

## 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 25 年 5 月 1 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590348

研究課題名（和文）

血漿 S19 リボソームタンパク質の細胞性免疫反応における役割

研究課題名（英文）

Role of plasma ribosomal protein S19 in cellular immunity

研究代表者

千場 梅子（SEMBA UMEKO）

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教

研究者番号：50109691

研究成果の概要（和文）：結核菌（死菌）を血漿に曝すと、血液凝固反応に伴い、血漿中のリボソームタンパク質 S19（RP S19）が結核菌膜上の負荷電領域を足場にして血漿トランスグルタミナーゼ（FXIIIa）により架橋二量体化され、単球の C5a レセプターを介して単球／マクロファージを動員することが明らかになった。このことから、結核菌が局所に侵入したとき、血管外へ透過した RP S19 が上記の機序で架橋されて単球／マクロファージを動員し、菌を貪食処理すると考えられた。この単球走化には、補体活性化産物 C5a も関与していた。結核菌感染に対する自然免疫反応に、補体系とともに RP S19 も関わっていることが示された。

研究成果の概要（英文）：When mycobacterial dead cells were exposed to plasma, ribosomal protein S19 (RP S19) was cross-linked by a transglutaminase-catalyzed reaction on the mycobacterium membrane, working as the negatively charged scaffold, during blood coagulation. The cross-linked RP S19 dimer induced chemotactic response of monocytes/macrophages recruitment via C5a receptor, suggesting phagocytosis of mycobacterium by recruited macrophages. C5a anaphylatoxin was partly involved in this monocyte chemotaxis. It was demonstrated that RP S19 participated in innate immunity against the mycobacterium infection in association with C5a.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2011 年度	600,000	180,000	780,000
2012 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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

キーワード：RP S19・補体系・結核菌

## 1. 研究開始当初の背景

RP S19 はリボソーム小サブユニットの構成成分であるが、我々は、アポトーシスの過程で RP S19 が架橋二量体化されて細胞外に遊

離されると、単球の走化性 C5a レセプターに結合することにより単球を浸潤させ、アポトーシス細胞を貪食処理させることを見出した。その際、貪食マクロファージは T 細胞系

にアポトーシス細胞由来の抗原を提示することで、自然免疫を応答免疫に繋ぐ役割を果たすことも見出した。

一方で、RP S19 が正常の血漿中にも存在することを見出し、この血漿 RP S19 も血液凝固の過程において、活性化血小板膜のフォスファチジルセリン分子上（負荷電）で、血漿トランスグルタミナーゼ（活性型凝固 FXIII 因子）の作用により架橋二量体化され、単球／マクロファージを動員して、凝血塊を貪食処理させることが明らかになった。

他方で、結核感染に対する応答免疫反応と、血管外での血液（血漿）凝固反応および単球／マクロファージの緊密な連携が従来から指摘されてきた。血管外での血漿の凝固には、侵入してきた細菌が拡散しないよう局所に止め、かつ単球／マクロファージを呼び寄せて貪食させ、菌の増殖を防ぐという機能が残されていると考えられる。事実我々は、血漿タンパク質の多くが血漿濃度の3分の1程度の濃度で、正常の血管外の間質液中に存在し、生体防御上の役割を發揮することを報告した。

## 2. 研究の目的

背景で述べた RP S19 のリボソーム外機能に着目して、その医学生物学的役割を生体防御機能という観点から明らかにしようとするものである。具体例として、結核感染防御において、血管外へ透過した血漿 RP S19 が結核菌膜上で架橋二量体化されて、単球／マクロファージを動員し菌を貪食処理させるとともに、結核菌に対する細胞性免疫能を獲得させるのではないかという仮説を立て、実験的に検証することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### 1) 結核菌による血液凝固反応の検討

結核菌（青山株）死菌を用い、血漿に曝すことで、血漿の内因系凝固カスケードが活性化されるかどうかを検討した。結核菌懸濁液を乏血小板血漿と混和しながら 37°C でインキュベーションし、過剰のカルシウムを添加してのち凝固するまでの時間をコアグロメーターにて測定した。

### 2) RP S19 架橋化二量体生成の確認および架橋二量体化機構の検討

pH 7.4 の生理的条件下、結核菌混濁液を乏血小板血漿と混和し、凝固反応を行い、上清（血清）中に RP S19 架橋化二量体が出現するかどうかを、マイクロウェルチャンバー法を用いた単球走化活性の測定、および抗 RP S19

抗体を用いたウェスタンブロッティングにより検討した。

単球走化活性が、C5a リセプターを介した反応であるかどうか、C5a リセプターアンタゴニストを用いて検討した。RP S19 の架橋二量体化に、負の荷電を持つ結核菌膜構成分子と血液凝固 XIII 因子が必須であるかどうかを検討した。前者には正の荷電体である Glucosamine (GlcN) を、後者には XIII 因子欠損血漿および活性型 XIII 因子 (XIIIa) の阻害剤である *p*-chloromercuriphenyl-sulfonic acid (PCMPS) を用いて、単球走化活性が抑制されるかどうかを検討した。

### 3) 補体系の関与についての検討

① 結核菌存在下、好中球走化活性が引き起こされるかを検討した。

② C5a の不活化剤である carboxypeptidase B (CPB) で血漿を処理したときの単球走化活性を調べた。

③ 3つの補体活性化経路全てを遮断するため抗ヒトC3抗体ビーズを作製し、血漿を前処理したときの単球走化活性を調べた。

④ 予め 56°C、30分処理して補体系を壊した FXIII 欠損血漿を用いたときの単球走化活性を調べた。

### 4) Gln137Asn-RP S19 変異体遺伝子導入マウス血漿を用いた実験

我々の研究室では、RP S19 架橋化二量体の生成ができない Gln137Glu-RP S19 変異体遺伝子導入マウスを作製した。そのマウスの血漿を用いて、結核菌により凝固反応が起こるかどうかを検討した。

## 4. 研究成果

### 1) 結核菌による内因系血液凝固カスケードの活性化

pH 7.4 の生理的条件下、結核菌を乏血小板血漿に曝したとき、結核菌懸濁液の濃度依存性に凝固時間の短縮が認められた。結核菌を超音波処理して負の荷電を増加させると、未処理の場合に比し血漿の凝固時間はさらに短縮した。

### 2) RP S19 架橋化二量体の確認および単球走化誘導

血液凝固反応後の上清（血清）中に RP S19 架橋化二量体の生成が認められた。結核菌の超音波処理により、血清中の RP S19 架橋化二量体の生成も増加した。得られた血清には単球走化活性が認められ、抗 RP S19 抗体により抑制された。また C5aR アンタゴニスト

により走化活性は抑制されたことから、C5a リセプターを介した反応であることが判明した。

### 3) RP S19 架橋二量体化機構

正の荷電体である GlcN を共存させると、GlcN の濃度依存性に単球走化活性が抑制された。FXIII 因子欠損血漿において単球走化活性は認められなかったが、FXIII を添加して正常血漿を再構築すると走化活性は回復した。活性型 XIII 因子 (XIIIa) の阻害剤である *p*-chloromercuriphenylsulfonic acid (PCMPs) を共存させると、単球走化活性が抑制された。以上のことから、血漿中の RP S19 の二量体化には、結核菌膜上の負荷電領域および FXIIIa が必須であることが明らかとなった。

### 4) 単球走化誘導への補体系の関与

①結核菌存在下、好中球の走化活性が出現し、活性はC5aリセプターアンタゴニストにより抑制された。この活性にFXIIIの関与は認められなかった。

②FXIII 欠損血漿では、CPB 処理により C5a を不活化すると単球走化活性は消失した。FXIII を添加して正常血漿を再構築すると走化活性は上昇したが、CPB 処理により抑制された。

③予め 56°C、30 分処理して補体系を壊した FXIII 欠損血漿を用いたとき、結核菌による単球走化活性は殆ど消失した。

④抗ヒト C3 抗体ビーズによりヒト乏血小板血漿を前処理し、C5a の産生を抑制した。その後結核菌に曝すと、血清化後の単球走化活性は抑制された。

5) 架橋二量体の生成ができないQ137E-RP S19変異体遺伝子導入マウスの血漿では、内因系凝固カスケードの活性化が有意に遅延した。

研究の結果、結核菌（青山株）死菌をヒト乏血小板血漿に曝したとき、凝固反応に伴い RP S19架橋二量体が生成されること、RP S19 架橋二量体化には結核菌膜上の負荷電領域および血漿トランスグルタミナーゼ (FXIIIa) が必須であること、また生成した RP S19 架橋二量体はC5aリセプターを介して単球を遊走させることが明らかになった。これらの事実は、結核感染防御において、血管外へ透過した血漿 RP S19が結核菌膜上で架橋二量体化されて、単球/マクロファージを動員し菌を貪食処理させるという我々の仮説を、強く支持するものと考えられる。

但し、血漿中に結核菌が存在するとき引き起こされる単球走化活性には、RP S19 架橋二量体のみならず、補体活性化産物 C5a も関与していることが明らかになった。おそらく、結核菌膜表面に存在するリポグリカンや糖鎖が、血漿中の MBL やフィコリンと結合して補体レクチン経路を活性化すると考えられる。

結核菌感染に対する自然免疫反応に、補体系とともに RP S19 も関与していることが示された。

### 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 3 件)

①Xie P, Nishiura H, Semba U, Chen J, Zhao R, Kuniyasu A, Yamamoto T. Inhibitory effects of C4a on chemoattractant and secretagogue functions of the other anaphylatoxins via Gi protein-adenylyl cyclase inhibition pathway in mast cells. *Int. Immunopharmacol. Jan;12(1): 158-68. 2012. 査読有*  
doi: 10.1016/j.intimp.2011.11.006.

②Nishiura H, Tanase S, Tsujita K, Sugiyama S, Ogawa H, Nakagaki T, Semba U, Yamamoto T. Maintenance of ribosomal protein S19 in plasma by complex formation with prothrombin. *Eur J Haematol. May;86(5):436-41, 2011. 査読有*  
doi: 10.1111/j.1600-0609.2011.01585.x.

③Nishiura 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. 10(12): 1541-7, 2010. 査読有*  
doi: 10.1016/j.intimp.2010.09.002.

[学会発表] (計 5 件)

① Nishiura H, Chen J, Semba U, Yamamoto T. Involvement of cross-linked ribosomal protein S19 oligomers and C5a receptor in definitive erythropoiesis. 第 38 回日本微小循環学会総会 2013. 2. 9. 東京慈恵会医科大学 (東京)

②千場梅子、謙俊、西浦弘志、山本哲郎. リボソームタンパク質 S19 架橋化多量体の赤

血球造血への関与. 第 85 回日本生化学会  
大会 2012. 12. 15. 福岡国債会議場 マリ  
ンメッセ福岡 (福岡)

③ 千場梅子、諫俊、山本哲郎. 血漿リボソ  
ムタンパク質 S19 の結核菌感染に対する自然  
免疫における役割. 第 84 回日本生化学会  
大会. 2011. 9. 22. 国立京都国際会館 (京都)

④ Yamamoto T, Semba U, Nishiura H. Role of  
plasma ribosomal protein S19 and  
coagulation factor XIIIa in cellular  
fibrinolysis and innate immunity against  
mycobacterial infection. 第 84 回日本生化学  
学会大会. 2011. 9. 21. 国立京都国際会館 (京  
都)

⑤ Semba U, Nishiura H, Yamamoto T.  
Ribosomal protein S19-prothrombin  
complex in plasma and its role in coagulum  
resorption. 第 36 回日本微小循環学会年次  
総会. 2011. 2. 11. 名古屋市立大学病院 (名  
古屋)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

千場 梅子 (SEMBA UMEKO)  
熊本大学・大学院生命科学研究部・助教  
研究者番号：50109691

### (2) 研究分担者

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