

平成 21 年 6 月 16 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19790594

研究課題名 (和文) 慢性腎臓病における蛋白メチル化とその意義

研究課題名 (英文) Role of protein methylation in chronic kidney disease

研究代表者

立松 覚 (TATEMATSU SATORU)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：20317126

研究成果の概要：

生体でタンパク質のメチル化は重要な役割を果たしているが、慢性腎臓病 (CKD) での動態・意義は不明である。まず CKD における蛋白メチル化の亢進の有無を検討した。CKD モデルラットの腎組織でメチル化酵素 (PRMT1) 発現が亢進し、タンパク質中のメチルアルギニン発現も亢進していた。次に CKD モデルラットの腎組織を用い、アミノ酸につきメタボローム解析を行った。正常ラットと比較し、種々の物質において増減が認められた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,300,000	0	1,300,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,400,000	330,000	2,730,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：慢性腎臓病，蛋白メチル化，メタボローム

1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病において心血管合併症の発症頻度が高くなることが報告されている (N Engl J Med 351: 1296-1305, 2004)。その要因として高血圧、脂質代謝異常、インスリン抵抗性、血液凝固系異常などの古典的なリスクファクター以外にホモシステイン、酸化ストレス (Nephron 65: 401-409, 1993), asymmetric dimethylarginine (ADMA) (Kidney Int 41: S72-77, 1993, Lancet 339: 572-575, 1992) などが注目されている。これらの因子の中で私は内因性の NO 合成酵素阻害物質である ADMA に注目してこれまで研究を行ってきた。CCD カメラを用い、冠動脈を直視できるシステムを用い (図 1)、慢性腎臓病モデル犬における冠動脈の内皮障害を証明した (図 2)。

さらにその機序として ADMA 分解酵素である dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH) の冠動脈での発現低下が ADMA の上昇を引き起こし、NO 合成酵素の抑制に伴う NO 産生低下によって冠動脈内皮機能障害が生じる可能性を示した (J Am Soc Nephrol 18: 741-749, 2007)。慢性腎臓病モデル (5/6 腎摘犬, 5/6 腎摘ラット) における DDAH 発現の抑制は腎臓組織においても報告されている (Hypertens Res 28: 181-189, 2005, J Am Soc Nephrol 17: 2176-2183, 2006)。ADMA は蛋白中の L-arginine が S-adenosylmethionine をメチル基のドナーとして protein arginine methyltransferase (PRMT) によりメチル化され、hydrolysis を起こして生成される。現在までに慢性腎臓病において ADMA が上昇する

機序として分解系 (DDAH) の抑制に注目されていたが、合成系については報告が稀である。合成系について ADMA の上昇に關与すると想定される因子として PRMT 発現あるいは活性の上昇、メチル基ドナーの増加、hydrolysis の促進、が考えられる。

2. 研究の目的

上記背景を踏まえて、以下の点を研究目的とする。

(1) 慢性腎臓病における蛋白メチル化動態の解析

[In vivo] 慢性腎臓病モデルラットにおいて各臓器 (心臓, 腎臓, 肝臓, 血管) における蛋白中のメチル化の動態をメタボロームおよび生化学的手法で解明する。なおメタボローム解析は本塾医科学教室との共同実験で行いたいと考えている。そしてもしメチル化の亢進が認められれば、その鍵酵素である PRMT の発現がどのように制御されているかを検討する。慢性腎臓病下でタンパクメチル化の動態がどのようにになっているか、そしてそれが病的意義を有しているかは不明でありその最終産物の ADMA の機能より鑑みても興味深い。私のこれまでの研究から慢性腎臓病においてはメチル化 L-arginine, PRMT の発現が亢進していることが想定され、実際、予備実験において慢性腎臓病のモデルラットの腎臓においてメチルアルギニンのレベルの上昇が観察されている。アルギニンメチル化が亢進している場合、その阻害物質 (adenosine dialdehyde) を投与することにより、腎機能に何らかの影響をもたらせると思われる。まず、慢性腎臓病におけるタンパクメチル化の動態を明らかにし、次にその病的意義を阻害剤の投与実験を中心に解明することを目標にしたい。

(2) 蛋白メチル化の各種臓器機能への影響の解明

現在、ヒトにおいて PRMT の isoform は 1 から 9 まで報告されており、この中で ADMA の合成に関わるのは PRMT1, 2, 3, 4, 6, 8 であり、PRMT1 は哺乳類の細胞において他の isoform に比較し最も豊富に存在する (Pharmacol Ther 25, 2006)。この PRMT1 についてトランスジェニックマウス (TG) を作成し、その役割を検討する。TG の作成に当たっては、PRMT1 のクローニングを行い、その cDNA を CAG promoter を有する発現ベクターに組み込み、promoter を含んだ cDNA フラグメントをマウスの胚にインジェクトする。当研究室は現在 DDAH2 の TG の作成に成功しており、技術的に困難な点はない。そしてこの TG は全身の組織、細胞のタンパクのアルギニンメチル化が亢進しており、その機能解析はきわめて興味深い。

3. 研究の方法

(1) Spontaneously hypertensive rat (SHR) を用い、以下の 4 群に分けた。

1. SHR, sham-operation: C 群 (n=6)
2. SHR, 5/6 腎摘: Nx 群 (n=6)
3. SHR, sham-operation + adenosine dialdehyde: AD 群 (n=6)
4. SHR, 5/6 腎摘 + adenosine dialdehyde: Nx+AD 群 (n=5)

* adenosine dialdehyde (AD) は PRMT 阻害剤。

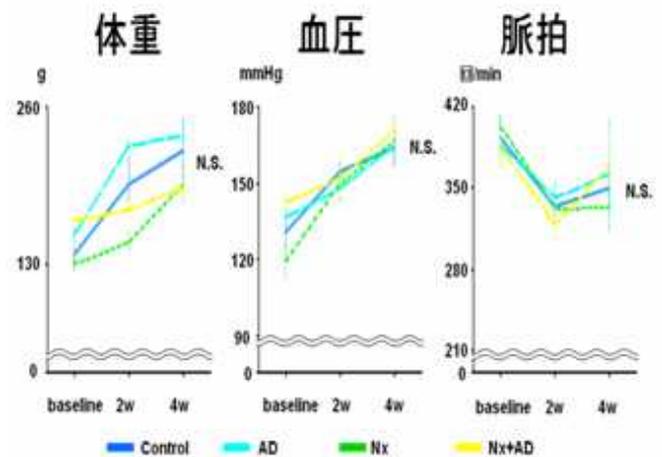
5/6 腎摘は 6 週齢で左腎を 2/3 切除し、7 週齢で右腎を摘出することによって行った。モデル作成手術 4 週間後 (11 週齢) に以下の項目について評価を行った。

- ・体重, 血圧, 脈拍
- ・血液検査: BUN, Cr, ADMA, L-arginine
- ・尿検査: 1 日尿蛋白排泄量, Cr
- ・腎組織 PRMT1 の immunoblotting による定量
- ・腎組織 methylarginine の immunoblotting による定量

(2) (1)における C 群, Nx 群の腎組織を用いて、メタボローム解析を施行。

4. 研究成果

(1) 体重, 血圧, 脈拍については 4 群間で差を認めなかった。5/6 腎摘により Cr, BUN, 尿蛋白量が増加し、クレアチンクリアランス (CCr) が低下したが、AD の投与はこれらのパラメーターに影響を及ぼさなかった。血中 L-arginine は 4 群間で差を認めなかったが、ADMA 値は 5/6 腎摘により上昇したが、AD 投与によっても変化しなかった (図 1)。



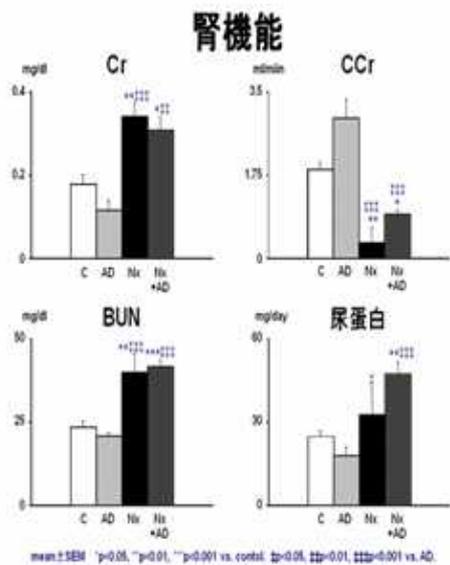
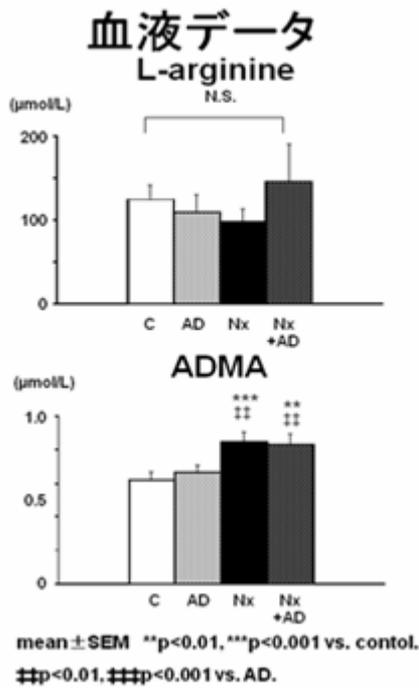


図1 . 体重・血圧・脈拍，腎機能，血液データ

腎組織における PRMT1 の蛋白発現は C 群と比較すると Nx 群で約 1.4 倍増加していた (p<0.05)(図 2).

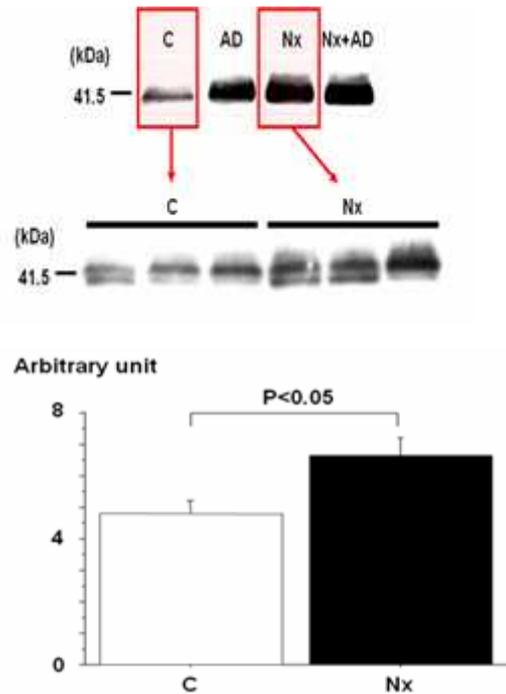
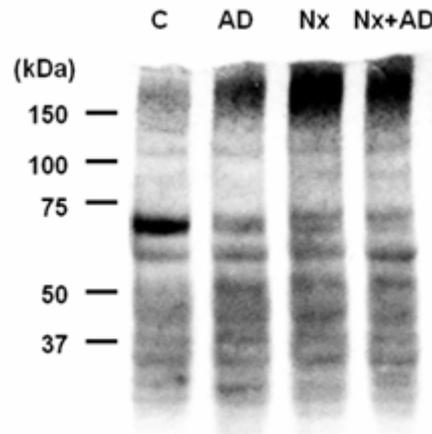


図2 . 腎組織における PRMT1 の発現

5/6 腎摘により腎組織において methylarginine の発現の亢進が一部認められた (図 3).



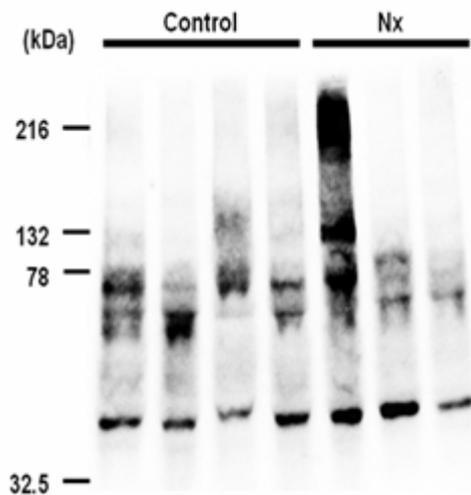


図3 . 腎組織における methylarginine の発現

(2) CKD モデルラットの腎組織を用い、アミノ酸につきメタボローム解析を行った結果、正常コントロールラットと比較し、3 Aminopyrrolidine ; Piperazine , Hexylamine , Creatinine , 1 Amino -1 -cyclopentanecarboxylate ; Pipecolate , Citrulline , などの物質が増加し、Pro , Guanidoacetate , Carnitine , Pyridoxal , Trp , 2' -Deoxycytidine , Anserine ; Homocarnosine , Thiamine などの物質が低下していることを見出した。

(3) 今後、(1)の CKD モデルラットで発現亢進したメチル化蛋白をプロテオーム解析により同定を行う。また(2)の CKD モデルラットで変化の認められた代謝物の病態における役割を検討していく。これらの解析によりCKD の進展抑制あるいはCKD に伴う心血管病の発症抑制に対する新たな治療戦略を確立する。

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 0件)

〔学会発表〕(計 1件)

Satoru Tatematsu. Effect of azelnidipine on the expression of PRMT1 in human coronary artery endothelial cells. International Society of Hypertension, 2008年6月16日, Berlin

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

6 . 研究組織

(1)研究代表者

立松 覚 (TATEMATSU SATORU)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：20317126

(2)研究分担者

(3)連携研究者