

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2013～2017

課題番号：25220205

研究課題名(和文) 蛋白質相互作用におけるパターン認識のモレキュラーダイナミクス

研究課題名(英文) Dynamics of Molecular Pattern Recognition in Protein Interaction

研究代表者

浜窪 隆雄 (HAMAKUBO, TAKAO)

東京大学・先端科学技術研究センター・教授

研究者番号：90198797

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 162,000,000円

研究成果の概要(和文)：蛋白質相互作用により、生体防御に関わるパターン認識受容体PTX3と、RNAプロセッシングに関与するWTAPについて、それぞれヒストンまたは相互作用タンパク質との認識部位を同定し、作用薬開発への候補を得た。また、PTX3とヒストンの凝集反応について、凝集しやすい部位を特定して生化学的、計算科学的解析を行い、候補パターンを得た。他に、ヒストンによる内皮細胞障害の際に放出されるベジクルを見出し、特異抗体による検出法を開発した。WTAPの複合体を同定し、オルタナティブスプライシングに関わること、またそのターゲット遺伝子を同定した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have analyzed the interaction pattern between PTX3 and histone, and obtained candidate molecules for regulating histone cytotoxicity in sepsis. Also we have detected direct interacting protein of WTAP and revealed the relation to alternative splicing of several target genes. We have obtained a candidate molecule which inhibits the interaction of WTAP and associating proteins. This should be a drug candidate as a RNA processing regulator in various biological phenomena. We identified a candidate peptide of aggregation prone part of PTX3 and interaction part in histone H3. Also we found the micro-particle release from histone damaged endothelial cells and developed specific antibodies to detect the identified marker proteins on the particle.

研究分野：生化学

キーワード：敗血症 ヒストン障害 ペントラキシン RNAプロセッシング 細胞周期

## 1. 研究開始当初の背景

ゲノム解析やプロテオミクス解析が進み、エピジェネティックな発現調節や RNA のプロセッシングおよび翻訳後修飾等によるタンパク質の相互作用解析の重要性が認識されるようになった。我々は、高親和性抗体による高感度ターゲットプロテオミクス法を開発し、先に見出していた RNA プロセッシングに関わる WTAP (Wilms' tumor 1-associating protein) の血管内皮細胞における内在性タンパク質複合体を同定し、また敗血症患者の血漿から PTX3 複合体を同定して、がんや敗血症に対する新規の治療標的を見出した。これらの結果を基に、新たな医薬開発にブレークスルーをもたらすには、タンパク質間相互作用において、分子認識機構の解明が重要であることが示唆された。

### (1) PTX3 の分子認識機構と自然免疫

PTX3 は急性炎症における自然免疫の液性のパターン認識受容体であり、外来性病原菌由来タンパク質、補体系タンパク質、マトリックスタンパク質など多種類のタンパク質を認識し結合することが知られている。我々は、敗血症患者血中に、ヒストンをはじめとする NETs (好中球細胞外トラップ) タンパク質との複合体を見出し、NETs の中で、新たな生体防御機構を担っている可能性を提唱した (Daigo, Hamakubo, *Front. Immunol.* 2012)。次に我々は、急性臓器障害の原因とみられている細胞外ヒストンによる、血管内皮細胞障害に注目した。その結果、PTX3 投与はヒストンの血管内皮細胞障害を抑制した。さらに、PTX3 の腹腔内投与は敗血症モデルマウスの生存率を改善することから、新規治療薬の可能性が示唆された。PTX3 とヒストンとの相互作用を調べた結果、凝集反応であることが判明した (特許出願済)。ヒストンは、NETs のみならず、障害された組織細胞からも大量に放出され、血管内皮細胞障害、血小板の活性化による微小血栓形成から急性臓器障害の原因となると考えられることから、PTX3 投与は組織障害を保護し、これまで治療法のない敗血症などの治療薬となると考えられ、詳細な分子メカニズムの解明が重要である。

### (2) RNA プロセッシングと細胞周期および細胞分化とのかわり

我々は、先行研究で WTAP が血管内皮細胞 (HUVEC) や HeLa 細胞などの細胞周期を G2/M 期で制御することを見出し、プロテオミクス解析により、Vililizer, BCLF1/THRAP3, CBLL1, RBM15, KIAA0105 などからなる WTAP 複合体を同定した。さらに、局在解析や相互作用の細胞増殖や代謝など細胞機能における役割の解析を行ってきた。WTAP はショウジョウバエの性決定因子 *sxl* (Sex-lethal) と複合体を作る *f12d* のヒトホモログとして同定されたが、機能はわかっていない。我々は mRNA 安定性の制御により細胞周期制御を担っていることを報告している (Horiuchi,

PNAS, 2006)。

## 2. 研究の目的

本研究は、これらのタンパク質間の相互作用におけるパターン認識の分子機構について解析し、RNA スプライシングや生体防御における役割を解明することを目指す。本研究は、タンパク質相互作用あるいは RNA 構造におけるパターン認識の動的な分子機構について解析する手法を開発し、細胞増殖や生体防御における役割を解明してがんや敗血症など、難治性疾患に対して新規治療薬の開発への道を拓くことを目的とする。

## 3. 研究の方法

タンパク質は相互作用によってコンフォメーションが変化し、シグナルの伝達や活性化などの機能が発揮される。相互作用面のホットスポットを同定し反応機構を解析することにより、タンパク質相互作用を制御する新しい概念の創薬につなげることができる。本研究では、PTX3 とヒストンについて、凝集反応ホットスポットの同定と相互作用様式を生化学的解析およびコンピュータシミュレーションを用いて反応の動的な解析を試みる。両タンパク質の部分ペプチドを作製して、ホットスポットを策定するとともに、シミュレーションの負荷の軽減を図る。複合体を認識する抗体を作製して相互作用コンフォメーションを固定化することにより、反応機構の解析に用いるとともに、フラグメントベースのスクリーニングへの応用を試みる。

また、WTAP については、ショウジョウバエホモログの *f12d* がオルタナティブスプライシングによって、*sxl* などの性決定遺伝子を制御していることから、複合体形成と細胞周期調節のメカニズムを、タンパク質科学的解析とゲノム解析、siRNA などによるスプライシング解析を手掛かりとする。WTAP も PTX3 と同様、凝集しやすく精製が困難である。フラグメント化するとともに、複合体形成に重要な結合部位を同定し、相互作用のアッセイ系の立ち上げを図る。WTAP が関与する RNA プロセッシングのターゲットを同定し、アッセイ系を構築することにより、上記相互作用の阻害剤をスクリーニングする系を立ち上げる。これらの結果より、タンパク質相互作用の分子認識にかかわるパターン抽出を試みる。

## 4. 研究成果

### (1) PTX3 の分子認識機構と自然免疫

ヒストンによる HUVEC 障害に対する保護作用は PTX3 の N 端半分ですべてであること、CRP や SAP などのペントラキシンよりも強いこと、アモルファスな凝集体を形成する凝集反応であること、PTX3 投与は敗血症モデルだけではなく、ヒストン静注の実験系でも極めて有効で生存率を高めること、炎症反応を抑え、血管内皮細胞を保護する効果があることを論文発表した (Daigo, *Science Signaling*,

2014), PTX3 の N 端(200a.a.)の中で、50 アミノ酸からなる数種のペプチドを作製し、ヒストンによる HUVEC 障害保護効果を見たところ、最も N 端に近いペプチドが最も効果が高いことを見出した(特許登録)。ヒストン H3 の部分ペプチドを数種類作製し、HUVEC 障害活性を測定したところ、酸性部位を含む部位に障害活性が強いことを見出した。また、抗 PTX3 抗体の中から、ヒストンとの凝集反応を阻害するクローンを選出し、エピトープとして 20 アミノ酸部位を特定した。この部位は構造をとらない天然変性部位と予測される。アミノ酸変異を入れ、構造予測を行い、ヒストンとの凝集反応を DLS にて測定したところ、予測と関連の近い凝集性が見られた。ある種の構造パターンが凝集反応のホットスポットである可能性が示唆される。構造予測の一部と、凝集反応が生体防御の方法としてむしろ積極的に使われている可能性について、レビューした(Daigo, *Front Immunol.* 2016)。ペプチドフラグメントに関する凝集反応解析、ヒストンの細胞障害に関わる部位同定と解析に関しては、一部を免疫学会および、生化学会に発表し、論文投稿準備中である。また、PTX3 と炎症とのかわりが見られることから、川崎病の患者血液について調べたところ、重症度と PTX3 血中濃度との関連性が高いことが判明した。豊富な数の臨床検体が集められなかったが、治療選択に関わる重要な所見と考えられ、血管炎国際学会で発表し、口演および論文集収録に選ばれた(学会発表として記載。Kitoh T.2017)。

#### (2) RNA プロセッシングと細胞周期および細胞分化とのかわり

WTAP の N 端と C 端を認識する抗体を作製し、磁気ビーズによるプロテオミクスによりタンパク質複合体を調べ、複合体として機能している主要なタンパク質群(VIRILIZER, CBLL1, KIAA0853, RBM15, BCLAF1, THRAP3, Mett13/14 等)および生理機能上重要と考えられる SR タンパク質、hnRNP、METTL3, METTL14 を同定した。これらの複合体タンパク質のうち、siRNA によりスペクル構造への局在に参与するタンパク質(BCLAF1/THRAP3)および non-coding RNA の MALAT1 との結合はスプライシングの場である核スペクル構造への局在に必要なことを示した。CBLL1 は Ring finger 部位を欠失すると、複合体を形成しないことを見出した。オルタナティブスプライシングのターゲットとして WTAP 自身を報告した。以上により、WTAP および m6A 修飾がオルタナティブスプライシング・オルタナティブポリアデニレーションに関与していると考え報告した(Horiuchi, *JBC*, 2013)。ゲノムワイドにオルタナティブスプライシングターゲットを調べ、ヒストン修飾酵素を同定した。スプライシングバリエーションの比率により、酵素活性を調節し、細胞周期の調節を行っている可能性が示唆された。また、血管内皮細胞(HUVEC)

を用いて RNAseq を行い、スプライシングの解析を行い、オルタナティブスプライシングターゲット候補遺伝子を同定した。

WTAP の発現精製を行い、部分長タンパク質で結合候補薬剤を見出した。その類似化合物の中から結合定数が  $\mu$  モル程度のものを取得し、上記ターゲット遺伝子についてのオルタナティブスプライシング、タンパク質間相互作用への効果を検討中である。

#### 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5件)

- (1) The Protective Effect against Extracellular Histones Afforded by Long-Pentraxin PTX3 as a Regulator of NETs Daigo, K, Takamatsu, Y, Hamakubo, T. *Front Immunol.* 2016;7:344 DOI: 10.3389/fimmu.2016.00344 査読有
- (2) Physiological levels of pentraxin 3 and albumin attenuate vascular endothelial cell damage induced by histone H3 in vitro. Iba T, Hamakubo T, Nagaoka I, Sato K, Jecko T. *Microcirculation*, 2016; 3; 240-7, doi:10.1111/micc.12269 査読有
- (3) Factor H-related protein 5 interacts with pentraxin 3 and the extracellular matrix and modulates complement activation. Csincsi ÁI Daigo K(9/12), Hamakubo T(10/12), Józsi M, *J Immunol.* 2015;194(10):4963-73, doi: 10.4049/jimmunol.1403121 査読有
- (4) Protective effect of the long pentraxin PTX3 against histone-mediated endothelial cell cytotoxicity in sepsis. Daigo K, Nakakido M, Ohashi R, Fukuda R, Matsubara K, Minami T, Yamaguchi N, Inoue K, Jiang S, Naito M, Tsumoto K, Hamakubo T, *Sci Signal.* 2014 7(343):ra88. doi: 10.1126/scisignal.2005522 査読有
- (5) Identification of Wilms' tumor 1-associating protein complex and its role in alternative splicing and the cell cycle. Horiuchi K, Kawamura T, Iwanari H, Ohashi R, Naito M, Kodama T, Hamakubo T *J Biol Chem.*, 2013 288(46):33292-302, doi: 10.1074/jbc.M113.500397. 査読有

〔学会発表〕(計6件)

- (1) Analysis of Aggregation Patterns of PTX3 preventing Histone-Cytotoxicity against Endothelial Cells. 早田敬太, 中木戸誠, 太期健二, 高松佑一郎, 山下雄史, 岩成宏子, 津本浩平, 浜窪隆雄. 第90回日本生化学会大会・第40回日本分子生物学会年会(生命科学系合同年次大会)2017/12/6~9, 神戸ポートアイランド, 兵庫県神戸市, 日本.
- (2) INCREASED LEVELS OF PLASMA PENTRAXIN 3 PREDICT IVIG RESISTANCE AND CORONARY ARTERY LESION FORMATION IN PATIENTS WITH KAWASAKI DISEASE, Kitoh, T, Hamakubo, T(11/11). 18<sup>th</sup> International Vasculitis and ANCA Workshop 2017.3.25~26 東京
- (3) Extracellular Histones on Endothelial Microparticles for Diagnosis of Endothelial Dysfunction. 早田敬太, 川村猛, 新井修, 岩成宏子, 浜窪隆雄. 第45回日本免疫学会学術集会 2016/12/5~7, 沖縄コンベンションセンター・ラグナガーデンホテル, 沖縄県宜野湾市, 日本.
- (4) Protective Effects of PTX3 Against Histone Cytotoxicity. 早田敬太, 新井修, 太期健二, 福田理絵, 岩成宏子, 浜窪隆雄. 第44回日本免疫学会学術集会 2015/11/18~20, 札幌コンベンションセンター, 北海道札幌市, 日本.
- (5) Protective Effect of Pentraxin 3 in Animal Models of Sepsis. Hamakubo T, Fukuda R, Iwanari H, Soda K, Daigo K, Targeting Ebola Paris2015/5/28 パリ
- (6) Pentraxin 3 in Coronary Artery Lesions in Kawasaki Disease, Kitoh T, Hamakubo T(7/7), 11th International Kawasaki Disease Symposium 2015/2/3 ハワイ

〔図書〕(計2件)

- (1) Nature's Robots, チャールズ・タンフォード著; 浜窪隆雄(監訳)エヌ・ディー・エス 2017年 ISBN:978-86043-473-11
- (2) 敗血症の診断/治療の実状と病態・メカニズムをふまえた開発戦略」浜窪隆雄ら執筆者 173名 技術情報協会 2013年

〔産業財産権〕

取得状況(計1件)

名称: 全身性炎症反応症候群の治療又は予防剤

発明者: 浜窪隆雄, 津本浩平, 太期健二, 井上健二, 山口尚敬, 水内素晶  
権利者: 国立大学法人東京大学、学校法人順天同大学、ベルセウスプロテオミクス社、JSR株式会社

種類: 特許

番号: 第6236633号

取得年月日: 2017年

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

(1) Web 研究室紹介

<http://www.qbm.rcast.u-tokyo.ac.jp/>

(2) Web プレスリリース

PTX3の敗血症における保護作用について、サイエンスシグナリング誌に発表した際に、東京大学の広報にてプレスリリースを行った。「病原体の排除に関わるペントラキシン3の敗血症への効果を発見 細胞外ヒストンの血管傷害を抑制」2014年9月17日 [http://www.u-tokyo.ac.jp/public/public01\\_260917\\_j.html](http://www.u-tokyo.ac.jp/public/public01_260917_j.html)

<http://www.u-tokyo.ac.jp/ja/utokyo-research/research-news/host-protective-effect-of-pentraxin-3-in-sepsis/>

英文題 'A novel therapy for sepsis?'

<http://www.medicalnewstoday.com/releases/282647.php>

東大先端研ウェブサイト [http://www.rcast.u-tokyo.ac.jp/whatsnew/index\\_ja.html](http://www.rcast.u-tokyo.ac.jp/whatsnew/index_ja.html)

海外での反響; AsianScientist [www.asianscientist.com/2014/09/in-the-lab/ptx3-protects-host-histones/](http://www.asianscientist.com/2014/09/in-the-lab/ptx3-protects-host-histones/), Infectionresearch [www.infection-research.de/news/view/detail/item-1/a-novel-therapy-for-sepsis/](http://www.infection-research.de/news/view/detail/item-1/a-novel-therapy-for-sepsis/), Medicalexpress <http://medicalxpress.com/news/2014-09-therapy-sepsis.html>, ScienceDaily [www.sciencedaily.com/releases/2014/09/14/916141527.htm](http://www.sciencedaily.com/releases/2014/09/14/916141527.htm)

(3) アウトリーチ活動情報

東京大学駒場リサーチキャンパス キャンパス公開 2017/6/5~6, 2016/6/5~6, 2015/6/5~6, 2014/6/6~7, 2013/5/31~6/1

東京大学オープンキャンパス模擬講義 (聴衆200名程度) <http://today.tv/contents-list/events/opencampus/2014engineering5> (東大TV)

東京大学・ミュンヘン大学学生交流セミナー 2014/9/11 (ミュンヘン大学生10名)

先端研リサーチツアー 島根県立浜田高校

(1年生50名) 2015年12月10日

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

浜窪 隆雄 (Hamakubo Takao) 東京大学先端科学技術研究センター・教授  
研究者番号: 90198797

### (2)研究分担者

堀内 恵子 (Horiuchi Keiko) 東京大学先端科学技術研究センター・特任助教  
研究者番号: 00456203

太期 健二 (Daigo Kenji) 東京大学先端科学技術研究センター・特任助教  
研究者番号: 20466866

篠田 恵子 (Shinoda Keiko) 東京大学先端科学技術研究センター・特任助教  
研究者番号: 80646951

岩成 宏子 (Iwanari Hiroko) 東京大学先端科学技術研究センター・特任助教  
(H25~26)  
研究者番号: 20176556

川村 猛 (Kawamura Takeshi) 東京大学アイソトープセンター・准教授  
研究者番号: 70306835

津本 浩平 (Tsumoto Kohei) 東京大学・大学院工学系研究科・教授  
研究者番号: 90271866

### (3)連携研究者

藤谷 秀章 (Fujitani Hideaki) 東京大学先端科学技術研究センター・特任教授  
研究者番号: 50417151

長門石 暁 (Nagatoishi Satoru) 東京大学・医科学研究所・助教  
研究者番号: 30550248

### (4)研究協力者

山下 雄史 (Yamashita Takefumi) 東京大学先端科学技術研究センター・特任准教授  
研究者番号: 50615622