

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：32305

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659057

研究課題名(和文) 微生物感染レセプターヌクレオリンを利用した抗腫瘍物質の細胞内導入法の探索

研究課題名(英文) Search for intracellular introduction method of anti-tumor substance using microbial infection receptor nucleolin.

研究代表者

平野 和也 (HIRANO, KAZUYA)

高崎健康福祉大学・薬学部・教授

研究者番号：80251221

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：多機能性分子ヌクレオリンの新しい結合分子として細胞増殖に関連する分子であるHABP4、NUDT5、HMGB1を見出した。また老化関連分子である糖化最終産物(AGEs)の中で毒性のAGEとして知られるグリセルアルデヒド(GCA)とグリコールアルデヒド(GOA)由来のAGEsがヌクレオリンを介して腹腔マクロファージによって認識されることを見出した。さらにアルツハイマー病と関連のある分子であるベータアミロイドとヌクレオリンを介してミクログリアが認識する受容体であることを示した。

研究成果の概要(英文)：We found HABP4, NUDT5, HMGB1 as a new nucleolin binding molecule using Yeast two-hybrid technique. Surface plasmon-resonance analysis revealed that these molecules had a strong binding to rNUC284. Advanced glycosylation end-products (AGEs) are non-enzymatically glycosylated proteins that play an important role in several diseases and aging processes. Surface plasmon-resonance analysis revealed that nucleolin strongly associated with GCA-BSA and GOA-BSA. We found nucleolin is a receptor that allows macrophages to recognize toxic AGEs. Amyloid-beta peptide 1-42 (A₄₂) plays a key role in the neurotoxicity found in Alzheimer's disease. We found monomeric and fibril A₄₂ were phagocytosed by mouse microglial EOC2 cells. These results indicate that nucleolin is a receptor that allows microglia to recognize monomeric and fibril A₄₂.

研究分野：衛生化学、生化学

キーワード：ヌクレオリン ツーハイブリッドシステム ヌクレオリン結合分子 AGE アミロイド

1. 研究開始当初の背景

nucleolin は細胞表面に存在し、HIV 等のウイルス、腸管出血性大腸菌 O157 や野兔病菌の感染レセプターとなり、細胞外の各種リガンドに結合し細胞内に取り込む。nucleolin は癌細胞の表面に存在する。nucleolin の結合分子を明らかにすることに成功すれば、新しい薬剤のターゲット・新しいドラッグデリバリー法の開発が期待できる。

2. 研究の目的

(1) 「nucleolin の細胞内外の結合性機能分子の探索」 nucleolin は、細胞の各所で、多様な分子と相互作用している可能性が高い。例えば、マクロファージ表面では nucleolin は右図のように存在していることを既に推定している。そこで酵母 two-hybrid 法等を用いて、nucleolin に結合する種々の細胞膜関連タンパク質の検出・同定を行なう。

(2) 「AGE や アミロイドと nucleolin の結合性の探索」 nucleolin の細胞外リガンド候補、あるいは予想・推定されている物質 (AGE, アミロイド) と nucleolin について明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 「nucleolin の細胞内局在別の結合性機能分子の探索」

細胞内で nucleolin と相互作用するタンパク質については、いくつかの報告がある。しかし nucleolin の細胞表面での局在や核内移行過程の際に、どの分子が実際に相互作用するかについては、まったく不明である。そこで酵母 Two-hybrid 法を用いて、nucleolin に結合する細胞膜関連分子 (タンパク質) の検出・同定を行い、細胞表面 nucleolin のサブユニット構造 (分子複合体) を明らかにする、さらに SPR 法により nucleolin との結合性、結合親和性を調べた。

(2) グリセルアルデヒド (GCA) - とグリコールアルデヒド (GOA) とウシ血清アルブミン (BSA) とのインキュベーションによって AGE を作成した。GCA 処理された BSA (GCA-BSA) と GOA 処理した BSA (GOA-BSA) は、チオグリコレート刺激マウス腹腔マクロファージによる認識実験を行った。

また、A タイプ 1-42 と 1-40 について。モノマーおよびフィブリル A 42 がマウスミクログリアの EOC2 細胞によって認識されるかを調べた。

4. 研究成果

(1) yeast two-hybrid 法による nucleolin 結合分子の探索

yeast two-hybrid 法を用いて、nucleolin 結合タンパク質の探索を行った。探索プローブ (bait) として、1) full length nucleolin (full length NUC; 1-710AA) 2) nucleolin の RNA binding domain (RBD) 1-4 領域 (NUC R1-4; 308-647AA) の 2 種類の nucleolin cDNA を bait ベクターに組み込み、GAL4 DNA-BD - nucleolin 融合タンパク質 (bait タンパク質)

として発現させた。スクリーニング対象には、human brain cDNA ライブラリーを用い、2 種の nucleolin タンパク質に結合するタンパク質の探索を行った。その結果、1) full length NUC 結合候補分子として、BclB C-terminal domain-containing protein、collagen triple helix repeat protein (CTHRP)、late cornified envelope 1J (LCE1J)、polysaccharide deacetylase、ribosome ABC transporter permease、sporulation lipoprotein YhcN/YlazJ、topoisomerase beta (TOP β)、transcriptional regulator の 8 種の分子を見出した。また、2) NUC R1-4 結合候補分子として COP9 signalosome complex subunit 5 (COP5)、G elongation factor mitochondrial 1 (GFM1)、variant erythrocyte surface antigen-1 beta subunit (VESA1β) の 3 種の分子を見出した。特に、Top β 及びこれまでの研究においても結合候補分子として見出されていた COP5、GFM1 は有力な結合候補分子であると言える。また、yeast two-hybrid 法を行う上でプロトコールの検討・改定を行い、実験系の確立に貢献した。

これまでの研究で nucleolin Glycine-arginine rich domain (GAR) 領域 (NUC GAR; 627-710AA) への結合性が認められた HABP4 (hyaluronan binding protein 4)、NUDT5 (nudix-type motif 5) 及び結合性が高いと考えられる HMGB1 (high mobility group box protein 1) について、cell-free 系結合実験である SPR 法を用いて、recombinant nucleolin (rNUC284 (284-710AA)) に対する直接的な結合性を調べた。その結果、HABP4、NUDT5、HMGB1 は、結合性に程度の差はあるものの (Table. 1) いずれも rNUC284 に対して結合性を示した。また、nucleolin 結合分子の局在部位を考慮し、nucleolin との相互作用部位を Figure. 1 に模式的にまとめた。今後、他の recombinant nucleolin との結合性の確認を行い、結合部位の確定を進めていく必要がある。

多機能シャトルタンパク質 nucleolin の新規結合分子の探索を yeast two-hybrid 法を用いて行った結果、11 種の nucleolin 結合候補分子を見出した。第二章では、SPR 法を用い、rNUC284 に対して強い結合性を有する、有力な新規 nucleolin 結合分子 (リガンド候補分子) として HABP4、NUDT5、HMGB1 を見出した。今後、また、これらの分子の細胞内での局在、機能は多様であり、nucleolin の新たな機能解明の手がかりになると思われる。nucleolin の機能、作用機序を明らかにすることで、細胞貪食機構、情報伝達機構の解明に加え、臨床への応用が期待される。

結合候補分子	局在部位	rNUC284
HABP4	Intracellular	○
NUDT5	nucleus	○
HMGB1	nucleus	○

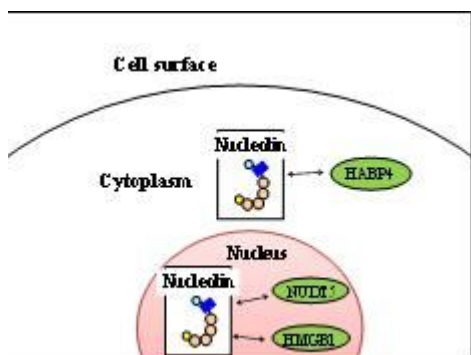


Figure.1

nucleolin の新規リガンドとその局在部位

(2) 終末糖化産物(後期糖化生成物、AGEs (Advanced Glycation End Products))は、血管障害、腎不全、糖尿病性合併症、およびいくつかの神経変性疾患を含むいくつかの疾患および老化過程において重要な役割を果たして非酵素的グリコシル化タンパク質である。特に、グリセルアルデヒド(GCA)とグリコールアルデヒド(GOA)由来のAGEsは、細胞毒性が高く、毒性のAGEsとされている。近年、タンパク質ヌクレオリンは、スカベンジャー受容体活性を有することが示されている。そこでマクロファージは、それらの表面上に発現ヌクレオリン受容体を介して毒性のAGEを認識しているかどうかを調べた。ウシ血清アルブミン(BSA)に見出される遊離アミノ酸基およびアルギニン残基が時間依存GCAとGOAとのインキュベーションによって修飾した。また、平均分子サイズは、GCAとGOAとのインキュベーションによって増加した。GCA処理されたBSA(GCA-BSA)とGOA処理したBSA(GOA-BSA)は、それぞれのアルデヒド修飾比に比例してチオグリコレート刺激マウス腹腔マクロファージによって認識されたが、アルデヒド未処理対照-BSAは認識しなかった。表面プラズモン共鳴分析(SPR法)により、ヌクレオリンはGCA-BSAとGOA-BSAに関連することを明らかにした。さらに、抗ヌクレオリン抗体を用いてマクロファージを前処理したところマクロファージによるGCA-BSAとGOA-BSAの結合が阻害された。さらに、AGRO、ヌクレオリン特異的オリゴヌクレオチドアプタマーは、GCA-BSAとGOA-BSAの認識を阻害した。また、ヌクレオリンcDNAをトランスフェクトしたHEK293細胞は、対照HEK細胞よりGCA-BSAとGOA-BSAを認識した。ヌクレオリンとGCA-BSAの結合/GOA-BSAは、抗ヌクレオリン抗体によってブロックされた。これらの結果は、ヌクレオリンは、マクロファージが毒性のAGEを認識することができる受容体であることを示している。

アミロイドβペプチド1-42(Aβ42)はアルツハイマー病に見られる神経毒性において重要な役割を果たしている。近年、タンパク質ヌクレオリンは、スカベンジャー受容体活

性を有することが示されている。そこでこの受容体が、Aβタイプ1-42と特異的に相互作用し、ミクログリアに取り込まれるかどうかを調べた。その結果、モノマーおよびフィブリルAβ42がマウスミクログリアのEOC2細胞によって貪食されたが、ペプチド1-40(Aβ40)βアミロイドは弱くしか貪食されなかった。表面プラズモン共鳴分析(SPR法)により、ヌクレオリンが強くAβ42と会合することが明らかになった。抗ヌクレオリン抗体の免疫蛍光染色はEOC2細胞およびラット初代ミクログリアは、それらの細胞表面上のヌクレオリンを発現することを明らかにした。さらに、抗ヌクレオリン抗体とEOC2細胞を前処理すると、ミクログリアの単量体Aβ42の食作用が阻害された。さらに、ヌクレオントランスフェクトHEK293細胞は、単量体および線維化Aβ42は、単量体および線維化Aβ40よりも多く貪食された。また、ヌクレオリン特異的オリゴヌクレオチドアプタマー(AGRO)は、単量体および線維化Aβ42の食作用を阻害したが、単量体および線維化Aβ40されなかった。これらの結果は、ヌクレオリンは、ミクログリアが単量体および線維化Aβ42を認識する受容体であることを示している。

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 2 件)

三木雄一、檀原光、立花佳弘、平野和也、小西美緒、別府正敏

Miki Y, Dambara H, Tachibana Y, Hirano K, Konishi M, Beppu M.

Biol Pharm Bull. 2014;37(4):588-96. 査読有
Macrophage recognition of toxic advanced glycosylation end products through the macrophage surface-receptor nucleolin.

小澤大輔、中村卓史、小池正哲、平野和也、三木雄一、別府正敏
Ozawa D, Nakamura T, Koike M, Hirano K, Miki Y, Beppu M.

Biol Pharm Bull. 2013;36(10):1587-93.2013
査読有
Shuttling protein nucleolin is a microglia receptor for amyloid beta peptide 1-42.

〔学会発表〕(計 3 件)

日本薬学会 第133年会((2013年3月27-30日、横浜)橋本兆棋,鈴木寛香,井口聡介,有賀健,米沢康平,渋谷大輝,平野和也,別府正敏「ヌクレオリンの細胞質型チロシンフォスファターゼ結合性及び相互作用の解析」

第14回Pharmaco-Hematologyシンポジウム (2013年6月1日、東京)鈴木寛香、橋本兆棋、井口聡介、土屋七奈、上野洋和、有賀健、米沢康平、渋谷大輝、平野和也、別府正敏「ヌクレオリン結合タンパク質の探索」

第14回 日本抗加齢医学会総会 (2014年6月6,7,8日、大阪国際会議場)招待講演 平野和也「マクロファージ系細胞による老化蛋白除去」

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
http://www.takasaki-u.ac.jp/p_yaku/8017/

6. 研究組織

(1)研究代表者

平野 和也 (HIRANO, Kazuya)
高崎健康福祉大学・薬学部・教授

研究者番号：80251221

(2)研究分担者 無し

(3)連携研究者 無し