

異性化タンパク質修復酵素 PIMT の細胞機能における役割

古地 壯光, 本間 浩*

The Role of Isomerized Protein Repair Enzyme, PIMT, in Cellular Functions

Takemitsu FURUCHI and Hiroshi HOMMA*

Sch. of Pharmaceut. Sci., Kitasato Univ., 5-9-1 Shirogane, Minato-ku, Tokyo 108-8641, Japan

(Received July 20, 2007)

Proteins are subject to various types of spontaneous modifications that can disrupt their structures with sometimes adverse effects on biological activity. The formation of L-isoaspartyl (or D-aspartyl) residues, through either the deamidation of asparagine or dehydration of aspartate, is one of the most frequent types of deterioration occurring under physiological conditions. Protein L-isoaspartate/D-aspartate *o*-methyltransferase (PIMT) is a conserved and ubiquitous enzyme that participates in the repair of various isomerized proteins. PIMT catalyzes the transfer of the methyl group of S-adenosyl-L-methionine onto the α -carboxyl group of an L-isoaspartyl (or the β -carboxyl group of an D-aspartyl) residue, which initiates the conversion of this residue to an L-aspartyl residue. PIMT-deficient mice have been shown to die at a mean age of 42 days from progressive epileptic seizures with grand mal and myoclonus. Although PIMT-deficiency clearly leads to the accumulation of isomerized proteins, it is currently unclear how this causes progressive epilepsy in PIMT-deficient mice. As a first step towards understanding this, we developed a new assay to measure PIMT activity in cell lysates. Additionally, we isolated PIMT knockdown cells from HEK293 cells that were stably transfected with a PIMT small interfering RNA expression vector. PIMT activities were significantly decreased in the PIMT knockdown cells, and analysis of the transfectants revealed that MEK and ERK were hyperactivated after cell stimulation with epidermal growth factor (EGF). These results indicate that the ability to repair L-isoaspartyl- (or D-aspartyl-) containing proteins is important for the maintenance of normal MEK-ERK signaling.

Key words—protein L-isoaspartate *o*-methyltransferase; isomerization; protein repair

1. はじめに

タンパク質やペプチド中の L 型のアスパラギン残基 (L-Asn) やアスパラギン酸残基 (L-Asp) は異性化やラセミ化を非常に起こし易く, その結果, D 型や L 型のイソ型アスパラギン酸残基 (D, L-isoAsp) や D 型のアスパラギン酸残基 (D-Asp) が生じることが知られている.¹⁻⁶⁾ L-Asn 及び L-Asp の異性化及びラセミ化の機構について Fig. 1 (A) に示す. この反応は, L-Asn 及び L-Asp の側鎖にあるカルボニル基が C 末端側隣接残基の N 原子電子対に攻撃され, その結果 L-Asn の脱アミド又は L-Asp の脱水を介して不安定な環状イミド中間体が形成されることにより開始される (Fig. 1). この環状イミド中間体の α -炭素の立体配置は変化し易く, ラ

セミ化により D 体の環状イミド中間体も形成される. これらイミド中間体の開裂により, その 70-85% が isoAsp に, 15-30% が Asp に変換されることが知られている. これら反応の律速段階は, 環状イミド中間体が形成されるステップであり, その速度は Asn 残基の方が Asp 残基より 10 倍早いことが報告されている. また, この反応は C 末端側の隣接残基のかさ高さにも影響され, 特に立体障害の小さいグリシンやセリンなどの場合に生じ易いこと, さらにタンパク質の立体構造上の環境によっても左右され, 溶媒にさらされ易い位置やゆらぎの高い位置にある L-Asn や L-Asp は異性化を受け易いことも報告されている. これらの異性化反応は, pH 7.4, 37°C という穏やかな条件下においても進行することが分かっており, 反応に要する時間は 1 日から 1000 日の間と幅広い.¹⁻⁴⁾

ペプチド主鎖中の L-Asn 及び L-Asp の異性化はタンパク質の立体構造変化を引き起こすことが考え

北里大学薬学部 (〒108-8641 東京都港区白金 5-9-1)

*e-mail: hommah@pharm.kitasato-u.ac.jp

本総説は, 日本薬学会第 127 年会シンポジウム S11 で発表したものを中心に記述したものである.

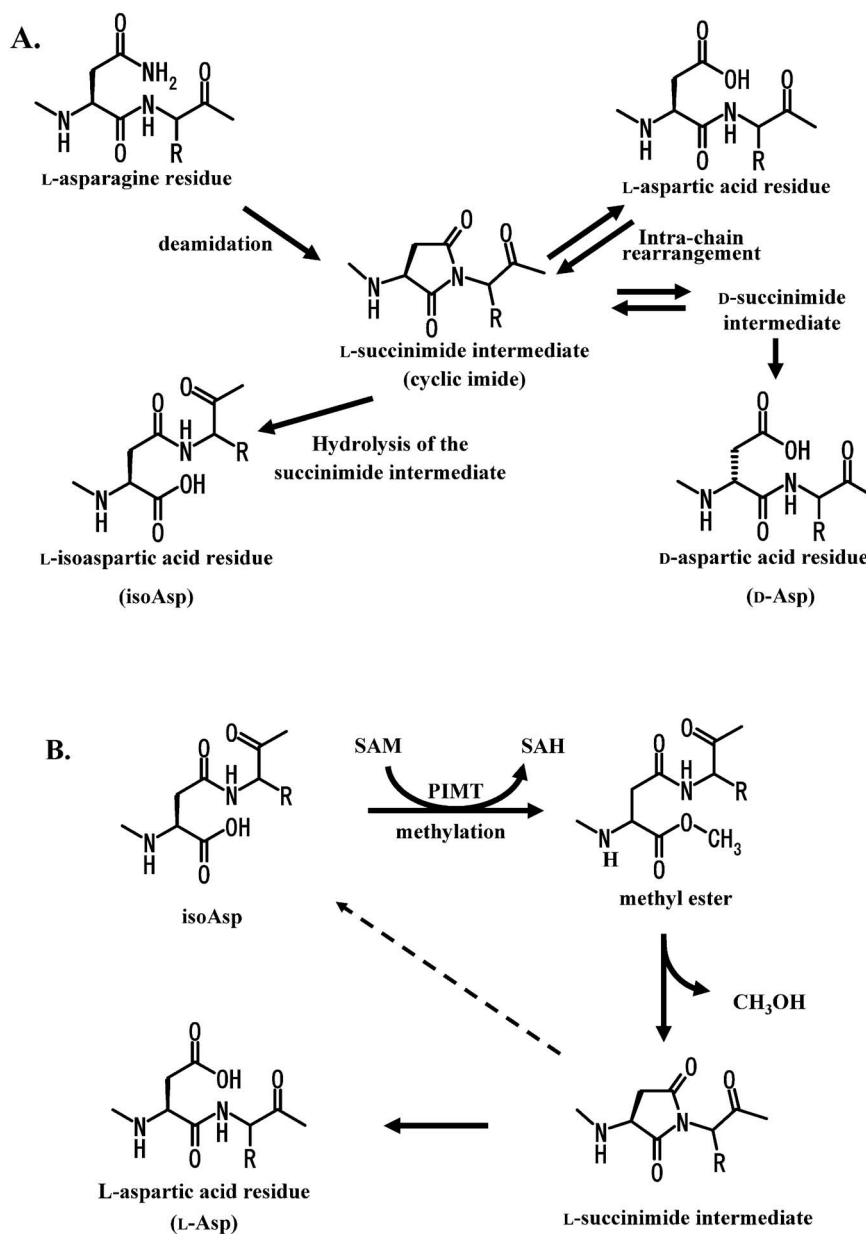


Fig. 1. Mechanism for the Formation of L-Isoaspartyl and D-Aspartyl Residues in peptides and Proteins (A) and the Repair of These Residues by PIMT (B)

A. Deamidation of L-asparagine (L-Asn) or dehydration of L-aspartate (L-Asp) leads to the formation of a metastable L-succinimide (cyclic imide) intermediate, which is hydrolyzed to a mixture of L-Asp and L-isoaspartyl (L-isoAsp) residues. L-Succinimide undergoes reversible racemization to D-succinimide. The D-succinimide is hydrolyzed to a mixture of D-aspartyl (D-Asp) and D-isoaspartyl (D-isoAsp) residues, which are poor substrates for PIMT. B. PIMT catalyzes transfer of an active methyl group from S-adenosylmethionine (SAM) onto the atypical α -carboxyl of the isoAsp site. The methyl ester undergoes spontaneous demethylation to form an L-succinimide intermediate. Hydrolysis of the L-succinimide generates a mixture of L-isoAsp and L-Asp. The L-isoAsp product can reenter the methylation/demethylation cycle, eventually leading to the conversion of nearly all of the L-isoAsp to L-Asp.

られるため、タンパク質自体の機能にも影響が及ぶ可能性が示唆されている。事実、これらアミノ酸残基の異性化によってタンパク質の活性が著しく減少することや、タンパク質の免疫原性が増強する可能性が報告されている。^{7,8)} 例えば、末梢 T 細胞表面に存在しヒト免疫不全ウイルス (human immunodeficiency virus; HIV) 受容体として機能する糖タ

ンパク質である CD4 の組換えタンパク質 (rCD4) は、25°C で 6 ヶ月放置することにより N 末より 52 番目の Asn が isoAsp に変換され、その結果 HIV のエンベロープに存在する糖タンパク質である gp120 との結合能が正常な rCD4 の 76% にまで減少すること、⁹⁾ また、マウスの組換えインターロイキン-1 β においては、37°C で 35 時間処理することで

N 末より 149 番目の Asn が isoAsp に変換され、受容体への親和性及びマイトジェニック活性が低下することなどが知られている。¹⁰⁾ *In vivo* においても、ラットの尾に存在するタイプ I コラーゲン中に含まれる isoAsp 含量が生後 3 ヶ月から 20 ヶ月までの間に約 3 倍に増加すること、また、タイプ I コラーゲンをコーティングしたプレートを用いて培養細胞移動能について解析した結果から、20 ヶ月齢のマウスより調製したコラーゲンをコーティングした場合、3 ヶ月齢のマウスのものをコーティングしたものより細胞移動能が 65% にまで低下することが明らかにされている。¹¹⁾ また、アルツハイマー病脳から精製された β アミロイドタンパク質中においては isoAsp 含量が増加していることや、 β アミロイド合成ペプチド中の L-Asp を異性化あるいはラセミ化することによりその *in vitro* での凝集性が増加し、アミロイド繊維の形成が促進されることが示されていることから、L-Asp 残基の異性化あるいはラセミ化がアルツハイマー病発症の要因となっている可能性も示唆されている。^{3,12,13)} また最近では、異性化されることにより活性を獲得するタンパク質の例も報告されている。細胞外マトリックスであるフィブロネクチンは、その 263 番目の Asn が異性化され Asn-Gly-Arg (NGR) site が L-isoDGR に変換されることによりインテグリン (α (v) β 3) に対する結合活性を獲得する。また、この異性化された L-isoAsp が L-Asp へと変換されるとインテグリンに対する結合活性を失う。¹⁴⁾ これらの結果は、タンパク質の異性化は単なるタンパク質の劣化を意味するのではなく、タンパク質の翻訳後修飾による生理活性調節機構として生体により積極的に利用されている可能性を示唆するものである。

一方、生体内には L-isoAsp 及び D-Asp から、通常の L-Asp への修復を促進する酵素である Protein L-isoaspartyl (D-aspartyl) methyltransferase (PIMT) が存在する。PIMT は、L-isoAsp の遊離の α -カルボキシル基、又は D-Asp の遊離の β -カルボキシル基を特異的に認識し、補酵素である S-adenosyl-L-methionine (SAM) からのメチル基転移反応を触媒する酵素である。PIMT によりメチル化を受けた L-isoAsp 又は D-Asp は、速やかにメタノールの脱離を伴って環状イミド中間体へと変換され、生成した環状イミド中間体はその一部が通常の L-Asp へと

戻る。PIMT はこの経路を繰り返すことにより、D-Asp や L-isoAsp を L-Asp へと修復しているものと考えられている (Fig. 1(B)).^{2,3,6)}

PIMT はヒトの脳組織で初めて見い出されてから、これまでに種々の動物の血液細胞や脳組織から分離・同定されている。また、大腸菌、線虫、麦など原核及び真核生物を問わず生物界に広く分布することが明らかにされている。^{15,16)} 一方、その基質特異性は生物種により異なり、例えば、ヒト由来の PIMT では D-Asp 及び L-isoAsp を基質として認識するが、超好熱性古細菌 *Thermotoga maritima* 由来の PIMT は L-isoAsp のみを認識し、D-Asp は認識しない。¹⁷⁾

PIMT の生理的な役割についてはいまだ不明な点が多いが、ノックアウトマウスを用いた解析より、マウスの生存に必須なタンパク質であることが明らかとされている。^{18,19)} PIMT ノックアウトマウスは、正常に生まれ、脳も正常に発生するものの、生後 4 週齢以降になると神経細胞の興奮性が異常亢進し、最終的には致死性のけいれん発作で生後 12 週までに死亡する。このマウスの脳波の解析結果より、PIMT ノックアウトマウスの脳波では、典型的な大発作型、海馬型、ミオクローヌス型のでんかん発作性脳波が認められている。このてんかん発作の出現時期が死亡時期に一致していること、また、抗てんかん薬であるバルプロ酸ナトリウムの投与により PIMT ノックアウトマウスの寿命が 4-6 週間延長することより、致死性の大発作が直接の死亡原因であると推論されている。¹⁸⁾ PIMT ノックアウトマウスの脳においては isoAsp 含量が対照マウスの脳の 7-10 倍に増加しており、また、ヒトのてんかん患者においても海馬中の PIMT 発現量が健常者の約 50% にまで減少し、isoAsp 含有タンパク質が健常者の 1.5 倍に蓄積していることが報告されていることから、²⁰⁾ isoAsp の蓄積とてんかん症状発症との関連に関心が寄せられている。

以上のことから、PIMT は生体内において異性化されたタンパク質の修復酵素として重要な役割を果たしているものと考えられる。しかしながら、タンパク質が異性化することにより生じる個体レベルでの機能障害発生のメカニズムや、PIMT による異性化タンパク質の修復が生体において担っている役割については不明な点が多い。そこでわれわれは、タ

ンパク質の異性化により生じる機能障害や、その修復酵素である PIMT の機能を分子レベルで解析することにより、異性化したタンパク質が生体に及ぼす影響や PIMT が生体内において果たしている役割を解明することを目的とし研究を行っている。本稿では、われわれの最近の検討結果を中心に紹介する。

2. 新規 PIMT 活性測定系の開発

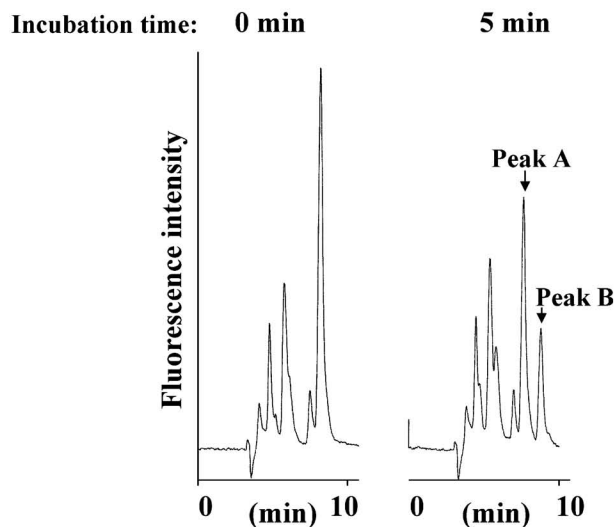
異性化したタンパク質の修復酵素である PIMT の役割を解析する上で、その活性測定系の開発は重要である。現在報告されている PIMT の活性測定系は主に 2 通りある。1 つ目は、PIMT の反応により SAM より生じる S-adenosylhomocysteine (SAH) の量を HPLC により測定する方法である。^{21,22)} しかしこの方法では、精製した PIMT の活性を測定することはできるが、細胞や組織の抽出液では多量の夾雑物が混在してくるため、SAH のピークを同定することが難しく、PIMT の活性を測定することは不可能である。2 つ目は、メチル基をトリチウムラベルした SAM を補酵素として用い反応を行ったのち、イミド中間体が生成される際に生じる $[^3\text{H}]$ -メタノールを気化させその蒸気をトラップしたのち、放射活性を測定する方法である。しかしこの方法は、操作が煩雑でその活性測定には熟練を要するものと考えられる。また放射標識されたメタノールを気化させる段階で大気を汚染してしまうことも危惧される。そこでわれわれは、もっと簡便かつ安全な活性測定系が作れないか検討を行った。

基質となる isoAsp 含有ペプチドを NBD で蛍光ラベル化し、これを PIMT と反応させメチル化させたのち HPLC で分離測定する活性測定系の確立を試みた。基質となる isoAsp 含有ペプチドとしてデルタスリープ誘導ペプチド (DSIP) を用い、この NBD 標識体を作製し HPLC を用いて解析した結果、ピーク高さあるいはピーク面積を測定することにより、幅広いレンジで検出可能であり、また、数 pmol まで検出可能であることが明らかとなった。そこで精製した組換え PIMT を用いて基質を一定時間反応後、HPLC を行い分離測定した結果、反応により基質のピークが減少し、同時に新しいピークの出現が確認された。これら 2 つのピークを分取し質量分析にかけたところ、その質量はそれぞれ基質及びそのメチル化体の分子量と一致したこ

とから、それぞれ基質及びそのメチル化体のピークであることが確認された (Fig. 2)。以上の結果から、この活性測定系を用いることにより少なくとも精製した組換え PIMT の活性が測定できると考えられた。

次に細胞抽出液中に含まれる PIMT 活性が測定できるかどうか検討を行った。酵素試料として PIMT を発現していることが確認済みである

A.



B.

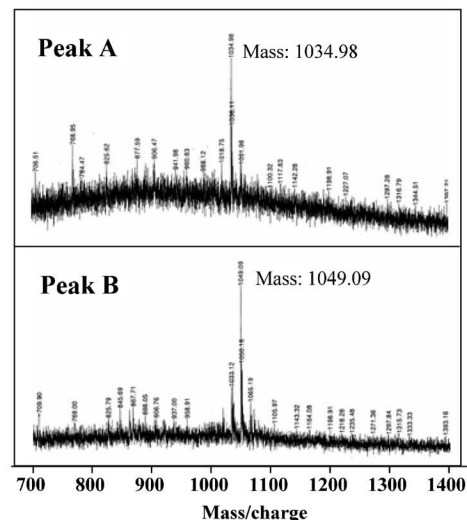


Fig. 2. Chromatogram of Reaction Products of NBD-DSIP (isoAsp) after Incubation with hPIMT (A) and MALDI-TOF/MS Spectra of Peak A and Peak B (B) of the Chromatogram

A. Thirty pmol of NBD-DSIP (isoAsp) was incubated with SAM and recombinant human PIMT for 5 min and then the products were analyzed by HPLC. Column: ODS, Mobile phase: Methanol : H₂O (60 : 40) containing 0.05% TFA. B. The candidate peaks of NBD-DSIP (isoAsp) (peak A) and its methylated form (peak B) were collected and analyzed by MALDI-TOF MS.

HEK293 細胞の抽出液を用いた。蛍光ラベルした基質を細胞抽出液中で一定時間反応させたのち HPLC にて分離測定した結果、メチル化されたピークが検出された。また、反応溶液中加入した細胞抽出液のタンパク質量と分離検出されたメチル化基質の量との間に相関が認められた。以上の結果から、本活性測定系を用いることにより、細胞抽出液中に含まれる PIMT の活性が測定できることが明らかとなった。本活性測定系は全工程含めて 1 時間以内で測定可能であり、従来の系に比較し非常に簡便で迅速な活性測定系である。

3. PIMT 発現抑制株の樹立

タンパク質の異性化とその修復酵素である PIMT の機能を分子レベルで解析することにより、タンパク質の異性化と PIMT によるその修復の生物学的意義を解明することを目的とし、mRNA を特異的に分解することが可能な siRNA 発現系を用いて PIMT 発現抑制細胞株を樹立した。

まず、哺乳類細胞発現用ベクター pcDNA3.1(+) を用いて、human PIMT (hPIMT) をターゲットとする siRNA の発現ベクターを構築した。pcDNA3.1(+) ベクターは、形質転換細胞セレクション用のネオマイシン耐性遺伝子及び CMV プロモーター配列を、また CMV プロモーター配列の下流にはマルチクロニングサイトを有している (Fig. 3)。そこで、CMV プロモーター配列を制限酵素処理により除去し、H1 プロモーター及び PIMT をターゲットとするステムループタイプの siRNA 発現配列をマルチクロニングサイトに挿入して PIMT siRNA 発現プラスミドを構築した。siRNA 発現ベクターには主に U6 プロモーターと H1 プロモーターが使われているが^{23,24)} これらはそれぞれ small nuclear RNA (U6) と human RNase P RNA H1 のプロモーターであり、Type III に属する Pol III 転写系プロモーターとして知られている。Type III のプロモーターには転写に必要とされる保存配列として、proximal sequence element (PSE), Staf-binding site, distal sequence element (DSE) 及び TATA box が存在し、H1 プロモーターにおいてはこれらの配列が約 100 bp 以内に存在しているため、このプロモーターを用いることによりコンパクトなベクターの構築が可能となる。

構築した PIMT siRNA 発現ベクターを、ヒト胎

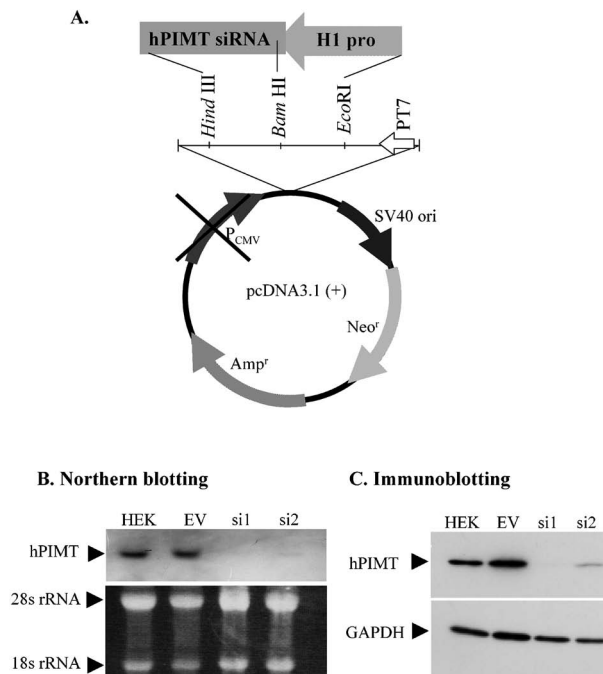


Fig. 3. Schema for the Construction of the PIMT siRNA Expression Vector (A) and the Analyses of PIMT Expression in the HEK293 Stable Transfectants Carrying the PIMT siRNA Expression Vector by Northern blotting (B) and Immunoblotting (C)

A. After removal of the CMV promoter region, the H1 promoter and oligonucleotides encoding a short hairpin-type siRNA were integrated into the pcDNA3.1(+) vector. B. Expression levels of PIMT mRNA in untransfected HEK293 cells (HEK) or in HEK293 cells stably transfected with the empty vector (EV) or the PIMT siRNA expression vectors (si1 and si2) were analyzed by Northern blotting using DIG-labeled RNA probes for human PIMT (upper panel). The lower panel shows the levels of 28 s and 18 s ribosomal RNAs as loading controls. Each lane contains 20 μ g of total RNA. C. Expression levels of PIMT in HEK293 untransfected (HEK) cells and in stably transfected cells carrying the empty vector (EV) or the PIMT siRNA expression vectors (si1 and si2) were analyzed by immunoblotting using the anti-PIMT antibody (upper panel). The lower panel shows the GAPDH level as a loading control. Each lane contains 15 μ g of total protein.

児腎由来 HEK293 細胞に導入し、G418 耐性となった安定形質転換細胞をクロニングした。siRNA による PIMT 発現抑制効果を確認するため、得られたクローンの RNA を単離し、Northern blotting を行った結果、PIMT mRNA レベルの減少が確認された (Fig. 3(B))。また、抗 PIMT 抗体を用いて Western blotting を行った結果、PIMT 発現抑制株において PIMT タンパク質の発現減少も確認された (Fig. 3C)、さらに上記の PIMT 活性測定系を用いて活性を測定した結果、PIMT 発現抑制株における活性の減少も確認された (Fig. 4)。なお、CMV プロモーターを除去しただけの pcDNA3.1(+) ベクター (空ベクター) 及びランダムに配列を並び替えた siRNA を発現するベクターをコントロールとし

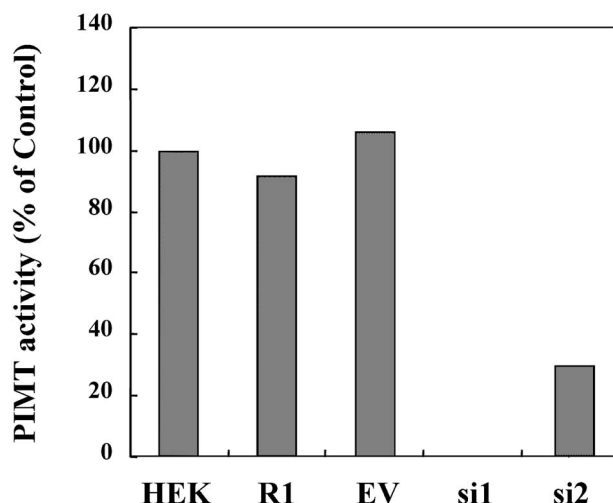


Fig. 4. PIMT Activity in the HEK293 Stable Transfectants Carrying the PIMT siRNA Expression Vector

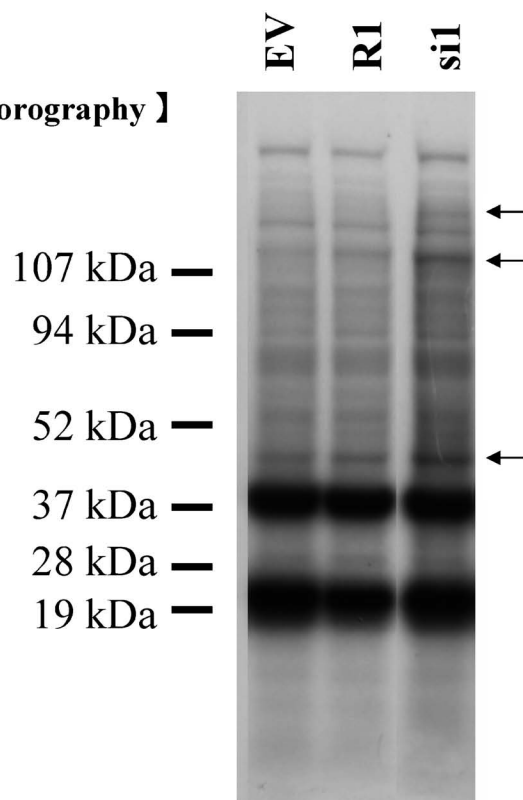
Total cell lysates (100 μ g protein) of HEK-293 stable transfectants carrying the empty vector (EV), the sequence-randomized control siRNA (R1) or the PIMT siRNA expression vectors (si1 and si2) were incubated with SAM and NBD-DSIP (isoAsp) and then the products were analyzed by HPLC. Column: ODS, Mobile phase: Methanol : H₂O (60 : 40) containing 0.05% TFA.

て導入した細胞株では、親株である HEK293 細胞と同等の PIMT の発現あるいは活性が認められた (Figs. 3 and 4).

4. PIMT 発現抑制株におけるタンパク質の異性化の促進

樹立した PIMT 発現抑制細胞株において、異性化したタンパク質の蓄積が生じているか否かを解析するために、精製した組換え PIMT を用いて酵素反応を行い、SAM よりタンパク質へ転移されるメチル基の量を測定した。前述したように PIMT は、isoAsp の α -カルボキシル基 (あるいは D-Asp の β -カルボキシル基) を特異的に認識し、メチル基供与体である SAM から isoAsp の α -カルボキシル基へとメチル基を転移する (Fig. 1)。この PIMT の基質特異性を利用して、[methyl-³H]SAM 存在下、組換え PIMT と反応させたのちにタンパク質に取り込まれたメチル基を検出すると、異性化した Asp を定量することが可能である。試料である細胞抽出液中に、組換え PIMT 及び [methyl-³H]SAM を添加して一定時間反応後、試料中のタンパク質に取り込まれたメチル基をフルオログラフィーにより検出した。その結果、コントロール細胞と比較して PIMT 発現抑制細胞ではメチル基の取り込み量が増加しており、細胞内で異性化したタンパク質の蓄積

【 Fluorography 】



【 CBB staining 】

37 kDa —

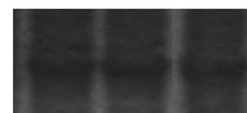


Fig. 5. Analysis of the Levels of Isomerized or Racemized Proteins in HEK293 Stable Transfectants Carrying the PIMT siRNA Expression Vector

Total cell lysates (40 μ g protein) of HEK-293 stable transfectants carrying the empty vector (EV), the sequence-randomized control siRNA (R1) or the PIMT siRNA expression vector (si1) were incubated with [methyl-³H] SAM in the presence of recombinant human PIMT. The ³H-labeled proteins were separated by SDS-PAGE and visualized by fluorography. The arrows indicate proteins that were more intensely labeled in the cells transfected with the PIMT siRNA expression vector than in the control cells. The lower panel shows the loading control (Coomassie brilliant blue staining).

が促進されているものと考えられた (Fig. 5)。また、ラベルの取り込み量にタンパク質間で明らかな差が認められたことから、細胞レベルにおいてもタンパク質間で異性化され易さが異なることが確認された。

5. PIMT 発現抑制が細胞内情報伝達に及ぼす影響

細胞には、外的環境に応じた細胞応答を引き起こすため、細胞内へ情報を伝える経路であるシグナル伝達系が存在することが知られている。それらの中でも MAP キナーゼシグナル伝達系は、細胞外の情

報を核へと伝える主要な経路の1つとして知られている。MAP キナーゼシグナル伝達系は、外界からの様々な刺激にตอบสนองして活性化するプロテインキナーゼカスケードで、細胞外からのシグナルを伝達し、遺伝子発現の調節等を行うことにより、増殖・分化・アポトーシスといった様々な細胞応答の制御に重要な役割を果たしているものと考えられている。^{25,26)}

一方、PIMT ノックアウトマウスを用いた解析より、脳、心臓、肝臓、血液細胞等の種々の臓器において異性化タンパク質の蓄積量が、野生型マウスに比較し有意に多いことが報告されている。同様に、リンパ節、脾臓、及び胸腺細胞においても異性化タンパク質の蓄積量が増加していることが確認されている。¹⁸⁾ この PIMT ノックアウトマウスから単離したリンパ節中の T リンパ球を精製し細胞レベルで解析した結果、ノックアウトマウス由来の細胞では、種々の刺激にตอบสนองした T リンパ球の増殖能が、野生株マウス由来の細胞よりも亢進していることが明らかにされている。²⁷⁾ また *in vivo* においても、通常の外來抗原にตอบสนองした T リンパ球の増殖能が、コントロールマウスと比較して約 4 倍に増加していることも観察されている。さらに、リンパ節中のシグナル伝達に係わるタンパク質の抗 CD3/CD28 抗体刺激によるリン酸化を解析した結果より、Extracellular signal-regulated kinase (ERK) 及び Mitogen-activated protein kinase (MAPK)/ERK kinase (MEK) を含むいくつかのシグナル伝達分子のリン酸化が亢進していることも明らかにされている。これらの報告より、PIMT 欠損により生じる個体レベルでの機能障害発生のメカニズムに、シグナ

ル伝達に係わるタンパク質の異性化による細胞内情報伝達の異常が関与している可能性も否定できない。

HEK293 細胞は、EGF (Epidermal Growth Factor; 上皮成長因子) 受容体を発現しており、EGF 刺激による MAP キナーゼカスケードの活性化が確認されている。そこで、EGF 刺激による MAP キナーゼカスケードの活性化に及ぼす PIMT 発現抑制の影響を解析する目的で、抗リン酸化抗体を用いた Western blotting による解析を行った。PIMT 発現抑制細胞及びコントロール細胞に EGF を添加し、0、5、10、及び 30 分間培養したのちに細胞抽出液を調製し、抗リン酸化 ERK 抗体を用いた Western blotting によりリン酸化 ERK の検出を試みた。その結果、コントロール細胞では、EGF 刺激 5 分後に ERK のリン酸化の一過的な上昇がみられたのに対して、PIMT 発現抑制細胞では、コントロール細胞と同様に EGF 刺激 5 分後にリン酸化された ERK が検出され始めるものの、このリン酸化はその後も減衰せずに刺激後 30 分まで持続して認められた (Fig. 6)。次に、この ERK のリン酸化の持続が、その上流のシグナル伝達因子である MEK のリン酸化活性の上昇によるものであるか検討するため、リン酸化 MEK に対する抗体を用いた Western blotting により解析した。その結果、コントロール細胞においては、MEK は刺激後 5 分の時点でリン酸化のピークに達しその後は減少するのに対し、PIMT 発現抑制細胞ではコントロール細胞同様に刺激後 5 分の時点でリン酸化のピークを迎えるが、30 分後においてもリン酸化の亢進又は持続が認められた (Fig. 6)。さらにわれわれは、MEK キナーゼである Raf-1 に関しても、PIMT 発現抑制株において

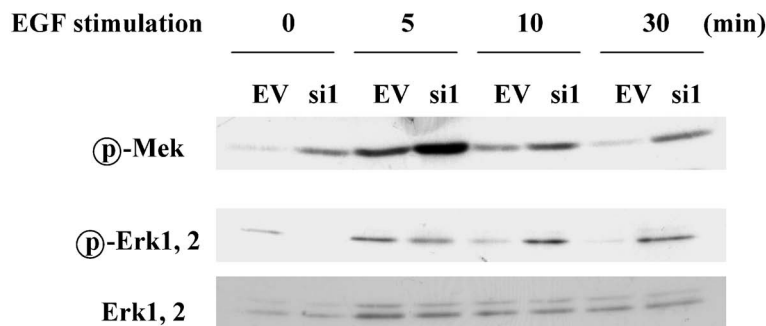


Fig. 6. Effect of PIMT Knockdown on EGF-stimulated MEK and ERK Activation

HEK293 stable transfectants carrying the empty vector (EV) or the PIMT siRNA expression vector (si1) were treated with 1 µg/ml EGF for the indicated times. The cells were lysed and the extracts were immunoblotted using an anti-phosphorylated MEK or ERK antibody. The lower panel shows total ERK levels as a loading control. Each lane contains 15 µg of total protein.

EGF 刺激による活性化の上昇あるいは持続が生じることを、抗リン酸化 Raf-1 抗体を用いた解析により確認している。以上の結果より、PIMT 発現抑制株においては、EGF 刺激による MAP キナーゼカスケードの活性化の亢進又は持続が、少なくとも Raf-1 あるいはその上流以降に生じていることが明らかとなった。

細胞内情報伝達を担うタンパク質のリン酸化状態は、プロテインキナーゼによるリン酸化とプロテインフォスファターゼによる脱リン酸化により調節されている。最近、2次元電気泳動を用いた網羅的解析結果より、PIMT ノックアウトマウス脳中において isoAsp 含有量が増加しているタンパク質の1つとして、Raf キナーゼ阻害タンパク質 (RKIP) が同定された。²⁸⁾ RKIP は、Raf-1 に結合しその活性化を抑制するタンパク質として知られており、本研究結果と考え合わせると大変興味深い。現時点では、RKIP が異性化されることによりその機能にどのような影響が生じるか不明であるが、もし RKIP の活性が抑制されていれば、結果として Raf-1 の活性が上昇することにつながり、本研究結果と矛盾しない。RKIP の異性化が本 PIMT 発現抑制株においても亢進しているか、また異性化が RKIP の活性にどのような影響を及ぼすか解析していくことは重要な検討課題であると思われる。

一方、プロテインフォスファターゼが関与している可能性も考えられる。Raf-1 の脱リン酸化を触媒する酵素については、現在ほとんど解明されていないが、最近、リン酸化 Raf-1 の脱リン酸化酵素として protein phosphatase 5 (PP5) がクローニングされた。^{29,30)} PP5 は Raf-1 の活性化に必要な 338 番目の Ser のリン酸を脱リン酸化し、その活性及び下流の MAP キナーゼカスケードを阻害することが明らかになっている。また、MAP キナーゼカスケードを構成する情報伝達分子群を基質とするプロテインフォスファターゼも数多く見出されている。例えば、セリンスレオニンフォスファターゼである protein phosphatase 2A (PP2A) は、主に細胞質に局在しており、MEK1/2 の 2 ヶ所のセリン残基及び ERK1 のスレオニン残基を脱リン酸化して不活化することなどが明らかにされている。³¹⁾ 今回確認された Raf-1、MEK 及び ERK のリン酸化の持続には、プロテインキナーゼが関与するメカニズムのほ

かに、1) Raf-1 (あるいは MEK 又は ERK) が異性化されることによりプロテインフォスファターゼに対する基質として認識されづらくなった、2) プロテインフォスファターゼの異性化によりその脱リン酸化活性が低下したなど、プロテインフォスファターゼに係わるメカニズムも十分考えられる。

今後、このリン酸化の亢進あるいは持続の原因となっているタンパク質を特定し、PIMT 発現抑制による MAP キナーゼカスケードの活性化の促進あるいはその持続に係わるメカニズムを追究したいと考えている。

6. おわりに

本研究では、タンパク質の異性化及び PIMT の機能を分子レベルで解析することにより、異性化したタンパク質や PIMT が生体内において果たしている役割を解明することを目的として、PIMT 活性測定系の開発、PIMT 発現抑制細胞株の樹立、及び樹立した細胞株を用いて細胞内シグナル伝達系への影響の解析を行った。

まず、細胞抽出液中に含まれる PIMT の活性を測定するための簡便なアッセイ系の確立を行った。次に PIMT をターゲットとする siRNA 発現ベクターを構築し、それを HEK293 細胞に導入することにより PIMT 発現抑制細胞株を樹立した。また樹立した細胞株における PIMT の mRNA 及びタンパク質の発現レベルをそれぞれ Northern blotting 法及び Western blotting 法により解析し、両レベルともに減少していることを確認した。また PIMT 活性についても合わせて確認した。さらに、樹立した細胞株における内在性タンパク質の異性化の程度を検討した結果、細胞質画分において異性化タンパク質の増加が観察された。

樹立した PIMT 発現抑制細胞株を用いて、PIMT 発現抑制が MAP キナーゼカスケードを構成するシグナル伝達分子群の活性化に及ぼす影響を解析した結果、発現抑制細胞株において EGF 刺激による Raf-1、MEK 及び ERK のリン酸化の亢進又は持続が確認された。MAP キナーゼカスケードにおいては、細胞膜上の受容体が細胞外から受け取ったシグナルが、伝達分子群の連鎖的なリン酸化を介して核内へと伝わり、最終的には標的遺伝子の転写活性が調節され細胞応答の制御が行われている。それゆえに、情報伝達分子群が正常にリン酸化あるいは脱リ

ン酸化されていくことは、細胞が外界からの刺激に対して適切な応答を行う上で非常に重要であるといえる。MAP キナーゼカスケードを構成する一連のタンパク質のリン酸化状態の変化は、増殖・分化等の細胞機能に大きな影響をもたらすことが予測される。

MAP キナーゼカスケードは、Tリンパ球や本研究で用いた上皮細胞のみならず、線維芽細胞や神経系の細胞を始めとする様々な細胞においてもその細胞応答における調節機構として重要な役割を果たしている。一方、PIMT 欠損マウスの大脳皮質の錐体神経において樹状突起の異常伸張が観察されており、これがマウスのてんかん症状発症の原因となっている可能性も示唆されている。PIMT 欠損マウスにおける神経細胞の異常の一因として、MAP キナーゼカスケードを構成するタンパク質のリン酸化の亢進あるいは持続が関与している可能性は十分考えられるのではないだろうか。

今後は、PIMT 発現抑制細胞株の表現型を解析することにより、ERK 及び MEK のリン酸化の持続がもたらす細胞機能の変化を解析する予定である。PIMT 発現抑制が細胞機能に及ぼす影響を明らかにしていくことで、異性化タンパク質や PIMT によるその修復が生体内において担っている役割の解明へと結び付くことが期待される。

謝辞 本研究は、北里大学薬学部生体分子解析学教室の小杉桜子さんを中心となり、片根真澄助教、関根正恵助教の協力の元に行ったものであり、ここに厚く感謝いたします。また、抗 PIMT 抗体をご供与いただき、終始ご指導、ご協力いただきました東京都老人総合研究所の清水孝彦先生及び白澤卓二先生（現順天堂大学大学院医学研究科）に深甚なる謝意を表します。また、研究のお手伝いをしていただいた北里大学薬学部生体分子解析学教室の卒業生及び在校生の皆様にご心より御礼申し上げます。

REFERENCES

- 1) Aswad D. W., Paranandi M. V., Schurter B. T., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **21**, 1129–1136 (2000).
- 2) Clarke S., *Ageing Res. Rev.*, **2**, 263–285 (2003).

- 3) Shimizu T., Matsuoka Y., Shirasawa T., *Biol. Pharm. Bull.*, **28**, 1590–1596 (2005).
- 4) Wakankar A. A., Borchardt R. T., *J. Pharm. Sci.*, **95**, 2321–2336 (2006).
- 5) Fujii N., Momose Y., Ishii N., Takita M., Akaboshi M., Kodama M., *Mech. Ageing Dev.*, **107**, 347–358 (1999).
- 6) Reissner K. J., Aswad D. W., *Cell Mol Life Sci.*, **60**, 1281–1295 (2003).
- 7) Doyle H. A., Zhou J., Wolff M. J., Harvey B. P., Roman R. M., Gee R. J., Koski R. A., Mamula M. J., *J. Biol. Chem.*, **281**, 32676–32683 (2006).
- 8) Doyle H. A., Gee R. J., Mamula M. J., *Autoimmunity*, **40**, 131–137 (2007).
- 9) Teshima G., Porter J., Yim K., Ling V., Guzzetta A., *Biochemistry*, **30**, 3916–3922 (1991).
- 10) Daumy G. O., Wilder C. L., Merenda J. M., McColl A. S., Geoghegan K. F., Otterness I. G., *FEBS Lett*, **278**, 98–102 (1991).
- 11) Lanthier J., Desrosiers R. R., *Exp. Cell Res.*, **293**, 96–105 (2004).
- 12) Shimizu T., Fukuda H., Murayama S., Izumiyama N., Shirasawa T., *J. Neurosci. Res.*, **70**, 451–461 (2002).
- 13) Shimizu T., Watanabe A., Ogawara M., Mori H., Shirasawa T., *Arch. Biochem. Biophys.*, **381**, 225–234 (2000).
- 14) Curnis F., Longhi R., Crippa L., Cattaneo A., Dondossola E., Bachi A., Corti A., *J. Biol. Chem.*, **281**, 36466–36476 (2006).
- 15) Kagan R. M., Clarke S., *Biochemistry*, **34**, 10794–10806 (1995).
- 16) Fu J. C., Ding L., Clarke S., *J. Biol. Chem.*, **266**, 14562–14572 (1991).
- 17) Skinner M. M., Puvathingal J. M., Walter, R. L., Friedman, A. M., *Structure*, **8**, 1189–1201 (2000).
- 18) Kim E., Lowenson J. D., MacLaren D. C., Clarke S., Young S. G., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **94**, 6132–6137 (1997).
- 19) Yamamoto A., Takagi H., Kitamura D., Tatsuoka H., Nakano H., Kawano H., Kuroyanagi H., Yahagi Y., Kobayashi S., Koizumi K., Sakai T., Saito K., Chiba T., Kawamura K., Suzuki K., Watanabe T., Mori H., Shirasawa T., *J. Neurosci.*, **18**, 2063–2074 (1998).
- 20) Lanthier J., Bouthillier A., Lapointe M., Demoule M., Beliveau R., Desrosiers R. R., *J.*

- Neurochem.*, **83**, 581–591 (2002).
- 21) Carlson A. D., Riggan R. M., *Anal. Biochem.*, **278**, 150–155 (2000).
- 22) Johnson B. A., Aswad D. W., *Anal. Biochem.*, **192**, 384–391 (1991).
- 23) Brummelkamp T. R., Bernards R., Agami R., *Science*, **296**, 550–553 (2002).
- 24) Wadhwa R., Kaul S. C., Miyagishi M., Taira K., *Curr. Opin. Mol. Ther.*, **6**, 367–372 (2004).
- 25) Nishida E., Gotoh Y., *Trends Biochem. Sci.*, **18**, 128–131 (1993).
- 26) Qi M., Elion E. A., *J. Cell Sci.*, **118**, 3569–3572 (2005).
- 27) Doyle H. A., Gee R. J., Mamula M. J., *J. Immunol.*, **171**, 2840–2847 (2003).
- 28) Vigneswara V., Lowenson J. D., Powell C. D., Thakur M., Bailey K., Clarke S., Ray D. E., Carter W. G., *J. Biol. Chem.*, **281**, 32619–32629 (2006).
- 29) Shah B. H., Catt K. J., *Trends Endocrinol. Metab.*, **17**, 382–384 (2006).
- 30) von Kriegsheim A., Pitt A., Grindlay G. J., Kolch W., Dhillon A. S., *Nat. Cell Biol.*, **8**, 1011–1016 (2006).
- 31) Robinson M. J., Cobb M. H., *Curr. Opin. Cell Biol.*, **9**, 180–186 (1997).