

令和元年6月20日現在

機関番号：83903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K09451

研究課題名(和文)血管老化におけるリポキシゲナーゼの細胞内局在制御システムの役割

研究課題名(英文)The role of cellular localization of ALOX proteins in vascular aging

研究代表者

勝見 章 (KATSUMI, Akira)

国立研究開発法人国立長寿医療研究センター・病院・部長

研究者番号：80378025

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：我々はRho GTPaseをbaitとしたアフィニティークロマトグラフィーとそれに続くマストペクトロメトリー実験系を確立した。血小板細胞質分画のアフィニティークラム精製の結果、既知のエフェクター(mDia, PKN1, Rho kinase, IQGAP2, Daam1等)に加えて、アラキドン酸リポキシゲナーゼ(ALOX)が活性型RhoAに結合することが見いだされた。RhoAとALOXの結合はDaam1を介していることが判明した。さらにALOXのLH2ドメインがDaam1のN末に結合することが明らかになった。以上の結果からALOXの細胞内局在にRhoAが関与していることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アラキドン酸リポキシゲナーゼ(ALOX)とその下流の脂質メディエーターは動脈硬化、血小板凝集、慢性炎症、がんの進展などに関与する多機能蛋白である。ALOX下流の脂質メディエーターについては活発に研究が行われているが、上流の制御メカニズムについては殆ど報告がなされていなかった。当該研究ではALOXの細胞内局在をRho family GTPaseが制御しており、動脈硬化部位、免疫器官など多様な臓器に脂質メディエーターをリクルートする際にこの経路が重要であるという新たな知見を得た。

研究成果の概要(英文)：Rho family proteins play a role in organelle development, cytoskeletal dynamics, cell movement, and other common cellular functions. To identify novel downstream effectors of RhoA, we performed GST-RhoA affinity column chromatography by using platelet lysates. Cytosol fraction of platelet was loaded onto affinity columns on which GST, GST-RhoA-N19, or GST-RhoA-L63 was immobilized. Using triple quadrupole liquid chromatography tandem mass spectrometer, several proteins associated with active RhoA were identified. Arachidonate lipoxygenase (ALOX) binds to GST-RhoA-L63, but not to GST-RhoA-N19 along with the known RhoA effectors. ALOX does not directly bind to RhoA-L63, although Daam1 is shown to bind to ALOX. The second LH2 domain of ALOX directly binds to N-terminal of Daam1, suggesting that Daam1 functions as a scaffolding protein for the assembly of ALOX. We further investigate the roles of Daam1 on ALOX activity and subcellular localization of these molecules.

研究分野：血液内科

キーワード：RhoA 脂質メディエーター 細胞内輸送

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脂質メディエーターの動脈硬化、血栓症、免疫細胞の遊走など様々な生体反応への重要性が近年再認識されている。アラキドン酸リポキシゲナーゼ(ALOX)は種々の刺激により細胞膜から切り出された遊離アラキドン酸から炎症を惹起するロイコトリエン(LTA4~E4)、抗炎症作用を持つリポキシン(LX)等の種々の脂質メディエーターを生成する。ALOXにはアラキドン酸への酸素添加部位の違いによってALOX5, ALOX12, ALOX15などが知られている。ALOXはLDL (low density lipoprotein)の酸化、下流のLTによる動脈硬化への影響(ALOX5, ALOX12, ALOX15)に加えて、血小板凝集(ALOX12)、慢性炎症、癌の進展(ALOX5, ALOX15)、造血、白血病幹細胞の維持(ALOX5, ALOX15)に必須な多機能蛋白である。ALOXは通常細胞質内に局在しているが、脂質メディエーターの産生には細胞膜へ輸送されることが必須である。しかしながらその輸送メカニズムについては、ほとんど解明されていない。研究代表者らは数年来一貫して造血細胞におけるRho GTPaseの機能につき研究を進めており、悪性リンパ腫、白血病におけるRHOH遺伝子の変異、発現異常につき報告している(Hiraga J et al, Leukemia 2007, Iwasaki T et al, Eur J Haematol 2008)。またRhoF欠失マウスを作成し、脾臓辺縁帯の形成にRhoFが必須であることを明らかにした(Kishimoto M et al, Nagoya J Med Sci 2014)。これまでの研究の蓄積と、ALOX family蛋白は血小板凝集、血管の慢性炎症、単球やTリンパ球の遊走などの生体反応を制御していることなどから、我々は動脈硬化において、Rho familyによるALOXの細胞内局在の変化が重要な役割を果たすという仮説を立てた。

2. 研究の目的

アラキドン酸リポキシゲナーゼ(ALOX)とその下流の脂質メディエーターは動脈硬化、血小板凝集、慢性炎症、がんの進展などに関与する多機能蛋白である。ALOX下流の脂質メディエーターについては活発に研究が行われているが、上流の制御メカニズムについては殆ど報告がなされていない。当該研究ではALOXの細胞内局在をRho family GTPaseが制御しており、動脈硬化部位、免疫器官など多様な臓器に脂質メディエーターをリクルートする際にRho-ALOX経路が重要であるという仮説を証明するために蛋白生化学、マススペクトロメトリー、加齢マウスモデル、各種ノックアウトマウスを用いた動物実験を計画した。

3. 研究の方法

我々はRhoA, Rac1, Cdc42などに加え、RhoH, Rac2等の血球特異的GTPaseをbaitにした網羅的アフィニティークロマトグラフィーとそれに続くマススペクトロメトリー(LC/MS-MS)の実験系を確立している。この実験システムを用いて、既に我々はGTP結合型の活性化Rho family蛋白の一部にALOXが結合することを明らかにしており、さらに複数の活性化Rho GTPasesと複数のALOX familyの結合の証明を目的とする。次にGTP結合型Rho familyとALOXをCOS7細胞で共発現し、両者の直接結合を証明する。直接結合が認められない場合は既知のエフェクターを介した結合を証明する。また相互の結合に必要なドメインの同定を行う。GTPaseの阻害薬によるALOX下流脂質メディエーターの抑制効果の証明、ALOXとの活性化依存性の結合が明らかになったRho family分子につきそれぞれの阻害剤(ボツリヌス毒素、RhoA下流阻害剤Y-27632, Rac阻害剤NSC23766, Cdc42阻害剤ZCL278など)を内因性のALOXが発現した細胞に添加し、脂質メディエーター(ロイコトリエン、リポキシン、HETEなど)の産生が抑制されるかどうかをELISAで検討する。

4. 研究成果

我々はRho family GTPaseをbaitとしたアフィニティークロマトグラフィーとそれに続くマススペクトロメトリー(LC/MS-MS)実験系を確立し、活性化RhoAに特異的に結合する複数の蛋白を同定した。そのうちアラキドン酸リポキシゲナーゼ-12(ALOX12)が活性化RhoAに結合することを見いだした。RhoAとALOX12をCOS-1細胞内で発現したところ両者の直接の結合は認められなかった。一方でRhoAエフェクターDaam1とALOX12の結合がCOS-1細胞での発現実験で証明された。このことからALOX12はDaam1を介して活性化RhoAに結合することが判明した。さらにALOX12のLH2ドメインがDaam1のN末に結合することが明らかになった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 6件)

- 1) Apparent synonymous mutation F9 c.87A>G causes secretion failure by in-frame mutation with aberrant splicing. Odaira K, Tamura S, Suzuki N, Kakihara M, Hattori Y, Tokoro M, Suzuki S, Takagi A, Katsumi A, Hayakawa F, Okamoto S, Suzuki A, Kanematsu T, Matsushita T, Kojima T. *Thromb Res*. 2019 in press (査読あり)。
- 2) Molecular basis of SERPINC1 mutations in Japanese patients with antithrombin deficiency. Tamura S, Hashimoto E, Suzuki N, Kakihara M, Odaira K, Hattori Y, Tokoro M, Suzuki S, Takagi A, Katsumi A, Hayakawa F, Suzuki A, Okamoto S, Kanematsu T, Matsushita T, Kojima T. *Thromb Res*. 2019 Apr 11;178:159-170 (査読あり)。
- 3) Rearrangement of VPS13B, a causative gene of Cohen syndrome, in a case of

RUNX1-RUNX1T1 leukemia with t(8;12;21). Abe A, Yamamoto Y, Katsumi A, Okamoto A, Tokuda M, Inaguma Y, Yamamoto K, Yanada M, Kanie T, Tomita A, Akatsuka Y, Okamoto M, Kameyama T, Mayeda A, Emi N. Int J Hematol. 2018 Aug;108(2):208-212 (査読あり).

- 4) In vitro exploration of latent prothrombin mutants conveying anti thrombin resistance. Tamura S, Murata-Kawakami M, Takagi Y, Suzuki S, Katsumi A, Takagi A, Kojima T. Thromb Res. 2017 Sep 20;159:33-38 (査読あり).
- 5) 池野世新、勝見 章 老年医学 XI. 高齢者の臓器別疾患 悪性リンパ腫 日本臨牀 76 巻 7 (2018 年 8 月)
- 6) 西田徹也、今橋真弓、今橋伸彦、大橋春彦、勝見 章、寺倉精太郎、村田 誠、清井 仁、直江知樹 後天性慢性赤芽球癆に対する ABO 血液型一致同胞間骨髓移植後も赤血球造血のみ遅延した一例 日本輸血細胞治療学会誌 63(4):614-618.2017 (査読あり).

[学会発表](計 14 件)

- 1) 勝見 章, 渡辺 浩, 松下 正, 小嶋哲人. 臨床研究 DB システム D D を用いた静脈血栓塞栓症の発症率推計. 第 60 回日本老年医学会学術集会. 平成 30 年 6 月 14-16 日. 京都
- 2) 勝見 章, 渡辺 浩, 松下 正, 小嶋哲人. 臨床研究 DB システム D D を用いた静脈血栓塞栓症の発症率推計. 第 40 回日本血栓止血学会学術集会. 平成 30 年 6 月 28-30 日. 札幌
- 3) Shogo Tamura, Moe Murata-Kawakami, Yuki Takagi, Sachiko Suzuki, Akira Katsumi, Akira Takagi, Tetsuhito Kojima. Many of the prothrombin mutations in the sodium-binding region cause an antithrombin-resistance phenotype.SPC シンポジウム 1.The 10th Congress of the Asian-Pacific Society on Thrombosis and Hemostasis.平成 30 年 6 月 28-30 日. 札幌
- 4) Akira Katsumi, Seara Ikeno, Hiroshi Watanabe, Tadashi Matsushita, Tetsuhito Kojima. Prevalence of venous thromboembolism (VTE) in a single institute.第 80 回日本血液学会学術集会.平成 30 年 10 月 12-14 日.大阪
- 5) Seara Ikeno, Motohito Okabe, Yuka Kawaguchi, Marie Ohbiki, Yoonha Lee, Masahide Osaki, Miyo Goto, Hiroaki Araie, Takahiko Sato, Takanobu Morishita, Yukiyasu Ozawa, Akira Katsumi, Koichi Miyamura. Efficacy of Eculizumab for aplastic anemia developed to paroximal nocturnal hemoglobinuria after IST.第 80 回日本血液学会学術集会.平成 30 年 10 月 12-14 日.大阪
- 6) 宮澤 憲治, 早川 裕二, 溝神 文博, 加藤 雅斗, 平野 隆司, 關 留美子, 勝見 章, 八田 裕之. 在宅におけるトイレの抗がん剤曝露による汚染調査. 第 7 2 回国立病院総合医学会 平成 30 年 11 月 9 日~10 日. 神戸
- 7) Moe Murata, Akira Katsumi, Katsuhiko Kato, Asami Matsuda, Tomoki Nishioka, Mutsuki Amano, Tadashi Matsushita, Hitoshi Kiyoi, Mitsuo Maruyama, Tetsuhito Kojima, Kozo Kaibuchi. Arachidonate 12-lipoxygenase binds to active RhoA through Daam1 第 39 回日本血栓止血学会学術集会 (名古屋 2017/6/10)
- 8) 宮澤 憲治, 小林理穂, 溝神文博, 熊谷隆治, 磯貝善蔵, 勝見 章, 高橋朗 皮疹によるボルテゾミブ中止後、カルフィルゾミブで Infusion reaction を発症した多発性骨髄腫の一例 第 15 回日本臨床腫瘍学会学術集会 (神戸 2017/7/27)
- 9) 橋本恵梨華, 高木夕希, 鈴木幸子, 坂根寛人, 田村彰吾, 高木明, 金子誠, 勝見 章, 松下正, 小嶋哲人 新規大欠失症例を含む先天性アンチトロンピン欠乏症の SERPINC1 解析 第 18 回日本検査血液学会学術集会 (札幌 2017/7/22-23)
- 10) Moe Murata, Akira Katsumi, Katsuhiko Kato, Asami Matsuda, Tomoki Nishioka, Mutsuki Amano, Tadashi Matsushita, Hitoshi Kiyoi, Mitsuo Maruyama, Tetsuhito Kojima, Kozo Kaibuchi. Arachidonate 12-lipoxygenase binds to active RhoA through Daam1 第 79 回日本血液学会学術集会 (東京 2017/10/20-22)
- 11) 松田亜沙実, 勝見 章, 天野睦紀, 永田泰之, 小野孝明, 大西一功, 丸山光生, 貝淵弘三, 清井 仁, 直江知樹 血球特異的な Rho ファミリー蛋白 RhoH による Rac の不活性化機構は T 細胞活性化 GAP(TAGAP)を介する第 77 回日本血液学会学術集会 2015 年 10 月 17 日金沢
- 12) 松田亜沙実, 勝見 章, 天野睦紀, 永田泰之, 大西一功, 清井仁, 直江知樹 血球特異的な Rho ファミリー蛋白 RhoH は T cell activation GTPase activating protein(TAGAP) を介して Rac を不活性化する 第 74 回日本癌学会学術総会 2015 年 10 月 10 日
- 13) Asami Matsuda, Akira Katsumi, Mutsuki Amano, Yasuyuki Nagata, Takaaki Ono, Mitsuo Maruyama, Hiroshi Kiyoi, Tomoki Naoe, Kozo Kaibuchi, Rho H, a hematopoietic cell specific Rho protein, Deactivates Rac through T cell activation GTPase activating protein (TAGAP) 第 38 回日本分子生物学会年会 2015 年 12 月 1 日~4 日 神戸
- 14) 勝見 章 “Cancer-Associated Thrombosis: an Overview” 第 3 7 回日本血栓止血学会学術集会 学術推進委員会 (SPC) シンポジウム 2015 年 5 月 21 日、甲府市民会館

〔図書〕(計 1 件)

1) 勝見 章 著書(分担)臨床医のための静脈血栓塞栓症診断・治療マニュアル 全 599
ページ 悪性腫瘍・化学療法 521-526 医薬ジャーナル社 2015年

〔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：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：丸山 光生
ローマ字氏名：(MARUYAMA, Mitsuo)
所属研究機関名：国立長寿医療研究センター
部局名：研究所
職名：副所長
研究者番号(8桁)：00212225

研究分担者氏名：天野 睦紀
ローマ字氏名：(AMANO, Mutsuki)
所属研究機関名：名古屋大学
部局名：医学系研究科
職名：准教授
研究者番号(8桁)：90304170

(2)研究協力者

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。