

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590057

研究課題名(和文) ユニークな組織発現・細胞内局在を持つ M1 アミノペプチダーゼの生理機能の解明

研究課題名(英文) Biological Function of the M1 Family of Human Aminopeptidases

研究代表者

服部 明 (HATTORI AKIRA)

京都大学・薬学研究科・准教授

研究者番号：50300893

研究成果の概要(和文)：M1 アミノペプチダーゼファミリーは様々な生理現象に関与する多機能は酵素群である。11 種類のヒト M1 酵素のうち、脂肪細胞由来ロイシンアミノペプチダーゼ、白血球由来アルギニンアミノペプチダーゼは小胞体局在型酵素であり、またリーベリンは胎盤特異的な発現を示すユニークな酵素である。本研究では、これら M1 酵素の機能発現メカニズムを解明するため、各酵素の基質特異性に関与するアミノ酸残基の同定や遺伝子発現あるいは細胞内局在性発揮の理解を目指した解析を行った。

研究成果の概要(英文)：Adipocyte-derived leucine aminopeptidase, leukocyte-derived arginine aminopeptidase and Laeverin are belonging to the M1 family of zinc-metallo aminopeptidases. In this study, biochemical and cell biological analyses were conducted to comprehend their catalytic mechanisms and characteristic subcellular localization/tissue distribution (endoplasmic reticulum retention or placenta specific expression). Several amino acid residues essential for catalysis were identified and genetic/cell biological tools (reporter plasmids and cell lines) were also established.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：アミノペプチダーゼ、M1 ファミリー、抗原提示、阻害剤、部位特異的変異導入法、基質特異性、小胞体アミノペプチダーゼ、Laeverin

1. 研究開始当初の背景

亜鉛アミノペプチダーゼファミリーである M1 アミノペプチダーゼファミリーはペプチドホルモン分解酵素としての役割のみならず、血管新生、免疫疾患、ガンをはじめ多くの生理現象に関与する多機能酵素群であることが近年明らかとなってきた。研究代表者・服部は、新規 M1 アミノペプチダーゼである脂肪細胞由来ロイシンアミノペプチダーゼ (A-LAP) および白血球由来アルギニン

アミノペプチダーゼ (L-RAP) を見出し、それが、従来プロテアーゼ活性がほとんどないと考えられていた小胞体内腔に存在する極めてユニークなプロテアーゼであること、MHC クラス I 提示抗原ペプチドの最終プロセシング酵素として機能することを明らかにしてきた。またリーベリン (Laeverin) は、母体と胎児の境界に位置する、胎盤の絨毛外栄養膜細胞の細胞表面抗原として同定された新規の M1 ファミリー分子であり、最近、

関節リウマチ発症との関連についても示唆されている新規タンパク質である。服部は **Laeverin** のリコンビナント酵素を作製し、本分子がアミノペプチダーゼ阻害剤である **bestatin** 高感受性のロイシンアミノペプチダーゼであることを最近明らかにしている。

2. 研究の目的

本研究では、小胞体アミノペプチダーゼおよび **Laeverin** の酵素触媒メカニズムの解明および機能制御法の開発に向けた小胞体アミノペプチダーゼの小胞体内貯留メカニズム解析や **Laeverin** の発現の意義や役割の解明を行う。本解析を通じて、小胞体アミノペプチダーゼおよび **Laeverin** の機能制御による免疫疾患やガンなどに対する新しい疾患治療法の確立に向けた分子基盤を構築することを目指す。

3. 研究の方法

各酵素に特異な酵素学的性状の発現メカニズムを明らかにするために、活性ポケットを構成するアミノ酸残基に点変異を導入した変異体酵素を用いた解析を行う。この際、ヒト M1 アミノペプチダーゼファミリー間の一次構造比較あるいは異なる種間での比較などの結果を基に点変異導入するアミノ酸残基を選択する。

Laeverin の発現調節機構については、ルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイを利用した解析を行う。また、小胞体アミノペプチダーゼの小胞体内腔貯留メカニズムについては、両小胞体アミノペプチダーゼ分子内には既知の小胞体貯留シグナルが見いだされないことから、本酵素群と相互作用するタンパク質を探索することで、その貯留メカニズムを解明する。

4. 研究成果

ヒト A-LAP の酵素活性発現、特に基質特異性に重要なアミノ酸残基の同定を行った。ヒト A-LAP の触媒ポケット内に存在する Gln-181 は、他の M1 ロイシンアミノペプチダーゼでは保存されているが、塩基性アミノ酸を良い基質とする L-RAP では Asp であることから、本残基に注目して解析を行った。Ala、Glu ならびに Asn 変異体ヒト A-LAP を作製し、その酵素活性を検討した結果、野生型酵素の持つ Leu ならびに Met 遊離活性のみならず、各変異体では検討したすべてのアミノ酸残基について遊離活性が認められなかった。一方、Asp 変異体ヒト A-LAP でも Leu、Met 遊離活性が消失していたものの L-RAP と同様の Arg、Lys 遊離活性が認められ、本変異体の基質特異性は L-RAP のそれと近いものであった。これらの結果から、ヒト A-LAP の基質特異性発現には Gln-181 が

重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

Laeverin はアミノペプチダーゼ阻害剤である **bestatin** 高感受性のロイシンアミノペプチダーゼであり、他の M1 アミノペプチダーゼとは異なる酵素学的性状を持つ。**Laeverin** の特異な酵素学的性状の発現機構を明らかにするため、生化学的な解析を行った。M1 アミノペプチダーゼファミリー各酵素の一次構造中には基質ペプチドの認識に重要であるエキソペプチダーゼモチーフ (GAMEN 配列) が存在する。ところがヒト **Laeverin** では本モチーフを構成する Gly が His へと分子進化の過程で置換されており、HAMEN 配列となっている。そこでヒト **Laeverin** の His-379 残基の酵素活性発現における役割を解析した。その結果、Phe 変異体ヒト **Laeverin** では、野生型酵素の酵素学的性状との差異は認められなかったが、Gly 変異体ヒト **Laeverin** では、酵素触媒数ならびに基質親和性の低下が認められ、その酵素活性が著しく低下していた。また、ヒト **Laeverin** の良い基質である **Endokinin C** の分解活性や **bestatin** の感受性においても Gly 変異体では著しい低下が認められた。これらの結果から、ヒト **Laeverin** の His-379 残基は本酵素の酵素学的性状の発現に極めて重要な役割を果たしていることが明らかとなった。さらに、コンピューターシミュレーションの結果、His-379 残基の Gly 残基へ置換は、ヒト **Laeverin** の触媒ポケットの構造変化を生じ、その結果として著しい酵素学的性状の変化を引き起こしている可能性が強く示唆された。また、前述のヒト A-LAP の Gln-181 残基に相当するヒト **Laeverin** の Gln-238 残基について、その基質特異性に関与しているかどうかを解析した。その結果、Gln-238 を Ala に置換した変異体ヒト **Laeverin** では、中性アミノ酸遊離活性の消失、塩基性アミノ酸遊離活性の増大が認められ、その基質特異性は野生型酵素と比較して大きく異なっていた。また、**bestatin** 感受性については Ala 変異体ヒト **Laeverin** では大きく低下していたことから、ヒト **Laeverin** の Gln-238 残基も本酵素の基質特異性に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

ヒト **Laeverin** の遺伝子発現調節機構を明らかにする目的でレポーター遺伝子アッセイ用プラスミドを構築した。HeLa 細胞より抽出したゲノム DNA を鋳型として、PCR 法によりヒト **Laeverin** 遺伝子のプロモーター領域 (約 2000 base) を増幅し、レポータープラスミド pGL3 basic に挿入した。その後、制限酵素処理によってプロモーター領域に欠損を加えた種々のレポータープラスミドも作製した。作製したレポータープラスミドを利用するに当たり、抗ヒト **Laeverin** 抗体

を用いて各種培養細胞における Laeverin の発現を検討したが、その発現は全く認められなかった。従って、今後はヒト絨毛外栄養膜細胞の初代培養細胞など Laeverin が確かに発現している細胞を利用して、レポーター遺伝子アッセイによる遺伝子発現調節機構の解析を行う予定である。さらに、Laeverin 発現細胞の検討過程でこれまでに作製したヒト Laeverin に対する特異抗体がネズミ Laeverin タンパク質には交叉しないことが明らかとなった。その原因として、ヒトとネズミ Laeverin 間の一次構造上の相同性の乏しさが考えられた。そこで、マウス胎盤より調製した mRNA から PCR 法を用いてマウス Laeverin cDNA を取得した。その後、マウス Laeverin cDNA をバキュロウイルス発現用ベクターに挿入した。今後、組換え型マウス Laeverin、次いで特異抗体の作製を行い、マウス胎盤組織を利用した Laeverin の発現解析などを行う。

A-LAP の小胞体内腔での貯留に重要な役割を果たすタンパク質分子（複合体）の存在が示唆されたことから、本分子の探索用細胞株の樹立を行った。A-LAP の C 末端に x3 FLAG タグを付加した A-LAP-FLAG 発現ベクターを構築し、これを HeLa S3 細胞に安定的に導入した。ベクターに挿入した薬剤選択マーカー-Blasticidin S 耐性を指標にコロニーを取得し、A-LAP-FLAG を構成的に発現する細胞株 A-LAP-FLAG/HeLa を得た。本細胞株を利用することによって、共免疫沈降法による複合体構成因子の同定が可能となった。

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 10 件)

- ① Waditee R, Shibato J, Rakwal R, Sirisattha S, Hattori A, Nakano T, Takabe T, & Tsujimoto M (2011) The arabidopsis aminopeptidase LAP2 regulates plant growth, leaf longevity and stress response. *New Phytologist* (査読有) in press
- ② Zervoudi E, Papakyriakou A, Georgiadou D, Evnouchidou I, Gajda A, Poreba M, Salvesen GS, Drag M, Hattori A, Swevers L, Vourloumis D, Stratikos E. (2011) Probing the S1 specificity pocket of the aminopeptidases that generate antigenic peptides. *Biochem J* (査読有) 435: 411-420
- ③ Goto Y, Yoshioka R, Arisaka N, Hattori A, & Tsujimoto M (2011) Involvement of glutamine-238 in the substrate specificity of human laeverin/aminopeptidase Q. *Biol Pharm Bull* (査読有) 34: 24-27
- ④ Maruyama M, Arisaka N, Goto Y, Ohsawa Y, Inoue H, Fujiwara H, Hattori A, & Tsujimoto M (2009) Histidine 379 of human laeverin/aminopeptidase Q, a nonconserved residue within the exopeptidase motif, defines its distinctive enzymatic properties. *J Biol Chem* (査読有) 284: 34692-34702
- ⑤ Ishii M, Hattori A, Numaguchi Y, Ma X, Nagasaka T, Tsujimoto M, Murohara T, Kobayashi H, & Mizutani S (2009) The effect of recombinant aminopeptidase A (APA) on hypertension in pregnant spontaneously hypertensive rats (SHRs). *Early Hum Dev* (査読有) 85: 589-594
- ⑥ Ishii M, Naruse K, Hattori A, Tsujimoto M, Ishiura S, Numaguchi Y, Murohara T, Kobayashi H, & Mizutani S (2009) Oxytocin hypersensitivity in pregnant P-LAP deficient mice. *Life Sci* (査読有) 84: 668-672
- ⑦ Goto Y, Tanji H, Hattori A, & Tsujimoto M (2008) Glutamine-181 is crucial in the enzymatic activity and substrate specificity of human endoplasmic-reticulum aminopeptidase-1. *Biochem J* (査読有) 416: 109-116
- ⑧ Ishii M, Hattori A, Numaguchi Y, Tsujimoto M, Ishiura S, Kobayashi H, Murohara T, Wright JW, & Mizutani S (2008) The effect of recombinant aminopeptidase a on hypertension in spontaneously hypertensive rats: its effect in comparison with candesartan. *Horm Metab Res* (査読有) 40: 887-891
- ⑨ Mizutani S, Ishii M, Hattori A, Nomura S, Numaguchi Y, Tsujimoto M, Kobayashi H, Murohara T, & Wright JW (2008) New insights into the importance of aminopeptidase A in hypertension. *Heart Fail Rev* (査読有)

有) 13: 273-284

- ⑩ Tsujimoto M, Goto Y, Maruyama M, & Hattori A (2008) Biochemical and enzymatic properties of the M1 family of aminopeptidases involved in the regulation of blood pressure. Heart Fail Rev (査読有) 13: 285-29

[学会発表] (計 9 件)

- ① Phagocytosis of macrophages is facilitated by secreted ER-aminopeptidase 1
後藤芳邦、小川健司、服部 明、辻本雅文
第 33 回日本分子生物学会・第 83 回日本生化学会合同年会 平成 22 年 12 月 10 日 兵庫・神戸
- ② Histidine-379 of human laeverin/aminopeptidase Q, a non-conserved residue within the exopeptidase motif, defines its distinctive enzymatic properties
Hattori A, Maruyama M, Arisaka Y, Goto Y, Ohsawa Y, Inoue H, Fujiwara H, & Tsujimoto M
6th General meeting of the International Proteolytic Society, Gold Coast, Australia, Oct 27th 2009
- ③ ERAP-1/A-LAP is secreted from macrophages treated with IFN- and LPS
Goto Y, Hattori A, & Tsujimoto M
6th General meeting of the International Proteolytic Society, Gold Coast, Australia, Oct 27th 2009
- ④ マクロファージにおけるカルシウムを介した小胞体アミノペプチダーゼ-1 の分泌
後藤芳邦、服部 明、辻本雅文
第 82 回日本生化学会 平成 21 年 10 月 23 日 兵庫・神戸
- ⑤ 小胞体アミノペプチダーゼの基質認識機構
後藤芳邦、服部 明、辻本雅文
第 129 回日本薬学会年会 平成 21 年 3 月 26 日 京都・京都
- ⑥ 点変異導入によるヒト Laeverin の His379 残基の機能解析
有坂尚美、丸山正人、服部 明、辻本雅文

第 31 回日本分子生物学会・第 82 回日本生化学会合同年会 平成 20 年 12 月 10 日 兵庫・神戸

- ⑦ ヒト脂肪細胞由来ロイシンアミノペプチダーゼの Gln-181 残基は基質特異性に重要である
後藤芳邦、丹治弘江、服部 明、辻本雅文
第 31 回日本分子生物学会・第 81 回日本生化学会合同年会 平成 20 年 12 月 10 日 兵庫・神戸
- ⑧ ヒト Laeverin の酵素学的性状の発現における His379 残基の役割
有坂尚美、丸山正人、服部 明、辻本雅文
第 13 回病態と治療におけるプロテアーゼとインヒビター学会 平成 20 年 8 月 22 日 大阪・千里
- ⑨ ヒト脂肪細胞由来ロイシンアミノペプチダーゼの Gln-181 残基は基質特異性に重要である
後藤芳邦、丹治弘江、服部 明、辻本雅文
第 13 回病態と治療におけるプロテアーゼとインヒビター学会 平成 20 年 8 月 22 日 大阪・千里

6. 研究組織

(1) 研究代表者

服部 明 (HATTORI AKIRA)
京都大学・薬学研究科・准教授
研究者番号：50300893