 週齢の C57/BL6 のマウス肺から組織抽出液を用意し、ウサギで作成された PHB1 抗体で免疫沈降し、その後今回作成したモノクローナル抗体で N24D-PHB1 蛋白質の検出を行った。加齢マウス肺では N24D-PHB1 の発現が増加し、細胞増殖の低下、脂肪滴の集積を伴う加齢現象の促進が慢性閉塞性肺疾患の進展と深く関連することが示唆された。

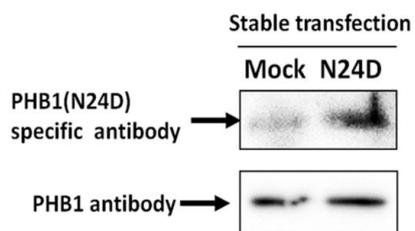
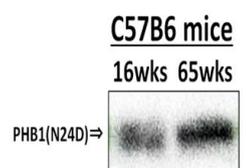


図7-1  
PHB1 (N24D)特異的モノクローナル抗体の特異性の検証



マウス肺組織におけるPHB1(N24D)の増加  
加齢(65週齢)マウスでは16週齢マウスに比べ  
PHB1 (N24D)の増加が認められた。

図7-2

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yamashita M, Ogasawara M, Kawasaki Y, Niisato M, saito H, Kasai S, Maesawa C, Maemondo M, Yamauchi K	4. 巻 17
2. 論文標題 Deficiency of protein -L-isoaspartate(D-aspartate) O-methyl-transferase expression under endoplasmic reticulum stress promotes epithelial mesenchymal transition in lung adenocarcinoma.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 13287-13300
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） :10.18632/oncotarget.24324.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Piao H, Choi YH, LiH, Wang C, Xian Z, Ogasawara M, Jiang J, Li L, Yamauchi K, Yan G	4. 巻 89(1)
2. 論文標題 Recombinant pyrin domain protein attenuates allergic inflammation by suppressing NF-κB pathway in asthma mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scand.J. Immunol.	6. 最初と最後の頁 e12720
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） :10.1111/sji.12720	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yamauchi K, Ogasawara M	4. 巻 20(7)
2. 論文標題 The role of histamine in the pathophysiology of Asthma and the Clinical Efficacy of Antihistamines in asthma therapy.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int. J. Mol. Sci.	6. 最初と最後の頁 1733
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） :10.3390/ijms20071733, int J Mol Sci.2019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kiyoi T, Lui S, Sahid MNA, Shudou M, Ogasawara M, Mogi M, Maeyama K.	4. 巻 69
2. 論文標題 Morphological and functional analysis of beige (Chediak-Higashi syndrome) mouse mast cells with giant granules.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int. Immunopharmacol.	6. 最初と最後の頁 202-212
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） :10.1016/j.intimp.2019.01.053.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takezaki A, Tsukumo S, Setoguchi Y, Ledford JG, Goto H, Hosomichi K, Uehara H, Nishioka Y, and Yasutomo K.	4. 巻 216(12)
2. 論文標題 A homozygous SFTPA1 mutation drives necroptosis of type II alveolar epithelial cells in patients with idiopathic pulmonary fibrosis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J. Exp. Med	6. 最初と最後の頁 2724-2735
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) :10.1084/jem.20182351	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Ogasawara M, Shudou M, Tamura H, Yamauchi K.
2. 発表標題 Deamidation of asparagine residues in Prohibitin1 is involved in lipid droplet formation and cell proliferation in alveolar epithelial cell line.
3. 学会等名 18th world congress of Basic and Clinical Pharmacology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yamauchi K, Ogasawara M.
2. 発表標題 A role of histamine in asthma pathogenesis and clinical efficacy of antihistamine for asthma therapy.
3. 学会等名 World Histamine Symposium 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小笠原正人、首藤政親、田中ゆき、亀田健治、入江太郎、山下雅大、田村晴希、山田ありさ
2. 発表標題 ミトコンドリア蛋白prohibitin1の翻訳後修飾による脂肪滴およびその関連蛋白の変化
3. 学会等名 第18回ミトコンドリア学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小笠原正人、薬師神芳洋、首藤政親、清井武志、下川哲哉、山下雅大、前門戸 任、山内広平、田村晴希、山田ありさ、前山一隆
2. 発表標題 ドキシルピシン誘発心毒性の有機カチオントランスポーターOCT3欠損またはL-ヒスチジン投与による抑制効果
3. 学会等名 第92回日本薬理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ogasawara M, Shudou M, Tanaka Y, Maeyama K, Yamauchi K,
2. 発表標題 Deamidation of asparagine residues in Prohibitin 1 is involved in lipid droplet formation in alveolar epithelial cell line.
3. 学会等名 The International Conference of D-Amino Acid Research, July 2017, Varese, Italy. (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山下雅大、斎藤平佐、小笠原正人、山内広平、前門戸任
2. 発表標題 小胞体ストレスに対するProtein-L-isoaspartate(D-aspartate)O-methyltransferase代償発現の不足は肺腺癌浸潤を促す .
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術大会 2017年9月 (横浜)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ogasawara M. Kon M, Ishikawa T, Ito T, Tamura H, Yamada A, Yamada H, Maemondo M.
2. 発表標題 Novel molecular targets of TAS2Rs on inhibitory expression of VEGF.
3. 学会等名 IADR/AADR/CADR general session & Exhibition (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小笠原正人
2. 発表標題 ヒスタミンの産生・吸収・代謝、そして受容体の新たな役割についての最近の進歩
3. 学会等名 第50回消化吸収学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小笠原正人
2. 発表標題 臨床から研究生活へーヒスタミン研究との関わり
3. 学会等名 岩手医科大学歯学会第87回例会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	瀬戸口 靖弘  (Setoguchi Yasuhiro)  (90206649)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・特任教授    (12602)	