

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590275

研究課題名(和文) サイトカインLECT2レセプターの性状・機能とシグナル伝達の解析

研究課題名(英文) Analysis of LECT2 receptor and its signal transduction

研究代表者

山越 智 (Satoshi, Yamagoe)

国立感染症研究所・真菌部・主任研究官

研究者番号：00212283

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 0円

研究成果の概要(和文)：サイトカインLECT2は、これまでに様々な生理反応に関わることが明らかとなっているが、その作用メカニズムはほとんど分かっていない。そこで本研究では、LECT2レセプターの同定のために、レトロウイルスベクターを用いcDNAライブラリーを作成、細胞へのLECT2-Fc融合蛋白質の結合を指標とする発現クローニングを行った。その結果、膜蛋白質をコードする一遺伝子のみがクローニングされ、その蛋白質がレセプターかどうかの検証を行った。さらにその下流のシグナル伝達に関わるリン酸化蛋白質を調べるために、約30種類の抗リン酸化抗体を用いたウエスタンブロットを行い、いくつかのリン酸化蛋白質を見出した。

研究成果の概要(英文)：Accumulating evidences indicate that LECT2 is associated with several physiological phenomena, but its function is not fully understood. To make clear the function of LECT2, it is important to identify the LECT2 receptor. We performed expression cloning with a retroviral cDNA library constructed from a cell line that highly expressed the LECT2 receptor. Retrovirus infected cells binding LECT2-Fc fusion protein were enriched by cell sorting. The seven cell lines cloned from the enriched cells all had cDNAs derived from the same gene in integrated retrovirus vector. We checked the possibility that this protein was the LECT2 receptor by some experiments. Moreover, we analyzed the phosphoprotein involved in LECT2 signal transduction by western blotting with thirty different kinds of anti-phosphoprotein antibodies, identifying some possible phosphoproteins.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：生理活性 シグナル伝達 LECT2

### 1. 研究開始当初の背景

LECT2 は研究代表者らにより好中球走化性蛋白質として発見された。遺伝子のクローニング、抗体の作成等により肝臓の肝実質細胞で合成され血中に分泌されることが明らかとなり、生体内では別の生理活性があることが予想された。そこで遺伝子欠損マウス、遺伝子導入マウスを作製、その性状を解析し生理作用の探索を行ってきた。その結果、自己免疫疾患、発癌、感染症等の疾患に関与することが判明し、様々な生理作用に関与する多機能蛋白質であることが推定された。しかし、LECT2 の標的細胞、生理活性、さらにはその作用機序に関しては、ほとんど何も分かっていない状況であった。そこでこれらの問題を解決するためには、LECT2 のレセプターの同定が必要と考えた。

### 2. 研究の目的

LECT2 レセプターの同定、性状解析を行い、さらに、LECT2 のシグナル伝達系について解析をすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### LECT2 発現細胞のスクリーニング

動物細胞発現ベクターを用いてヒト IgG1 抗体の Fc 部分とマウス LECT2 との融合蛋白質を CHO 細胞に発現させ Protein A カラムにて部分精製し、細胞に対して添加、フローサイトメトリーにより LECT2-Fc 融合蛋白質の結合について調べた。

発現クローニング法によるレセプター候補遺伝子のクローニング

#### 1) cDNA ライブラリーの作製

スクリーニングした中で LECT2-Fc 融合蛋白質が最も結合したマウスの間葉系細胞株から mRNA を抽出し、cDNA を作成した。アガロース電気泳動にて分画後、pMX レトロウイルスベクターに連結し、大腸菌に導入した。ライブラリーの integrity を確認した後、大腸菌からプラスミドを調製し、パッケージング培養細胞にトランスフェクションし、レトロウイルスライブラリーを調製した。

#### 2) レトロウイルスライブラリーを感染させた LECT2-Fc 結合細胞の濃縮

レトロウイルスライブラリーをマウス Ba/F3 細胞に感染させ、IL-3 存在下培養した。anti-CD16/32 で Fc レセプターをマスクした後、4 で LECT2-Fc を結合させ、その後 PE 標識抗マウス IgG 抗体で処理し、細胞をセルソーターに供した。LECT2-Fc 陽性と想定される画分を回収培養した。同様の陽性細胞濃縮操作を 4 回繰り返した。

#### 3) LECT2 レセプター候補遺伝子の同定

4 回濃縮操作を繰り返し、濃縮された陽性細胞を限界希釈して、細胞をクローン化した。約 90 種類のクローン化された細胞 (LD 細胞) からゲノム DNA を抽出し、

挿入されているライブラリー由来の遺伝子を PCR 法により解析した。その中で代表的な 7 株を選んで PCR で増幅し DNA の塩基配列を調べた。

#### 4) LD クローンにおけるレセプター候補蛋白質の抗体による確認

レセプター候補蛋白質に対する抗体を用いてフローサイトメトリーによる解析を行った。染色は、前述の LECT2-Fc 融合蛋白質の反応条件と同じで行った。

LECT2 とレセプター候補蛋白質の相互作用についての解析

#### 1) フローサイトメトリーによる解析

細胞に LECT2-Fc 処理を行う前に、4 で 10 倍、100 倍濃度の組換え体マウス LECT2 で処理した。その他は、前述の LECT2-Fc 融合蛋白質の反応条件と同じで行った。

#### 2) BIACORE による解析

BIACORE 社の Biacore2000 を使い、センサーチップ CM5 に組換え体マウス LECT2 を固定し、アナライトとしてレセプター候補蛋白質およびその変異体を添加し、解析を行った。

#### LECT2 の in vitro での多量化の解析

100 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl を基本溶液として、1 µg の組換え体マウス LECT2 を 20 µl の反応液に加え 37 でインキュベーションした。反応の停止のために、同じ量の SDS-PAGE サンプルバッファ (還元剤なし) を加え、1 時間室温で放置後、SDS-PAGE を行い、抗マウス LECT2 抗体によるウエスタンブロットを行った。

#### 炎症性サイトカインの作用抑制活性

ヒト滑膜細胞、ヒト血管内皮細胞を用いて、各濃度のヒト LECT2 存在下、IL-1β あるいは TNF-α を添加し、一定時間処理後、培地を交換し 6 時間後の各種炎症性サイトカイン、ケモカインの mRNA 誘導を、Real-time PCR にて測定した。

シグナル伝達に関わるリン酸化蛋白質の解析

培養細胞を LECT2 で処理し、一定時間ごとに 10% TCA 処理を行い、細胞を固定後、SDS-PAGE サンプルバッファ (+DTT) に溶解し、100 5 分加熱後、遠心分離しその上清を SDS-PAGE に供し、ウエスタンブロットを行った。

### 4. 研究成果

#### LECT2 発現細胞のスクリーニング

LECT2-Fc 融合蛋白質を用いて初代培養細胞として滑膜細胞、骨芽細胞、血管内皮細胞、間葉系幹細胞、さらに各種培養細胞株、HeLa 細胞、HEK293T 細胞、FM3A 細胞、CHO 細胞等の上皮系細胞、さらに MEL 細胞、P3U1 細胞、Ba/F 細胞等の血球系細胞に添加してフローサイトメトリーにより、結合するかどうか調べた。ほとんどの

細胞で強度の差はあったが結合することがわかった。血球系の細胞では結合の強度が弱い傾向があった(図1)。

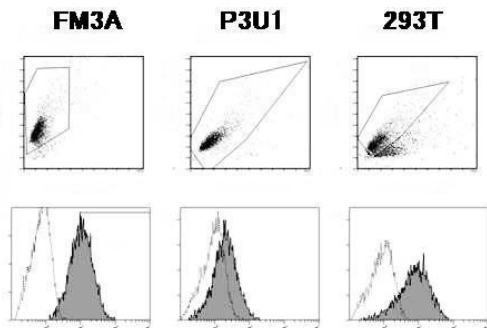


図1 . LECT2-Fc 陽性細胞の例  
縦軸は細胞数、横軸は蛍光強度

#### 発現クローニング法によるレセプター候補遺伝子のクローニング

LECT2-Fc 融合蛋白質の結合のスクリーニングで最もシグナルが強かったマウス間葉系細胞株から、mRNA を調製し、レトロウイルス発現ベクターを用いて cDNA ライブラリーを作成した。Ba/F3 細胞に感染培養後、LECT2-Fc 融合蛋白質を添加してセルソーターにて陽性画分を回収した。その操作を合計 4 回繰り返すことで、陽性細胞を濃縮することができた(図2)。

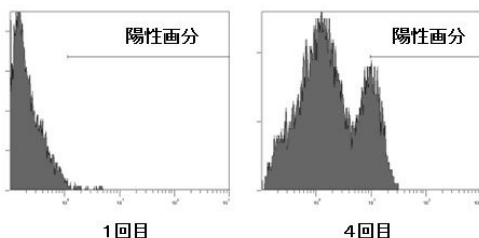


図2 . LECT2-Fc 陽性細胞の濃縮  
縦軸は細胞数、横軸は蛍光強度

陽性細胞画分を増殖させた後、限界希釈にて細胞をクローン化し、それぞれを LD クローンと名付けた。約 90 種類の LD クローンから、ゲノム DNA を回収し、インテグレーションしているレトロベクターに挿入されているライブラリー由来の cDNA を PCR 法にて増幅したところ、ほとんど同じサイズの DNA 断片が増幅された。そこでその中からすべてのバンドのパターンが含まれるように代表的な 7 クローンを選別し、増幅された PCR 断片の塩基配列を決定したところ、すべて同じ遺伝子がプロモーターに対して順方向で検出された。そこでこの遺伝子を LECT2 レセプター候補として X 蛋白質とした。この蛋白質は膜蛋白質であり、発現の強弱はあるものの多くの細胞、組織で発現していることが知ら

れている。さらにこれら LD クローンを市販の抗 X 蛋白質抗体で染色してフローサイトメトリーで解析したところ、Ba/F3 細胞では染色されず、LD クローンのみが陽性になった。LD クローン間の陽性シグナルの相対的強度、パターンが LECT2-Fc 陽性細胞と同じ傾向を示した。これらのことから X 蛋白質が LECT2 レセプターの第一の候補と考えられた。

LECT2 とレセプター候補蛋白質の相互作用についての解析

#### 1) フローサイトメトリーによる解析

同定された X 蛋白質が LECT2 レセプターであることを確かめるために、過剰量の LECT2 で細胞を処理した後、LECT2-Fc 融合蛋白質を処理し競合阻害が起きるかフローサイトメトリーで検討した。その結果、競合阻害が起きず、LECT2 の濃度依存的に、シグナルが増加した。

#### 2) BIACORE による解析

別の方法で特異的結合を検討した。BIACORE 社の Biacore2000 を用い、センサーチップ CM5 に組換え体マウス LECT2 を固定し、アナライトとして X 蛋白質を用いた。解析の結果、特異的結合が観察された。さらに、X 蛋白質の欠失変異体を作成し検討した結果、X 蛋白質の約 100 アミノ酸残基からなる蛋白質断片が LECT2 との結合に関与することが分かった。さらに、その断片を大腸菌の maltose binding protein (MBP) に連結した融合蛋白質を BIACOR に供したところ、その融合蛋白質が LECT2 に結合するようになった(図3)。

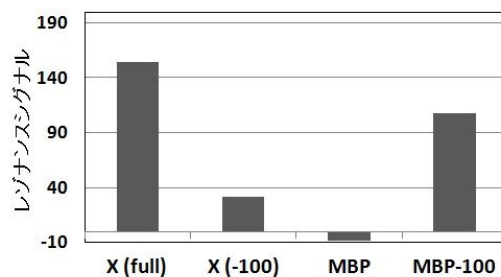


図3 . LECT2 とレセプター候補の結合  
X (full): 全長、X (-100): 100 aa の欠損  
MBP-100: MBP に 100 aa の付加

#### LECT2 の in vitro での多量化の解析

X 蛋白質との相互作用を調べる過程で、LECT2 が多量体形成をする可能性が分かった。そこでそのメカニズムを調べた。動物細胞で作成した組換え体 LECT2 は、37 でインキュベーションすることで単量体、2 量体、3 量体と時間依存的に多量体形成することがわかった。DTT, ヨード酢酸等により影響を受けたことから、この多量体化は、LECT2 のシステインが関与し、新たなジスルフィド結合の形成が寄与

していることが予想された。ところで、LECT2 はその構造的特徴から peptidase M23 superfamily に属し、亜鉛を分子内に持つことが予想されたため、ESI-MS, XAFS により解析したところ実際に亜鉛原子を持つことが分かった。この亜鉛が、LECT2 の多量体形成にどのように影響を与えるか調べたところ、亜鉛により多量体形成が阻害された。他の 2 価金属イオン  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  ではそのような阻害は観察されなかった。さらに EDTA 等金属キレート剤を反応液に加えたところ多量体形成が促進されたことから、LECT2 内の亜鉛分子が、蛋白質構造の安定化に関わっていることが分かった (図 4)。

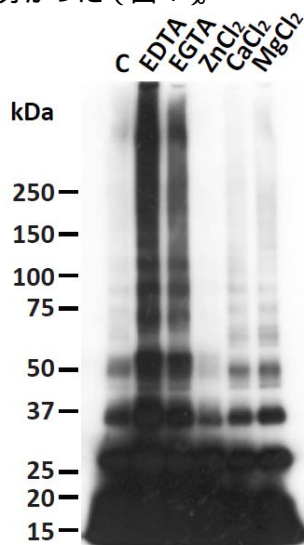


図 4 . LECT2 多量化の各種条件による影響

#### 炎症性サイトカインの作用抑制活性

これまで LECT2 遺伝子欠損マウスを用いた結果から、LECT2 は抗炎症作用を持つことが推定されている。しかし、ターゲットの細胞、作用メカニズムは分かっていない。そこでヒト滑膜細胞、ヒト血管内皮細胞の初代培養細胞を用いて炎症性サイトカイン刺激に対する LECT2 の効果を調べた。IL-1 $\beta$ あるいは TNF- $\alpha$ の低濃度処理により誘導される炎症性サイトカイン、ケモカインの産生は、LECT2 により阻害されたが、刺激サイトカインが高濃度になるに従い阻害の程度は低下した。

#### シグナル伝達に関わるリン酸化蛋白質の解析

ヒト滑膜細胞を LECT2 で刺激した。刺激後、1 分、5 分、10 分、30 分、1 時間と一定時間ごとにウエスタンブロットによりリン酸化蛋白質について解析した。まず、二次元電気泳動したのち、抗リン酸化チロシン抗体でウエスタンブロットをしたところパターンの変化が観察された。また、30 種類の抗リン酸化蛋白質抗体を使い個々の蛋白質について SDS-PAGE を用いて調べたところ、MAP kinase 系の蛋白質、

接着に関与する蛋白質、炎症に関わる転写因子等いくつかの蛋白質のリン酸化の変化が観察された。その中には、レセプター候補 X 蛋白質の関わるリン酸化蛋白質の変化も観察された。

#### 考察

現在までに、論文で報告されている LECT2 レセプター候補は、CD209a と c-MET であり、CD209a は DC-SIGN として知られ、マクロファージ、樹状突起細胞に発現する C-type レクチンでありマンノース型の糖鎖を認識する。LECT2 が結合することで、マクロファージが活性化することが報告されている。c-MET は成長因子 HGF のレセプターで LECT2 が非競争的に結合して HGF の活性を阻害することが報告されている。今後これら 3 つの LECT2 レセプター候補が本物かどうか検討されていくと考えられる。

## 5 . 主な発表論文等

(雑誌論文)(計 6 件)

Fei Lan, Hirofumi Misu, Keita Chikamoto, Hiroaki Takayama, Akihiro Kikuchi, Kensuke Mohri, Noboru Takata, Hiroto Hayashi, Naoto Matsuzawa-Nagata, Yumie Takeshita, Hiroyo Noda, Yukako Matsumoto, Tsuguhito Ota, Toru Nagano, Masatoshi Nakagen, Ken-ichi Miyamoto, Kanako Takatsuki, Toru Seo, Kaito Iwayama, Kunpei Tokuyama, Seiichi Matsugo, Hong Tang, Yoshiro Saito, Satoshi Yamagoe, Shuichi Kaneko, Toshinari Takamura. LECT2 Functions as a Hepatokine That Links Obesity to Skeletal Muscle Insulin Resistance. *Diabetes*, 63, 2014, 1649-1664  
DOI: 10.2337/db13-0728

Akinori Okumura, Hiroyuki Unoki-Kubota, Yumi Matsushita, Tomoko Shiga, Yuriko Moriyoshi, Satoshi Yamagoe, Yasushi Kaburagi. Increased serum leukocyte cell-derived chemotaxin 2 (LECT2) levels in obesity and fatty liver. *BioScience Trends*, 査読有, 7, 2013, 276-283

Hai Zheng, Takuya Miyakawa, Yoriko Sawano, Satoshi Yamagoe, Masaru Tanokura. Crystallization and preliminary X-ray analysis of human leukocyte cell-derived Chemotaxin 2 (LECT2). *Acta Crystallographica Section F*, 査読有, 69, 2013, 316-319  
DOI: 10.1107/S1744309113003758

Akinori Okumura, Takehiro Suzuki, Hideyuki Miyatake, Tomoya Okabe, Yuki Hashimoto, Takuya Miyakawa, HaiZheng, Hiroyuki Unoki-Kubota, Hideaki Ohno, NaoshiDohmae, Yasushi Kaburagi, Yoshitsugu Miyazaki, Masaru Tanokura, Satoshi Yamagoe. Leukocyte cell-derived chemotaxin 2 is a zinc-binding protein. FEBS letter, 査読有, 587, 2013, 404-409  
DOI: 10.1016/j.febslet.2013.01.025

Hai Zheng, Takuya Miyakawa, Yoriko Sawano, Satoshi Yamagoe, Masaru Tanokura. Expression, high-pressure refolding and purification of human leukocyte cell-derived chemotaxin 2 (LECT2). Protein expression and purification, 査読有, 88, 2013, 221-229  
DOI: 10.1016/j.pep.2013.01.008

Marie Anson, Anne-Marie Crain-Denoyelle, Véronique Baud, Fanny Chereau, AngéliqueGougelet, Benoit Terris, Satoshi Yamagoe, Sabine Colnot, Mireille Viguier, Christine Perret, Jean-Pierre Couty. Oncogenic  $\beta$ -catenin triggers an inflammatory response that determines the aggressiveness of hepatocellular carcinoma in mice. Journal Clinical Investigation, 査読有 122, 2012, 586-599  
DOI: 10.1172/JCI43937

〔学会発表〕(計 2件)

Akinori Okumura, Takehiro Suzuki, Hideyuki Miyatake, Takuya Miyakawa, HaiZheng, Hiroyuki Unoki-Kubota, NaoshiDohmae, Yasushi Kaburagi, Masaru Tanokura, Satoshi Yamagoe. Leukocyte cell-derived chemotaxin 2 is a zinc-binding protein: the monomeric forms are stabilized by the zinc ion. 第36回日本分子生物学会、2013年12月、神戸

Fei Lan, Hirofumi Misu, Keita Chikamoto, Hiroaki Takayama, Akihiro Kikuchi, Satoshi Yamagoe, Shuichi Kaneko, Toshinari Takamura. Hepatokine LECT2 causes insulin resistance in skeletal muscle through increased JNK phosphorylation. 第36回日本分子生物学会、2013年12月、神戸

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕  
ホームページ等  
[http://www.geocities.jp/lect2\\_yamagoe/](http://www.geocities.jp/lect2_yamagoe/)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山越 智 (YAMAGOE, Satoshi)  
国立感染症研究所・真菌部・主任研究官  
研究者番号: 00212283