

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06241

研究課題名(和文)脊椎動物における新奇血液凝固カスケードの探索

研究課題名(英文)Exploration of a novel blood-coagulation cascade in vertebrate

研究代表者

筒井 繁行(Tsutsui, Shigeyuki)

北里大学・海洋生命科学部・准教授

研究者番号：20406911

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)：HjCLは軟骨魚類ネコザメの皮膚から見出されたC-typeレクチンであり、本種の血液凝固を誘導することが示されている。本研究では本レクチンがネコザメ血液凝固因子のどの因子に作用するのかを探索することで、脊椎動物における新奇血液凝固カスケードの全貌を明らかにしようとするものである。HjCLはプロトロンビンに直接的に作用した。また、意外なことに本レクチンはプロトロンビンの糖鎖ではなく、ペプチド鎖に結合することが示唆された。プロトロンビンが自己分解すること、およびHjCLは酵素ドメインを持たないことから、本レクチンの結合によりプロトロンビンの立体構造に変化が生じ、自己分解を誘導するものと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ネコザメの皮膚から単離したC-typeレクチンはネコザメ血漿中のプロトロンビンの分解を誘導した。また、この分解産物はヒトフィブリノーゲンをゲル化した。以上により、レクチンがプロトロンビンに直接的に作用する新奇血液凝固カスケードの全貌が明らかになったと共に、ヒトに対する医療分野にも応用できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Heterodontus japonicus C-type lectin (HjCL), which was isolated from bullhead shark skin, is known to show procoagulant activity. However, how HjCL propagates the blood coagulation pathway has been in black box. In this study, we searched for the target factor of HjCL in the shark plasma and revealed the complete picture of the novel blood coagulation cascade. Addition of HjCL to the shark plasma converted a 120-kDa protein to multiple fragments. Internal amino acid sequences of 120-kDa protein determined with de novo sequencing were matched to the amino acid sequence of the shark prothrombin (ProT). Moreover, HjCL induced the cleavage of the shark ProT purified from plasma, suggesting that HjCL directly affects on the zymogen. It was also revealed that HjCL generates the active enzyme thrombin from ProT. Finally, the fibrin-gel formation was detected from the mixture of HjCL, ProT and fibrinogen. Taken together, it is concluded that HjCL acts as a trigger of a novel coagulation cascade.

研究分野：免疫学

キーワード：レクチン 血液凝固 軟骨魚類 プロトロンビン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

循環系を有する生物は外傷を負った際に血液凝固によりすみやかに止血を行い、血液の流出を防いでいる。止血は創傷治癒に必要な不可欠な生体防御反応であり、哺乳類においては、血球成分のうちのひとつである血小板が血栓を形成する一次止血と、血漿中の種々の血液凝固因子に起因する二次止血に分けられる。後者に属する因子の多くはプロテアーゼの前駆体として存在しており、これらが連鎖反動的に活性化することで、最終的にフィブリノーゲンからフィブリンが形成される。さらに二次止血には内因系と外因系の2つの経路が存在し、ヒトでは13種類もの血液凝固因子が関与している。

魚類においても血液凝固が生じる。しかし魚類には血小板は存在せず、代わりに栓球と呼ばれる血球が同様の役割を担っている。また、全てではないものの、魚類においても哺乳類の血液凝固因子のホモログが多数同定されている。事実、トラフグのゲノムには、内因系に關与する3つの分子を除く、全ての血液凝固因子の遺伝子が存在することが示されている。よって、魚類においても、哺乳類と同様の外因系経路が備わっているものと考えられている。

一方で、興味深いことに、ヘビ毒が哺乳類の血液凝固を促進、または抑制することが知られており、ネズミなどの餌生物の捕食に重要であるとされている。一般に、ヘビ毒には様々な生理活性を示す様々なタンパク質が存在する。このうち、毒成分は神経毒と出血毒に分類され、種によって持つ成分が異なるが、出血毒の主な成分にはC型レクチン様タンパク質と血液凝固インヒビター、血液凝固アクティベーターがあげられる。C型レクチン様タンパク質は、カルシウムイオン依存的に糖鎖に結合するC型レクチンと相同性を示す分子であるが、そのリガンドは糖鎖ではなく、例えばハブ毒中のそれは血小板受容体や血液凝固因子の第IX因子および第X因子に強く結合する。その結果、血小板による血栓の形成や二次止血カスケードが抑制され、血液凝固が阻害される。血液凝固インヒビターはハブやハヤッポダといったヘビの毒に含まれ、第X因子および第XI因子に結合することで抗凝固活性を示し、結果的に餌生物は失血死する。一方、血液凝固アクティベーターとしてラッセルクサリヘビのメタロプロテアーゼが有名であり、これは第X因子やプロトロンピンを直接切断し、凝固を促進する。その結果、餌生物の血液凝固因子が咬傷部で局所的に消費されることにより枯渇し、餌生物を失血死させる。なお、ヘビ毒中には、糖鎖との結合能を有する「真の」C型レクチンも存在しているが、血液凝固への関与は不明である。

HjCLは申請者らが軟骨魚類ネコザメ *Heterodontus japonicus* の皮膚から単離した分子量約14 kDaのC型レクチンであり、様々な糖と結合するユニークなレクチンである (Tsutsui et al. 2015*)。系統解析の結果、興味深いことに本レクチンはヘビ毒のC型レクチンに近縁であることが示された。加えて特筆すべきことに、**本レクチンがネコザメの血液凝固を促進することが明らかとなった** (図1)。

HjCLはネコザメの表皮の大型細胞にのみ局在しており、通常は血液と接触することはないと思われる。これらのことから、ネコザメが受傷した際、血管から表皮を通じて体外に血液が流出した際にHjCLが血液凝固因子に作用し、止血を促進するとの仮説を立てた。

ネコザメの血漿をゲルろ過で分画し、そこにHjCLを添加して、未添加群とのバンドパターンの相違をSDS-PAGEで比較したところ、図2に示すように、ある画分において約120 kDaのタンパク質が切断されることが明らかとなった (筒井 未発表)。この結果は、この120 kDaタンパク質が血液凝固因子であり、HjCLによって活性化となり、さらに下流の血液凝固カスケードを活性化していることを示唆している。

*J. Biochem. 157(5): 345-356.

HjCL添加群 HjCL未添加群



図1. HjCLによるネコザメ血漿の凝固促進
HjCL添加血漿をろ紙に滴下した図。凝固が生じているため、ろ紙に吸収されない。

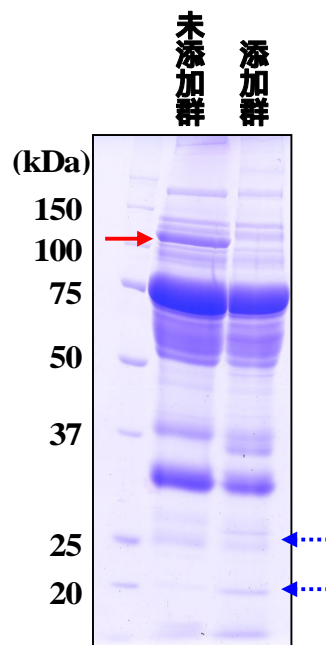


図2. HjCL添加による血漿タンパクの変化
赤い矢印 (実線) は切断前の、青い矢印 (点線) は切断後のタンパク質を示す。

2. 研究の目的

これまでにレクチンがトリガーとなるカスケードは知られていない。そこで**本研究はC型レクチンHjCLが起点となる新奇血液凝固カスケードの全容解明を目的とする。**

3. 研究の方法

まずはHjCLの添加によって切断される120 kDaタンパク質の同定を試みた。具体的にはSDS-PAGE後のゲルからバンドを切り出し、TOF/MSを用いたde novoシーケンシングにより内部アミノ酸配列を決定した。これをblast検索に供し、相同性を示す配列を検索した。

RNA-seqを用いて、ネコザメの肝臓で発現している遺伝子の配列を網羅的に得た。これをレファレンスとし、得られた内部アミノ酸配列を演繹アミノ酸配列内に含むものを抽出した。

哺乳類の方法を応用し、硫酸バリウムに対するアフィニティークロマトグラフィーおよび2つの異なる陰イオン交換カラムを用いて、ネコザメ血漿からプロトロンピンを精製した。ネコザメプロトロンピンの性状を調べるとともに、精製品にHjCLを添加し、分解が生じるかを調べた。

HjCLがプロトロンピンと結合するかをバイオレイヤー干渉法で調べた。即ち、精製したネコザメプロトロンピンを電極に固相化した後、アナライトとしてHjCLを供し、シグナルを測定した。

HjCLの添加によって分解されたトロンピンがプロテアーゼ活性を有するかを調べるために、活性型プロテアーゼの酵素領域に不可逆的に結合するPPACKを用いて検証した。即ち、HjCLと反応させたネコザメプロトロンピンにピオチン標識PPACKを添加した後、SDS-PAGEで分離した。メンブレンに転写後、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン及びDAB発色系を用いて染色した。

HjCLの添加によって分解されたトロンピンがフィブリノーゲン分解能を有するか、また、本レクチンがヒトの血液凝固カスケードにも作用しうるかを調べるために、市販のヒトプロトロンピンおよびヒトフィブリノーゲンにHjCLを添加し、フィブリンゲルの形成を経時的に濁度を測定することで検証した。

HjCLによるプロトロンピンの活性化が糖によって阻害されるかを調べるため、6種類の単糖とHjCLを反応させた後にネコザメプロトロンピンと反応させ、分解の程度を糖未添加群と比較した。

HjCLがプロトロンピンのペプチド鎖に結合するのか、そうだとするとプロトロンピンのどのドメインに結合するのか、プロトロンピンの欠失変異体を作製し、フィブリンゲルの形成を同様の手法で検討した。即ち、ヒトプロトロンピンをトロンピンまたはキモトリプシンで処理し、ガンマカルボキシルグルタミン酸ドメインおよびクリングル1ドメインを欠くプロトロンピン1と、シマカルボキシルグルタミン酸ドメインを欠くGD-プロトロンピンを得て、HjCLとヒトフィブリノーゲンと混合した。

4. 研究成果

de novoシーケンシングにより120 kDaタンパク質から16個の内部アミノ酸配列が得られた。これらの配列はデータベースに登録されていたジンベイザメのプロトロンピンに相同性を示した。

de novoシーケンシングで得られた内部アミノ酸配列は、RNA-seqで決定したネコザメプロトロンピン様配列にほぼ完全にマッピングされた。とより、HjCLがネコザメのプロトロンピンに直接作用するか、あるいは他の因子を活性化し、それがプロトロンピンを切断しているものと考えられた。

SDS-PAGEで単一のバンドが得られ、且つ内部アミノ酸配列がネコザメプロトロンピンと一致したことから、高純度のネコザメプロトロンピンの精製に成功した。本分子のSDS-PAGE上での分子量は約120 kDaであり、アミノ酸配列から計算した分子量との比較から、40 kDa程度の巨大な糖鎖が付加しているものと思われた。これを裏付けるように、グリコシダーゼ処理によりネコザメプロトロンピンの分子量は40 kDaほど減少した。また、HjCLの添加により本分子が分解されたことから、HjCLが直接プロトロンピンに作用するものと思われた。

HjCLの添加直後からシグナルの上昇が認められ、HjCLがネコザメプロトロンピンに結合する事が示された。一方で添加から一定時間が経過するとシグナルの急激な低下が認められた。このことからHjCLによって活性化されたプロトロンピンが自己消化を起こし、電極から一部が解離した可能性が考えられた。

トロンピンのプロテアーゼドメインに相当する約35 kDaの位置にバンドが検出されたことから、HjCLによりプロトロンピンから転換されたトロンピンが酵素活性を有することが示された。

ゲル形成を示す濁度の上昇が認められ、HjCLによって誘導されたトロンピンがフィブリン形成能を有すること、およびHjCLがネコザメのみならずヒトの血液凝固系にも作用することが明らかとなった。

糖の添加はHjCLのプロトロンピン分解誘導能に影響を与えなかった。このことからHjCLはプロトロンピンの糖鎖ではなく、ペプチド鎖に作用することが示唆された。

2つのプロトロンピン変異体にHjCLおよびフィブリノーゲンを加えてもゲル化は起こらなかった。これらの変異体は共通してガンマカルボキシルグルタミン酸ドメインを持たないことから、HjCLはプロトロンピンの同ドメインに結合するものと思われた。

以上の結果より、HjCLが既知の血液凝固カスケードの下流から2番目に位置するプロトロンピンに

直接作用し、活性型となったトロンピンがフィブリノーゲンをフィブリンに転換する新奇血液凝固カスケードの全容が明らかとなった。一方でHjCLはプロテアーゼドメインを持たないことから、プロトロンピンの活性化、即ち切断はHjCLによるものではなく、HjCLがガンマカルボキシルグルタミン酸ドメインに結合することでプロトロンピンの立体構造が変化し、酵素ドメインが露出して自己消化を誘発している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Matsui Shintaro, Nakamura Osamu, Tsutsui Shigeyuki	4. 巻 193
2. 論文標題 Unique properties of prothrombin in the bullhead shark <i>Heterodontus japonicus</i> : the first report of purification and characterization of a blood coagulation factor in Chondrichthyes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Comparative Physiology B	6. 最初と最後の頁 71 ~ 80
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00360-022-01472-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松井信太郎
2. 発表標題 ネコザメ皮膚Cタイプレクチンを起点とする新奇血液凝固カスケードの分子メカニズムの解明
3. 学会等名 第6回コニーク会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松井信太郎、中村修、筒井繁行
2. 発表標題 ネコザメ皮膚C-typeレクチンを起点とする新奇血液凝固系
3. 学会等名 日本比較免疫学会第33回学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松井信太郎、中村修、筒井繁行
2. 発表標題 ネコザメC-typeレクチンによるプロトロンビン活性化機構
3. 学会等名 日本比較免疫学会第33回学術集会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------