

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 22 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461194

研究課題名(和文)酸化ストレスによる蛋白傷害に対する異性体アミノ酸修復酵素の防御的役割の解析

研究課題名(英文) Analysis of the defensive roles of isoform amino acid repair enzyme on protein damage by oxidative stress

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：慢性閉塞性肺疾患(COPD)の発症過程において酸化ストレス障害の1つとしてアスパラギン(Asn)及びアスパラギン酸(Asp)残基の異性体化が起こり、D-体Asp残基やD-isoAsp残基は蛋白の機能障害を起こすと考えられる。この過程は部分的に修復酵素PCMT1で異性体化は緩和されるが、我々はCOPD患者の肺組織におけるPCMT1の蛋白質発現を検討し、有意な低下を見出した。活性酸素産生、酸化ストレスに強い因果関係を示すミトコンドリア蛋白であるProhibitin1(PHB1)においてPCMT1低下の際に、有意にPHB1蛋白におけるD-Asp残基の増加を示し、加齢変化に関連することを見出した。

研究成果の概要(英文)：The isomerization of aspartic acid and asparagine residues among several post-translational protein modifications is one of the damages by oxidative stress which occurs in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). Its D-isoaspartyl (D-isoAsp) and D-aspartic acid (D-Asp) cause the protein structure alteration and functional impairment. This process is partially reversed by the protein carboxyl-isoaspartyl methyltransferase 1 (PCMT1) repair enzyme. We investigated PCMT1 expression in the pulmonary tissue from COPD patients and evaluated its significant reduction. The mitochondrial protein, Prohibitin1 (PHB1) is deeply associated with production of active oxygen species and oxidative stress. Under low PCMT1 condition, D-Asp content in PHB1 increased significantly. In this regard, deamidation of Asp residues in the mitochondrial protein, PHB1 is associated with aging via changes of cellular organelles.

研究分野：呼吸器病学

キーワード：異性体アミノ酸 PCMT1 COPD 酸化ストレス Prohibitin 1 ミトコンドリア オートファジー

1. 研究開始当初の背景

地球上の生物が有するアミノ酸は全て L 体であり、L 体で構成される蛋白が機能上必要なコンフォーメーションを有し、生命活動に重要な役割を果たしている。生物は古来、宇宙線や活性酸素の傷害により、蛋白の酸化修飾を受けて来た。アミノ酸が受ける酸化ストレスとしてチオール基の修飾と並んで、L 体アミノ酸の D 体化(異性化)があり、特にアスパラギン及びアスパラギン酸残基で起こりやすく、この変化は非酵素的で半永久的な高度の蛋白傷害と考えられる。酸化ストレスに対しては一連の防御システムがあり、PCMT もその一群の中の酵素である。PCMT1 は異性体化アスパラギン酸残基を L 体アミノ酸へ修復する酵素であり、蛋白機能の回復と異常蛋白による小胞体ストレスを軽減し、傷害を受けた細胞のアポトーシスを回避する役割を有する。

COPD の成因は未だ十分に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が示唆される。COPD の病態においては、活性酸素による蛋白変性が肺組織傷害を引き起こすと考えられる。しかし従来の喫煙に由来する“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。

我々は酸化ストレスによる非可逆的蛋白傷害として、蛋白質のアミノ酸中でも特にアスパラギン及びアスパラギン酸残基の L 体から D 体への構造異性化に注目し、これまでの先行研究より、4 つの蛋白 (serum amyloid P component protein: SAMP, prohibitin, glutathione S-transferase p1: GSTp1, peroxyredoxin-2) において、健康人に比べ COPD 患者で有意に D 体のアスパラギン残基が増加していることを確認した (European Respiratory Society Annual Congress. 2013 にて報告)。

上記の結果は COPD 患者肺では D 体アスパラギン残基、即ち異性体アミノ酸を含む異常蛋白が増加していることが示されている。特に prohibitin、glutathione S-transferase、peroxyredoxin-2 等の蛋白は酸化ストレスに防御的に働く蛋白であり、それらの異性体アミノ酸含有率が高いことは正常の蛋白機能を有する蛋白の減少を意味する。このことは原因か結果かはともかく、COPD 肺は酸化ストレスに傷害を受けやすい状態になっていると考えられる。また別の見方をすれば、異性体化アスパラギン酸の修復酵素である PCMT が十分に機能しなかったことが推測される。

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酸

残基の異性化”とも理解される (Clarke S. Aging Res Rev. 2003)。COPD は高齢者の疾患であり、細胞の老化と密接に関連している。

異性化アスパラギン酸残基の修復酵素 PCMT が生物系に存在するという事は、生物の歴史の中で種々の酸化ストレスによる蛋白中のアスパラギン酸残基の異性化を代表とする L-アミノ酸の D 体化という傷害を受けてきた証拠であり、且つアミノ酸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示唆している。したがって PCMT 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重要であり、PCMT1 の活性が喫煙による肺組織傷害の修復に強く影響することが考えられる。

2. 研究の目的

我々は培養細胞を用いて、siRNA による PCMT のノックダウンにより、ミトコンドリア蛋白の異性体アミノ酸含量を測定し PCMT 活性がどのような影響を与えるかを検証したい。

以上、我々は本研究により異性化アミノ酸残基を有する異常蛋白の修復に主要な役割を担う PCMT1 が COPD 肺組織傷害の修復に防御な役割を果たしていることを証明したい。

3. 研究の方法

1) COPD 患者の肺組織中の PCMT1 活性を測定して、肺機能正常の喫煙健康成人及び非喫煙健康成人の肺組織中 PCMT 活性の比較を行なう。

2) 培養細胞を用いて、タバコ抽出液 (CSE) がどのように PCMT の遺伝子発現及び活性誘導を起こすかを解析する。

3) 安定的に PCMT1 遺伝子をノックアウトした細胞株を用いて、CSE 刺激下に COPD 患者肺で異性体化アスパラギン酸残基比率が有意に高かった SAMP, prohibitin, GSTp1, peroxyredoxin-2 の 4 つの蛋白の D 体アスパラギン酸残基比率を解析し、対照と比較する。

4. 研究成果

慢性閉塞性肺疾患 (COPD) の発症過程において酸化ストレス障害の 1 つとしてアスパラギン (Asn) 及びアスパラギン酸 (Asp) 残基の異性体化という翻訳後修飾が起こり、この過程は部分的に修復酵素 PCMT1 で異性体化は緩和されるが、D-体 Asp 残基や D-isoAsp 残基は蛋白質の構造変化として残り、機能障害を起こすと考えられる。我々は COPD 患者の肺組織における PCMT1 の蛋白質発現を検討し、有意な低下を見出した。この結果を基に PCMT1 を標的とした shRNA を用いて A549 細胞での PCMT1 を低下させた安定細胞株を作成した。この細胞株を用い D-Asp 特異的エンドペプチダーゼ (Paenidase I) で D-Asp 残基を有する蛋白質をスクリーニングし 4 種類の蛋白質を見出した。その中で活性酸素産生、酸化ストレスに強い因果関係を示すミ

トコンドリア蛋白である Prohibitin1(PHB1)に注目した。この蛋白質は PCMT1 低下、または煙草抽出液を用いた時有意に D-Asp 残基の増加を示した。PCMT1 低下細胞株ではミトコンドリアクリステの破壊、オートファージの亢進が認められた。PCMT1 には細胞質型と小胞体型のアイソフォームが存在し、細胞質型の遺伝子発現を回復させるとミトコンドリア形態も回復した。PHB1 には7か所のアスパラギン残基を有し、Asn(N)残基を Asp(D)残基へ変化させた蛋白質を発現させた A549 細胞を樹立した。この中で N24D と N226D はカルボキシ端がグリシンまたはセリン残基でアスパラギン残基脱アミド化が特に起こりやすく、この2種類の細胞の細胞内脂肪滴の大きさ、個数について検討した。脂肪滴はミトコンドリアと接触する形で相互作用し、加齢現象と関連することが報告されている。この2種類の細胞を解析すると、N24D, N226D ともに脂肪滴の大きさが拡大し、細胞あたりの脂肪滴の数が減少し脂肪滴の癒合促進が示唆された。電子顕微鏡レベルで検討すると、脂肪滴の大きさが増大してもミトコンドリアと接触した形で存在した。したがってミトコンドリア蛋白質 PHB1 のアスパラギン残基脱アミド化の過程が脂肪滴の形成に関係し、細胞内小器官の変化を通じての加齢変化に関連することを見出した。

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 12 件)

1. Nakamura Y, Suzuki R, Mizuno T, Abe K, Chiba S, Horii Y, Tsuboi J, Ito S, Obara W, Tanita T, Kanno H, Yamauchi K. Therapeutic implication of genetic variants of IL13 and STAT4 in airway remodelling with bronchial asthma. Clin Exp Allergy. 2016; 46(9): 1152-61.
2. Ogasawara M, Nakamura Y, Morikawa N, Nitana H, Moriguchi S, Chiba R, Saito H, Ohta M, Tanita T, Sugai T, Maeyama K, Yamauchi K, Takaoka Y. Analysis of a single-codon E746 deletion in exon 19 of the epidermal growth factor receptor. Cancer Chemother Pharmacol. 2016 77(5):1019-29.
3. Ogasawara M, Otani M, Takano M, Shudou M, Inaba Y, Nirasawa S, Takahashi S, Kiyoi T, Tanaka Y, Kameda K, Kunugita N, Maeyama K, Sano K, Yamashita M, Yamauchi K. The protective role of protein L-isoaspartyl (D-aspartate) O-methyltransferase for maintenance of mitochondrial morphology in A549 cell. Exp Lung Res. 2016;42:245-62. doi: 10.1080/01902148.2016.1197984.
4. Saito H, Yamashita M, Ogasawara M, Yamada N, Niisato M, Tomoyasu M, Deguchi H, Tanita T, Ishida K, Sugai T, Yamauchi K. Chaperone protein l-isoaspartate (d-aspartyl) O-methyltransferase as a novel predictor of poor prognosis in lung adenocarcinoma. Hum Pathol. 2016 ;50:1-10.
5. Oikawa Y, Sasaki N, Niisato M, Nakamura Y, Yamauchi K. A phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor strongly suppressed pulmonary vascular remodeling of allergic vasculitis in a murine model. Exp Lung Res. 2016,42:111-20.
6. Suzuki R, Nakamura Y, Chiba S, Mizuno T, Abe K, Horii Y, Nagashima H, Tanita T, Yamauchi K. Mitigation of tight junction protein dysfunction in lung microvascular endothelial cells with pitavastatin. Pulm Pharmacol Ther. 2016 ;38:27-35.
7. Yamashita M, Niisato M, Hanasaka T, Iwama N, Takahashi T, Sugai T, Ono M, Yamauchi K. Development of Lymphatic Capillary Network Along the Alveolar Walls of Autopsied Human Lungs with Pneumonia. Lymphat Res Biol. 2016;14(4):210-219..
8. Murata O, Sasaki N, Sasaki M, Kowada K, Ninomiya Y, Oikawa Y, Kobayashi H, Nakamura Y, Yamauchi K. Detection of cerebral microvascular lesions using 7 T MRI in patients with neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. Neuroreport. 2015;26(1):27-32.
9. Nakamura Y, Nagashima H, Ohta S, Ono J, Yamauchi K, Izuhara K. Periostin in the bronchial lavage fluid of asthma patients. Allergol Int. 2015 ;64:209-10.
10. Yamashita M, Mouri T, Niisato M, Nitana H, Kobayashi H, Ogasawara M, Endo R, Konishi K, Sugai T, Sawai T, Yamauchi K. Lymphangiogenic factors are associated with the severity of hypersensitivity pneumonitis. BMJ Open Respir Res. 2015, 29;2:e000085.
11. Koizumi R, Sasaki N, Nakamura Y, Suzuki N, Sawai T, Yamauchi K. Rapamycin attenuates pulmonary allergic vasculitis in murine model by reducing TGF-β production in the lung. Allergol Int. 2014;63(3):457-66.

12. Moriguchi S, Utsumi Y, Sasaki N, Nagashima H, Suzuki N, Nakamura Y, Kobayashi H, Yamauchi K, et al. Association of thymic stromal lymphopoietin gene polymorphisms with atopic status and pulmonary function in a Japanese adult asthmatic population. JIMA 2014;66:47-55.

〔学会発表〕(計 6 件)

1. 山下雅大、小笠原正人、斎藤平佐、山内広平 . 小胞体ストレスに対する Protein-L-aspartate (D-aspartate) O-methyltransferase (PIMT) 代償発現の不足は肺腺癌浸潤を促す . 第 57 回日本呼吸器学会、2017, 4 月、東京
2. Chiba R, Sato J, Morikawa N, Saito H, Nihei S, Moriguchi S, Nagashima H, Nakamura Y, Yamauchi K. The relationship between plasma afatinib concentration and the severity of adverse events. Asian Pacific Society of Respiratory Congress 2016, Bangkok, Thailand. December 12, 2016.
3. Morikawa N, Miyauchi E, Sugawara S, Yamauchi K, et al. Phase II study of Carboplatin plus weekly nab-paclitaxel in elderly patients with non-small cell lung cancer : North Japan Lung Cancer Study Group Trial 1301. Asian Pacific Society of Respiratory Congress 2015, Kuala Lumpur, Malaysia. December 5, 2015.
4. Chiba R, Morikawa N, Saito H, Yamauchi K, et al., Evaluation of EGFR-TKIs efficacy according to mutation type and body size in patients with non-small cell lung cancer harboring EGFR mutations. Asian Pacific Society of Respiratory Congress 2015, Kuala Lumpur, Malaysia. December 5, 2015.
5. Oikawa Y, Sasaki N, Niisato M, Nakamura Y, Yamauchi K. A phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor strongly suppressed pulmonary vascular remodeling of allergic vasculitis in a murine model. Annual Congress of the European Respiratory Society; 2015 September; Amsterdam, Netherland.
6. Suzuki R, Nakamura Y, Chiba S, Yamauchi K. Mitigation of tight junction protein dysfunction in lung microvascular endothelial cells with pitavastatin. Annual Congress of the European Respiratory Society; 2015 September; Amsterdam, Netherland.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕
ホームページ等

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 Masahito)
愛媛大学・医学部・准教授

研究者番号 : 00325367

(3)連携研究者

()

研究者番号 :

(4)研究協力者

()