

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19590080  
 研究課題名(和文) 細胞表面シャトルタンパク質ヌクレオリンの死細胞除去機能および新機能の解明  
 研究課題名(英文) STUDY ON THE FUNCTIONS OF CELL-SURFACE SHUTTLE PROTEIN NUCLEOLIN

研究代表者  
 別府 正敏 (BEPPE MASATOSHI)  
 東京薬科大学・薬学部・教授  
 研究者番号：60114633

研究成果の概要：細胞の核、細胞質、細胞表面に存在するシャトルタンパク質ヌクレオリンは細胞膜に存在する何らかの足場タンパク質に結合して細胞表面に存在することが示唆された。また、細胞内においても多種類の機能性タンパク質と結合して多様な生理的役割を果たしていることが実験に基づき示唆された。さらに、細胞表面ヌクレオリンの新しい機能として、マクロファージ表面では変性タンパク質や変性リポタンパク質を結合し取込むスカベンジャーレセプターの機能があることが示唆された。また、脳ミクログリアの表面ではマクロファージ同様、アポトーシス初期の細胞を除去するレセプターとしての機能があることが明らかとなった。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：生物系薬学

キーワード：マクロファージ、ミクログリア、死細胞除去、シャトルタンパク質、動脈硬化

## 1. 研究開始当初の背景

筆者らはアポトーシス初期の細胞を認識し貪食除去するマクロファージ表面のレセプタータンパク質としてヌクレオリンを同定した。ヌクレオリンは、核、細胞質、ある種の細胞の表面に存在する多機能性シャトルタンパク質であり、各種の細胞外のリガンドタンパク質のレセプターとして、また、ある種のウイルスや細菌の感染レセプターとしても知られている。しかしながら、ヌクレオリンの細胞表面での存在様式や動

態、各種リガンドとの結合の実態はほとんど知られていなかった。さらに、未知のリガンドがまだ多く存在することも予想された。

## 2. 研究の目的

(1) ヌクレオリンは膜貫通ドメインを持たないにもかかわらず細胞外の各種リガンドを細胞内に取込む機能を有しており、細胞膜にはヌクレオリンの足場となるタンパク質が存在すると予想された。この足場タンパク質を見つけることを第一の目的とした。

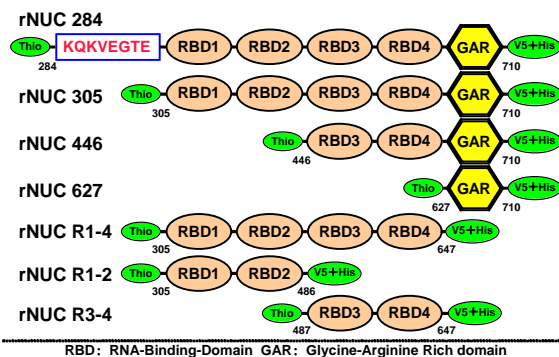
(2) また、マクロファージ表面ヌクレオリンの新たな機能を見いだすことを第二の目的とした。ヌクレオリンは核酸などの陰性荷電を帯びた粒子に結合する傾向があることをふまえ、陰性荷電粒子のレセプターとして知られるスカベンジャーレセプターの活性を有するかどうか検討することとした。

(3) さらに、脳ミクログリアについて、マクロファージと同様、細胞表面にヌクレオリンが発現しているかどうか、また、それにアポトーシス細胞除去機能があるかどうか検討した。

### 3. 研究の方法

(1) の研究において、マクロファージ細胞表面に対するヌクレオリンの結合性、および、(2) の研究において、各種スカベンジャーレセプターリガンドに対するヌクレオリンの結合性を直接的に調べ、また、それらが結合する場合、ヌクレオリンのどの部位で結合するのかも検討するため、ヒトヌクレオリンの下記のような部分配列に対応する各種リコンビナントタンパク質 (rNUC284, rNUC305, rNUC446, rNUC627, rNUCR1-4, rNUCR1-2, rNUCR3-4) を大腸菌にて作成し、精製した。

用いたリコンビナントヌクレオリン (rNUC) の配列



マクロファージの前駆細胞である単球としては、培養ヒト単球系細胞である THP-1 を使い、また、これを PMA で刺激してマクロファージに分化させた THP-1 マクロファージ、および常在性のマウス腹腔マクロファージ、チオグリコレートで誘導したマウス腹腔マクロファージなどを用いた。

また、細胞膜におけるヌクレオリンの足場タンパク質を全く別の手法で見つける目的で、Yeast two-hybrid 法によりヌクレオリン結合タンパク質を網羅的に探索した。1) full length ヌクレオリン (full length NUC ; 1-710AA)、2) ヌクレオリンの RNA binding domain (RBD) 1-4 領域 (NUC R1-4 ; 308-647AA)、3) ヌクレオリンの RBD3-4 領域 (NUC R3-4 ;

487-647AA) の 3 種類のヌクレオリン cDNA を bait ベクターに組み込み、GAL4 DNA-BD-ヌクレオリン融合タンパク質 (bait タンパク質) として発現させた。スクリーニング対象には、human bone marrow cDNA ライブラリーを用い、これら 3 種のヌクレオリンタンパク質に結合するタンパク質の探索を行った。

(2) の研究において、マクロファージは、THP-1 マクロファージ、および常在性のマウス腹腔マクロファージを用いた。スカベンジャーレセプターのリガンドとして、各種のポリアニオン類、高度に maleyl 化した牛血清アルブミン (maleyl BSA)、無水酢酸で高度にアセチル化した BSA (acetyl LDL) 等を作製して用いた。これらのスカベンジャーレセプターリガンドとヌクレオリンの結合性の有無は、マクロファージなどの細胞を用いる場合は、細胞に対するこれらのリガンドの結合がヌクレオリンに対する抗体で阻害されるかどうかで判定し、無細胞系で調べる場合は、Surface Plasmon Resonance (SPR) により直接結合性を測定した。

(3) の研究では、脳ミクログリアとしてマウスの不死化ミクログリア cell line を使い、このミクログリアによるアポトーシス細胞の認識除去実験では、小胞体ストレスによりアポトーシスを誘導した Jurkat 細胞 (T 細胞系培養細胞株) を用いた。

### 4. 研究成果

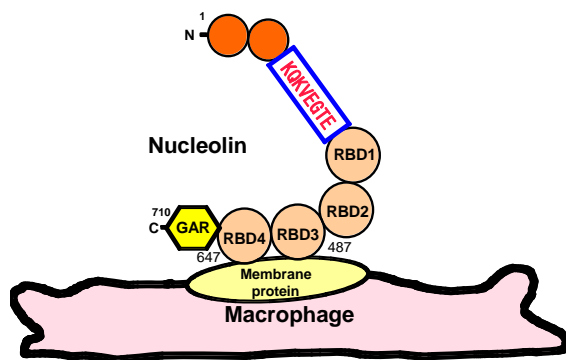
#### 研究 (1) の成果

高濃度 NaCl 処理により細胞表面ヌクレオリンを除去した THP-1 Mφ と、etoposide 処理によりアポトーシスを誘導した Jurkat 細胞との細胞結合実験を行った。その結果、細胞表面ヌクレオリンを除去した THP-1 Mφ では、アポトーシス Jurkat 細胞との結合数は、細胞表面ヌクレオリンを除去していない THP-1 Mφ と比べ、有意に減少した。また、細胞表面ヌクレオリンを除去した後、KQKVEGTE 配列を含む rNUC284 を結合させた THP-1 Mφ は、細胞表面ヌクレオリン除去 THP-1 Mφ に比べ、アポトーシス Jurkat 細胞が多く結合した。以上の結果より、Mφ がアポトーシス細胞を認識・除去する際にはヌクレオリン (KQKVEGTE 配列) が必要と考えられた。

ヌクレオリンが RBD 以降のどの配列を介して Mφ 細胞表面に結合しているのかを詳しく検討するため、THP-1 Mφ、TG-Mφ 細胞表面への各種 rNUC (rNUC284, rNUC305, rNUC446, rNUC627, rNUCR1-4, rNUCR1-2, rNUCR3-4) の結合性を FCM 法で調べた。その結果、rNUCR1-2、rNUC627 以外の RBD3-4 を含む rNUC で十分な結合性が得られた。従って、ヌクレオリンは

Mφ細胞表面に487から647番目までのRBD3-4領域を介して結合している可能性が高いと考えられた。

アポトーシス細胞の認識にはヌクレオリン(特にKQKVEGTE配列)が重要であることが確認され、またMφ細胞表面にはヌクレオリンのRBD3-4付近の配列を介して結合していることが明らかとなった。さらに、このRBD3-4付近を介した結合様式はMφに分化した細胞に共通のものである可能性が示唆された。以上より、ヌクレオリンはMφとアポトーシス細胞を架橋するbridging moleculeとして機能していると考えられた(下図)。



上記の手法で、細胞表面ヌクレオリンが何らかの細胞膜タンパク質に結合していることが示唆されたが、そのタンパク質が何であるかは特定できなかった。

そこで、ヌクレオリンの足場タンパク質をヌクレオリンと結合する全細胞タンパク質の中から見つけ出す目的で、Yeast two-hybrid法によりヌクレオリン結合タンパク質を網羅的に探索した。その結果、細胞膜近傍に存在すると考えられている3種のタンパク質がヌクレオリンと結合することが判明した。しかし、これらのタンパク質が細胞表面側に存在しているかどうかは不明であり、結論づけるためには更なる検討が必要と思われるが、この手法でいずれは足場タンパク質が特定できるものと期待される。

#### 研究(2)の成果

rNUC284をSPR測定用センサーチップに固定化し、これに対する各種ポリアニオン、化学修飾タンパク質、化学修飾LDLの結合性をSPR法により定量的に測定した。その結果、fucoidan, polyinosinic acid (poly I)、polycytidylic acid (poly C)、maleyl BSA、AcLDLで結合が濃度依存的に認められた。poly inosinic acid-polycytidylic acid (poly I/C)、AGE-BSA、酸化BSA、BSA、LDLには結合性は見られなかった。このことから、ヌクレオリンはSRに類似したリガンド特異性を有することが明らかになった。さらに、ヌクレオリンがSRと同様に、変性タンパク

質や変性LDLへの結合やエンドサイトーシスに関与しているかどうか調べるため、蛍光標識したmaleyl BSA、蛍光標識したDiI-AcLDLを作製し、ヒト培養単球、マウス腹腔Mφによる結合および取り込みに対するanti-rNUC抗体による阻害効果を検討した。その結果、蛍光標識maleyl BSAと蛍光標識AcLDLはヒト培養単球やマウス腹腔Mφに結合し取り込まれ、この結合と取り込みはanti-rNUC抗体により部分的に阻害された。マウス腹腔Mφによるこれらの結合・取り込みはanti-rNUC抗体により部分的に減少した。従って、単球・Mφの細胞表面ヌクレオリンはSR活性を有し、変性タンパク質や変性LDLの結合・取り込みにも関与していることが示唆された。また、各種ポリアニオン、maleyl BSA、AcLDLの認識にヌクレオリンのどの部位が関与するかを、rNUC305、rNUC627、rNUCR1-4を用いてSPR法により検討した結果、ヌクレオリンとポリアニオン、化学修飾タンパク質および化学修飾LDLの結合には、RNA binding domain (RBD領域)が必要であることが示唆された。また、ヌクレオリンのアポトーシス細胞認識にはKQKVEGTE配列が必要であるが、この配列を欠くりコンビナント体でもリガンド結合性には変化がなかったことから、ヌクレオリンのアポトーシス細胞認識部位とSR活性部位は異なると考えられた。

#### 研究(3)の成果

神経変性疾患におけるアポトーシスの要因として小胞体ストレスが注目されている。小胞体には多種多様な分子シャペロンやフォールディング酵素が存在し、新生タンパク質の高次構造形成に関わっているが、新生タンパク質が高次構造形成に失敗し、小胞体内に蓄積するとそれが「小胞体ストレス」となってアポトーシスが引き起こされる。本研究では、小胞体ストレスによるアポトーシス誘導の場合にも、ミクログリアがヌクレオリンを介してアポトーシス細胞を認識除去するかどうか検討した。

#### 小胞体ストレス誘導剤である

thapsigarginを用いてJurkat細胞にアポトーシスを誘導したところ、時間、濃度依存的にcaspase3の活性が上昇した。マウス由来の培養ミクログリア細胞を用いてthapsigarginで2h、20h処理したJurkat細胞と結合実験を行うと高い結合性を示した。ミクログリアとこれらのアポトーシスJurkat細胞との結合は、1) anti-CD43抗体でJurkat細胞を予め処理した場合、2) ポリラクトサミン含有オリゴ糖鎖を共存させた場合、3) anti-rNUC抗体でミクログリア細胞を処理した場合、阻害された。また、thapsigargin 20h処理したJurkat細胞では、phosphatidylserine (PS)の露出はわずかに

起こるものの、PS 結合性タンパク質 annexin V によって、結合は阻害されなかった。また、thapsigargin 処理 20 h 以降で PS の露出が増えはじめる頃にはネクロシスも増えはじめて速やかにネクロシスに移行してしまうことが判明した。以上のことから、thapsigargin により誘導されたアポトーシス Jurkat 細胞では PS の露出期間が短く、ミクログリア細胞による認識除去では、Jurkat 細胞表面 CD43 のシアリルポリラクトサミン型糖鎖が ligand となり、ミクログリア細胞表面ヌクレオリンが receptor として働く糖鎖認識が主たる認識機構であろうと考えられた。

#### 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 Miki, Y., Tazawa, T., Hirano, K., Matsushima, H., Kumamoto, S., Hamasaki, N., Yamaguchi T., and Beppu, M.

Clearance of oxidized erythrocytes by macrophages: Involvement of caspases in the generation of clearance signal at band 3 glycoprotein

*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 363, 57-62 (2007) 査読有.

② Miki, Y., Itoh, T., Hirano, K., Eda, S., Hayashi, A., Yamanaka, M., and Beppu, M.

Clearance of oxidatively damaged cells by macrophages: Recognition of glycoprotein clusters by macrophage-surface nucleolin as early apoptotic cells.

*Biol. Pharm. Bull.*, 32, 564-572 (2009) 査読有.

[学会発表] (計 8 件)

① 鍋村実希

マクロファージ細胞表面ヌクレオリンのスカベンジャーレセプターとしての結合特性  
日本薬学会第 129 年会  
2009 年 3 月 27 日、国立京都国際会館

② 松本達也

Yeast two-hybrid 法による多機能タンパク質ヌクレオリンのリガンドの検索

日本薬学会第 129 年会

2009 年 3 月 27 日、国立京都国際会館

③ 三木雄一

マクロファージ細胞表面ヌクレオリンによる酸化細胞の糖鎖依存性認識とその機構  
第 9 回 Pharmaco-Hematology シンポジウム

2008 年 6 月 21 日、日本薬学会長井記念館

④ 鍋村実希

マクロファージ細胞表面の新たなスカベンジャーレセプター分子ヌクレオリン

第 9 回 Pharmaco-Hematology シンポジウム

2008 年 6 月 21 日、日本薬学会長井記念館

⑤ 松島秀樹

マクロファージ細胞表面の新たなスカベンジャーレセプター候補分子ヌクレオリン  
フォーラム 2007: 衛生薬学・環境トキシコロジー

2007 年 11 月 1 日、アピオ大阪森ノ宮ピロティホール

⑥ 原 ゆかり

アポトーシス細胞認識に関わるマクロファージ表面 nucleolin の結合様式の検討

第 51 回日本薬学会関東支部大会

2007 年 10 月 6 日、星薬科大学

⑦ 小澤大輔

小胞体ストレスで誘導されたアポトーシス細胞のミクログリアによる認識機構

第 51 回日本薬学会関東支部大会

2007 年 10 月 6 日、星薬科大学

⑧ 松島秀樹

マクロファージ細胞表面ヌクレオリンはスカベンジャーレセプター活性を有する

第 7 回 Pharmaco-Hematology シンポジウム

2007 年 6 月 7 日、金沢エクセルホテル東急

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

別府 正敏 (BEPPU MASATOSHI)

東京薬科大学・薬学部・教授

研究者番号: 60114633

(2) 研究分担者

平野 和也 (HIRANO KAZUYA)

東京薬科大学・薬学部・講師

研究者番号: 80251221

(3) 研究分担者

三木 雄一 (MIKI YUICHI)

東京薬科大学・薬学部・助手

研究者番号: 20366420