

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2006～2008  
 課題番号：18580118  
 研究課題名（和文） 腸管由来セリンプロテアーゼの細胞死における意義と食品成分による調節機構の解明  
 研究課題名（英文） Elucidation of significance of serine proteases found in the intestines on cell death and the mechanism of the proteases-mediated cell death regulated by food components  
 研究代表者  
 都築 巧 (TSUZUKI SATOSHI)  
 京都大学・農学研究科・助教  
 研究者番号：50283651

研究成果の概要:腸管の上皮層にはmembrane-type serine protease 1 (以下MT-SP1)やgranzyme A (以下GrA)と呼ばれるセリンプロテアーゼが存在している。本研究ではGrAが古くなった腸管上皮細胞の除去に関与する可能性を示した。またMT-SP1がIEC-6細胞の細胞死を誘導するかを明らかにする目的で、本酵素のリコンビナント体の作製に着手し、その大量調製に成功した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,300,000	0	1,300,000
2007年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	630,000	4,030,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：セリンプロテアーゼ、アノイキス、アポトーシス、腸管細胞、細胞代謝

## 1. 研究開始当初の背景

腸管粘膜の上皮細胞は体内で最も代謝回転（再生と死滅）の速い細胞である。絨毛先端部における細胞の死滅（アノイキス）は基底膜を構成する細胞外マトリックス蛋白質のプロテアーゼによる分解・修飾が必須であると考えられている。

MT-SP1（ゼラチン分解活性をもつのでmatriptaseとも呼ばれている）は脊椎動物の上皮細胞（特に腸管上皮細胞）で発現する膜結合性のセリンプロテアーゼである。我々は

本酵素が、正常ラット小腸の絨毛先端部の上皮細胞で強く発現すること、フィブロネクチン、ラミニンといった基底膜構成因子を分解するとともに、ウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーター（urokinase-type plasminogen activator, uPA）を活性型に変換することを明らかにしてきた。

GrAは抗原刺激などで活性化された細胞傷害性Tリンパ球やナチュラルキラー細胞で産生されるセリンプロテアーゼである。本酵素の意義は同時に産生されるパーフォリンに

よって形成される孔を介して標的細胞（癌細胞あるいはウイルス感染細胞）に侵入しアポトーシスを誘導することであると考えられている。近年、我々はGrAが正常ラットの腸管上部の上皮細胞間リンパ球に発現していることをみいだした。また、正常なヒト小腸の上皮細胞間リンパ球においてGrAは発現しているが、パーフォリンは発現していないことが報告された。これらのことからGrAは腸管においてパーフォリン非依存的に何らかの機能を果たしていることが示唆された。実際にGrAは細胞外マトリックスの分解作用を示すことも報告されている。

## 2. 研究の目的

MT-SP1とGrAの腸管絨毛における分布や基底膜の構成成分を分解するという性質から、我々はこれらのプロテアーゼが腸管上皮細胞の自死（アノイキス）を誘導するのではないかと考えた。本研究ではこのことを細胞レベルで検証することを目的とする。

## 3. 研究の方法

酵母 *Pichia pastoris* (以下 *P. pastoris*) を用いてリコンビナントの GrA と MT-SP1 を調製することとした。得られたリコンビナント酵素をラット小腸上皮由来の IEC-6 細胞に添加し、アノイキスを誘導するかどうかを検討した。細胞死は TUNEL 法とカスパーゼ 3 活性の増加を指標に判定した。GrA についてはヒト肺胞上皮由来の培養細胞 A549 にも添加し、細胞を剥離させるかについて検証するとともに、インターロイキン 6、8 等の炎症メディエーターの放出を促進するかについても調べた。

## 4. 研究成果

### (1) GrA による IEC-6 細胞の剥離作用

GrA については本研究開始以前から *P. pastoris* を用いたリコンビナント体 (以下 rGrA) の生産方法を構築していた。300 nM の rGrA を含む血清不含培地で IEC-6 を培養したところ細胞の変形と培養皿からの剥離が見られた (図 1)。また、GrA 特異的なプロテアーゼインヒビター pancreatic secretory trypsin inhibitor (PSTI) を 60  $\mu$ M の濃度で rGrA と共に添加することによって細胞の変形と剥離が抑制された (発表論文 3)。これらの結果から rGrA はプロテアーゼとしての作用によって IEC-6 を剥離させていることが示唆された。

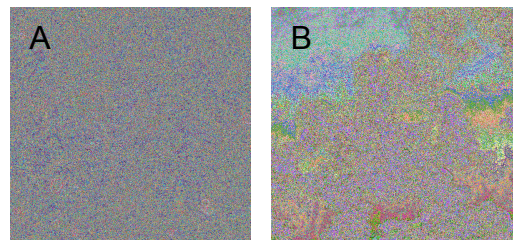


図 1 rGrA による IEC-6 細胞の変形と剥落  
無血清培地(A)または 300 nM rGrA を含む無血清培地で(B)で 48 時間インキュベートした IEC 細胞の顕微鏡像。

GrA は細胞外マトリックス成分を分解する作用があることが知られている。IEC-6 細胞をマイクロプレートに播種する際、3 種の細胞外マトリックスタンパク質 (コラーゲン IV、フィブロネクチン、ラミニン) のいずれかを 50  $\mu$ g/ml で添加した無血清培地に細胞を分散して容器に接着させた。その後、300 nM rGrA と共に細胞を 24 時間インキュベートした。コラーゲン IV、フィブロネクチンとともに接着した細胞は rGrA によって変形と剥落が起こったが、ラミニンを用いたときにはそれら

が起こらなかった（発表論文3）。この結果は、GrAはコラーゲンIVやフィブロネクチンを分解するがラミニンを分解しないという先行研究と一致した。GrAは腸管上皮細胞層において、基底膜中に存在するコラーゲンIVやフィブロネクチンなどのタンパク質を分解することにより基底膜-上皮細胞間接着を低下させることが示唆された。一方、剥離した細胞に対するTUNELアッセイとカスパーゼ-3活性測定の結果、rGrAが細胞死を促す作用は認められなかった（発表論文3）。以上の結果から、GrAは古くなった腸管上皮細胞の除去に関与していることが示唆された。本研究は免疫細胞から分泌されるプロテアーゼが腸管上皮細胞の代謝に影響を与えるということを細胞レベルで示した最初の例である。

## （2）GrAによる炎症メディエーター放出促進作用

rGrAをA549細胞に作用させたところIEC-6と同様細胞の変形と剥離を引き起こした。この結果からGrAの細胞剥離作用は腸管上皮細胞に限定されるものでないことが示された（発表論文4）。さらにrGrAはA549細胞から炎症メディエーターであるIL-6、IL-8の放出を促進させることが明らかになった（一方、IEC-6細胞から炎症メディエーターの放出促進は引き起こさなかった）（発表論文4）。rGrAによる炎症メディエーターの放出はPSTIの同時添加によって完全に抑制された（発表論文4）。またrGrAによるA549細胞の剥離、炎症メディエーターの放出促進は食品中に含まれるカラギーナンなどの硫酸化多糖の同時添加によって完全に抑制された（発表論文6）。カラギーナンは藻類の細胞壁の構成成分であるがGrAによる炎症疾

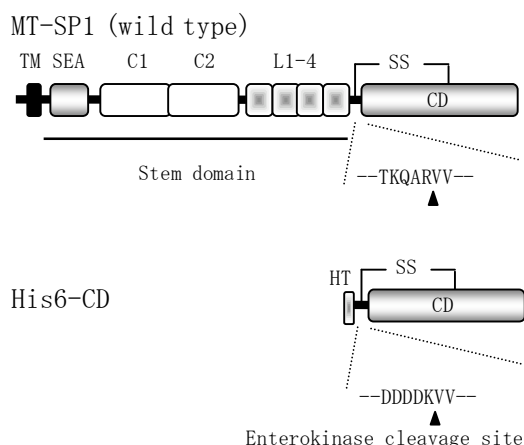
患の増悪（例えば潰瘍性大腸炎の増悪）（発表論文1）を抑制できることが期待できる。

## （3）MT-SP1のリコンビナント体の生産

我々はこれまでハムスター卵巣由来のCHO-K1細胞（発表論文5）を用いてMT-SP1のリコンビナント体（以下rMT-SP1）を調製してきた（発表論文2、7、8）。しかしながら培養細胞への添加実験に使用できるほどの量を得ることでできていなかった。そこでrGrAと同様に*P. pastoris*を用いてrMT-SP1の生産を行うこととした。

MT-SP1はシングルトランスメンブレン型の酵素であり、その細胞外領域は様々な構造モチーフからなるステムドメインと触媒ドメインから成る（図2）。我々はステムドメインと触媒ドメインから成るものと触媒ドメインだけで構成される分泌型のrMT-SP1をCHO-K1細胞を用いて作製してきている（発表論文2、7、8）。これら2者の低分子合成基質分解活性やuPA活性化能は等しいことが明らかになった（発表論文7）。すなわちMT-SP1の活性は触媒ドメインだけに依存することが示唆された。そこで*P. pastoris*においてもプロテアーゼドメインから成るrMT-SP1の生産を試みた（図2中のHis6-CD）。His6-CDにおいてはMT-SP1の活性化開裂部位の配列（TKQAR）をエンテロキナーゼの認識配列DDDDKに変異させてある。従って不活性体として精製したのち*in vitro*においてエンテロキナーゼを処理することによって活性体MT-SP1に変換させることができる。その後エンテロキナーゼを除去する目的でN末端にはヘキサヒスチジンタグを融合させてある。His6-CDは酵母の培養上清1L中に数ミリグラムのオーダーで分泌された。精製産物はエンテロキナーゼで切断され、さらに

His6-CD のプロテアーゼ活性は動物細胞を用いて生産させた rMT-SP1 と同等であった(学会発表 2)。食品成分との相互作用という観点からは、His6-CD 活性が亜鉛イオンによって著しく阻害されることがみいだされた(未発表データ)。今後は His6-CD 活性体を用いて IEC-6 細胞のアノキスを誘導するかについて検証をしていく予定である。



TM: Transmembrane domain  
SEA: SEA domain  
C1 and C2: CUB domains  
L1-4: LDL receptor class A domain repeats  
CD: Catalytic domain  
HT: Hexahistidine tag

図 2 天然型 MT-SP1 と rMT-SP1 (His6-CD) のドメイン構造、スパーサー領域とプロテアーゼドメインに形成されるジスルフィド結合は SS で示される。天然型 MT-SP1 と rMT-SP1 の活性化開裂配列と切断部位を矢印で示す。

#### 補足(略語の説明)

CUB, complement factor 1R-urchin embryonic growth factor-bone morphogenetic protein; LDL, low-density lipoprotein; SEA, sea-urchin sperm protein-enterokinase-agrin;

#### 5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計 8 件)

1. Hirayasu H, Yoshikawa Y, Tsuzuki S, Fushiki T. A role of a lymphocyte

tryptase, granzyme A, in experimental ulcerative colitis. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**: 234-237 (2007) 査読有

2. Kojima K, Tsuzuki S, Fushiki T, Inouye K. Roles of functional and structural domains of hepatocyte growth factor activator inhibitor type I in the inhibition of matriptase. *J. Biol. Chem.* **283**: 2478-2487 (2008) 査読有

3. Hirayasu H, Yoshikawa Y, Tsuzuki S, Fushiki T. A lymphocyte serine protease granzyme A causes detachment of a small-intestinal epithelial cell line (IEC-6). *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **72**:2294-2302 (2008) 査読有

4. Yoshikawa Y, Hirayasu H, Tsuzuki S, Fushiki T. Granzyme A causes detachment of alveolar epithelial A549 cells accompanied by promotion of interleukin-8 release. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **72**: 2481-2484 (2008) 査読有

5. Inagaki H, Tsuzuki S, Iino T, Inoue K, Fushiki T. Development of an in vitro system for screening the ligands of a membrane glycoprotein CD36. *Cytotechnology* **57**: 145-150 (2008) 査読有

6. Yoshikawa Y, Hirayasu H, Tsuzuki S, Fushiki T. Carrageenan inhibits granzyme A-induced detachment of and interleukin-8 release from alveolar epithelial A549 cells. *Cytotechnology*, **58**: 63-67 (2008) 査読有

7. Kojima K, Tsuzuki S, Fushiki T, Inouye K. The activity of a type II transmembrane serine protease, matriptase, is dependent solely on the catalytic domain. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **73**: 454-456 (2009) 査読有

8. Kojima K, Tsuzuki S, Fushiki T, Inouye K. Roles of the stem domain of matriptase in the interaction with its physiological inhibitor, hepatocyte growth factor activator inhibitor type I. *J. Biochem.* in press 査読有

#### 〔学会発表〕(計 5 件)

1. 安元 誠ら Matriptase の LDLRA ドメインの HAI-1 との相互作用における意義 日

本農芸化学会 2008. 3. 29 福岡 (マリンメッセ福岡)

2. 持田 誠也ら Pichia pastoris を用いた matriptase 触媒ドメインの生産 日本農芸化学会 2008. 3. 28 福岡 (マリンメッセ福岡)
3. 都築 巧ら グランザイム A による炎症メディエーターの放出機構の解明 日本栄養・食糧学会 2007. 5. 20 京都 (国立京都国際会館)
4. 平康 博章ら グランザイム A による腸管上皮細胞の形態変化と剥落 日本農芸化学会 2007. 3. 26 東京 (東京農業大学)
5. 兒島 憲二ら Membrane-type serine protease 1 (MT-SP1) の阻害における hepatocyte growth factor activator inhibitor type-1 (HAI-1) の各ドメインの役割 日本農芸化学会 2007. 3. 25 東京 (東京農業大学)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

都築 巧 (TSUZUKI SATOSHI)  
京都大学・大学院農学研究科・助教  
研究者番号 : 50283651

##### (2) 研究分担者

井上 和生 (INOUE KAZUO)  
京都大学・大学院農学研究科・准教授  
研究者番号 : 80213148