

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26292192

研究課題名(和文) 生体機能を司る蛋白質架橋化とその制御破綻に関する分子基盤

研究課題名(英文) Molecular basis fo protein-crosslinking reaction by transglutaminase focusing on aberrant regulation

研究代表者

人見 清隆 (Hitomi, Kiyotaka)

名古屋大学・創薬科学研究科・教授

研究者番号：00202276

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：蛋白質架橋化反応は血液凝固や皮膚表皮の形成に必須な、生体内での重要な蛋白質修飾の一つで、トランスグルタミナーゼという酵素で行われる。この酵素反応によって、必要な場合にのみ蛋白質どうしが不可逆に架橋接着されて、本来の機能や形が変化して細胞・組織・個体の恒常性維持に貢献する。しかし、酵素が働く部位や作用が異常になってこの反応様式が破綻すれば、様々な疾患状態をもたらす。本研究では、蛋白質架橋が破綻した場合に生じる細胞の変化、組織の損傷、個体の異常を明らかにするべく、様々なモデル系での酵素の変動、産物、細胞・組織と個体の変化を解析した。

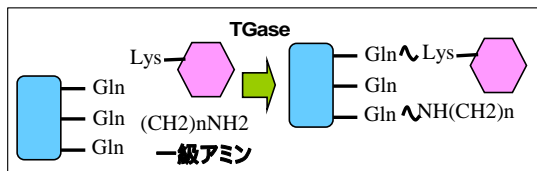
研究成果の概要(英文)：Enzymatic cross-linking reaction of proteins is carried out by transglutaminase, which consists of enzyme family in human. By the enzymatic reaction, several essential protein modifications are accomplished such as blood coagulation and epidermis formation. The enzymatic reaction is critically regulated and contribute to homeostasis. However, in the case of aberrant expression, activation, or reaction of the transglutaminase, cellular and/or tissue damage occur that will bring several kinds of diseases in human. In order to clarify the aberrant enzymatic reactions and their products at the level of cell, tissue, and body, we investigated the variation of the enzymatic activities and substrates (products), expression pattern of the enzymes in several tissues: liver, kidney, epidermis at disease condition. Furthermore, using medaka as the model organism, we established the gene-deficient fish of transglutaminase as diseases model.

研究分野：応用分子細胞生物学

キーワード：酵素 カルシウム 表皮 線維症

1. 研究開始当初の背景

蛋白質架橋反応は生体内の重要な蛋白質修飾の一つとして、高等動物においては血液凝固や皮膚表皮形成を始め重要な生命現象に参与している。この反応は、トランスグルタミナーゼという酵素ファミリーにより行われ、ヒトでは8種類のアイソザイム(Factor XIII, TG1-TG7) から構成される。この酵素反応は、異種または同種の蛋白質を不可逆に架橋接着させることで、本来持っていた機能や形を変化させる。これまでに先述の生命現象以外にも細胞外マトリクスの強化や転写調節因子の不活性化など正常時において貢献する他、活性が異常な場合は、血液凝固不全や皮膚病、自己免疫疾患(セーリアック病:小麦摂食を原因とする欧米では深刻な疾患)など多くの疾患に参与する。



トランスグルタミナーゼによる様々な基質蛋白質の修飾結果として、細胞・組織に多大な変化をもたらす。より詳細には、基質となる蛋白質の特定のグルタミン残基とリジン残基の間に、共有結合(イソペプチド結合)を形成させて不可逆な構造に至る。そのため正常時においてはその活性発現に厳密な制御がされており、この酵素が働く部位や基質への作用様式もきわめて特異的に行われている。しかしながら、この制御機構が異常になったり、通常と異なるレベルの発現や活性に至ったりした場合には、生体は細胞や組織のレベルでその活動に疾患状態をもたらす。また疾患状態の組織において蛋白質架橋酵素活性・発現の破綻も見られる。

トランスグルタミナーゼが関与するとされる疾患は古くから研究がなされ、先述の血液凝固や皮膚疾患のみならず、線維症、糖尿病、アルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患との関わりも報告されてい

る。蛋白質架橋が異常な状態となる場合に、細胞・組織・個体のレベルでどのような破綻が生まれるのかについて、分子細胞レベルでの基盤的研究知見は少なかった。

研究代表者は多年にわたって本酵素反応の生化学的研究に携わり、世界に先駆けて基質として認識されるのに必要なアミノ酸配列情報の同定に成功している。その情報に基づいた高反応性基質配列を用いての研究を展開しており、この方面からのアプローチを行う準備も整っている状況にあった。

2. 研究の目的

蛋白質架橋反応は本来、生体内で必要な際に適切な制御が行われている。これが破綻した際におこる蛋白質架橋反応(産物)の分子基盤を明らかにするために、以下の3点の方向から検討することを目的とした。

(1) 疾患時の細胞や組織内で、架橋酵素の活性や発現レベルに変化が起こってくるのか:対象組織を腎臓と肝臓とし、近年疾患のメカニズムが注目されている「線維症」症状での発現および活性レベルの変動を明らかにすることとした。また抗ガン剤のシスプラチンによる急性腎不全における酵素(TG1, TG2)活性発現変動も研究対象とした。

この他、蛋白質架橋反応が必須とされる表皮形成においては、今なお正常状態においても架橋形成レベルがどのように変動するのか、については不明な点が多い。そのため、表皮立体培養系を用いて、特異的に発現する架橋酵素(TG1, TG3)について明らかにすることを目的とした。

(2) 細胞や組織でどのような蛋白質がまず架橋されやすいのか(責任基質となるのか):

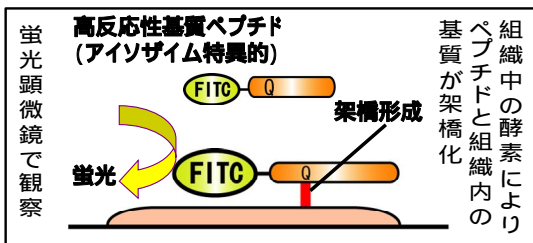
上にあげた腎・肝での線維症を対象にして、酵素が架橋する基質蛋白質を網羅的に明らかにすることを目的とした。表皮細胞においても、培養細胞系を利用して正常状態における架橋される基質をTG1について明らかにすることを目指した。

(3) 架橋酵素反応が破綻した、細胞や個体のモデル系を確立した際にどのような変化が生じるのか、細胞レベルでは siRNA、個体レベルではゲノム編集技術を駆使して、蛋白質架橋反応が生じない状況を生み出して、細胞・組織・個体での酵素反応の変動を始めとして、その後生じる「架橋反応欠損」に起因する現象、架橋されるべきであった基質蛋白質群を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

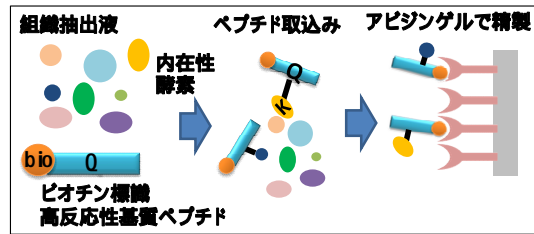
(1) 高反応性基質配列を用いた活性の可視化による細胞・組織の制御破綻の解析

代表者らが確立している、各アイソザイムに対する高反応性基質配列を蛍光標識し、組織切片における反応性を明らかにすることで、疾患状況にある組織での異常な酵素活性変動を検出できる(下図)。研究対象としては、培養細胞レベルでの表皮細胞、疾患状態を再現させた腎臓および肝臓とした。後者についてはシスプラチン投与による急性腎障害、胆管結紮 BDL による肝線維症、尿管結紮 UUO による腎線維症のモデルマウスを用いた。



(2) 高反応性基質配列を用いた正常及び異常の差異の基質候補蛋白質の同定

高反応性基質配列を適切に標識することにより(ビオチン標識など)(1)にあげたような異常および正常組織での反応を再現し、ビオチン標識基質ペプチドを取り込んだ蛋白質群から精製し(アビジンゲルクロマトグラフィー)、質量分析にて網羅的に同定した。



(3) 高反応性基質配列を用いた高感度アッセイ系の確立

架橋化産物が生成した際に初めて、FRET(共鳴蛍光エネルギー移動現象)を起こす、という系を組み立てるため、まず高反応性基質配列(グルタミン側基質)と蛍光蛋白質を融合させて発現精製した。同時に別波長の蛍光蛋白質とリジン側基質配列を融合させてそれぞれを大腸菌にて発現させ精製した。双方を濃度検討しながら混合し、架橋化が検出される最も感度の良い条件を検討した。

(4) 蛋白質架橋反応を中心とした該当遺伝子欠損疾患モデル動物の確立と解析

蛋白質架橋反応自体がうまく行われない場合にはヒトではいくつかの疾患状態が報告されている。そのためモデル生物としてのノックアウトマウスがすでにいくつか作製されているものの TG1(表皮形成に必須)ノックアウトなどでは皮膚が不十分で出生後に致死に至るため成長後の解析に難がある。また系統維持や作製には困難が多いため、モデル生物として近年創薬研究にも利用され始めている「メダカ」(*Oryzias latipes*)を用い変異個体の取得を試みた。

メダカにはヒトの主要な蛋白質架橋化酵素に相当する遺伝子が全て存在している。生化学解析(組換え蛋白質作製と抗体による組織解析)によってそれぞれは同様の酵素としての性質を有することを確認ののち、ゲノム編集法のひとつである CRISPR/Cas9 法を用いて、遺伝子変異個体を作製した。

4. 研究成果

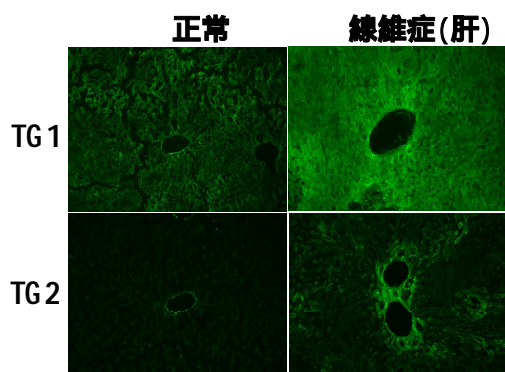
研究成果は蛋白質架橋酵素およびその反応産物について、生体が異常な状態にある場

合の発現レベルや基質についての解析、架橋が破綻した細胞系や個体を得たものであるが、以下のように4項目に分けて記述する。

(1) 高反応性基質配列を用いた活性の可視化による細胞・組織の制御破綻の解析

対象とした表皮の細胞培養系(立体培養)においては正常な皮膚と同様の分化を達成しうるものであるが、役割分担がある2つの主要なアイソザイム(TG1, TG3)の活性の可視化を行った。結果として、TG1とTG3が異なる段階で発現することを明らかにした。すなわちTG1に比してTG3の方が分化の後期、顆粒層を中心に活性が高かった。両者の発現パターンはこれまでの表皮組織でバリア形成を進めるうえでの知見を裏付けた。また、各TG1, TG3に対するsiRNA(抑制的RNA)を用いて発現抑制した場合の表皮細胞系の作製も行った。その場合に表皮細胞分化がどのように破綻するかを光学顕微鏡及び電子顕微鏡において観察している(投稿準備中)。

傷害を与えて破綻する系の一つとして、シスプラチン投与時の急性腎障害について、進行程度に合わせて活性の可視化を行い、進行に基づきTG1, TG2の上昇を明らかにした。どの組織にもあるTG2の上昇は推測したが、TG1(皮膚型)についてはその発現や上昇は予想しておらず興味ある知見である(論文)。



腎と肝における線維症については、TG1とTG2が発現部位を異にし、明確に症状の進行に合わせて活性上昇を確認した。腎においてTG1は尿管に、TG2は糸球体から間質領域に活性発現部位が変動した(投稿準備中)。

肝臓はTG1が全体的に活性上昇する一方で、TG2が門脈周囲や細胞外を中心に活性を認めた(左下図、論文)。

(2) 高反応性基質配列を用いた正常及び以上の差異の基質候補蛋白質の同定

対象として細胞レベルではヒト由来の表皮細胞培養系と個体レベルで急性腎障害・腎及び肝臓のモデルマウスを用いた。

表皮細胞については平面培養系を用いて、高反応性基質ペプチドを用いた基質候補の同定を行った。その結果、従来の既知の基質に加えて、新たに3種の基質候補蛋白質(ガレクチン、カリクレイン10、クリスタリン)を同定した(論文)。今後組換え蛋白質を作製して、架橋反応後の機能変換を検討する。

線維症は細胞抽出液に混合した標識された高反応基質ペプチドを用い、各々の疾患の進行程度ごとの抽出液から基質候補を精製した。精製された分子は質量分析で同定した。これらの中でこれまで見出されていなかった、特に注目される基質として、炎症応答に関わるS100タンパク質(腎)、肝の細胞死に伴い局在変動するKeratin8及びkeratin18等を見出した。実際にこれらは、基質ペプチドの取込みをそれぞれの組換え蛋白質を作製して基質となることを確認しており、今後架橋に伴う機能変換を解析する。

(3) 高反応性基質配列を用いたFRET高感度アッセイ系の確立

基質配列(高反応性基質配列とリジン提供配列)と2種の蛍光蛋白質(Evenus, Celurian)との融合タンパク質を用いて、FRET現象による新規なアッセイ系を確立した(論文)。

今後は同時に細胞内で発現、もしくは一分子の中に両方の融合蛋白質をコードする分子を発現するようにして、細胞内でのリアルタイムでの活性可視化をめざす。

(4) 蛋白質架橋反応を中心とした該当遺伝子欠損疾患モデルメダカの確立と解析

モデル生物としてのメダカには、主要なアイ

ソザイム (Factor XIII; 血液凝固、TG1; 皮膚表皮形成、TG2; 細胞死制御や細胞外マトリクス強化等) のそれぞれについてアイソザイムを見出している (FXIII; OITGB, TG1; OITGK1, OITGK2, OITGK3, TG2; OITGT)。本研究期間では、これらのアイソザイムについて、抗体による発現部位の同定を含めて生化学的解析を全てについて終えた (論文、)。ゲノム編集法によって正常な蛋白質としての酵素を発現できない変異個体の作製に成功した。酵素蛋白質が発現しないことは抗体による発現によって確認したうえで、表現型を解析して次のような結果を得ている。

OITGB (FXIII) については2種の異なる変異体を取得し、いずれもフィブリンの架橋が進まないことを確認し血液凝固物も野生型に比べてもろいものとなった (論文投稿中)。OITGT (TG2) については、時間あたりの遊泳距離が短く、現在は遺伝子を再び補って野生型と同様の遺伝子に戻したメダカを作製して裏付けを進めている。OITGK1 (TG1) については、表皮構造に異常が出ていないかを観察した。明確に表皮形成の異常はないが、今後は生育する外液で負荷をかけ (pH, 塩) それに対する反応を検討する。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計9件)

Furukawa K., Yamane M., Tatsukawa H., Hitomi K. Early response as shown by enhancement of transglutaminase 1 expression after cisplatin-induced acute kidney injury. **Arch. Biophys. Biochem.** 586: 27-32 (2015) doi: 10.1016/j.abb.2015.09.021.

Tatsukawa H., Abe N., Ohashi S., and Hitomi K. Distribution of transglutaminase family members in mouse tissues and whole body sections. **Biochem Biophys Res Commun.** 467(4): 1046-51 (2015) doi: 10.1016/j.bbrc.2015.10.001.

Kikuta A., Tatsukawa T., Hashimoto H. and Hitomi K. (他8名) Biochemical characterization of medaka (*Oryzias*

latipes) transglutaminases, OITGK1 and OITGK2, as orthologues of human keratinocyte-type transglutaminase. **PLoS One** 10(12): 0144194 (2015) doi: 10.1371/journal.pone.0144194

Tatsukawa H., Furutani Y., Hitomi K., Kojima S., Transglutaminase 2 has opposing roles in the regulation of cellular functions as well as cell growth and death. **Cell Death Dis.** 7(6): e2244. doi: 10.1038/cddis.2016.150. (2016)

Yamane M., Sugimura K., Kawasaki H., Tatsukawa H., Hitomi K. Analysis on transglutaminase 1 and its substrates using specific substrate peptide in cultured keratinocytes. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 478: 343-348. (2016) doi: 10.1016/j.bbrc.2016.07.051

人見清隆 トランスグルタミナーゼとポリアミン ポリアミン (日本ポリアミン学会) 3(1): 8-13 (2016)

Tatsukawa H. Liu HH., Ooba S., Kamiya N., Nakanishi Y., Hitomi K. FRET-based detection of isozyme-specific activities of transglutaminases. **Amino Acids** 49: 615-623 (2017) doi: 10.1007/s00726-016-2322-0. (2017)

Takada Y., Watanabe Y., Okuya K., Tatsukawa H., Hashimoto H., Hitomi K. Characterization of medaka orthologue of human transglutaminase 2 (OITGT). **Biochem. Biotechnol. Biosci.** 81: 469-474 (2017) doi: 10.1080/09168451.2016.1256757

Tatsukawa H., Tan Y., Otsu R., Nakagawa H., Hitomi K. Global identification and analysis of isozyme-specific possible substrates crosslinked by transglutaminases using their substrate peptides in mouse liver fibrosis. **Sci. Rep.** 7: 45049. doi: 10.1038/srep45049. (2017)

[学会発表] (計16件)

山根美樹、梶村佳代子、辰川英樹、人見清隆、皮膚表皮細胞内でトランスグルタミナーゼ 日本生化学会大会第87回大会 (京都) 平成26年10月15-16日

菊田彩華、古川エリ、橋本寿史、辰川英樹、人見清隆 皮膚表皮形成に必須な蛋白質架橋化酵素のメダカにおける類似遺伝子群の解析 日本生化学会大会第87回大会 (京都) 平成26年10月15-16日

谷優治、辰川英樹、人見清隆 肝線維症の

病態形成における架橋化反応の役割 日本生化学会大会第 87 回大会 (京都) 平成 26 年 10 月 15-16 日

大津里紗、谷優治、辰川英樹、人見清隆 腎臓線維化組織において架橋修飾されるタンパク質群の網羅的解析 第 88 回日本生化学会大会 (神戸) 平成 27 年 12 月 2 日

堀水里麻、小河亮太、橋本寿史、木下政人、辰川英樹、橋本寿史、人見清隆 モデル生物としてメダカを用いたタンパク質架橋化酵素の生理的機能解析 第 88 回日本生化学会大会 (神戸) 平成 27 年 12 月 3 日

梶村佳代子、川崎寛子、山根美樹、辰川英樹、人見清隆 ヒト表皮細胞分化に伴うタンパク質架橋化酵素とその基質群の発現解析 第 88 回日本生化学会大会 (神戸) 平成 27 年 12 月 3 日

Hitomi K., Tatsukawa H., Takahashi K., Yuzawa Y. Simple and sensitive detection system of the enzymatic activity for analyses on diseases related to transglutaminases 第 88 回日本生化学会ワークショップ 演者およびオーガナイザー (神戸) 平成 27 年 12 月 2 日

人見清隆 タンパク質架橋化酵素トランスグルタミナーゼ活性で病態を診断する 2016 年日本農芸化学会大会シンポジウム (札幌) 平成 28 年 3 月 28 日

人見清隆 タンパク質架橋酵素高反応性基質配列を用いた病態解析 日本農芸化学会中四国支部第 23 回若手シンポジウム (岡山) 平成 28 年 5 月 20 日

Wakita S., Otsu R., Yuji T., Tatsukawa H., Hitomi K. Identification and characterization of crosslinked substrates by transglutaminases in renal fibrosis. Gordon Research Conference (Barcelona, Spain) 平成 28 年 7 月 11 ~ 14 日

Hitomi K., Horimizu R., Okuya K., Watanabe Y., Hashimoto H., Tatsukawa H., Hitomi K., Transglutaminases in the medaka, fish as a model animal: biochemical characterization of mammalian orthologues and establishment of gene-deficient fish. 平成 28 年 7 月 11 日 ~ 14 日 Gordon Research Conference (Barcelona, Spain)

Tatsukawa H., Tani Y., Otsu R., Hitomi K. Comprehensive approach for identification and analysis of crosslinked substrate in liver fibrosis Gordon Research Conference (Barcelona, Spain) 平成 28 年 7 月 11 ~ 14 日

人見清隆 タンパク質架橋酵素トランスグルタミナーゼの高反応性ペプチドの多面的活用 生物工学会中部支部例会 (名古屋) 平成 28 年 8 月 3 日

脇田峻資、大津理沙、辰川英樹、人見清隆 腎臓線維化に伴い架橋される新規基質タンパク質 S100-A8 および S100-A9 の機能解析 第 89 回日本生化学会 (仙台) 平成 28 年 9 月 27 日

奥谷冬穂、橋本寿史、辰川英樹、人見清隆 他 メダカを用いた遺伝子変異個体の作製

による組織型トランスグルタミナーゼの機能解析 第 39 回 分子生物学会 (横浜) 平成 28 年 12 月 1 日

人見清隆、堀水里麻、奥谷冬穂、渡辺優子、木下政人、橋本寿史、辰川英樹 血液凝固に関するメダカトランスグルタミナーゼの解析と遺伝子変異個体の作製 日本農芸化学会大会 平成 29 年 3 月 18 日 (京都)

〔図書〕(計 1 件)

(自身も含め国内外の研究者による執筆 17 章からなる英文総説本を編集した) Kiyotaka HITOMI, Soichi Kojima, Laszlo Fesus, Springer Japan, Transglutaminase: Multiple Functional Modifiers and Targets for New Drug Discovery. 2015

〔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

トランスグルタミナーゼの発現基質データベース

http://www.ps.nagoya-u.ac.jp/lab_pages/biochemistry/transglutaminases_database.html

自身の研究室のホームページにトランスグルタミナーゼの解説、発現基質データベースとして mRNA 発現、活性可視化による発現パターン、同定した基質候補を載せている。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

人見清隆 (HITOMI Kiyotaka)

名古屋大学・大学院創薬科学研究科・教授
研究者番号: 00202276

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

橋本寿史 (HASHIMOTO Hisashi)

名古屋大学・生物機能利用研究センター・助教

研究者番号: 30359757

山西清文 (YAMANISHI Kiyofumi)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号: 10182586

黒田俊一 (Kuroda Syunichi)

大阪大学・大学院理学研究科 (産業科学研究科)・教授

研究者番号: 60263406

(4) 研究協力者

辰川英樹 (TATSUKAWA Hideki)

名古屋大学・大学院創薬科学研究科・助教

木下政人 (KINOSHITA Masato)

京都大学・大学院農学研究科・助教