

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 3 月 31 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23792140

 研究課題名（和文）ホロカルボキシラーゼ合成酵素を介した
 ビオチンによる炎症制御機構の解明

 研究課題名（英文）Study of inflammatory regulation by biotin
 via holocarboxylase synthetase

研究代表者

黒石 智誠 (KUROISHI TOSHINOBU)

東北大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：30400261

研究成果の概要（和文）：水溶性ビタミン B 群の 1 種であるビオチンによる炎症制御機構を解明する目的で、細胞内ビオチン代謝の要となる酵素であるホロカルボキシラーゼ合成酵素の遺伝子を欠損させたマクロファージ（炎症の誘導に重要な免疫細胞）を作製した。その結果、本細胞では炎症の誘導に重要なタンパク質である腫瘍壊死因子- α の産生能が低下していた。その一方、細胞が炎症局所に留まるのに重要なタンパク質（接着分子）の 1 種である CD11b の発現上昇が認められた。

研究成果の概要（英文）：Biotin is a water-soluble B complex vitamin found in all organisms. To elucidate the mechanisms of inflammatory regulation by biotin, a holocarboxylase synthetase knock-down macrophage (HCS-KD cells) was constructed. The holocarboxylase synthetase (HCS) is a key-enzyme in cellular biotin metabolisms. The production of tumor necrosis factor- α , an important bioactive protein that involved with inflammation, was decreased in the HCS-KD cells. On the other hand, CD11b, an adhesive protein that involved with inflammation, was up-regulated in the HCS-KD cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：免疫、炎症、金属アレルギー、ビオチン

1. 研究開始当初の背景

ビオチンは水溶性ビタミン B 群の 1 種であり、細胞内において 5 種類のカルボキシラーゼの補酵素として機能する。ビオチン依存性カルボキシラーゼは糖新生・エネルギー代謝（Pyruvate carboxylase; PC）、脂肪酸合成（Acetyl-CoA carboxylase-1 および 2; ACC-1、2）、分岐鎖アミノ酸と奇数鎖脂肪酸代謝およびエネルギー代謝（Propionyl CoA carboxylase; PCC）、ロイシン分解（ β -Methylcrotonyl CoA carboxylase; MCC）に関係し、ビオチンが特異的リジン残基側鎖のアミノ基に結合することによりホロカルボ

キシラーゼとなる。このリジン残基へのビオチンの転移反応を触媒する酵素がホロカルボキシラーゼ合成酵素（holocarboxylase synthetase; HCS）であり、細胞内におけるビオチン代謝経路の key enzyme である。HCS 遺伝子の変異に伴う HCS 酵素活性の低下（HCS 欠損症）は、ビオチン依存性カルボキシラーゼ活性の低下に起因する先天的代謝異常（multiple carboxylase deficiency; MCD）を引き起こし、ビオチン投与が無ければ致死となる。

ビオチン欠乏症において脱毛、皮膚炎症状が認められることは古くから知られている。

また、金属アレルギー、掌蹠膿疱症、関節リウマチおよびクローン病など、慢性炎症性疾患や自己免疫疾患において血清ビオチン濃度が低下することが報告されており、ビオチンの炎症性疾患への関与が示唆されている。

これまでに研究代表者らは、ビオチン欠乏マウスおよびビオチン欠乏細胞株（株化マクロファージ）を用いた研究から、(1) ビオチン欠乏により炎症性サイトカインである腫瘍壊死因子 (TNF) - α 産生が増強し、ビオチン投与によりその増強が抑制される、(2) ビオチン欠乏によりインターロイキン (IL) - 1β 産生が増強され金属アレルギー性炎症が悪化すること、(3) ビオチン投与により金属アレルギー性炎症が軽減することを明らかにした。これらの報告はビオチンによる金属アレルギー性炎症の制御を直接示した画期的な論文であるが、その詳細なメカニズムの解析には至っていない。

また、ビオチンによる遺伝子発現制御として、ヒストンのビオチン化を介したクロマチン構造の制御が報告されている。これまでに、(1) ヒストン H2A、H3 および H4 の特異的リジン残基がビオチン化されること、(2) このビオチン化ヒストンは遺伝子発現が抑制されているヘテロクロマチンに多く存在すること、(3) HCS がヒストンのビオチン化を触媒することが報告されている。さらに、cGMP 依存性プロテインキナーゼを介した細胞内シグナル伝達経路の制御なども報告されている。

以上の背景から、細胞内カルボキシラーゼの補酵素としての古典的な生理活性に加え、炎症・免疫制御、エピジェネティック制御、細胞内シグナル伝達系の制御など、新たなビオチンの生理機能が注目されている。

2. 研究の目的

これまでに研究代表者らは、ビオチン欠乏に伴う炎症性サイトカイン産生の増強と金属アレルギー性炎症の悪化、並びにビオチン投与による炎症抑制を報告したがその詳細は明らかとなっていない。

本研究では、細胞内ビオチン代謝の key enzyme である HCS の遺伝子をノックダウンした細胞 (HCS-KD 細胞) を作製し、ビオチンによる炎症制御機構、特に金属アレルギー性皮膚炎におけるビオチンおよび HCS の病因論的役割の解明を目的とする。そして、金属アレルギー性炎症に対するビオチン療法の作用機序を明らかにすることを旨とする。

3. 研究の方法

(1) HCS-KD 細胞の作製

HCS 遺伝子ターゲティングベクターは、マウス HCS 遺伝子のエクソン 7 とエクソン 9 および 10 をホモロジーアームとして持ち、エ

クソン 8 (基質であるビオチンとの結合部位をコード) の部位にネオマイシン耐性遺伝子を持つものであり、研究代表者が共同研究者である Janos Zempleni 教授 (University of Nebraska-Lincoln) の研究室で作製したものである (図 1)。そして、相同組換えを利用してマウス HCS 遺伝子のエクソン 8 をネオマイシン耐性遺伝子に置換するものである。本ベクターをマウスマクロファージ様細胞株である J774.1 細胞にエレクトロポレーション法 (Amaza 4D-Nucleofector) を用いて導入した。遺伝子導入後、G418 (ネオマイシン系抗生物質) 存在下で細胞を培養した (ポジティブセクション)。4 週間後、G418 存在下で増殖した細胞を回収し、PCR 法により遺伝子導入を確認するとともに、限界希釈法によりクローニングを行なった。各クローンが増殖した後、PCR 法により陽性クローンを選択した。再度、限界希釈法によるクローニングを行い、HCS-KD 細胞 (クローン HCS-KD-15) およびコントロール細胞 (G418 耐性であるが HCS 遺伝子は欠損していない細胞。クローン Control-16) を得た。

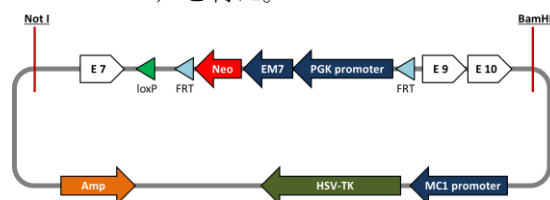


図 1 HCS ターゲティングベクター

E7、9、10 はそれぞれマウス HCS 遺伝子のエクソン 7、9、10 を、Neo はネオマイシン耐性遺伝子を示す。

(2) 細胞培養

細胞培養にはビオチン除去 RPMI1640 培地を用いた。ウシ胎児血清 (FCS) 中のビオチンは、FCS をアビジン結合アガロースと反応させることにより除去した。ビオチン除去 RPMI1640 培地にビオチン除去 FCS を終濃度 10% で添加した後、ビオチンを終濃度 40 nM (ビオチン充足条件) もしくは 0.04 nM (ビオチン欠乏条件) で添加し細胞培養に用いた。

(3) 細胞内ビオチン化カルボキシラーゼの検出

HCS 活性の指標として細胞内カルボキシラーゼのビオチン化を検出した。HCS-KD および Control 細胞より調整した細胞質画分を SDS-PAGE により分離した後、ペルオキシダーゼ標識アビジンを用いたウェスタンブロットング法によりビオチン化カルボキシラーゼを検出した。

(4) TNF- α 産生能の解析

HCS-KD および Control 細胞をグラム陰性菌

の細胞壁成分であるリポポリサッカライド (LPS、10 ng/mL) 存在下で 24 時間刺激培養した。培養上清中 TNF- α 濃度は市販 ELISA キット (BioLegend 社) を用いて測定した。

(5) 細胞表面抗原の解析

HCS-KD および Control 細胞を APC/Cy7 標識抗 CD11b 抗体 (クローン M1/70、BioLegend 社) および AlexaFluor 647 標識抗 CD11c 抗体 (クローン N418、BioLegend 社) で染色し、フローサイトメーターにより細胞表面における CD11b および CD11c 発現を解析した。

4. 研究成果

(1) HCS-KD 細胞の解析

まず、細胞内カルボキシラーゼのビオチン化に対する HCS 遺伝子ノックダウンの影響を検討するため、HCS-KD および Control 細胞を 2 種類のビオチン濃度 (ビオチン欠乏 0.4 nM、ビオチン充足 40 nM) で 2 週間培養し、細胞質画分中のビオチン化カルボキシラーゼを検出した (図 2)。その結果、いずれの細胞においてもビオチン欠乏条件下では細胞内カルボキシラーゼのビオチン化が低下していたが、HCS-KD および Control 細胞間で有意な差は認められなかった。

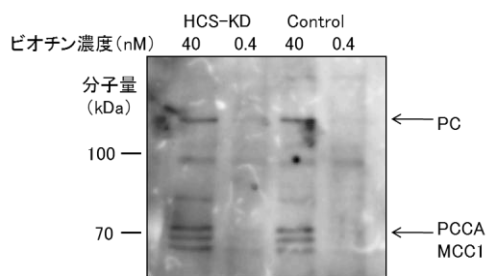


図 2 HCS-KD および Control 細胞における細胞内カルボキシラーゼのビオチン化状態
PC: Pyruvate carboxylase
PCCA: Propionyl CoA carboxylase, α subunit
MCC1: β -Methylcrotonyl CoA carboxylase, subunit 1

本研究で作製した HCS-KD 細胞は 1 対の染色体の片方でのみ HCS 遺伝子を欠損したヘテロ体であり、正常な HCS 遺伝子を 1 コピー保持していると考えられる。このため、この正常 HCS 遺伝子が機能したため、Control 細胞との差が認められなかったと考えられる。

(2) HCS-KD 細胞における TNF- α 産生

これまでに研究代表者らは、ビオチン欠乏下で培養した J774.1 細胞では TNF- α 産生能が増強されることを報告している。そこで、HCS-KD 細胞における TNF- α 産生能を解析した (表 1)。その結果、HCS-KD 細胞では Control 細胞に比較して、LPS 刺激による TNF- α 産生

量が低下していた。

	培養上清中 TNF- α 濃度 (ng/mL)	
	HCS-KD 細胞	Control 細胞
未刺激	8.8 \pm 0.4	8.8 \pm 0.4
LPS 刺激	76.4 \pm 3.4	115.9 \pm 3.8

表 1 HCS-KD および Control 細胞における TNF- α 産生能

この結果は、これまでに研究代表者が報告してきた「ビオチン欠乏に伴う TNF- α の産生増強」と相反する結果である。上述した様に、ビオチンには細胞内カルボキシラーゼの補酵素としての古典的な生理活性の他に、エピジェネティック制御やシグナル伝達系の制御など、様々な生理活性が報告されている。このため、①ビオチン欠乏で認められた TNF- α 産生増強効果は HCS を介していないこと、②ビオチン代謝の key enzyme である HCS のノックダウンと培地中 (環境中) ビオチン濃度の低下ではその作用が異なる可能性が推察された。

(3) ビオチン欠乏に伴う CD11b 発現の変化

HCS-KD および Control 細胞の培養において、ビオチン欠乏条件下ではプラスチック製細胞培養用フラスコへの付着が増強される傾向が認められた。そこで、細胞表面の接着分子の発現についてフローサイトメトリーにより解析した (図 3)。その結果、HCS-KD および Control 細胞のいずれにおいても、ビオチン充足条件下 (ビオチン濃度 40 nM) では CD11b 強陽性と弱陽性の 2 種類の細胞集団が認められたが、ビオチン欠乏条件下 (ビオチン濃度 0.4 nM) では CD11b 強陽性集団のみとなり、弱陽性集団は認められなかった。

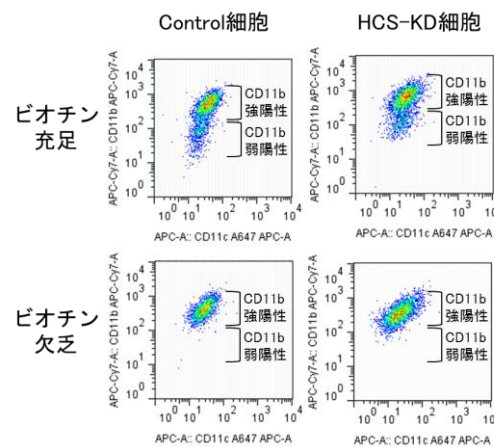


図 3 HCS-KD および Control 細胞における CD11b 発現

CD11b は代表的なマクロファージのマーカーであるが、CD18 とヘテロダイマーを形成し細胞接着因子として機能する。そのリガンドには ICAM-1 などの接着分子に加え様々なタンパク質や多糖類が報告されており、単球・マクロファージの炎症局所への浸潤で重要な役割を担っている。このことから、本研究で見出した「ビオチン欠乏に伴う CD11b 発現の増強」が、研究代表者がこれまでに報告した「ビオチン欠乏に伴う金属アレルギーの悪化」に關与する可能性が示唆された。

(4) 今後の展開

本研究で作製した HCS-KD 細胞はその HCS 活性（細胞内カルボキシラーゼのビオチン化）の面から Control 細胞と有意な差が認められなかった。今後は、①Cre-loxP システムなどによるコンディショナルノックダウンを用いた HCS-ホモ KD 細胞、②siRNA 発現ベクターなどを用いた HCS-KD 細胞などを作製し、ビオチンによる炎症制御における HCS の役割を検討する必要があると考える。

また、ビオチン欠乏に伴う CD11b 発現の増強に関しては、①in vivo での CD11b 発現に対するビオチン欠乏の効果、②CD11b 発現増強に關わる分子機構を解析するなどし、その生理的意義についてさらなる検討が必要である。

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 7 件)

1. Kim, Y., Seiryu, M., Okada, S., Kuroishi, T., Takano-Yamamoto, T., Sugawara, S., Endo, Y. Analgesic effects of the non-nitrogen-containing bisphosphonates etidronate and clodronate, independent of anti-resorptive effects on bone. *European Journal of Pharmacology* 699: 14-22, 2013. 査読有り.
2. Tanaka, Y., Nagai, Y., Dohdoh, M., Oizumi, T., Ohki, A., Kuroishi, T., Sugawara, S., Endo, Y. In vitro cytotoxicity of zoledronate (nitrogen-containing bisphosphonate: NBP) and/or etidronate (non-NBP) in tumour cells and periodontal cells. *Archives of Oral Biology* doi:p11: S0003-9969(12)00408-6. 10.1016/j.archoralbio.2012.11.010. 2012. 査読有り.
3. Nagai, Y., Tanaka, Y., Kuroishi, T., Sato, R., Endo, Y., Sugawara, S.

Histamine reduces susceptibility to natural killer cells via down-regulation of NKG2D ligands on human monocytic leukaemia THP-1 cells. *Immunology* 136: 103-114, 2012. 査読有り.

4. Zemleni, J., Kuroishi, T. Biotin. *Advance in Nutrition* 3: 213-214, 2012. 査読有り.
5. Zemleni, J., Teixeira, D.C., Kuroishi, T., Cordonier, E.L., Baier, S. Biotin requirements for DNA damage prevention. *Mutation Research* 733: 58-60, 2012. 査読有り.
6. Tanaka, Y., Nagai, Y., Kuroishi, T., Endo, Y., Sugawara, S. Stimulation of Ly-6G on neutrophils in LPS-primed mice induces platelet-activating factor (PAF)-mediated anaphylaxis-like shock. *Journal of Leukocyte Biology* 91: 485-494, 2011. 査読有り.
7. Kuroishi, T., Rios-Avila, L., Pestinger, V., Wijeratne, S.S.K., Zemleni, J. Biotinylation is a natural, albeit rare, modification of human histones. *Molecular Genetics and Metabolism* 104: 537-545, 2011. 査読有り.

[学会発表] (計 2 件)

1. Kuroishi, T., Endo, Y., Sugawara, S. IL-1 β augments nickel-induced nitric oxide production by mouse dermal fibroblast. 第 41 回日本免疫学会学術集会、2012 年 12 月 5~7 日、神戸.
2. 黒石智誠, 遠藤康男, 菅原俊二. ニッケル刺激マウス線維芽細胞による NO 産生と IL-1 β によるその増強. 第 54 回歯科基礎医学会、2012 年 9 月 15~16 日、郡山市.

[図書] (計 1 件)

1. Zemleni, J., Wijeratne, S.S.K., Kuroishi, T. Present Knowledge in Nutrition, 10th edition. Wiley-Blackwell. 359-374, 2012.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒石 智誠 (KUROISHI TOSHINOBU)
東北大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号：30400261