

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月30日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590441

研究課題名（和文） 血漿内 S19 リボソームタンパク質の血液凝固に伴う単球走化能獲得機構と凝血処理機能

研究課題名（英文） Studies on the mechanism to gain monocyte chemotactic capacity of ribosomal protein S19 and its role in coagulum resorption.

研究代表者

山本 哲郎 (YAMAMOTO TETSURO)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授

研究者番号：60112405

研究成果の概要（和文）：

細胞内タンパク合成装置の構成成分のリボソームタンパク質 S19 (RP S19) が正常の血漿中に存在することは報告していた。当該研究においては、この血漿 RP S19 が血液凝固の過程で活性化血小板の膜表面で活性化型 XIII 因子の作用を受けて架橋化二量体となり単球特異的な走化性を獲得すること、その結果単球を凝血塊に向けて動員させて凝血塊の吸収を促すこと、末梢血の単球を増多させると凝血塊吸収が促進することなどを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

In the present research, we have revealed that ribosomal protein S19 (RP S19) present in normal blood plasma is covalently dimerized by activated factor XIII on the activated platelet surface and gains monocyte chemotactic capacity during blood coagulation process, that the RP S19 dimer recruits monocytes to the coagulum resulting in cellular fibrinolytic absorption of the coagulum, and that monocytotic state of peripheral blood enhance the coagulum resorption process.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学・炎症

キーワード：リボソームタンパク質 S19, プロトロンビン, 血液凝固反応, 凝固 XIII 因子, 血小板, 線溶

1. 研究開始当初の背景

(1) リボソームタンパク質 S19 (RP S19) は細胞のアポトーシスの過程で細胞内のトランスグルタミナーゼの作用で架橋二量体化（もしくは多量体化）されて細胞外に遊離

され、その細胞の C5a 受容体に結合してアポトーシスを促進させる一方で、単球/マクロファージの C5a 受容体に結合することで走化性を惹起して動員し、アポトーシス細胞を速やかに貪食させるというリボソーム外機能

を持つことを報告していた。

(2) 分子量約 16,000 の細胞内タンパク質である RP S19 が正常のヒトやモルモットの血漿中に存在することを見出していた。しかし、その由来、安定して血漿中に存在できる理由、また、生体にとっての役割については明らかにできていなかった。

2. 研究の目的

(1) 血液凝固 XIII 因子がトランスグルタミナーゼの前駆体であることから、血液凝固反応の過程で血漿の RP S19 は活性化型 XIII 因子の作用を受けて架橋二量体化されて単球走化活性を獲得する可能性が想定された。また、RP S19 にはヘパリンなどの負の荷電分子に結合する分子内領域があることから、架橋二量体化反応は、活性化されてホスファチジルセリン分子が細胞膜表面に露出した血小板の表面上で起きることが想定された。これらの仮説を *in vitro* の実験で明らかにすることを目的の一つとした。

(2) 血液凝固の過程で上記の反応が起きるとすると、演繹的に、生成した RP S19 二量体の作用により単球/マクロファージが凝血塊に向けて動員されることになる。それは、単球/マクロファージの細胞性線溶機能や貪食能により凝血塊を吸収する結果となることが想定された。この仮説を *in vivo* の実験で明らかにすることをもう一つの目的とした。

3. 研究の方法

(1) *in vitro* での血液凝固の過程で RP S19 架橋化二量体が生成されたかどうかは、抗 RP S19 抗体で抑制できる単球走化活性の出現と、ウエスタンブロット法による RP S19 二量体分子形成の観察により行った。単球走化活性は、末梢血から分離した単球を用いたマイクロウェルチャンパー法により定量した。

(2) 凝固 XIII 因子の関与については、XIII 因子欠損血漿とそれを精製 XIII 因子で再構成した血漿それぞれに、末梢血から分離した血小板を加えて富血小板血漿にしたものを用いての比較実験により検討した。

(3) 血小板の関与については、乏血小板血漿と富血小板血漿とを用いての比較実験により検討した。血小板の有無にかかわらず同様な濃度のトロンビンを遊離させるために、蛇毒から精製されたプロトロンビン活性化

プロテアーゼ CA-1 を用いて凝固反応を開始させた。

(4) 活性化血小板表面のホスファチジルセリンの関与については、ホスファチジルセリンに高親和性を持つアネキシン V の共存の有無、並びに、ホスファチジルセリンを含むリポソームと含まないものを血小板に代替させる条件下での比較実験により検討した。

(5) *in vivo* の実験は、モルモットの心臓血 1 ml をガラス管内で凝固させ、それを麻酔下に開腹したモルモットの腹腔内に挿入して縫合閉腹し、経時的あるいは経日的に回収して、重量測定と組織学的観察により、凝血塊の吸収速度とマクロファージの浸潤状態を観察する系を考案して実施した。なお、比較が必要な場合には、2 本の凝血塊の片方に微量の蛍光標識タンパク質を混在させて目印とし、セットで腹腔内に挿入した。

(6) 光学顕微鏡用組織標本は、PFA 固定パラフィン切片のヘマトキシリン・エオジン染色と、PLP 固定凍結切片の抗マクロシアリン抗体を用いた免疫染色とナフチル酢酸を用いたマクロファージ特異的エステラーゼ組織化学染色により観察した。

(7) 走化型電子顕微鏡観察は、凝血塊を PFA 固定後、金コロイドを蒸着させて行った。また、透過型電子顕微鏡観察は、グルタルアルデヒドと PFA で固定後に酸化オスミウムで抗固定してエポンに包埋し、超薄切片を鉛染色して行った。

4. 研究成果

(1) 正常ヒト末梢血あるいは富血小板血漿に CA-1 を加えて凝固させて得た血清中には強い単球走化活性が出現した。この活性は、抗 RP S19 抗体ビーズで吸収された。一方、乏血小板血漿から得られた血清中には明らかに弱い走化活性しか認められなかった。さらに、あらかじめ抗 RP S19 抗体カラムで処理した血漿を富血小板血漿化して調製した血清中には単球走化活性は出現しなかった。

これらのことから、血漿中の RP S19 は血液凝固の過程で単球走化活性を獲得することが明らかとなった。また、その過程では血小板が必要であること、しかし RP S19 が血小板から供給されるわけではないことも明らかになった。

(2) 血漿と血清について、抗 RP S19 抗体

を用いたウエスタンブロッティングを行ったところ、血漿中には RP S19 の単量体に相当する移動度の部位のみにバンドが認められ、血清中では、そのバンドが明らかに弱くなるとともに、二量体に相当する移動度の部位に新たなバンドが出現した。

これらのことから、血漿中の RP S19 は血液凝固の過程で二量体化されることが明らかになった。

(3) 凝固 XIII 因子欠損血漿を富血小板血漿化して調製した血清中には単球走化活性は出現しなかった。ところが、精製した XIII 因子を加えて再構築したものを使って同様のことを行ったところ、正常富血小板血漿から得られた血清と同じ程度の単球走化活性が出現した。ただし、その際にトランスグルタミナーゼ阻害剤を共存させた場合には単球走化活性は出現しなかった。

これらのことから、血漿中の RP S19 が凝固の過程で二量体化して単球走化活性を獲得するには活性型 XIII 因子、すなわち血漿トランスグルタミナーゼの作用が必要であることが明らかになった。

(4) 富血小板血漿から血清を調製する際にホスファチジルセリンに強い親和性を持つアネキシン V を共存させておいたところ、アネキシン V の濃度に依存して単球走化活性の出現が抑制された。そこで、ホスファチジルセリンをそれぞれ 0%、10%、30%含むリポソームを乏血小板血漿に加えた後に凝固させて血清を得たところ、ホスファチジルセリン含有濃度が高いほど強い単球走化活性が出現した。また、その単球走化活性は抗 RP S19 抗体で抑制された。

これらのことから、血漿中の RP S19 が活性型 XIII 因子により架橋二量体化される反応はホスファチジルセリンを豊富に持つ活性化血小板の表層で進行することが明らかになった。

(5) モルモットを用いた *in vivo* の実験において、心臓血から調製した凝血塊を腹腔に挿入し、経時的に回収して表面を走査型電子顕微鏡で観察したところ、6 時間目ごろから表層は白血球と思われる球状の細胞で覆われ始め、24 時間目には完全に覆われた。凝血塊の切片を光学顕微鏡で観察したところ、表層を覆っている細胞はマクロファージであった。更に日にちがたつと、覆っているマクロファージの層は重層化していた。また、マクロファージは凝血塊内部にも浸潤してい

た。そこで、両細胞を透過型顕微鏡で観察したところ、表層のマクロファージは立方形の形態をとり、細胞間に向けて複雑な突起を出してあって相互に結合しあうとともに底部ではフィブリンに結合していた。貪食像は全く認められなかった。一方、内部に浸潤したマクロファージは球形または卵形の自由細胞として存在し、赤血球を多数貪食していた。そこで、光学顕微鏡を用いた免疫組織化学ならびに酵素組織化学を行ったところ、表層のマクロファージは、マクロファージ特異的エステラーゼを豊富に持つ一方で、貪食リソソームに存在するマクロシアリンに対する抗体ではほとんど染まらなかった。一方、凝血塊内部に侵入したマクロファージは全く逆の染色パターンを示した。

これらのことから、凝血塊を腹腔内に挿入した場合にはそれに向けたマクロファージの浸潤が速やかに起きること、マクロファージは表層を覆う細胞と内部に侵入して貪食処理する細胞の二方向に分化することが明らかとなった。

(6) 凝血塊を調製する際に、抗 RP S19 抗体あるいは蛍光標識正常ウサギ IgG を共存させ、それら 2 本の凝血塊をセットで腹腔内に挿入し、1 日後あるいは 3 日後に回収して観察したところ、抗 RP S19 抗体を含む凝血塊は、極めて数少ないマクロファージがバラバラに表層に付着しているのみであった。また、凝血塊内部にはマクロファージに替って多核球が浸潤していた。次に、凝血塊を調製する際に、機能的な二量体化ができない Gln137Asn-RP S19 変異組換え体もしくは野生型 RP S19 組換え体を共存させておいたものを調製してセットで挿入したところ、Gln137Asn-RP S19 変異組換え体を加えた方は抗体を共存させたものと類似の形態像を示した。

これらのことから、凝血塊の表層を覆うマクロファージ並びに内部に浸潤するマクロファージは、ともに凝血塊中の RP S19 架橋二量体の作用により動員されることが明らかになった。

(7) 上記 (6) の実験において 3 日目に回収した凝血塊の重量を測定したところ、抗 RP S19 抗体あるいは Gln137Asn-RP S19 変異組換え体を含む方では、重さの減少が有意に遅延していた。一方、RP S19 二量体と同じ単球/マクロファージ特異的な走化活性を持つ C5a/ RP S19 組換えタンパク質を共存させたものでは、正常の凝血塊に比して重量が明ら

かに減少していた。

これらのことから、RP S19 二量体によるマクロファージの凝血塊への動員は、マクロファージの細胞性線溶機能や食食能を介して凝血塊の吸収をもたらすことが明らかになった。

(8) 事前に5日間ヒト単球コロニー刺激因子を投与して単球増多症にしたモルモットを用いて同じ実験をしたところ、凝血塊には極めて多数のマクロファージが浸潤し、一部は巨細胞化していた。そして、正常のモルモットの場合よりも凝血塊の重量は明らかに減少していた。ところが、抗 RP S19 抗体を含ませた凝血塊の場合には、単球増多症モルモットと正常モルモットの間に全く差を認めなかった。

これらのことから、RP S19 二量体が機能する凝血塊吸収の場合には、単球増多症状態にすることでさらに吸収効率を高めることができることが明らかになった。

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6件)

① Nishiura, H., Tanase, S., Tsujita, K., Sugiyama, S., Ogawa, H., Nakagaki, T., Semba, U., and Yamamoto, T. : Ribosomal protein S19 is present in plasma as a complex with prothrombin. 、 *Eur. J. Haematol.*、査読有、86: 436-441, 2011. DOI:10.1111/j.1600-0609.2011.01585.x

② Ota, Y., Chen, J., Shin, M., Nishiura, H., Tokita, K., Shinohara, M., Yamamoto, T. : Role of ribosomal protein S19-like plasma protein in blood coagulum resorption.、 *Exp. Mol. Pathol.*、査読有、90 : 19-28, 2010.

③ Nishiura, H., Chen, J., Ota, Y., Semba, U., Higuchi, H., Nakashima, T., Yamamoto, T. : Base of molecular mimicry between human ribosomal protein S19 dimer and human C5a anaphylatoxin.、 *Int. Immunopharmacol.*、査読有、10(12) : 1541-1547, 2010

④ Jia, N., Semba, U., Nishiura, H., Kuniyasu, A., Nsiama, T.K., Nishino, N., and Yamamoto, T. : Inter-conversion between pure chemotactic ligands and

chemoattractant/secretagogue ligands of neutrophil C5a receptor by a single amino acid substitution.、 *J. Leukocyt. Biol.*、査読有、87 : 965-975, 2010.

⑤ Semba, U., Chen, J., Ota, Y., Jia, N., Arima, H., Nishiura, H., and Yamamoto, T. : A Plasma Protein Indistinguishable from Ribosomal Protein S19: Conversion to a Monocyte Chemotactic Factor by a Factor XIIIa-Catalyzed Reaction on Activated Platelet Membrane Phosphatidylserine in Association with Blood Coagulation. *Am. J. Pathol.*、査読有、176 : 542-1551, 2010.

⑥ Nishiura, H., Nonaka, H., Revollo, I., Semba, U., Li, Y., Irie, A., Harada, K., Kehrl, J. H. and Yamamoto, T. : Pro- and anti-apoptotic dual functions of the C5a receptor: Involvement of regulator of G protein signaling 3 and extracellular signal-regulated kinase.、 *Lab. Invest.*、査読有、89 : 676-694, 2009.

[学会発表] (計9件)

① Umeko Semba, Hiroshi Nishiura, Tetsuro Yamamoto : Ribosomal protein S19-prothrombin complex in plasma and its role in coagulum resorption. 第36回日本微小循環学会総会、2011年2月11日、愛知県・名古屋市立大学大ホール

② Hiroshi Nishiura, Tetsuro Yamamoto : A molecular mimicry basis on the two-step binding structure to the C5a receptor between ribosomal protein S19 homodimer cross-linked by transglutaminase and C5a anaphylatoxin. 第83回日本生化学会大会、2010年12月10日、兵庫県・神戸ポートアイランド

③ Umeko Semba, Hiroshi Nishiura, Sumio Tanase, Tetsuro Yamamoto : Maintenance of ribosomal protein S19 in plasma by complex formation with prothrombin. 第83回日本生化学会大会、2010年12月10日、兵庫県・神戸ポートアイランド

④ Tetsuro Yamamoto : Conversion of a ribosomal protein S19-like plasma protein to a monocyte chemotactic factor on activated platelets during blood coagulation. 第83回日本生化学会大会

2010年12月9日、兵庫県・神戸ポートアイランド

⑤ 西浦 弘志, 山本 哲郎: 第2の補体 C5a リセプターリガンドにより活性化するヒト肥満細胞株 HMC-1 内の新たな Gi 蛋白質依存性 p38MAPK-TRPM 経路. 第82回日本生化学会大会、2009年10月24日、兵庫県・神戸ポートアイランド

⑥ 山本 哲郎: S19 リボソームタンパク質の凝固 XIIIa 因子による架橋二量体化とその凝血塊吸収における役割. 第82回生化学会大会、2009年10月23日、兵庫県・神戸ポートアイランド

⑦ 千場 梅子, 諫 俊, 太田 宜彦, 西浦 弘志, 山本 哲郎: 血漿に含まれる S19 リボソームタンパク質様分子の血液凝固に伴う架橋二量体化機構. 第82回日本生化学会大会、2009年10月22日、兵庫県・神戸ポートアイランド

⑧ 太田 宜彦, 千場 梅子, 諫 俊, 西浦 弘志, 山本 哲郎: 血漿の S19 リボソームタンパク質様分子の二量体化と単球 C5a レセプターの凝血塊吸収における役割. 第46回補体シンポジウム、2009年8月21日、福岡県・九州大学西新プラザ大会議室

⑨ 太田 宜彦, 山本 哲郎: 血漿中の S19 リボソームタンパク質様分子の血液凝固に伴う単球走化活性の獲得と凝血塊除去における役割. 第98回日本病理学会総会、2009年5月1日、京都府・国立京都国際会館

[図書] (計1件)

① T. Yamamoto and H. Nishiura、
Extraribosomal functions of ribosomal
protein S19 In Ribosomal Proteins and
Protein Engineering: Design, Selection
and Applications. (Valter Ortendhal,
Hjalmar Salchow eds.)、Nova Scientific
Publishers、2010、pp21-39

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 哲郎 (YAMAMOTO TETSURO)
熊本大学・大学院生命科学研究部・教授
研究者番号: 60112405