

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460379

研究課題名(和文)凝固第XIII因子(血漿トランスグルタミナーゼ)の細胞内基質及び活性化因子の検索

研究課題名(英文) Search for the intracellular substrates and activators of coagulation factor XIII (plasma transglutaminase)

研究代表者

惣宇利 正善 (SOURI, Masayoshi)

山形大学・医学部・准教授

研究者番号：20292419

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：血漿トランスグルタミナーゼ(TGase)である凝固第XIII因子Aサブユニット(FXIII-A)は、巨核球や単球・マクロファージ等の細胞内にも存在する。本研究では、細胞内におけるFXIII-Aの活性化および酵素機能について検討し、活性化ペプチドの切断を伴わずにFXIII-Aを活性化する因子が細胞の核内に存在すること、FXIII-Aが少なくとも3種類の核内タンパク質の修飾に関わり得ることを見出した。さらに、TGase活性によるアミン修飾が、ユビキチン化を伴わずにプロテアソームでの分解を促進し、基質タンパク質の機能制御に働くことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The A subunit of coagulation factor XIII (FXIII-A) is a plasma transglutaminase (TGase), which exists not only in plasma but also inside bone marrow-derived cells such as megakaryocytes and monocytes/macrophages. In the present study, we examined the intracellular activation and activity of FXIII-A. We found that there was an activation factor(s) of FXIII-A in nucleus in the absence of proteolytic cleavage of the activation peptide in FXIII-A, and that at least three nuclear proteins were identified as possible substrates for FXIII-A. Furthermore, our study suggested that amine-modification of proteins by TGase activity regulates functions of the substrate proteins by the acceleration of proteasomal degradation in the absence of ubiquitination.

研究分野：医歯薬学

キーワード：酵素 トランスグルタミナーゼ 凝固第XIII因子 細胞内基質 細胞内活性化

1. 研究開始当初の背景

トランスグルタミナーゼ (TGase) は、タンパク質分子同士を共有結合で糊付け (架橋) して、基質タンパク質の機能の制御や新たな機能の付加といった翻訳後修飾を担う酵素であり、局在部位や機能が異なる 9 種類の遺伝子ファミリーメンバーが存在する。そのうちの 1 つ、血漿 TGase である FXIII は、フィブリン分子同士、フィブリンと α_2 -プラスミンインヒビター、フィブロネクチンなどのタンパク質分子間を架橋して、止血の維持と傷害組織の修復に働く。FXIII は、酵素本体である FXIII-A と、FXIII-A の保護に働く B サブユニット (FXIII-B) との異種四量体として血中を循環している。FXIII-A はまた、巨核球・血小板や単球・マクロファージなどの細胞内にも、FXIII-B とは独立して存在する。

これまでに我々が作製した、FXIII-A あるいは FXIII-B 欠損マウスや FXIII-A を内在性に発現している巨核球系 MEG-01 細胞を用いた解析から、

- FXIII-A は細胞質のみならず核内や細胞膜にも局在し、増殖の盛んな時期においては中間径フィラメントタンパク質のビメンチンと相互作用する
- 血漿中の FXIII-A の欠損により、オスの心臓¹や妊娠中のメスの子宮および脱落膜内に出血を示す²が、FXIII-A 陽性細胞により致死的な出血が抑えられる
- 欠損マウスで FXIII-A 陽性細胞がない場合、心臓や妊娠期の子宮・胎盤、創傷皮膚での I 型コラーゲン産生の著しい低下を示す
- LPS 誘導性の心筋内マクロファージ浸潤が FXIII-A 欠損マウスでは低下する
- 血球分化誘導において FXIII-A 欠損マウスは野生型と異なる挙動を示す

といった、細胞機能や遺伝子発現への関与を示唆する結果を得ている。これらの知見から、細胞内での FXIII-A の TGase 酵素としての作用を予想し、ビオチン化アミン基質 [5-(biotinamido) pentylamine (BAPA)] を添加した培地中で MEG-01 細胞を培養したところ、特に核分画のタンパク質に BAPA が取込まれることを予備的に確認している。

これまでに、海外のグループの研究からも、少なくとも核内において TGase 活性を発揮していることが報告されている³が、FXIII-A が基質とする細胞内タンパク質は、ごく一部しか同定されていない。また、血漿中の凝固反応においては、FXIII-A はその N 末端の活性化ペプチドがトロンビンにより切断されて活性化するが、細胞内での活性化システムについては、カルパインに

よる切断や、カルシウムによる非酵素的メカニズムが推定されているのみで、現在まで実証されていない。

2. 研究の目的

本研究では、細胞内での FXIII-A 活性の存在を明確にし、その生理的な意義を探ることを目的として、細胞内活性化システムおよび基質タンパク質の検索・同定を行った。

3. 研究の方法

(1) 核及び核抽出液の調製 Dignam ら (1983) の方法⁴に従った。

(2) 細胞アミン取り込み反応 およそ $1 \sim 3 \times 10^6$ 個のヒト巨核球系 MEG-01 細胞あるいは FXIII-A 発現ベクターを導入した Baby hamster kidney (BHK) 細胞を、4 mM BAPA (Pierce 社)、10 μ M プロテアソーム阻害剤 MG-132 (Calbiochem 社) を含む 0.1 mL の培養培地に懸濁し、37°C で 1 時間インキュベートした。核及び細胞質を分画し、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを用いたウエスタンブロットティングにより、BAPA が取り込まれたタンパク質を検出した。

(3) 核アミン取り込み反応 核分画を 4 mM BAPA, 2 mM CaCl_2 とともに 37°C で 1 時間インキュベートし、遠心回収後、核抽出液を調製した。

(4) 基質タンパク質の同定 核アミン取り込み反応で調製した核抽出液をプロテアーゼ消化し、ストレプトアビジンアガロース (Thermo Scientific 社) にて回収された BAPA 修飾ペプチドを、Nano-flow liquid chromatography-tandem mass spectrometry (NanoLC MS/MS) によって同定した。

(5) FXIII-A 活性化活性の測定 N,N-dimethylcasein をコートした 96 穴プレートに、2 mM BAPA, 2 mM CaCl_2 , 1 mM DTT, 2 μ g/mL 組換え体 FXIII-A (rFXIII-A), 及び核抽出液を入れて、37°C で 1 時間反応した。洗浄後、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを加えて結合させた後、tetramethylbenzidine (TMB) で発色定量した。

4. 研究成果

(1) FXIII-A の TGase 活性による細胞内タンパク質へのアミン取り込み

FXIII-A を内在性に発現する巨核球系 MEG-01 細胞について、培養上清に BAPA を添加して培養した場合、ビオチン標識されたタンパク質が核分画で多数検出された一方で、細胞質分画にはほとんど認められ

なかった。核分画タンパク質への BAPA の取り込みは、TGase 阻害剤の添加により強く阻害されることから、TGase 活性によることが確認され、また、培養上清へのカルシウムの添加は要求しないものの、EDTA の添加により抑制されたことから、TGase 反応に必要なカルシウムは細胞内プールで賄われていることが示唆された。さらに、プロテアソーム阻害剤の添加により核分画タンパク質の BAPA 標識が著しく増加したことから、プロテアソームによるアミン標識タンパク質の迅速な分解が強く示唆された。一方で、E1 ユビキチンリガーゼ阻害剤による BAPA 取り込みへの影響は認めなかったことから、ユビキチン化を介さない、アミン修飾による核内タンパク質の新たなプロテアソーム分解系の存在が疑われた。

MEG-01 細胞には組織型 TGase (TGM2) も発現していることから、FXIII-A が細胞内で機能し得るかどうかを確認するために、内在性には FXIII-A を発現していない BHK 細胞に FXIII-A 発現ベクターを導入して検討した。発現した FXIII-A は核分画にも検出され、培養上清に BAPA を添加することで、FXIII-A 未導入では見られない核分画タンパク質への BAPA の取り込みが明確に検出された。BHK 細胞でのタンパク質アミン修飾は FXIII-A の触媒残基変異体を導入した場合には検出されないことから、FXIII-A が核で TGase として機能しうることを確認した。さらに、FXIII-A 欠損、TGM2 欠損の各マウスから採取した骨髓細胞を BAPA とインキュベートし、蛍光免疫染色を行ったところ、TGM2 欠損骨髓細胞のうち FXIII-A 陽性細胞、CD61 陽性細胞 (巨核球) に BAPA の取り込みが検出され、FXIII-A 欠損骨髓細胞では CD61 陽性細胞における BAPA の取り込みは観察されなかったことから、巨核球における FXIII-A 活性の寄与が強く示唆された。

(2) 核内基質タンパク質の同定

MEG-01 細胞から調製した核分画を用いて、カルシウムイオン濃度依存性に BAPA がタンパク質に取り込まれること、TGase 阻害剤により BAPA の取り込みが阻害されること、抗 FXIII-A 抗体、抗 TGM2 抗体により、それぞれ異なるタンパク質への BAPA の取り込みが抑制されることを確認した。そこで、核分画での BAPA 反応物について、NanoLC MS/MS による解析を行ったところ、15 種類の候補タンパク質が同定され、同時に、それぞれの候補タンパク質について、アミン取り込み部位が推定された。同定されたタンパク質は、RNA スプライシングに関与するものや核小体に含まれるものなど、いずれも核に存在するタンパク質であった。このうち、11 種類については抗体を

入手し、MEG-01 細胞の核に発現していることをウエスタンブロット解析により確認した。

候補タンパク質のうち 4 種類について、誘導発現系を用いて BHK 細胞で cDNA の発現実験を行った。1 種類 (候補 1) は、FXIII-A と共発現した場合に細胞核内でタンパク質分子へのアミンの取り込みが確認され、また FXIII-A 発現に依存した部分的な分解も検出された。別の候補 (候補 2) は、cDNA 発現細胞から精製したタンパク質について、トロンビンで活性化した rFXIII-A とともに *in vitro* で BAPA と反応させた場合、BAPA が取り込まれることが確認された。また、さらに別の候補タンパク質 (候補 3) は、FXIII-A を共発現させた場合に核内で高分子量化することが観察された。

MEG-01 細胞を BAPA やポリアミン存在下で培養し、4 種類の基質候補タンパク質についてウエスタンブロット解析を行ったところ、候補 1 および 2 について、核分画中の量の低下を認め、候補 1 については断片化が観察された。プロテアソーム阻害剤 (MG-132) 存在下で細胞をポリアミン処理した結果、基質候補タンパク質の核分画における減少・断片化が抑制された。ポリアミン処理による核分画での減少・断片化はまた、トランスグルタミナーゼ活性阻害剤で抑制された一方で、ユビキチンリガーゼ阻害剤 (Pyr-41) では抑制されなかった。以上の結果から、少なくとも 3 種類は FXIII-A の基質となりうることを示され、TGase 活性による修飾、生体内ではおそらくはポリアミン付加によりプロテアソームでの分解が促されて、その核内存在量が調節されているものと推測された。

(3) 細胞核内での FXIII-A 活性化

MEG-01 の核抽出液を *in vitro* で rFXIII-A と混合したところ、rFXIII-A のアミン取り込み活性が出現した。細胞質分画と混合した場合、rFXIII-A の活性化は検出されなかった。細胞核内の FXIII-A 活性化因子について、DNase 処理により核分画からの抽出効率が顕著に増加することから、核内クロマチンに含まれるタンパク質である可能性が示唆された。また、ゲル濾過において FXIII-A 活性化活性が void 分画に溶出されることから、FXIII-A 活性化因子は巨大なタンパク質複合体に含まれていることが示唆された。

ウエスタンブロット解析において、MEG-01 および FXIII-A cDNA を導入した BHK 細胞の核抽出液に含まれる FXIII-A、核抽出液と混合した rFXIII-A にはいずれも、活性化ペプチドの切断は認められなかつ

た。そこで、活性化部位（トロンビン切断部位）を変異させた FXIII-A (R37G) を BHK 細胞に導入したところ、核抽出物による *in vitro* での活性化反応、導入細胞内における核内タンパク質アミン取り込み反応はいずれも野生型と同程度であったことから、血液凝固反応（血漿中）と異なり、細胞内においては、核分画に存在する活性化因子との複合体形成による、活性化ペプチドの切断を伴わない FXIII-A の活性化が強く示唆された。

(4) 本研究のまとめと今後の展望

本研究では、活性化に寄与する因子が核に局在するため、細胞内の FXIII-A は核においてのみ TGase として機能しうること、その活性化が限定分解による活性化ペプチドの切断を伴わないことを示した。極めて興味深いことに、FXIII-A を含む TGase による核タンパク質の修飾は、ユビキチン化を介さない新たなプロテアソーム分解系に含まれる可能性が本研究にて示唆された。FXIII-A は巨核球や単球・マクロファージといった分化した細胞のみならず、CD34 陽性の比較的未分化な細胞にも発現することを見出しており、今後は、同定した基質タンパク質の機能調節を含めた細胞分化・機能への細胞内 FXIII-A の関与について、さらに追求する予定である。

参考文献

1. Souri M, Koseki-Kuno S, Takeda N, Yamakawa M, Takeishi Y, Degen JL, Ichinose A. *Thromb. Haemost.* 99: 401-408 (2008)
2. Koseki-Kuno S, Yamakawa M, Dickneite G, Ichinose A. *Blood* 102: 4410-4412 (2003)
3. Adány R, Bárdos H, Antal M, Módos L, Sárváry A, Szücs S, Balogh I. *Thromb. Haemost.* 85: 845-851 (2001)
4. Dignam JD, Lebovitz RM, Roeder RG. *Nucleic Acids Res.* 11: 1475-1489 (1983)

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)

1. Souri M, Osaki T, Ichinose A. The non-catalytic B subunit of coagulation factor XIII accelerates fibrin cross-linking. *Journal of Biological Chemistry* (査読あり) 290, 2015 12027-12039. DOI: 10.1074/jbc.M114.608570.
2. Souri M, Osaki T, Ichinose A. Anti-factor XIII A subunit (FXIII-A)

autoantibodies block FXIII-A₂B₂ assembly and steal FXIII-A from native FXIII-A₂B₂. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* (査読あり) 13, 2015 802-814. DOI: 10.1111/jth.12877.

[学会発表] (計 6 件)

1. 惣宇利 正善, 尾崎 司, 一瀬 白帝. 非酵素部位である凝固第 XIII 因子 B サブユニットのフィブリン架橋反応における見過ごされていた役割. 第 38 回日本分子生物学会・第 88 回日本生化学会合同大会. 2015 年 12 月 2 日 神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市)
2. Souri M, Osaki T, Ichinose A. Development of a novel assay of coagulation factor XIII activity for the detection of its inhibitor in plasma. 第 25 回国際血栓止血学会学術集会 2015 年 6 月 23 日 トロント (カナダ)
3. 惣宇利 正善, 尾崎 司, 和田 秀穂, 一瀬 白帝. 先天性凝固第 XIII 因子 B サブユニット欠損症例に生じた抗 B サブユニット同種抗体による活性阻害. 第 87 回日本生化学会大会. 2014 年 10 月 16 日 国立京都国際会館 (京都府京都市)
4. 惣宇利 正善, 尾崎 司, 一瀬 白帝. 凝固第 XIII 因子インヒビターの鋭敏な検出のための新規第 XIII 因子活性測定法の開発. 第 36 回日本血栓止血学会学術集会. 2014 年 5 月 31 日 大阪国際交流センター (大阪府大阪市)
5. 惣宇利 正善, 尾崎 司, 一瀬 白帝. フィブリン架橋反応における抗 XIII 因子自己抗体の阻害作用機序. 第 35 回日本血栓止血学会学術集会. 2013 年 6 月 1 日 山形国際ホテル (山形県山形市)
6. Souri M, Osaki T, Ichinose A. The B subunit for coagulation factor XIII accelerates the crosslinking of fibrin in human plasma. 第 24 回国際血栓止血学会学術集会 2013 年 7 月 1 日 アムステルダム (オランダ)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

惣宇利 正善 (SOURI, Masayoshi)
山形大学・医学部・准教授
研究者番号: 20292419