

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 5 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22590842

研究課題名（和文） 慢性閉塞性肺疾患の成因に關与する異性化アスパラギン含有蛋白とその修復酵素の解析

研究課題名（英文） Involvement of asparatic acid isomerization in the pathogenesis of COPD

研究代表者

山内 広平（YAMAUCHI KOHEI）

岩手医科大学・医学部・教授

研究者番号：20200579

研究成果の概要（和文）：

COPDでは酸化ストレス関連遺伝子、小胞体ストレス関連遺伝子の変化が指摘され、さらにタンパク質の様々な翻訳後修飾も報告されている。我々はアスパラギン酸の異性体化に着目した。アスパラギン酸の異性体にはD-Asp, D-isoAsp, L-isoAspが存在する。同意のもとに採取した肺組織の抽出液を作成し、D-Asp特異的タンパク分解酵素とプロテオミクスを組み合わせ、D-体化したアスパラギン酸を含むタンパク質の網羅的解析を行った。感受性タンパク質ではGSTpi, Peroxiredoxin-II, Prohibitin, Serum amyloid p component, また非感受性タンパク質ではapolipoprotein AIを同定した。コントロール群（非COPD群）では感受性タンパクは7%程度であったが、COPD群では30～40%の異性体化を示した。PCMT1の肺組織での発現はコントロール群とCOPD群で有意差はなかった。酸化ストレスの誘引物質としてタバコの抽出液を用い、肺胞上皮由来細胞（A549）における、修復酵素PCMT1、小胞体ストレス（GRP78）、感受性タンパク質の発現およびD-アスパラギン酸への変化についても検討した。A549細胞にタバコ抽出液2%暴露でsuperoxide dismutase 1(SOD1), PCMT1、GRP78の時間依存的有意な増加を認めた。また、prohibitin, GSTpiにおいて時間依存性に有意なD-体化アスパラギン酸の増加を認め、抗酸化作用に關連する分子(GSTpi)およびミトコンドリア機能關連分子(prohibitin)の翻訳後修飾による機能障害が示唆された。ヒト肺組織ではPCMT1の発現の変化がないことから、D-Asp特異的タンパク分解酵素では検出できないPCMT1の基質とならないD-isoAspの増加が考えられた。

研究成果の概要（英文）：

The pathogenesis of COPD involves posttranslational modification, including amino acid racemization and isomerization and damage in the protein induced by oxidative stress through mainly cigarette smoking. The modified and damaged proteins are susceptible to cell damage such as apoptosis or ER stress. Notably, asparatic acid and asparagine are more sensitive amino acids to oxidative stress. In the COPD cases, we investigated signs of oxidative stress from the point of asparatic acid isomerization in the proteins. Methods:Lung specimens surgically isolated from COPD patients or other controls without COPD were utilized to detect D-asparatic acid. To investigate exhaustively D-asparatic acid isomerization in the protein, we employed a paenidase I, D-asparatic acid specific endopeptidase, in combination with comparative two dimensional electrophoresis analysis.

The endopeptidase sensitive proteins revealed decreased amounts of intensity in the proteins. The sensitive proteins were identified by mass spectrometry analysis. Furthermore, we studied the asparatic acid isomerization in vitro using cell culture system under cigarette smoke exposure. Results and discussion: In the proteins from COPD lung, 4 isomerized proteins, Prohibitin, Peroxiredoxin-2, Gkutathione S-transferase Pi, and serum amyloid p component, were detected significantly as evaluated by 30~40% compared to ~7% in control patients. Further, in vitro studies, cigarette smoke extracts induced ER stress marker and increased the ratio of the isomerized proteins. We conclude that protein isomerization process is involved in the pathogenesis of COPD.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2010年度 | 1,400,000 | 420,000 | 1,820,000 |
| 2011年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 2012年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,200,000 | 960,000 | 4,160,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：酸化ストレス、異性化アミノ酸

Prorein L-isoaspartyl (D-aspartyl) methyltransferas (PIMT)

1. 研究開始当初の背景

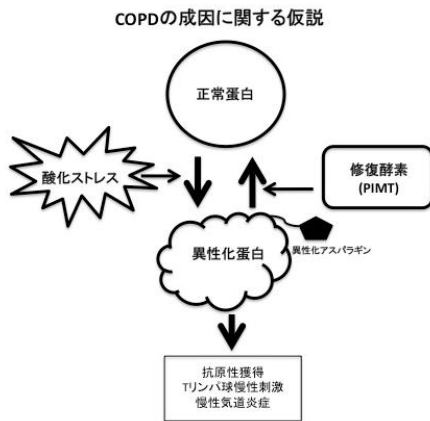
慢性閉塞性肺疾患 (COPD) は日本において潜在的に 500 万人を超える患者が存在すると考えられており、今後の患者数の増加が予想されている。しかしながら、COPD の成因は未だ明らかにはなっていない。外的原因としての長期間の喫煙暴露が COPD の誘因であるが、発症は喫煙者の 20% 程度であり、宿主側要因の重要性も示唆される。これまで COPD 患者の気道には CD8 リンパ球の集積やリンパ濾胞の存在より免疫学的機序の関与が考えられてきた。更に喫煙より生ずる活性酸素による気道組織中の変性蛋白が免疫学的抗原性を有し、COPD の気道に見られる免疫学的気道炎症が末梢気道壁肥厚を招来することが考えられる。しかしながら、従来の喫煙による“酸化ストレスによる蛋白変性”とは漠然とした理解であり、喫煙肺における明確な物質的証明は示されていない。

近年、蛋白の酸化ストレスによる傷害の分子機序が明らかになってきた。蛋白質のアスパラギン残基の異性化が最も起こり易い酸化ストレスによる修飾であり、生物系にはこのアスパラギン残基の異性化を

修復する酵素即ち、L-体イソアスパラギン及び D-体アスパラギンから、本来の L-体アスパラギンへの修復を触媒する酵素 Prorein L-isoaspartyl (D-aspartyl) methyltransferase (PIMT) が存在する。アスパラギン残基の異性化は蛋白質の立体構造変化を引き起こし、それぞれの蛋白の機能を変容・低下させ、かつ異質蛋白質として抗原性を惹起するようになる。すでに D 体アミノ酸を含む異常タンパク質は抗原性を獲得しやすく T リンパ球が活性化され、自己抗体の産生がより顕著に誘導されることが報告されている (HA Doyle, et al. J Immunol 2003)。したがって、活性酸素によりアスパラギン残基の異性化された傷害蛋白が抗原性を有し COPD の気道における免疫反応の原因となっていることが予測される。

また PIMT が生物系に存在するという事は進化の過程において、種々の酸化ストレスによる蛋白中のアスパラギン残基の異性化による傷害を受けてきた証拠であり、且つアスパラギン残基の異性化修復が生物にとって極めて重要であることを我々に教えてくれている。生物の老化と酸化ストレスによる蛋

白傷害は密接に関連しており、いわゆる“蛋白の老化”は分子学的には“蛋白のアスパラギン残基の異性化”とも理解される (Clarke S. Ageing Res Rev. 2003)。COPDは高齢者の疾患であり、老化と密接に関連している。したがって、PIMTの気道・肺組織中の活性は酸化ストレスによる蛋白傷害の修復酵素として極めて重要であり、PIMTの活性が喫煙による気道・肺組織傷害に強く影響することが考えられる。我々は喫煙がPIMT活性に与える影響を調べる目的で、たばこ抽出液を希釈濃度を変えて、肺胞上皮細胞株 A549 の培養上清に添加してPIMT活性を測定した。右図に示すようにたばこ抽出液はPIMTの活性を低下させることより、喫煙は蛋白のアスパラギン残基の異性化を起こし、更にその修復能を低下させることがわかる。



2. 研究の目的

慢性閉塞性肺疾患 (COPD) の成因は不明である。喫煙による気道及び肺胞組織中蛋白の酸化ストレスによる傷害と傷害蛋白に対する免疫学的反応が成因に関わっていることが考えられる。活性酸素による蛋白質中アスパラギン残基の異性化が最も起こりやすい傷害であり、異性化したアスパラギン残基を含む蛋白は立体構造が変化して異常蛋白として抗原性を惹起しやすい。我々は本研究において、1) COPD患者気道組織中の異性化されたアスパラギン残基を有する蛋白質を同定し、COPD患者末梢血リンパ球の活性化能を解析する。2) アスパラギン残基の異性化を修復する酵素 [Protein L-isoaspartyl (D-aspartyl) methyltransferase: PIMT] のCOPD患者気道組織中活性を測定し、気道および肺組織中の異性化されたアスパラギン残基を有する蛋白質量との関係やPIMTの遺伝子多型性を明らかにして、COPD発症におけるPIMTの関与を解析する。

3. 研究の方法

COPD患者気道肺組織より異性化アスパラギン残基を有する異性体蛋白質を検出・同定した。

COPD (25名)、喫煙健常者 (25名) 及び健常者 (25名) 気道肺組織は肺癌手術時の健常部分より採取する。組織をdetergentを含むリン酸バッファーでホモジェネートし、上清をD体アスパラギン酸エンドペプチダーゼ (Paenidase) で処理し、SDS-PAGEを行う。異性化アスパラギン残基を有する異性体蛋白質はPaenidaseの分解によりSDS-PAGE上新たなバンドとして検出される。バンドの一部を抽出して、一部のペプチドのアミノ酸配列を決定して蛋白を同定する。我々はこの方法にて喫煙負荷したマウス肺組織より6種類の蛋白質を検出しており、ヒト肺組織においても同方法で検出可能と考えている。ただ上記のホモジェネートではコラーゲンなどの細胞外基質蛋白は可溶化されにくい。したがって、ホモジェネートの遠心沈殿物をパパイニンなどの蛋白分解酵素で短時間処理 (限定分解) し、可溶化した上清を上記の方法と同様にPaenidaseで処理後SDS-PAGEで解析を行った。

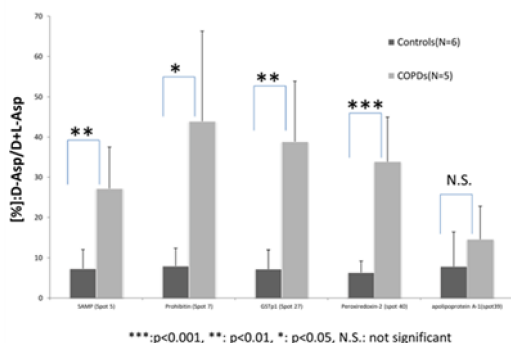
アミノ酸配列解析より異性体蛋白と推定された蛋白はそれらの抗体を用いて、ウェスタンブロットで確認した。

肺癌手術時のCOPD、喫煙健常者及び健常者気道肺組織の採取は岩手医科大学にて各々25名を目標に行う。本実験の施行に際しては、岩手医科大学及び愛媛大学にて倫理委員会の承認申請を行った。

4. 研究成果

COPDでは酸化ストレス関連遺伝子、小胞体ストレス関連遺伝子の変化が指摘され、さらにタンパク質の様々な翻訳後修飾も報告されている。我々はその中でもアスパラギン酸の異性体化に着目した。アスパラギン酸の異性体にはD-Asp, D-isoAsp, L-isoAspが存在する。同意のもとに採取した肺組織の抽出液を作成し、D-Asp特異的タンパク分解酵素とプロテオミクスを組み合わせ、D-体化したアスパラギン酸を含むタンパク質の網羅的解析を行った。タンパク分解酵素感受性タンパク質20個、非感受性タンパク質24個を採取し、感受性タンパク質ではGSTpi, Peroxiredoxin-II, Prohibitin, Serum amyloid p component, また非感受性タンパク

質では apolipoprotein AI を同定した。コントロール群（非 COPD 群）では感受性タンパクは 7%程度であったが、COPD 群では 30~40%の異性体化を示した。異性体化したアスパラギン酸の一部は修復酵素 PCMT1 で L-体アスパラギン酸に戻される。PCMT1 の肺組織での発現はコントロール群と COPD 群で有意差はなかった。



酸化ストレスの誘引物質としてタバコの抽出液を用い、肺胞上皮由来細胞 (A549) における、修復酵素 PCMT1、小胞体ストレス (GRP78)、感受性タンパク質の発現および D-アスパラギン酸への変化についても検討した。A549 細胞にタバコ抽出液 2% 暴露で superoxide dismutase 1 (SOD1), PCMT1, GRP78 の時間依存的有意な増加を認めた。また、prohibitin, GSTpi において時間依存性に有意な D-体化アスパラギン酸の増加を認め、酸化作用に関連する分子 (GSTpi) およびミトコンドリア機能関連分子 (prohibitin) の翻訳後修飾による機能障害が示唆された。ヒト肺組織では PCMT1 の発現の変化がないことから、D-Asp 特異的タンパク分解酵素では検出できない PCMT1 の基質とならない D-isoAsp の増加が考えられた。

5. 主な発表論文等 (研究代表者、研究分担者には下線)

[雑誌論文] (計 13 件)

- 1) Miyamoto T, Nagashima H, Kobayashi H, Sato A, Utsumi Y, Nakamura Y, Yamauchi K. A comparison of peripheral airway obstruction and airway hyperresponsiveness in the patients with early bronchial asthma and cough variant asthma. Jap J Clin Physiol 2013, in press. (査読有)
- 2) Yamashita M, Mouri T, Niisato M, Kowada K, Nitana H, Kobayashi H, Sugai T, Sawai T, Takahashi T, Yamauchi K. Heterogeneous characteristics of lymphatic microvasculatures associated

with pulmonary sarcoid granulomas. Annals of the American Thoracic Society 2013, in press. (査読有)

- 3) Suzuki N, Sasaki N, Niisato M, Utsumi Y, Nakajima Y, Yamashita M, Nakamura Y, Kobayashi H, Sawai T, Yamauchi K. Effects of imatinib mesylate on pulmonary allergic vasculitis in murine model. International Journal of Rheumatic Diseases, 2013, in press. (査読有)
- 4) Utsumi Y, Miyamoto T, Sekimura K, Sasaki N, Suzuki N, Nakamura Y, Kobayashi H, Yamauchi K. Association of IL-13 gene polymorphism with airway hyperresponsiveness in Japanese asthmatic population. Respiratory Investigation 2013 in press. (査読有)
- 5) Nakajima Y, Nakamura Y, Tomoyasu M, Deguchi H, Tanita T, Yamauchi K. The role of tumor necrosis factor- α and interferon- γ in regulating angiomin-like protein 1 expression in lung microvascular endothelial cells. Allergology Int., 2013 in press. (査読有)
- 6) Zhu P, Hata R, Ogasawara M, Cao F, Kameda K, Yamauchi K, Schinkel AH, Maeyama K, Sakanaka M. Targeted disruption of organic cation transporter 3 (Ocat3) ameliorates ischemic brain damage through modulating histamine and regulatory T cells. J Cereb Blood Flow Metab. 2012;32(10):1897-908. (査読有)
- 7) Nagashima H, Nakamura Y, Kanno H, Sawai T, Inoue H, Yamauchi K. Effect of genetic variation of IL-13 on airway remodeling in bronchial asthma. Allergol Int. 2011;60(3):291-8. (査読有)
- 8) Yamauchi K, Shikanai T, Nakamura Y, Kobayashi H, Ogasawara M, Maeyama K. Roles of histamine in the pathogenesis of bronchial asthma and reevaluation of the clinical usefulness of antihistamines. Yakugaku Zasshi. 2011;131(2):185-91. (査読有)
- 9) Nakamura Y, Nagashima H, Akiyama M, Sato A, Miyamoto T, Sasaki N, Nitana H, Kowada K, Nakadate T, Kobayashi H, Uesugi N, Sugai T, Kakiuchi T, Inoue H, Yamauchi K. Novel ribbon-type nuclear factor of activated T cells decoy oligodeoxynucleotides preclude airways hyperreactivity and Th2 cytokine expression in experimental asthma. Int Arch Allergy Immunol. 2011;155(2):129-40. (査読有)

- 10) Inoue H, Nakasato T, Yamauchi K, Nakamura Y, Oshida S, Ehara S. Risk factors concerning sternal bone marrow aspiration and patient safety in Japan. Intern Med. 2010;49(12):1089-95. (査読有)
- 11) Matsui M, Fujii S, Shiroya R, Amemura-Maekawa J, Chang B, Kura F, Yamauchi K. Isolation of Legionella rubrilucens from a pneumonia patient co-infected with Legionella pneumophila. J Med Microbiol. 2010;59(Pt 10):1242-6. (査読有)
- 12) Yamauchi K, Sasaki N, Niisato M, Kamataki A, Shikanai T, Nakamura Y, Kobayashi H, Suwabe A, Kanno H, Sawai T, Inoue H. Analysis of pulmonary allergic vasculitis with eosinophil infiltration in asthma model of mice. Exp Lung Res. 2010;36(4):227-36. (査読有)
- 13) Sekimura K, Ito H, Nakamura Y, Kobayashi H, Oikawa H, Ehara S, Yamauchi K. Analysis of small-sized airway wall thickness in smokers and patients with bronchial asthma by multislice helical CT. Jap J Clin Physiol 2010; 40 (6) : 243-249. (査読有)

[学会発表] (計 9 件)

- 1) A longitudinal characterization of lymphangiogenesis in bleomycin-induced pulmonary fibrosis mouse model. Yamashita M, Niisato M, Kobayashi H, Shibata Y, Sawai T, Yamauchi K. European Respiratory Society Annual Congress. (2012) Sep. 4, Vienna
- 2) The Effect of Single-Nucleotide Polymorphism in IL-13 on Airway Hyperresponsiveness in Asthmatics. Utsumi Y, Miyamoto T, Sekimura K, Sasaki N, Suzuki N, Nakamura Y, Kobayashi H, Yamauchi K. European Respiratory Society Annual Congress. (2012) Sep. 3 Vienna.
- 3) Roles of Periostin in Vascular Remodeling of Allergic Granulomatous Angiitis in Murine Model. Suzuki N, Sasaki N, Niisato M, Utsumi Y, Nakajima Y, Yamashita M, Nakamura Y, Kobayashi H, Sawai T, Yamauchi K. European Respiratory Society Annual Congress. (2012) Sep. 3 Vienna.

- 4) The role of tumor necrosis factor- α and interferon- γ in regulating angiotensin-like protein 1 expression in lung microvascular endothelial cells. Nakajima Y, Nakamura Y, Tomoyasu M, Deguchi H, Tanita T, Yamauchi K. European Respiratory Society Annual Congress. (2012) Sep. 2, Vienna
- 5) Characterization Of Lymphangiogenesis In Pulmonary Sarcoidosis. Yamashita M, Mouri T, Niisato M, Kowada K, Nitani H, Kobayashi H, Sugai T, Sawai T, Takahashi T, Yamauchi K. American Thoracic Society: International Conference; 2012, May 20; San Francisco, U. S. A.
- 6) Akiyama M, Nakamura Y, Yamauchi K, Uwano I, Matsumura Y, Sasaki M. Analysis of activation process of dyspnea sensation in CNS in patients with COPD measured by fMR. European Respiratory Society Annual Congress. (2011) Sep. 27, Amsterdam.
- 7) Miyamoto T, Kobayashi H, Sato A, Utsumi Y, Nakamura Y, Yamauchi K. Peripheral airway obstruction is a predictive sign of early asthma. European Respiratory Society Annual Congress. (2011) Sep. 25. Amsterdam.
- 8) Hiromi Nagashima, Nobuhito Sasaki, Kohei Yamauchi, Miyuki Niisato, Yu Utsumi, Naomi Suzuki, Masachika Akiyama, Yutaka Nakamura, Hitoshi Kobayashi, Hiroshi Inoue, Takashi Sawai. Imatinib Mesylate Inhibited Myofibroblasts Proliferation of Allergic Granulomatous Angiitis in Murine Model. ERS Annual Congress. (2010) Sep. 19. Valcelona.
- 9) Nobuhito Sasaki, Kohei Yamauchi, Miyuki Niisato, Hiromi Nagashima, Yu Utsumi, Naomi Suzuki, Yutaka Nakamura, Hitoshi Kobayashi, Takashi Sawai. " Effects of Imatinib Mesylate on Pulmonary Vascular Remodeling of Allergic Vasculitis in Murine Model." ATS International Conference. (2010) May. 18, New Orleans,

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山内 広平 (YAMAUCHI KOHEI)
岩手医科大学・医学部・教授
研究者番号：20200579

(2) 研究分担者

小笠原 正人 (OGASAWARA MASAHIRO)
愛媛大学・医学部・准教授
研究者番号：00325367