

平成 22 年 5 月 21 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007～2009

課題番号：19790224

研究課題名(和文) ビタミン K 依存性タンパク質の生合成機構とビタミン K 代謝酵素の機能解析

研究課題名(英文) Characterization of the mechanism of biosynthesis for vitamin K dependent proteins and functional study of Vitamin K metabolic enzyme.

研究代表者

岩田 宏紀 (IWATA HIROKI)

山形大学・医学部・助教

研究者番号：70361251

研究成果の概要(和文): PZ 遺伝子の基本的な発現機構を追究するため、肝癌細胞株 HepG2 では HNF-4 が重要な役割を果たすこと、Sp1 がエンハンサーとして働くことを明らかにした。また、妊娠中に PZ の血中濃度が高くなることからホルモンが PZ 遺伝子の発現調節に寄与している可能性が示唆され、プロゲステロンは PZ 遺伝子の発現を亢進することを明らかにした。

研究成果の概要(英文): We characterized the 5'-flanking region of PZ gene and identified cis-acting sequences and trans-acting factors responsible for the expression of human PZ gene using HepG2. HNF-4 α plays a crucial role in PZ gene expression, and that Sp1 acts as an enhancer. The levels of PZ and ZPI in plasma increased during normal pregnancy. It was suggested that the expression of PZ gene was regulated by hormones. And it was confirmed that the expression of PZ gene was enhanced by progesterone.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,500,000	0	1,500,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,200,000	510,000	3,710,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医科学

キーワード：プロテイン Z、ビタミン K、生合成、発現調節、ホルモン、遺伝子多型

1. 研究開始当初の背景

ヒトゲノムには、アミノ末端に γ -カルボキシグルタミン酸 (Gla) ドメインを持つビタミン K 依存性(VKD)タンパク質の遺伝子が約 10 種類存在する。その多くは血漿に存在する凝固関連タンパク質であるが、骨代謝に必須なものや、細胞表面に存在するものもあり、 γ -カルボキシラーゼがビタミン K 存在下でこれらのタンパク質のグルタミン酸残基を γ -カルボキシグルタミン酸へと翻訳後修飾する

反応、いわゆる Gla 化がそれらの構造と機能を完成し、生命を維持するのに必須である。VKD タンパク質の生合成については未だ不明な点が多いが、我々の予備的な実験の結果によれば、それぞれのタンパク質によって挙動が異なり、遺伝子発現の違いのみならず Gla 化の違いが分泌に重要な役割を果たしていることが判明している。ビタミン K 依存性タンパク質の基礎的研究は古くから行われてきたが、それらが持つ Gla 化に必須なビタ

ミン K エポキシド還元酵素サブユニット1(VKORC1)は、その活性は知られていたものの、分子そのものは長い間未同定であった。2004年に、その遺伝子がクローニングされたので、その遺伝子多型とワーファリン感受性/抵抗性について多くの研究がなされている。申請者らもワーファリン感受性とVKORC1遺伝子の多型との関係を調べるうちに、新たなアイソフォームがあることを発見した。このアイソフォームは酵素の活性を有するが、その詳細な性質は不明である。

このため、この基質特異性及び反応特性や組織分布を明らかにし、ビタミンK代謝系での役割を明らかにしたい。

また、VKDタンパクの1つであるプロテインZは、長年その機能が不明であったが、近年になり、プロテインZ依存性プロテアーゼインヒビターと結合し、活性型凝固X因子を阻害し、血液凝固系を制御することが明らかになった。さらに最近では、血中プロテインZレベルが低値の人では、脳梗塞、急性冠疾患、抗リン脂質抗体症候群、原因不明の流産等の血栓性疾患を発症するリスクが増大するという報告が多くなされているが、基礎的にはプロテインZについては構造に関する研究のみで、その発現や生合成については殆どデータが無いため、生合成機構の解明は基礎的にも臨床的にも非常に価値が高い。

2. 研究の目的

VKD血漿タンパク質のうち、特にそれぞれビタミンKに依存のおよび非依存の生合成されるプロテインZと血液凝固第X因子(以下X因子)をモデル基質として用い、これらの遺伝子発現や生合成機構について解析することを目的とした。また、VKDタンパク質のGla化には補助因子であるビタミンKが必須であるためVKDタンパク質の生合成機構への関与について解析することを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1)培養細胞を用いた転写調節領域および転写調節機構の解析

肝癌由来HepG2細胞は10%仔牛血清を含むD-MEM培地で培養した。

[RT-PCR] HepG2細胞を用いてエストラジオールおよびプロゲステロン添加時におけるPZおよびZPIの発現への影響について調べた。エストラジオールおよびプロゲステロンは1 μ g/mLの濃度で培養液に添加し、48時間後にRNAを抽出し発現の変化を調べた。HepG2よりのRNAの抽出は、グアニジンチオシアネート法を用い、オリゴ(dT)20プライマーおよびM-MLV逆転写酵素を用いて逆転写反応を行った。得られたcDNAおよびPZ、ZPIおよびGAPDHの特異プライマー

を用いてPCRをおこない各成分の発現を調べた。

[ルシフェラーゼレポーターアッセイ] ヒトPZ遺伝子の5'上流領域DNA断片をルシフェラーゼレポーターベクターpGL3に挿入した。HepG2細胞へはリン酸カルシウム法によりガラクトシダーゼ発現ベクターと共に10 μ gのルシフェラーゼベクターを導入した。24時間培養した後に、プロゲステロン、エストラジオールおよびビタミンKを1 μ g/mLの濃度となるように培養培地に添加し、48時間培養後にルシフェラーゼ活性およびガラクトシダーゼ活性を測定した。

(2)血中PZレベルおよびZPIレベルの測定

PZおよびZPIの抗原量は、特異抗体を用いたサンドイッチELISA法にて測定した。3 μ g/mLのPZおよびZPIそれぞれに対する抗体をELISAプレートの各ウェルに100 μ L/ウェル滴下、overnight静置することにより捕捉用抗体(PZ:ウサギ由来抗PZ抗体、ZPI:ウサギ由来抗ZPI抗体MQ126)を固定化した。抗体固定化用バッファーを除去した後にTBSで洗浄し、150 μ Lの1.5%BSAを滴下し、1時間静置することによりブロッキングした。ブロッキングバッファーを除去した後にサンプルを各ウェルに注入し、2時間インキュベートした。血漿検体は1.5%BSAに100倍希釈した後に測定に用いた。反応後に各ウェルをTBS-Tにて3回洗浄し、5 μ g/mLの検出用抗体(PZ:ペルオキシダーゼ標識ヒツジ由来抗PZ抗体、ZPI:ビオチン標識ウサギ由来抗ZPI抗体MQ191)を100 μ L滴下し1.5時間インキュベートした。ZPI系では、さらに洗浄後にペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを加え、1時間インキュベートした。TBS-Tにて5回洗浄した後に、3、3'、5、5'-テトラメチルベンジジン(TMB)を100 μ L加え、15-20分反応を行った後に、50 μ L/ウェルの1M硫酸を加え、450nmの吸光度をプレートリーダーにて測定した。健康人の平均値を100%とした。得られたデータは、正規性の検定およびF検定の後に、Student's t-testあるいはWelch's t-testを用いて有意差検定を行った。

4. 研究成果

(1)PZ遺伝子の転写調節領域の解析

PZ遺伝子の5'上流領域(-3058/+11)を挿入したルシフェラーゼレポーターベクターをHepG2細胞に導入しルシフェラーゼアッセイによりプロモーターおよびエンハンサー領域を決定した(図1)。この結果、(-83/+1)の領域にプロモーター領域が存在し、(-315/-255)の領域と(-116/-83)の領域にエンハンサー領域があることを明らかにした。

この領域に作用する転写因子についてデータベースを用いてサーチし、候補となる転写因子をゲルシフトアッセイによって調べた結果、プロモーター領域では SP1 および HNF4- が、(-315/-255)のエンハンサー領域では SP1 が作用することにより転写調節がおこなわれていることを明らかにした。(-116/-83)のエンハンサー領域に作用する転写因子は不明であった(図2)。

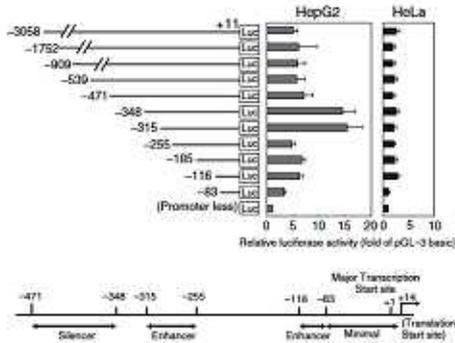


図1 様々な長さのPZ遺伝子5'上流領域をpGL3 vectorに挿入した際のルシフェラーゼ活性

様々な長さのPZ遺伝子5'上流領域断片を作製し、それぞれをpGL3ルシフェラーゼレポーターベクターに挿入し、ルシフェラーゼ活性を測定した。HepG2細胞では(-83/+11)にプロモーター領域が見られ、(-315/-255)および(-116/-83)にエンハンサー領域が見られた。

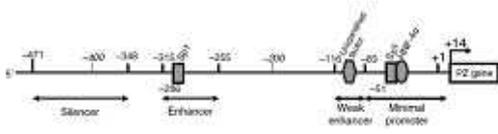


図2 PZ遺伝子の転写調節領域の概略図

ゲルシフトアッセイにより(-83/+11)のプロモーター領域にはSp1とHNF-4 が、(-315/-255)のエンハンサー領域にはHNF-4 が結合することが確認された。(-116/-83)のエンハンサー領域へ結合する転写因子は不明であった。

(2)PZ 欠乏患者の遺伝子解析

血中 PZ レベルが低値であった血栓症患者および正常者の遺伝子解析をおこなったところ、PZ 欠乏患者群において、これまで未知であった遺伝子多型 Intron E C48T を発見した。この多型の有無と血中 PZ レベルとを比較すると多型を有する症例では PZ レベルが有意に低値であった。

また、血中 PZ レベルが低値を示した習慣流産の患者について、既知の遺伝子多型である、Intron E T52A の遺伝子多型解析をおこない、遺伝子多型の有無と血漿 PZ レベルおよび血漿 ZPI レベルとの関係について調べた。この結果、血漿 PZ レベルが低値の群では、PZ intron E T52A 多型が高頻度でみられた。

さらに、PZ intron E T52A の多型と血漿 ZPI レベルとの関係を調べると、PZ intron E T52A の多型を有する群では、ZPI も有意に低値を示し、PZ-ZPI 複合体の形成が ZPI の安定化に寄与する可能性が示唆された(図3)。

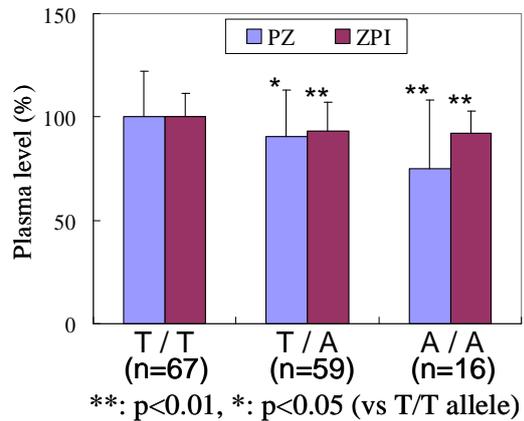


図3 血漿PZレベルおよびZPIレベルに及ぼす PZ intron E T52A 遺伝子多型の影響

PZ intron E T52A 遺伝子多型をヘテロあるいはホモでもつ群では、多型を持たない群に比べてPZレベルおよびZPIレベルが有意に低値であった。(T/Tを100%として表記)

(3)周産期における PZ および ZPI の変動

正常妊娠における血中の PZ および ZPI の変動を ELISA にて測定した、その結果、妊娠中では PZ および ZPI が大幅に増加する傾向が見られた。この結果より、PZ および ZPI の発現がホルモンによって調節される可能性が示唆されたため、HepG2 細胞を用いてエストロゲンおよびプロゲステロンの PZ 遺伝子発現に及ぼす影響を RT-PCR を用いて調べたところ、プロゲステロンが PZ の発現を亢進させることが明らかになった(図4)。ZPI の発現に及ぼすエストロゲンおよびプロゲステロンの影響は見られなかった。

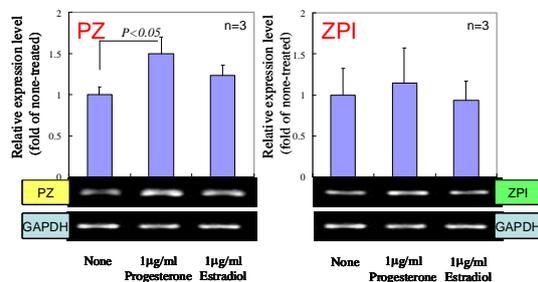


図4 PZおよびZPI遺伝子の発現に及ぼすプロゲステロンおよびエストラジオールの影響

HepG2細胞にプロゲステロンおよびエストラジオールを処理し、PZおよびZPI遺伝子の発現の変化をRT-PCRにて調べた。プロゲステロンの処理によりPZ遺伝子の発現亢進が見られた。

PZ の遺伝子発現に対するエストロゲンおよびプロゲステロンの影響をさらに詳細に調べるため、ルシフェラーゼレポーターアッセイをおこなったところ、RT-PCRの結果と同様に、プロゲステロンがPZの発現を亢進させることが明らかになった(図5)。さらに、PZの遺伝子発現に対するビタミンKの影響を調べると、ビタミンK2の存在下ではPZの発現が亢進することが、HepG2を用いたRT-PCRにより明らかになった。

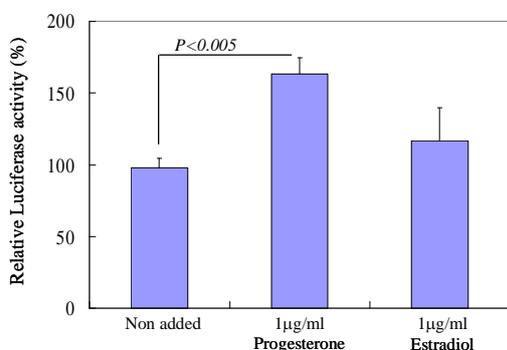


図5 PZ遺伝子の発現に及ぼすプロゲステロンおよびエストラジオールの影響

プロゲステロンによるPZ遺伝子の発現の変化をルシフェラーゼアッセイを用いて調べた。プロゲステロンの処理によりPZ遺伝子の発現亢進が確認された。

(4)総括と今後の展望

本研究では、PZ 遺伝子の基礎の発現機構を明らかにした。また、妊娠期に血中濃度が有意に増加することから、妊娠の維持に有用な役割を果たしている可能性が示唆された。さらに、ホルモンが転写調節に寄与することが示唆されたため、エストラジオールおよびプロゲステロンの影響について検討したところ、プロゲステロンが転写を亢進させることを明らかにした。PZ および ZPI の発現へのホルモンの影響については、さらに多くのホルモンを用いて調べる必要がある。また、PZ および ZPI は複合体の形成が、それぞれの因子の安定性や機能的にも重要であることから、血漿 PZ-ZPI 複合体の測定系の構築が必要である。

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6件)

惣宇利正善, 岩田宏紀, 張 偉光, 一瀬白帝: ヒト protein Z の分泌様式. 血液・腫瘍科. 60(2), 83-91, 2010 査読あり

Souri M, Iwata H, Zhang WG, Ichinose A.: Unique secretion mode of human protein Z: its Gla domain is responsible for inefficient, vitamin K-dependent and warfarin-sensitive secretion. Blood. 113, 3857-64, 2009 査読あり

Sugawara H, Iwata H, Souri M, Ichinose A.: Regulation of human protein Z gene expression by liver-enriched transcription factor HNF-4alpha and ubiquitous factor Sp1. J Thromb Haemost. 5, 2250-8, 2007 査読あり

[学会発表](計14件)

惣宇利正善, 張 偉光, 岩田宏紀, 一瀬白帝: Unique secretion mode of human protein Z : its Gla domain is responsible for inefficient, vitamin K-dependent and warfarin-sensitive secretion. 第33回日本血栓止血学会学術集会 ISTH 2011 Memorial Award, 鹿児島; 2010年4月22-24日

岩田宏紀, 杉浦真弓, 一瀬白帝: 妊娠および不育症におけるプロテインZおよびプロテインZ依存性プロテアーゼインヒビターの動態. 第32回日本血栓止血学会学術集会, 北九州; 2009年6月4-6日

惣宇利正善, 岩田宏紀, 張 偉光, 中垣智弘, 一瀬白帝: γ -グルタミルカルボキシラーゼはビタミンK依存性タンパク質のCargo receptorである. BMB2008 (第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会), 神戸; 2008年12月9-12日

惣宇利正善, 岩田宏紀, 張 偉光, 中垣智弘, 一瀬白帝: 分泌型ルシフェラーゼを用いたビタミンK依存性タンパク質分泌メカニズムの解析. 第31回日本血栓止血学会学術集会, 大阪; 2008年11月20-22日

惣宇利正善, 岩田宏紀, 張 偉光, 一瀬白帝: γ -グルタミルカルボキシラーゼはビタミンK依存性タンパク質の分泌に必須である. 第30回日本血栓止血学会学術集会, 三重; 2007年11月15-17日

惣宇利正善, 岩田宏紀, 張 偉光, 一瀬
白帝: グルタミンカルボキシラーゼ
はビタミン K 依存性タンパク質の分泌
に必須である. 日本生化学会東北支部第
73 回例会・シンポジウム, 仙台; 2007
年 5 月 12 日

〔図書〕(計 1 件)

岩田宏紀, 一瀬白帝: 人工的遺伝子変異
導入と発現解析. 図説 分子病態学.
2008; 154-8. 中外医学社

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩田 宏紀 (IWATA HIROKI)

山形大学・医学部・助教

研究者番号: 70361251