

令和元年6月6日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08608

研究課題名(和文)凝固第XIII因子(トランスグルタミナーゼ)による核内タンパク質修飾の意義を探る

研究課題名(英文) Search for the roles of modification of nuclear proteins by 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) 3,700,000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)は巨核球などの細胞内にも存在し、核内タンパク質を修飾し得ることが見出されている。本研究では、FXIII-Aの核内基質を同定した。FXIII-A欠損および組織型TGase欠損マウスを用いた解析から、FXIII-Aが巨核球での核内タンパク質修飾に寄与し、巨核球の分化に抑制的な機能を示すこと、FXIII-Aの核内基質が巨核球分化にしたがって増加するものの、FXIII-Aの存在によりその増加は抑制されることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

FXIII-Aが巨核球の分化に寄与すること、細胞内の基質タンパク質を同定したことは世界的にも全く新しい発見である。巨核球は血小板産生の元となる細胞であり、血小板減少症における治療や、再生医療における幹細胞・iPS細胞からの血小板産生効率の上昇に向けた新たなヒントとなる可能性がある。

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 was found to possibly modify nuclear proteins with amines. A nuclear protein was determined as a substrate for FXIII-A in the present study. Studies using FXIII-A- and/or tissue TGase deficient mice exhibited that (1) FXIII-A contributed to the modification of nuclear proteins in megakaryocytes, (2) FXIII-A controlled differentiation of megakaryocytes, (3) a FXIII-A substrate increased during differentiation of megakaryocytes which was suppressed by FXIII-A.

研究分野：医歯薬学

キーワード：凝固第XIII因子 トランスグルタミナーゼ 巨核球分化 細胞内基質

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

1. 研究開始当初の背景

トランスグルタミナーゼ (TGase) は、タンパク質分子間の架橋結合や基質タンパク質へのアミンの付加といった独特なタンパク質修飾を司る酵素であり、存在場所や基質の異なる9つの遺伝子ファミリーが存在している¹。分子間架橋による修飾には、血漿 TGase である凝固第 XIII 因子 (FXIII) によるフィブリン安定化 (止血の維持) や、ケラチノサイト TGase による表皮バリアの形成といった、その欠損により生命を脅かす重要な役割がよく知られている。一方で、アミン付加反応については、神経細胞におけるチュプリンのポリアミン化が軸索の伸長・安定化に寄与する可能性が最近になって報告されている²。

FXIII の酵素部位である A サブユニット (FXIII-A) は、血漿のみならず巨核球・血小板や単球・マクロファージなどの細胞内にも存在する。我々は細胞内 FXIII-A に着目し、

- ・ 巨核球系培養細胞において、FXIII-A は細胞質のみならず核や細胞骨格 (中間系フィラメント)、細胞膜といった多様な分布を示す。
- ・ 単球系細胞におけるマクロファージへの分化誘導時、FXIII-A の発現は著しく低下するのに対して、巨核球系細胞では分化誘導・成熟に従い発現量が増加する。
- ・ マウス骨髄において、少なくとも一部の CD34 陽性細胞に FXIII-A が発現しており、炎症性刺激を受けた際には FXIII-A 陽性かつ CD34 陽性細胞が一過的に増加する。
- ・ FXIII-A 欠損マウスにおいて、血小板数に有意差は認めないものの、骨髄中の巨核球は幼弱な傾向を示す。

など、巨核球の分化・成熟への細胞内 FXIII-A の関与を示唆する知見を得ていた。

また、細胞内 FXIII-A の酵素機能について、ビオチン標識低分子アミンを用いた解析を行ったところ、

- ・ 巨核球系培養細胞において主に核小体や RNA スプライシングに関わるタンパク質へのアミン取り込みが認められ、FXIII-A 発現量の増加に伴いアミン修飾も増加する。
- ・ アミン修飾反応がほとんど検出されない腎由来細胞に FXIII-A を過剰発現させると、著しい核タンパク質へのアミン修飾が起こる。
- ・ 組織型 TGase (TGM2) 欠損マウスにおいて CD42 陽性 FXIII-A 陽性細胞にのみアミン修飾反応が検出される。
- ・ 血漿中ではトロンピンにより活性化ペプチドの切断を受けて FXIII-A は活性化するが、活性化ペプチド切断を伴わない FXIII-A 活性化活性が巨核球系細胞のプロテアソーム画分に検出される。

といった結果が得られ、少なくとも細胞培養条件下で細胞内 FXIII-A が酵素として機能することを確認していた。

上記の研究において、同定したアミン修飾タンパク質 (FXIII-A 基質) に巨核球の分化・成熟への関与が示唆されているものが含まれていること、プロテアソーム阻害剤によりアミン修飾タンパク質が蓄積することから、FXIII-A による修飾が、特定の核内タンパク質の品質管理を介して巨核球の分化・成熟に寄与するものと予想された。

2. 研究の目的

第1の目的として、FXIII-A によるタンパク質修飾反応が巨核球の分化・成熟に関与しているか否かを明らかにする。関与が確認された場合、造血幹細胞から巨核球への分化、血小板産生に至るどの過程に、どのようなメカニズムで寄与しているかを詳細に調査する。

第2に、特に骨髄細胞における組織型 TGase と FXIII-A との発現細胞、時期、細胞内基質の比較を行い、血球分化における TGase 反応の意義と両 TGase の役割分担、あるいは協調性の有無を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 細胞内ビオチン化アミン (BAPA) 取り込み反応　およそ 10^6 個の細胞を、無血清培地もしくはハンクス液 0.1 mL に懸濁し、4 mM 5-(biotinamido)pentylamine (BAPA, Thermo Scientific 社)、10 μ M プロテアソーム阻害剤 MG-132(Calbiochem 社)、1 mM ポリアミン (spermidine もしくは spermine) を含む無血清培地もしくはハンクス液 0.1 mL 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。

(2) 基質タンパク質の同定　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、Nanoflow liquid chromatography-tandem mass spectrometry (NanoLC MS/MS)によって同定した。

MEG-01 細胞から抽出した RNA を用いて同定したタンパク質の cDNA を RT-PCR により調製し、哺乳細胞誘導発現ベクター pGene-V5His (Invitrogen 社) に挿入した。pSwitch ベクターとともに Baby hamster kidney (BHK)細胞にトランスフェクトし、Zeocin および Hygromycin B を培養培地に添加して遺伝子安定導入細胞を選別した。FXIII-A もしくは TGM2 cDNA を挿入した哺乳動物発現ベクター pcDNA3 (Invitrogen 社) を選別した細胞にトランスフェクトし、発現誘導剤 Mifepristone を添加して培養した後、細胞内 BAPA 取り込み反応を行なった。抗 V5 抗体を用いて核抽出液から基質候補タンパク質を免疫沈降し、BAPA 付加の有無を、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ティングにより確認した。

(3) FXIII-A/TGM2 二重欠損マウスの産生　FXIII-A、TGM2 各欠損マウスは C57BL/6 マウスとの交配を繰り返して純系統を維持している。FXIII-A 欠損雄マウスと TGM2 欠損雌マウスを交配して得た F1 マウス同士を交配し、二重欠損マウスを産生した。二重欠損マウスは、FXIII-A^{-/-}TGM^{-/-}雄マウスと FXIII-A^{+/-}TGM^{-/-}雌マウスとの交配により維持した。

(4) 巨核球の調製　マウス大腿骨から採取した骨髄細胞を、insulin-transferrin-selenium G supplement および 10 ng/mL トロンボポエチン (TPO) を含む IMDM で2~3日間培養した。2, 4, 16% 牛血清アルブミンの段階濃度勾配に細胞懸濁液を重層して静置し、最下層 30%に沈降した細胞を巨核球分画として回収した。

(5) FACS 解析　骨髄細胞および TPO 存在下で培養した細胞を 2%パラホルムアルデヒドで固定し、ハムスター抗 CD61 抗体、FITC 標識抗ハムスター IgG 抗体および APC 標識抗 CD117 抗体と反応させ、FACS Cantoll (BD Bioscience 社)により解析した。

4. 研究成果

(1) ヒト培養細胞における FXIII-A 基質の決定と発現動態　MEG-01 細胞から FXIII-A の細胞

内基質候補として同定したタンパク質数種類について、BHK細胞を用いて cDNA 発現し、細胞内 BAPA 取り込み反応後に免疫沈降を行なった結果、proline-glutamine rich splicing factor (SFPQ) が FXIII-A の細胞内基質となることを確定した。抗 SFPQ 抗体を用いたウエスタンブロット解析により、MEG-01 細胞および THP-1 細胞に SFPQ が存在することを確認した。MEG-01 および THP-1 細胞を BAPA あるいはポリアミン(スペルミジン、スペルミン)とインキュベートした場合に SFPQ の分解が観察されること、その分解がプロテアソーム阻害剤やトランスグルタミナーゼ(FXIII-A)阻害剤で抑制されることから、FXIII-A のトランスグルタミナーゼ活性による修飾が SFPQ のプロテアソームでの分解を促進していることが強く示唆された。

MEG-01 細胞を長期に培養した場合、FXIII-A の発現が増加するのと同様に細胞内アミン取り込み能が増加したのと対照的に、FXIII-A の基質として同定された SFPQ のタンパク質レベルは減少した。一方、THP-1 細胞をホルボールエステル(PMA)処理してマクロファージ様に分化させた場合、FXIII-A が急速に消失したのと対照的に SFPQ の一過的な増加が認められた。SFPQ の標的とされる数種の遺伝子についてもその発現を RT-PCR で調べたところ、培養日数や PMA 処理による変動を認めるものが確認された。

(2) FXIII-A の巨核球分化への関与 FXIII-A の巨核球分化への関与について、野生型、FXIII-A 欠損、TGM2 欠損それぞれのマウスから採取した骨髓細胞を TP0 存在下で 3 日間培養し、巨核球マーカーである CD61 と前駆細胞のマーカーである CD117 (c-kit)の抗体を用いて FACS 解析を行ったところ、FXIII-A 欠損骨髓細胞における CD61 陽性-CD117 陽性細胞(巨核球前駆細胞)の出現が野生型および TGM2 欠損細胞と比べて有意に増加することが示され、巨核球分化における FXIII-A の抑制作用が強く示唆された。

一方、TP0 とともにポリアミン(スペルミン)を添加して骨髓細胞を培養したものの、ポリアミンによる巨核球分化への影響は認められなかった。

(3) 巨核球分化における FXIII-A 酵素活性および基質タンパク質の動態 野生型、FXIII-A 欠損、TGM2 欠損、二重欠損各マウスの大腿骨から採取した骨髓細胞を BAPA 存在下でインキュベートし、細胞内タンパク質への BAPA 取り込みをウエスタンブロットで解析した結果、骨髓細胞全体での核分画タンパク質へのアミン取り込みは TGM2 が大半を担っており、FXIII-A の寄与は部分的であることが示された。一方、骨髓細胞を TP0 存在下で 3 日間培養し、牛血清アルブミン濃度勾配で調製した巨核球分画について BAPA 取り込み反応を行なったところ、野生型と比べて FXIII-A 欠損でタンパク質への BAPA 取り込みが著しく低下し、TGM2 欠損と同程度であったことから、巨核球における FXIII-A 酵素活性の強い関与が示唆された。

巨核球分画について、BAPA が取り込まれたタンパク質を質量分析にて解析したところ、FXIII-A と TGM2 それぞれに特異的な基質タンパク質の候補が同定された。一方、MEG-01 で同定された基質候補タンパク質については、野生型マウスを含めてマウス巨核球でのアミン付加は確認できなかった。そこで、マウス骨髓における SFPQ のウエスタンブロット解析を行ったところ、野生型、TGM2 欠損マウスと比べて高レベルの SFPQ タンパク質が FXIII-A 欠損マウスの骨髓で検出された。また、TP0 により分化誘導した巨核球分画では各マウスとも分化前の骨髓細胞と比べて SFPQ が増加していたが、FXIII-A 欠損細胞、TGM2 欠損細胞ともに野生型と比べて高レベルな蓄積が認められた。以上の結果から、FXIII-A 及び TGM2 が骨髓(巨核球)における SFPQ タンパク質レベルの調節に関与しており、巨核球分化に影響を及ぼす可能性が示唆された。さらに、MEG-01 細胞で同定された SFPQ の他の TGase 基質についても、マウス骨髓における

FXIII-A 及び TGM2 欠損による影響が認められ、血球分化への関与が示唆された。

以上のように、FXIII-A が巨核球の分化に抑制的に機能していること、細胞内の FXIII-A は少なくとも骨髄・巨核球において SFPQ を基質とすること、SFPQ が巨核球分化時に産生が増加するものの、FXIII-A によりその増加が抑制されることが示された。FXIII-A が CD34 陽性細胞にも発現すること、FXIII-A 欠損骨髄において SFPQ の蓄積が見られることから、巨核球分化の比較的初期の段階から FXIII-A が関与しているものと推測される。SFPQ と巨核球分化との関連はこれまで全く報告されておらず、SFPQ の標的となる遺伝子の検索などさらに追求する必要がある。今後、造血幹細胞からの分化の各段階における FXIII-A・TGM2 の発現動態、基質タンパク質の質的・量的変動などを調べ、血球分化における TGase の役割をより明確にしていく予定である。

<引用文献>

- 1: Lorand L and Graham RM. Nat.Rev.Mol.Cell.Biol. 4: 140-156, 2003.
- 2: Song Y. et al. Neuron 78: 109-123, 2013

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Souri M, Mokuda S, Inanami H, Osaki T, Takasugi K, Ichinose A. Non-autoimmune combined factor XIII A and B subunit deficiencies in rheumatoid arthritis patients treated with anti-interleukin-6 receptor monoclonal antibody (tocilizumab). Thromb Res. 2016;140:100-105. 査読あり

〔学会発表〕(計 3 件)

惣宇利正善、尾崎司、小澤龍彦、村口篤、一瀬白帝 自己免疫性第 XIII 因子欠乏症例で生じた抗第 XIII 因子自己抗体のモノクローン化による機能解析 (シンポジウム)

第 91 回日本生化学会大会 2018 年 9 月 26 日 国立京都国際会館

惣宇利正善、尾崎司、一瀬白帝 巨核球における凝固 XIII 因子の活性と基質

第 90 回日本生化学会大会 (生命科学系学会合同年次大会) 2017 年 12 月 6 日 神戸ポートアイランド

惣宇利正善、尾崎司、一瀬白帝 凝固 XIII 因子 A サブユニットの細胞内での活性化

第 89 回日本生化学会大会 2016 年 9 月 27 日 東北大学川内北キャンパス

〔図書〕(計 0 件)

〔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：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号（8桁）：

(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。