

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：26401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24700840

研究課題名(和文)加齢・生活習慣病のタンパク質アルギニンメチル化への影響とアルツハイマー病への役割

研究課題名(英文)Effect of aging and lifestyle disease on protein arginine methylation and Alzheimer's disease

研究代表者

鈴木 麻希子 (Suzuki, Makiko)

高知県立大学・その他部局等・准教授

研究者番号：60437001

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：マウスに5週齢から70週齢まで、高脂肪食を自由摂取させ、インスリン抵抗性を示すマウスを作製した。本モデルマウス的大脑皮質におけるたんぱく質アルギニンメチル基転移酵素の発現量を検討した結果、PRMT1の発現量は、加齢と高脂肪食の両因子によって減少すること、CARM1の発現量は、加齢によって増加することを示した。また、PRMT1の基質であり脳機能と関連するSam 68の発現量は、加齢や高脂肪食の影響を受けなかったが、Sam 68複合体の構成たんぱく質のアルギニンメチル化率が加齢と高脂肪食の両因子によって上昇することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：5 week-old mice were assigned to two groups fed with normal diet or high-fat diet for 65 weeks. High-fat diet group was induced insulin resistance. Expression of Protein arginine methyltransferase 1 (PRMT1) were decreased by both high-fat diet and aging. Expression of CARM1, an isoform of PRMTs was decreased by aging. Although expression of Sam 68 which is a substrate for PRMT1 was not affected by high-fat diet and aging, arginine methylation of component protein of Sam 68 complex was up-regulated by both high-fat diet and aging.

研究分野：分子病態栄養学

キーワード：アルギニンメチル化 PRMT マウス脳

1. 研究開始当初の背景

近年、増加の一途を辿るアルツハイマー病は新薬開発のため、数多くの研究がなされているが、未だ治療することのできない疾患であり、社会問題となっている。アルツハイマー病患者の血漿中では、内因性の NO synthase (NOS) 阻害剤であり冠動脈硬化性疾患のバイオマーカーである非対称性ジメチルアルギニン (ADMA) 濃度が増加していることが報告されている。また、糖尿病、高脂血症のような動脈硬化を引き起こす生活習慣病患者は、アルツハイマー病の罹患率が高いことが報告されている。しかしながら、これらの因果関係を明らかにする報告はまだない。ADMA は、アルギニンメチル化されたたんぱく質が分解され、代謝回転に伴って生成されることが知られているが、上記の患者で血漿中 ADMA 濃度が上昇する機序は不明である。我々は、先行研究において、海馬で成人期以降にアルギニンメチル化率が変化するタンパク質を見出し、プロテアソームを構成する proteasome subunit alpha type-2 (Psm2) と同定した。

2. 研究の目的

本研究は、成人期以降にアルギニンメチル化率が変化するタンパク質の意義解明およびアルツハイマー病と生活習慣病の両疾患で引き起こされる血漿中 ADMA の上昇の因果関係ならびに脳内 ADMA 代謝系との関連について明らかにすることを目的に行った。

3. 研究の方法

(1) 実験動物

C57BL/6J 雄マウスを 5 週齢時より、普通食群と高脂肪食群に分けて 70 週齢まで各飼料を自由摂取させた。5、42、70 週齢時に体重を測定し、解剖を行って、血液、大脳皮質および海馬を採取した。血液は血清を分離し、大脳皮質、海馬は液体窒素で凍結後、使用まで -80 °C で保存した。

(2) 血糖、インスリン濃度の測定

空腹時血糖は、18 時間絶食後にグルコースパイロットシステムを用いて測定した。空腹時の血清インスリン濃度は、Rat/Mouse Insulin ELISA kit のプロトコールに従って測定した。インスリン抵抗性指数 (HOMA-IR; Homeostasis model assessment-insulin resistance) は、空腹時インスリン値 ($\mu\text{U/ml}$) \times 空腹時血糖値 (mg/dl) / 405 により求めた。

(3) SDS-PAGE/イムノプロット解析

マウス大脳皮質よりタンパク質を抽出し、I 型のたんぱく質アルギニンメチル基転移酵素 PRMTs (PRMT1、CARM1) ならびに ADMA 分解酵素 DDAH1 および PRMT1 の基質である Sam 68 の発現量について SDS-PAGE/イムノプロット解析により検討した。また、アルギニンメチル化の検出には

ASYM24 抗体を用いた。

(4) DDAH 酵素活性測定

DDAH 酵素活性は基本的に ADMA を基質とした時の酵素反応生成物であるシトルリンを前報の方法を便宜的に用いて定量することにより測定した。

(5) 組み換え型たんぱく質発現系の構築

Psm2 の発現系を構築するため、マウス脳より RNA を抽出し、RT-PCR によって Psm2 を増幅させ、これを pGEX6P-1 に組み込み、大腸菌に形質転換した。クローニングした Psm2 の配列は Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer によって確認を行った。作製した Psm2/pGEX6P-1 ベクターを鋳型とし、Quick Change II mutagenesis kit を用いて変異体 R89K, R91K, R8991K を作製した。また、研究途中で cytochrome oxidase subunit II (COXII) がアルギニンメチル化を受けることが示唆されたため、同様に COXII/pGEX6P-1 発現ベクターも作製した。また、無細胞発現系を用いて、発現を行うため、COXII/pTD1 ベクターも作製した。

(6) 組み換え型たんぱく質の発現・精製

Psm2、Psm2 R89K, Psm2 R91K, Psm2 R8991K および既報の PRMT1, CARM1 は、GST 融合タンパク質として、発現させ、Glutathione Sepharose 4B を用いて精製し、PreScission protease によって GST を切断した。COXII はミトコンドリア DNA がコードするたんぱく質であり、普遍的な配列部分と異なる部分はすべて置換して、大腸菌および無細胞での発現誘導を試みたが、発現させることはできなかった。

(7) 免疫沈降

マウス大脳皮質タンパク質粗抽出液に抗 Sam68 抗体を用いて免疫沈降を行った。精製には、SureBeads ProteinG を用いた。

4. 研究成果

(1) 体重、空腹時血糖に及ぼす加齢と高脂肪食の影響

C57BL/6J マウス雄を 5 週齢より普通食群、高脂肪食群に分けて 70 週齢まで各飼料を自由摂取させた時の体重変化、および空腹時血糖値を Fig. 1 に示した。データには示していないが、摂食量は重量、エネルギー量ともに各群間で有意差は認められなかった。体重は普通食群、高脂肪食群ともに成長に伴って増加し、42 週齢においても 70 週齢においても普通食群に比べ高脂肪食群で有意に高かった (Fig. 1a)。また、空腹時血糖値も、42、70 週齢ともに普通食群に比べ高脂肪食群で有意に高値を示した (Fig. 1b)。

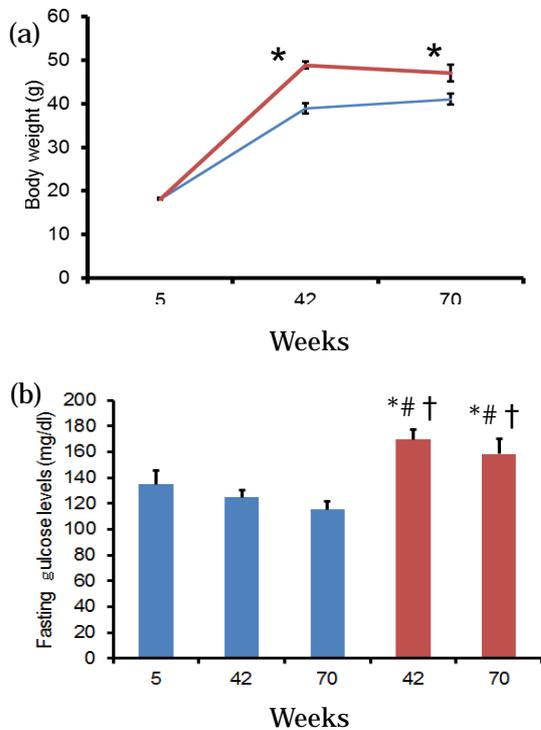


Fig. 1 加齢と高脂肪食による体重および血糖値の変化

* $p < 0.05$, significantly different from 42-week-old-mice fed normal diet. # $p < 0.05$, significantly different from 70-week-old-mice fed normal diet. † $p < 0.05$, significantly different from 5-week-old-mice fed normal diet. Red line or red bars: normal diet group, Blue line or blue bars: high-fat diet group.

(2) インスリン濃度および HOMA-IR に及ぼす加齢と高脂肪食の影響

空腹時のインスリン濃度および HOMA-IR は、普通食群では有意差はないものの週齢が高くなるにつれ、増加傾向を示し、高脂肪食によりその上昇が顕著となり、有意な上昇を示した (Fig. 2)。また、同週齢間の比較においても、普通食群に比べ高脂肪食群で有意な高値を示した。したがって、本研究で用いた Quick Fat を 5 週齢から摂取させた 42 週齢以降のマウスはインスリン抵抗性を示し、糖尿病を発症していることが示唆された。

(3) 大脳皮質における PRMT1 の発現量に及ぼす加齢と高脂肪食の影響

PRMT1 は PRMT_S 活性の 80% を占める酵素である。したがって、本酵素の発現量の減少は遊離型 ADMA の供給源となる ADMA を含むタンパク質の減少を引き起こす可能性が高いと言える。そこで、アルツハイマー病などの神経変性疾患で病変が顕著な大脳皮質における PRMT1 の発現量に加齢と高脂肪食が及ぼす影響を検討した。PRMT1 の発現量は加齢に伴って減少傾向を示し、5 週齢に比

べ 70 週齢の高脂肪食群では有意に低かった (Fig. 3)。このことから、加齢と高脂肪食という両因子が重なったときに PRMT1 の発現が低くなることが示唆された。

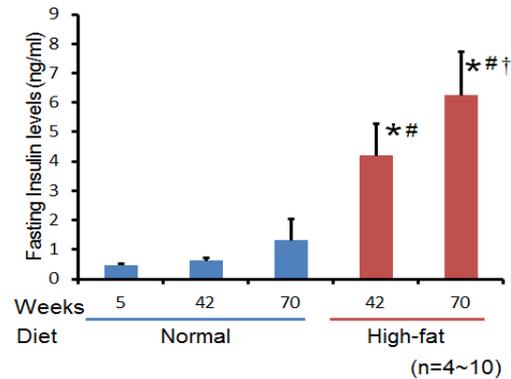


Fig. 2 血清インスリン濃度に加齢と高脂肪食の影響 (n=4~10)

* $p < 0.005$, significantly different from 5-week-old-mice fed normal diet. # $p < 0.005$, significantly different from 42-week-old-mice fed normal diet. † $p < 0.005$, significantly different from 70-week-old-mice fed normal diet.

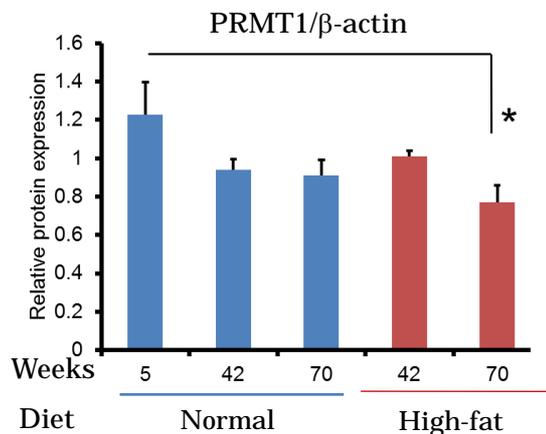


Fig. 3 マウス大脳皮質の PRMT1 発現量に加齢と高脂肪食の影響

* $p < 0.005$, significantly different from 5-week-old-mice fed normal diet.

(4) 大脳皮質における CARM1 の発現量に及ぼす加齢と高脂肪食の影響

CARM1 は核と細胞質に発現しており、ヒストンをメチル化することが広く知られているが、脳内の発現分布について詳細に解析したものはなく、海馬においてその発現が報告されているのみである。今回、大脳皮質においても CARM1 が発現していることが明らかとなった。CARM1 の発現量は加齢に伴い増加し、いずれの群においても 5 週齢と比べて有意に高かった。その一方で、高脂肪食による発現量の変化は認められなかった (Fig. 4)。

(5) 大脳皮質における DDAH1 の発現量に及ぼす加齢と高脂肪食の影響

遊離型 ADMA の分解酵素である DDAH の発現量に加齢と高脂肪食が及ぼす影響を大脳皮質において検討した。DDAH には 2 つのアイソフォーム (DDAH1, DDAH2) が存在するが、大脳皮質における DDAH2 の発現量は極めて低いことが先行研究により明らかになっていることから、本実験では DDAH1 の発現量を測定した。DDAH1 の発現量は、加齢に伴って有意に増加したのに対し、同週齢の普通食群と高脂肪食群の間では有意差が認められなかった (Fig. 5)。このことから、DDAH の発現は加齢によって高くなり、高脂肪食によってはその発現が左右されないことが示唆された。

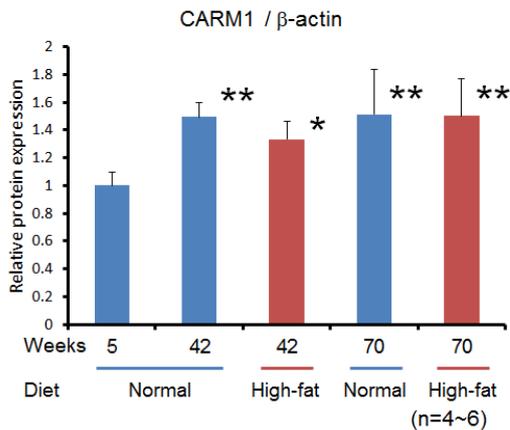


Fig.4 マウス大脳皮質の CARM1 発現量に及ぼす加齢と高脂肪食の影響

* $p < 0.05$, significantly different from 5-week-old-mice fed normal diet. ** $p < 0.05$, significantly different from 5-week-old-mice fed normal diet.

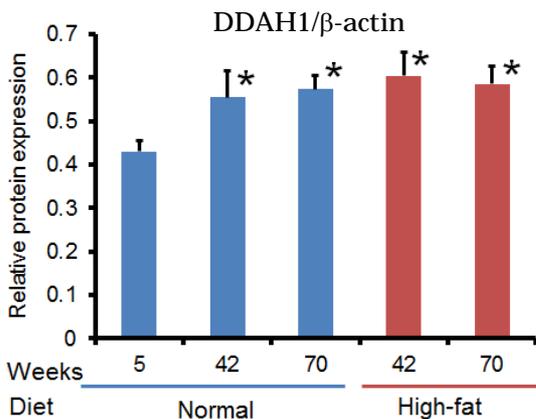


Fig. 5 マウス大脳皮質における DDAH1 発現量に及ぼす加齢と高脂肪食の影響

* $p < 0.05$, significantly different from 5-week-old-mice fed normal diet.

(6) マウス大脳皮質における DDAH 活性に及ぼす影響

DDAH の活性に加齢と高脂肪食が及ぼす影響を大脳皮質において検討した。本活性に

は DDAH1 と DDAH2 両方の活性が含まれる。が、DDAH2 の発現は極めて低く、活性もないことから、活性の由来はほとんど DDAH1 と考えられる。大脳皮質における DDAH 活性は、DDAH1 のタンパク質レベルで見られたような加齢による変化は認められず、また、高脂肪食による変化も見られなかった。Fig. 5 より 5 週齢においては DDAH1 の発現が低かったことから、5 週齢マウスの DDAH1 比活性は 42 週齢以降のマウスに比べ高いことが考えられる。

(7) Psma2 のメチル化

Psma2, Psma2 R89K, Psma2 R91K, Psma2 R8991K を方法に示したように大腸菌で発現、精製し、SDS-PAGE 後、CBB 染色を行って、精製度を確認した (Fig. 6)。

CARM1, PRMT1、無細胞で発現させた PRMT1 を用いて、メチル化反応を ^3H ラベルした S-adenosyl methionine を用いて行ったが、Psma2 のメチル化を確認することはできなかった。

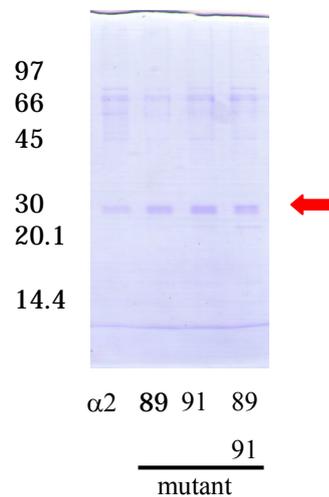


Fig. 6 Psma2 の発現、精製

(8) 大脳皮質における Sam68 の発現量および Sam68 複合体に及ぼす加齢と高脂肪食の影響

PRMT1 は多くのタンパク質を基質とすることが知られているが、本研究においては、その基質として広く知られ、脳機能と関連する Sam68 に注目し、その発現量に及ぼす加

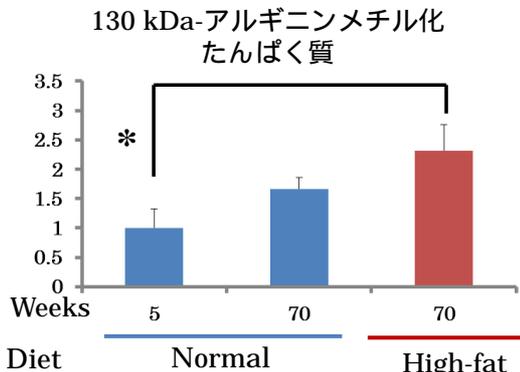


Fig. 7 130-kDa アルギニンメチル化たんぱく質に及ぼす加齢と高脂肪食の影響

* $p < 0.05$

齡と高脂肪食の影響を検討した。Sam68 は、脳機能と関連する RNA 結合タンパク質である。Sam68 の発現量は、5 週齡、70 週齡の普通食群、70 週齡の高脂肪食群の、いずれの群においても有意差は無く、加齡や高脂肪食による影響は見られなかった。しかしながら、抗 Sam68 抗体を用いて、免疫沈降を行い、免疫複合体の解析を行ったところ、Sam68 の発現量で補正した 130-kDa アルギニンメチル化たんぱく質の発現量は、5 週齡の普通食群と比べ、70 週齡の高脂肪食群で有意に高値を示した (Fig. 7)。このことから、Sam68 のタンパク質複合体は加齡と高脂肪食の両因子によって変化することが示唆された。

現在、Sam 68 と複合体を形成する 130-kDa アルギニンメチル化たんぱく質の同定を行っており、今後、本たんぱく質のアルギニンメチル化の意義を解明し、複合体のコンフォメーションおよび機能への影響を明らかにする予定である。

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)

[学会発表](計 3 件)

鈴木麻希子、守谷智恵、他、マウス海馬におけるタンパク質のアルギニンメチル化に及ぼす加齡と高脂肪食の影響、第86回日本生化学大会、2013. 9. 11、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

鈴木麻希子、守谷智恵、他、マウス海馬におけるタンパク質の非対称性アルギニンメチル化に及ぼす加齡と高脂肪食の影響、第67回日本栄養・食糧学会総会、2013. 5. 26、名古屋大学 東山キャンパス (愛知県名古屋市)

鈴木麻希子、横路三有紀、他、海馬における proteasome subunit alpha type-2 の ADMA 化に及ぼす加齡の影響、第66回日本・栄養食糧学会総会、2012. 5. 19、東北大学 川内北キャンパス (宮城県仙台市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 麻希子 (MAKIKO SUZUKI)
高知県立大学・健康栄養学部・准教授
研究者番号：60437001