

機関番号：16301

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590925

研究課題名 (和文) 間質性肺炎発症におけるアミノ酸異性体化機構の役割

研究課題名 (英文) The role of amino acid isomerization and racemization in the pathogenesis of interstitial pneumonia

研究代表者

小笠原 正人 (OGASAWARA MASATO)

愛媛大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：00325367

研究成果の概要 (和文)：

特発性間質性肺炎ではストレスタンパク質誘導が起これ、その原因として蛋白質高次構造の異常が挙げられる。そこで蛋白質高次構造異常を引き起こす因子として蛋白質の異性体化に注目した。加齢や酸化ストレスに伴いタンパク質中のアスパラギン酸は異性体化され高次構造の変化をもたらすが、アスパラギン酸異性体化を修復する酵素 (PCMT1) も細胞は備えており、肺胞上皮由来細胞株の PCMT1 遺伝子発現をノックダウンすることで上皮様細胞は線維芽細胞に変化し、上皮-間葉移行 (EMT) を起こすことを見出した。小胞体ストレスマーカーである GRP78 の誘導が確認された。一方、同様の細胞を TGF β 1 で刺激したとき線維芽細胞への変化は認められたが、GRP78 の低下が認められた。アスパラギン酸の異性体化、ラセミ化による構造異常蛋白質の蓄積は上皮-間葉移行 (EMT) を起こし、線維化の新たなメカニズムを提示することが出来た。本研究によりこの分子機序は特発性間質性肺炎の病気発症の原因の一つと考えられた。

研究成果の概要 (英文)：

Heat shock proteins are involved in the pathogenesis of idiopathic interstitial pneumonia, when misfolded proteins as a consequence of genetic mutations are generated. Although genome wide investigations have been performed, genetic mutations have not been identified in idiopathic interstitial pneumonia. We focused on isomerization and racemization of aspartic acid in the proteins during aging and oxidative stress, which can change three dimensional structure and induce stress proteins productions. In the cells, protein isomerization and racemization repair enzyme (PCMT1) exists for recovery and recycle of the partially damaged proteins. An alveolar epithelial cell line, A549, was subjected to epithelial-to-mesenchymal transition that was caused by PCMT1 gene knock down transfected with shRNA vector. The endoplasmic reticulum stress marker protein, GRP78, was induced after transfection. On the other hand, TGF β 1, which is a potent inducer of fibrosis in the lung, could not induce GRP78, rather decreased expression. The expression of PCMT1 with TGF β 1 treatment was comparable with the value found by PCMT1-shRNA vector transfection. The current study indicated that the novel molecular mechanism by accumulation of isomerized and racemized misfolded proteins seems to be one of causes of idiopathic interstitial pneumonia.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
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：内科系臨床医学・呼吸器内科

キーワード：間質性肺炎、異性体化蛋白質、上皮間葉移行、小胞体ストレス

1. 研究開始当初の背景

(1) 間質性肺炎の原因としての遺伝学的背景

特発性間質性肺炎の原因は依然不明であるが、原因探求の手掛かりとして、家族性間質性肺炎を呈する原因遺伝子がいくつか同定された。その一つがサーファクタントプロテイン C の遺伝子変異である。これは常染色体優性遺伝形式を示し、変異を持つ個人は乳児期より発症する。またリン脂質のトランスポーターである ABCA3 遺伝子の変異も報告され、同様に乳児期より症状を呈する。しかしながら、特発性間質性肺炎の発症には加齢や環境要因が関係し、特定の遺伝子変異では説明つかない。

(2) 間質性肺炎におけるシャペロン活性の役割

特発性間質性肺炎の患者の正確な病理診断のための組織検査では EB ウイルス持続感染やストレスタンパク質の誘導が報告されている。ウイルス由来の蛋白質、あるいは内因性の蛋白質の正確な蛋白質折りたたみ反応が阻害されている可能性が考えられた。また、サーファクタントプロテイン C のカルボキシ末端側は Brichos domain と呼ばれその一部はタンパク質の正確な折りたたみに必要なシャペロン活性が確認されていた。シャペ

ロン蛋白質には ATP 依存性のものと非依存性のものが知られているが、この蛋白質のシャペロン活性は ATP 非依存性である。しかも家族性間質性肺炎で報告されている遺伝子変異の位置も多くはこの Brichos domain に集中しており、特発性間質性肺炎ではウイルスの持続感染あるいは何らかの環境要因がこのシャペロン活性阻害を受けている可能性が考えられた。

(3) 上皮間葉系移行 (EMT) の関わりについて

間質性肺炎、肺線維症の進行過程において II 型肺胞上皮の異常な細胞分化過程が深く関与していることが報告されている。II 型肺胞上皮は肺損傷時に幹細胞のような役割を果たし、I 型肺胞上皮の修復に関わるが、この過程が異常な方向に分化が進み再生過程で不適切は修復として II 型上皮から線維芽細胞へと分化し、異常な増殖とともに隣接部位の上皮再生が損なわれる。

(4) 蛋白質異性体化とそれに伴う小胞体ストレス反応と EMT 誘導

一般に代謝回転の遅い蛋白質は細胞内に長くとどまるためミトコンドリア由来の活性酸素などによる酸化ストレスなどの影響で蛋白質の修飾を受けやすい。その中には蛋白質の機能を大きく阻害するものも知られて

いる。その一つとしてアスパラギン酸の異性体化が知られている。アスパラギン酸が L-体から D-体へと変化すると蛋白質の高次構造に変化をきたし、本来の機能を果たせなくなる。異性体化した蛋白質は小胞体にとどまり再度折りたたみ反応を繰り返すがこのとき異性体化した蛋白質の集積は小胞体ストレス反応を誘導し、GRP78、GRP94 などのストレス応答蛋白質の誘導を起こす。またアスパラギン酸に関しては D-体化したタンパク質をL-体に修復する酵素 PCMT1 が知られている。小胞体ストレスは異性体化蛋白質の集積だけでなく、タンパク質折りたたみ構造異常を起こした場合にも観察され、家族性間質性肺炎でも小胞体ストレス誘導は確認されている。小胞体ストレスをツニカマイシンなどの薬物で誘導するとその程度や細胞の分裂能力によって、神経細胞のようにアポトーシスを起こす場合と、EMT という異常な分化を遂げる細胞の種類も知られている。

2. 研究の目的

(1) これらの背景を踏まえて、異性体化蛋白質の集積は小胞体ストレスを誘導するかどうか、そして上皮-間葉移行 (EMT) を誘導するかについて PCMT1 遺伝子をノックダウンさせて II 型肺胞上皮細胞由来細胞株を用いて検証する。

(2) このノックダウンさせた細胞を用いて細胞のマーカ-を検討する。さらに蛋白質中の D-体化したアスパラギン酸特異的エンドペプチダーゼ *paenidaseI* を用いて異性体化した蛋白質を網羅的に解析し、直接小胞体ストレスの原因となる蛋白質を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) PCMT1 遺伝子ノックダウンの方法
ヒト由来の PCMT1 遺伝子をノックダウンするために、shRNA を発現するベクターを作成した。ベクター作成には2種類のオリゴヌ

クレオチドを合成した。一方、コントロールの shRNA 作成にはヘアピンループシークエンスとしてポリメラーゼ III 終結シグナルである 5'-TTTTT-3'を用いた。これら2種類のベクターを A549 細胞 (II 型肺胞上皮由来細胞株) に遺伝子導入し、薬剤選択として *zeocin* を用い、安定発現細胞株を作成した。コントロールとしては2種類の細胞を、またノックダウン細胞株としては3種類を分離した。遺伝子のノックダウンは western blot 方にて確認した。

(2) 遺伝子導入後の細胞の形質マ-カ-の確認

PCMT1 遺伝子のノックダウン細胞株では細胞の形態に変化が認められ、紡錘状の形態をした繊維芽細胞に変化した。一方、コントロールの shRNA 導入細胞は A549 細胞と同様の上皮様の細胞接着を示す形態を示した。細胞の形質転換を確認するため上皮マ-カ-として *E-cadherin*, また間葉系のマ-カ-として *Vimentin* の発現を western blot 法、及び蛍光免疫染色法にて確認した。

(3) 肺における PCMT1 発現の確認

ラット肺を環流固定し、免疫染色にて PCMT1 発現細胞を同定した。細胞の同定のためのコントロールとして II 型肺胞上皮のマ-カ-である *surfactant protein C* を同時に染色した。

(4) A549 細胞における TGF β 1 処理による EMT と PCMT1 遺伝子ノックダウンによる EMT の違い

A549 細胞を TGF β 1 処理すると EMT が認められる。そこで PCMT1 遺伝子ノックダウンさせたときの EMT の細胞の表現系を解析し、比較した。小胞体ストレスマ-カ-である GRP78,GRP94 及び酸化ストレスマ-カ-である *superoxide dismutase-1(SOD-1)*、さらにストレス関連蛋白質として *HSC70*,ま

た EMT 関連蛋白として β -catenin を検討した。

(5) 二次元電気泳動と paenidase I を組み合わせた解析によるアスパラギン酸異性体化タンパク質の網羅的解析

Paenidase I は高橋砂織博士、葦澤悟博士により解析された原核生物由来の酵素で、蛋白質中の D 体のアスパラギン酸を特異的に認識し切断するものである。そこで A549 細胞から樹立した control-shRNA 導入細胞と PCMT1-shRNA 導入細胞の可溶性画分をそれぞれ paenidase I で処理し、未処理の細胞抽出液と処理後の抽出液を二次元電気泳動で比較分析した。蛋白質のスポットは画像解析ソフトで処理し、定量化した。

(6) 間質性肺炎と非間質性肺炎の肺における PCMT1, 小胞体ストレスマーカーの比較

岩手医科大学との共同研究で間質性肺炎および間質性肺炎以外の肺疾患の検体を western blot 解析した。比較したマーカーは PCMT1, 小胞体ストレスマーカーの GRP78, GRP94 である。

(7) 間質性肺炎患者血清を用いての PCMT1 発現に対する影響

国立病院機構高知病院の大串博士との共同研究で間質性肺炎血清中に PCMT1 発現を調節する因子が存在するか検討した。A549 細胞を培養し間質性肺炎由来の患者血清を 1% 培養液中に添加し 48 時間さらに培養を続け、GRP78, PCMT1, β actin を western blot 法で解析した。

4. 研究成果

PCMT1 遺伝子ノックダウンと TGF β 1 の A549 細胞への効果の比較

A549 細胞を TGF β 1 処理すると E-cadherin が低下し、Vimentin の上昇が認められる。形態学的には細胞の相互の接着性が低下し、

EMT が認められ、細胞の形態が変わる。このとき PCMT1 は低下する。また小胞体ストレスマーカーである GRP78, の低下が認められる。一方、PCMT1 遺伝子ノックダウンでは E-cadherin は低下し、Vimentin の発現増加が認められ、同様に EMT が確認された。このとき小胞体ストレスマーカーである GRP78 は有意に増加し、GRP94 は有意に低下した。さらに酸化ストレス調節系の SOD-1 の低下、また β catenin の発現も低下した。

(3) 肺における PCMT1 の発現

ラット 12~15 週齢を還流固定後、肺の 5 ミクロン切片を作成し、PCMT1 抗体及び Pro-SP-C 抗体 (II 型肺胞上皮細胞のマーカー) で免疫染色した。PCMT1 は II 型肺胞上皮細胞に強く反応したが、I 型肺胞上皮、肺胞マクロファージにも弱い反応を示した。肺においては存在する細胞に発現する可能性が考えられたが、とくに II 型肺胞上皮細胞に強い発現が確認できた。また肺由来の線維芽細胞である (HFL-1) を用い、ウエスタンブロット解析を行った。HFL-1 は II 型肺胞上皮細胞に比べ PCMT1 の発現は極めて弱いことが明らかとなった。

(4) 二次元電気泳動法と D-アスパラギン酸感受性エンドペプチダーゼによるアスパラギン酸異性体化蛋白質の解析

A549 細胞に対して PCMT1-shRNA を遺伝子導入した細胞株 (以下 PCMT1-shRNA 細胞) と control-shRNA を遺伝子導入した細胞株 (以下 Control-shRNA 細胞) の細胞抽出液を Paenidase I buffer で調整し、それぞれ 150 ug のタンパク質を Paenidase I で処理した。二次元電気泳動で展開し Paenidase I 処理前と処理後のスポットシグナルを比較検討した。異性体化された蛋白質はスポットシグナルが低下する。そこで相対比率として

Ratio = [PaenidaseI 処理前] / [PaenidaseI 処理後]とし、Ratio を 1.5 以上と 1.0~1.5 未満に分類しその割合を 2 種類の細胞で比較検討した。Control-shRNA 細胞では Ratio:1.0~1.5 未満は 77.2%であったのに対し PCMT1-shRNA 細胞では 71.8%であった。一方、Ratio:1.5 以上に関しては control-shRNA 細胞では 15.2%であったのに対し、PCMT1-shRNA 細胞では 23.5%であった。従って、およそ 8.3%の可溶性画分にあるタンパク質はアスパラギン酸の異性体化を比較的強く起こしている可能性が示唆された。これは検討した 257 スポットのうちおよそ 21 種類の蛋白質に相当する。これらの蛋白質が高次構造異常を起こし、小胞体ストレスを誘導した可能性が考えられる。もちろん可溶性画分のタンパク質しか解析していないので正確な割合は不明であるが、この解析結果よりは高い割合である可能性はある。ここで重要な点はアスパラギン酸が異性体化した蛋白質は通常、小胞体型のアイソフォームである PCMT1 にて修復されるが、ノックダウンした細胞では PCMT1 の発現がないため修復されず、高次構造異常を起こした細胞が集積し、小胞体ストレスを起こしたと考えられる。

(5) 間質性肺炎とその他の肺疾患の肺凍結標本の生化学的解析

間質性肺炎患者 5 名とその他の肺疾患患者 5 名の肺生検の凍結標本の PCMT1 発現、小胞体ストレスマーカー GRP78, GRP94 をウェスタンブロット法にて検討した。内部スタンダードとして β actin を用いた。間質性肺炎患者群では有意に PCMT1 発現が低下していた。また小胞体ストレスマーカーに関しては GRP94 の有意な増加を認めた。GRP78 に関しては増加傾向を認めたが有意差は確認できなかった。

(6) PCMT1 発現を低下に關与する間質性肺炎患者が持つ液性因子の解析

間質性肺炎患者 12 人とコントロール 5 人の血清を用い、A549 細胞で発現する PCMT1 および GRP78 の β actin に対する相対的比率を検討した。間質性肺炎患者を 1%加えると有意に PCMT1 および GRP78 に発現が低下した。これは患者血清中に PCMT1 を低下させる因子と同時に小胞体ストレス反応 GRP78 の反応を抑え込む因子が存在する可能性を示している。

(7) PCMT1 と特発性間質性肺炎との関係

特発性間質性肺炎では、ストレス蛋白質の誘導から、蛋白質の折りたたみ構造の異常が示唆されていたが、その原因は不明であった。PCMT1 は蛋白質中のアスパラギン酸異性体化、ラセミ化による蛋白質構造異常を修復する酵素で体内に広く分布している。この遺伝子のノックダウンは構造異常蛋白質の集積を引き起こす。これは D-体化したアスパラギン酸を特異的に切断する酵素 paenidase I 処理によって確認できた。そこで PCMT1 発現の低下メカニズムであるが、特発性間質性肺炎の誘因はさまざま指摘されている。その主なものはウイルスの持続感染、加齢、喫煙、液性因子を含む環境因子が指摘されているが、本研究では液性因子である TGF β 1 による PCMT1 発現の低下が確認できた。TGF β 1 非存在下でも、異性体化した構造異常タンパク質の集積により、液性因子を介さない線維化の機序を明らかにした。従って、II 型肺胞上皮細胞における PCMT1 遺伝子発現低下は異性体化した構造異常蛋白質を集積し、アポトーシスよりも EMT を誘導し、線維化を起こすことが考えられる。この機序では TGF β 1 などのサイトカインの誘導を起こさないので、特発性間質性肺炎のとくに UIP タ

イプの病理組織像を説明できる可能性がある。
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1件)

① Kohei Yamauchi, Toshiki Shikanai, Yutaka Nakamura, Hitoshi Kobayashi, Masahito Ogasawara, and Kazutaka Maeyama (計6名)

Roles of Histamine in the pathogenesis of Bronchial asthma and Reevaluation of the clinical Usefulness of Antihistamines

YAKUGAKU ZASSHI 131(2)

185-191(2011) (査読あり)

[学会発表] (計5件)

① Masahito Ogasawara¹, Toshifusa, Toda², Satoru Nirasawa³, Kazutaka Maeyama¹, Saori Takahashi⁴, Kohei Yamauchi⁵ 計6名

Protein isoaspartyl methyltransferase gene knock down induced human alveolar epithelial to mesenchymal cell transition through endoplasmic reticulum stress

日本分子生物学会 (2010. 12. 10) 神戸

② 秦龍二、小笠原正人、朱鵬翔、曹芳、山内広平、前山一隆、阪中雅広 計7名

Organic cation transporter(OCT)-3 による虚血脳保護作用

日本ヒスタミン学会 (2010. 10.25) 川崎

③ 小笠原正人、戸田年総、重本和宏、菺澤悟、高橋砂織、山内広平 計6名

肺胞上皮由来細胞における protein L-isoaspartyl/D-aspartyl methyltransferase 遺伝子ノックダウンは epithelial-to-mesenchymal transition(EMT)を誘導する

アミノ酸研究会 (2010.9.17) 富山

[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]

ホームページ等 : なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小笠原 正人 (OGASAWARA MASATO)

愛媛大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号 : 00325367

(2) 研究分担者

丸山砂穂 (MARUYAMA SAHO)

愛媛大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号 : 10301325

(3) 研究協力者

山内広平 (YAMAUCHI KOHEI)

岩手医科大学・医学部・教授

大串文隆 (OOGUSHI FUMITAKA)

国立病院機構・高知病院・院長

高橋砂織 (TAKAHASHI SAORI)

秋田県総合食品研究センター・食品加工

研究所 所長

菺澤悟 (NIRASAWA SATORU)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研

究所・食品バイオテクノロジー研究領域

酵素研究ユニット・主任研究員