

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K05850

研究課題名（和文）ヒスチジン立体配置に基づいた細胞膜透過性タンパク質ファミリーの探索と機能解析

研究課題名（英文）Exploration and functional analysis of cell membrane-permeable protein families based on histidine conformation

研究代表者

岩崎 崇（Iwasaki, Takashi）

鳥取大学・農学部・准教授

研究者番号：30585584

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：微生物が産生するヒスチジン連続タンパク質は、ヒト細胞に対して細胞膜透過性を示し、さらに疾患に関連する挙動を示す。本研究では、ヒト血中から類似のヒスチジン連続タンパク質を網羅的に探索したところ、Histidine-rich glycoprotein（HRGP）が細胞膜透過性ヒスチジン連続タンパク質として見出された。さらに、HRGPは亜鉛イオンと結合した状態でヒト細胞内に取り込まれ、細胞内亜鉛イオン濃度を増加させるとともに、ミトコンドリア呼吸鎖複合体の遺伝子発現を抑制することが明らかとなった。すなわち、ヒトの細胞膜透過性ヒスチジン連続タンパク質も同様に疾患に関連する挙動を示すことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、ヒト血中に多量に存在するHRGPが細胞膜透過性ヒスチジン連続タンパク質としてふるまい、さらに亜鉛イオンを細胞内へ輸送することで、好気呼吸（ATP合成）の重要因子であるミトコンドリアの呼吸鎖複合体の発現量を低下させることが明らかになった。すなわち、HRGPはミトコンドリア機能障害に起因する神経変性疾患、代謝症候群、老化関連疾患などさまざまな疾患のリスク因子となりうる可能性が示唆された。今後は、HRGPを新たな切り口とした関連疾患の予防・改善法の開発につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：Histidine-rich proteins produced by microorganisms exhibit cell membrane permeability towards human cells and demonstrate behaviors associated with diseases. In this study, a comprehensive search for similar histidine-rich proteins in human blood identified Histidine-rich glycoprotein (HRGP) as a cell membrane-permeable histidine-rich protein. Furthermore, this study showed that HRGP, when bound to zinc ions, is internalized in human cells, increasing intracellular zinc ion concentration and suppressing the gene expression of mitochondrial respiratory chain complexes. The results suggest that cell membrane-permeable histidine-rich proteins in humans also exhibit behaviors associated with diseases.

研究分野：生物有機化学

キーワード：ヒスチジン タンパク質 HRGP 細胞膜透過 亜鉛 ミトコンドリア ミトコンドリア機能障害

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

我々はこれまでの研究から、ヒスチジンのみが連続した人工の細胞膜透過ペプチド「ポリヒスチジンペプチド」を開発し、ポリヒスチジンペプチドを融合した人工の組換えタンパク質も同様に、高い細胞膜透過性を示すことを発見した<sup>[1]</sup>。さらに、一次構造中にヒスチジン連続配列を有する天然タンパク質{例: 熱帯熱マラリア原虫 *Plasmodium falciparum* Histidine-rich protein II (マラリア HRP)、ピロリ菌 *Helicobacter pylori* Histidine rich protein (ピロリ菌 HRP)}についても、それぞれ細胞膜を透過することを明らかにした。非常に興味深いことに、これらマラリア HRP やピロリ菌 HRP は細胞膜を透過した後に、疾患に関与する挙動(例: 細胞毒性やアミロイド様線維形成)を示すことが明らかになった<sup>[2,3]</sup>。すなわち、ヒスチジン連続配列を有した天然タンパク質(ヒスチジン連続タンパク質と呼称する)は細胞膜透過性に加えて、細胞内機能を有した新たな機能性タンパク質ファミリーであると考えられる。

### 2. 研究の目的

これまでの研究では、一次構造中にヒスチジンが連続したタンパク質のみを解析対象としてきた。そこで本研究では、立体構造中にヒスチジンが連続するタンパク質を解析対象とすることで、新しいヒスチジン連続タンパク質の探索・同定・機能解析を目指す。これにより、ヒスチジン連続タンパク質ファミリーの一端を解明するとともに、新たな生命現象の発見に挑む。

具体的には、「ヒスチジン連続タンパク質は生体内・細胞内で一体何をしているのか?」という疑問を明らかにするため、ヒトに存在する新たなヒスチジン連続タンパク質を探索・同定し、その細胞膜透過性と機能を調べるとともに、未知なる生命現象の発見を目指す。従来は、バイオインフォマティクス解析により「一次構造中にヒスチジン連続配列を有するタンパク質のみ」に着目してきたが、本研究では生化学的な解析手法を駆使することで「立体構造中にヒスチジン連続配列を有するタンパク質」を探索・同定し、その生理機能を明らかにすることを目指す。

天然分子の構造をヒントにして人工の機能性分子を創生するバイオミメティクス研究が近年盛んであるが、本研究ではその真逆のリバースバイオミメティクス研究(人工分子の構造をヒントに機能性の天然分子を探索する研究)により、新しい機能を有したヒト由来ヒスチジン連続タンパク質の発見を試みる。

### 3. 研究の方法

本研究では、ヒト血中に含まれる「立体構造中にヒスチジン連続配列を有するタンパク質」を探索し、細胞膜透過性を解析するとともに、その生理機能を明らかにすることを目指す。具体的な研究方法を以下に記載する。

#### (1) ヒスチジン連続タンパク質の探索・精製

正常ヒト血清プール(年齢: 20代~60代、性別: 男性・女性、血液型: A・B・O・AB型)(コージンバイオ株式会社から購入)を Ni 固定化カラムへロードし、立体構造中にヒスチジンが連続したヒスチジン連続タンパク質を結合させた。次いで、イミダゾール濃度勾配により、Ni 固定化カラムに結合したヒスチジン連続タンパク質の中から、立体構造中のヒスチジン連続性の低い順にタンパク質を溶出させた。これにより、ヒスチジン連続性の異なるヒスチジン連続タンパク質画分を得た。さらに、イオン交換カラムにて細分化することで、ヒスチジン連続性と表面電荷の異なるヒスチジン連続タンパク質画分(合計 91 画分)を得た。

#### (2) ヒスチジン連続タンパク質の細胞膜透過性の解析

上記(1)にて得られたヒスチジン連続タンパク質画分の一部を蛍光色素 Fluorescein により蛍光修飾した(ヒスチジン連続タンパク質の N 末端またはリジン残基の NH<sub>2</sub> 基を Fluorescein 標識した)。蛍光標識したヒスチジン連続タンパク質画分を、ヒスチジン連続配列をよく取り込むことが分かっているヒト繊維肉腫細胞株 (HT1080 細胞) に添加処理し、フローサイトメーターにて細胞膜透過性を定量評価した。

#### (3) 細胞膜透過性ヒスチジン連続タンパク質の候補の同定

上記(2)にて高い細胞膜透過性を示したヒスチジン連続タンパク質画分(蛍光未標識画分)を、LC-MS/MS 質量分析に供し、細胞膜透過性のヒスチジン連続タンパク質画分に含まれるタンパク質配列を解析した。これにより、細胞膜透過性ヒスチジン連続タンパク質の候補を複数種同定した。

#### (4) 細胞膜透過性ヒスチジン連続タンパク質の機能解析

上記(3)にて同定された細胞膜透過性ヒスチジン連続タンパク質候補を、ヒト血清から精製・単離した。次いで、精製した細胞膜透過性ヒスチジン連続タンパク質を蛍光標識し、フローサイトメーターおよび共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いて、ヒト HT1080 細胞に対する細胞膜透過

メカニズムを調べた。また、細胞膜透過性ヒスチジン連続タンパク質を処理したヒト HT1080 細胞から mRNA を抽出し、RNA-Seq 解析により細胞内の遺伝子発現変動を調べた。これにより、細胞膜透過性ヒスチジン連続タンパク質が細胞に与える影響を解析し、ヒスチジン連続タンパク質の生体内・細胞内における機能解明を試みた。

#### 4. 研究成果

##### (1) 細胞膜透過性ヒスチジン連続タンパク質の探索

本研究では、ヒト血清中に存在するヒスチジン連続タンパク質の探索ならびに細胞膜透過性の評価と細胞に与える機能解析を実施した。まず、アフィニティー精製クロマトグラフィーおよびイオン交換クロマトグラフィーにより得られた 91 種類のヒスチジン連続タンパク質画分の細胞膜透過性を評価したところ、細胞膜透過をすることが分かっているポリヒスチジンペプチド融合タンパク質よりも高い細胞膜透過性を示す画分が 27 画分存在することが明らかになった (図 1)。これら 27 画分に含まれる細胞膜透過性ヒスチジン連続タンパク質について、LC-MS/MS 質量分析を用いたアミノ酸配列解析を実施した。その結果、細胞膜透過性ヒスチジン連続タンパク質の候補タンパク質が 221 種同定された。さらに、Gene ontology 解析結果を参照してエンドソームに存在が確認されているタンパク質 (エンドサイトーシスにより細胞膜透過を示す可能性のあるタンパク質) に絞り込んだ結果、7 種類の候補タンパク質が示唆された (表 1)。この 7 種類の候補タンパク質の中で、もっともヒスチジン含有率が高いタンパク質として Histidine-rich glycoprotein (HRGP) に着目した。HRGP はヒト血中に多量に存在する糖タンパク質であり、生体内で様々な機能を示す多機能タンパク質として知られている<sup>[4]</sup>。また、HRGP の中にはヒスチジンに富むヒスチジンリッチ領域が存在しており、立体構造予測 (AlphaFold Protein Structure Database: AF-P04196-F1) からこのヒスチジンリッチ領域はタンパク質表面に露出していることが示唆されたため、HRGP は細胞膜透過性ヒスチジンリッチタンパク質である可能性が強く示唆された。

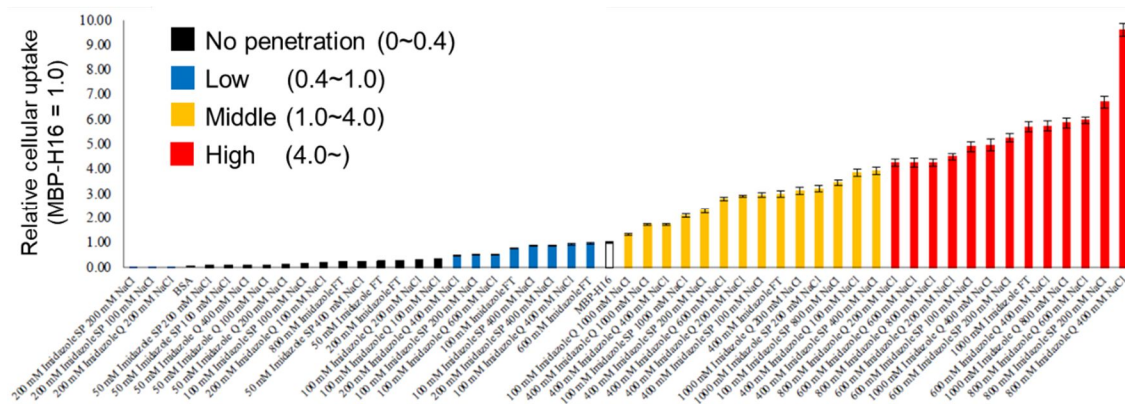


図 1. 細胞膜透過性ヒスチジン連続タンパク質の探索

ヒト血清中に存在するタンパク質を Ni イオン固定化カラムにて精製した際のイミダゾール溶出濃度と、陽イオン交換カラム (SP Sepharose) または陽イオン交換カラム (Q Sepharose) にて精製した際の NaCl 溶出濃度にて、各画分を示す。細胞膜透過をすることが分かっているポリヒスチジンペプチド融合タンパク質 (MBP-H16) の膜透過を 1.0 とした場合の相対値で示す。MBP-H16 よりも高い細胞膜透過性を示した Middle 画分および High 画分を、以降の LC-MS/MS 質量分析に供した。

表 1. 細胞膜透過性ヒスチジン連続タンパク質の候補

Identified Proteins	Accession Number	Molecular Weight	# of AA	# of His	% of His
<b>Histidine-rich glycoprotein</b>	<b>NP_000403.1</b>	<b>60 kDa</b>	<b>525</b>	<b>66</b>	<b>12.6 %</b>
Serotransferrin	NP_001054.1	77 kDa	698	19	2.7 %
Apolipoprotein A-I	NP_000030.1	31 kDa	267	6	2.2 %
Polyubiquitin-B	NP_001268645.1	26 kDa	229	3	1.3 %
Lactotransferrin	NP_002334.2	78 kDa	710	9	1.3 %
Annexin A2	NP_000691.1	39 kDa	339	4	1.2 %

##### (2) HRGP の細胞膜透過

上記(1)の結果から、ヒト血清中に存在する HRGP が細胞膜透過性ヒスチジン連続タンパク質である可能性が強く示唆された。そこで、ヒト血清から HRGP を精製し、蛍光標識した HRGP を調製してヒト細胞に対する細胞膜透過を再検証した結果、予想した通り、HRGP はヒト HT1080 細胞に対して高い細胞膜透過を示すことが確認された。また、二価金属イオン (Co<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>)

イオン)がHRGPの細胞膜透過に与える影響を調べたところ、 $Zn^{2+}$ イオン存在下においてHRGPの細胞膜透過が顕著に促進されることが明らかとなった(図2)。

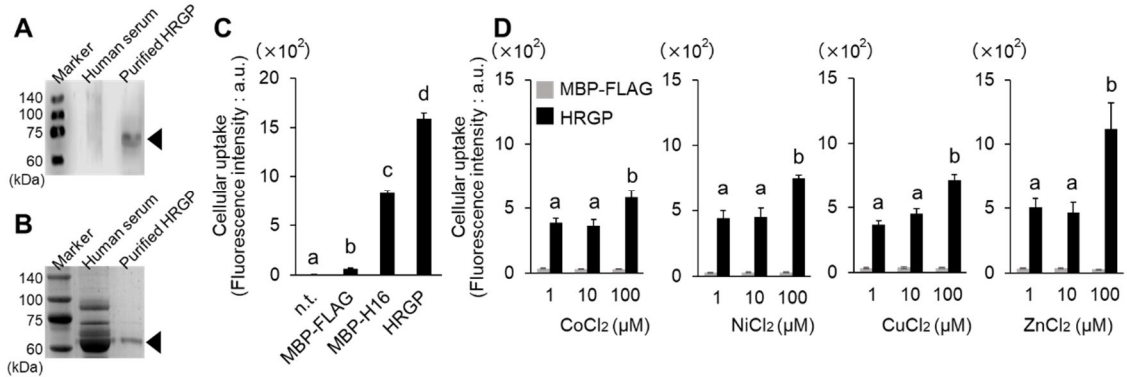


図2 . HRGP の細胞膜透過

(A) ヒト血清プールからNiイオン固定化カラムを用いてアフィニティー精製したHRGP画分(イミダゾール500 mM 溶出画分)のSDS-PAGE泳動写真、(B) Western Blottingの写真(一次抗体Anti-HRGP pAb from rabbit 5,000倍希釈、二次抗体Anti-Rabbit pAb from goat 10,000倍希釈)を示す。矢頭は精製HRGPのバンドを示す。(C) ヒト細胞(HT1080細胞)に対する蛍光標識HRGPの細胞膜透過を示す。比較対象として、非膜透過性のMBP-FLAGと膜透過性のMBP-H16を用いた。n.t.は未処理、異符号間は有意差有(Tukey test  $p < 0.05$ )を示す。(D) 異なる種類、濃度の二価金属イオン存在下における、蛍光標識HRGPの細胞膜透過を示す。異符号間は有意差有(Tukey test  $p < 0.05$ )を示す。

### (3) HRGPが細胞に与える影響の解析

上記(2)の結果から、HRGPの細胞膜透過は $Zn^{2+}$ イオンにより促進されることが明らかになった。また、先行研究より $Zn^{2+}$ イオンはHRGPの相互作用因子の一つとして報告されていることから<sup>[4]</sup>、HRGPは $Zn^{2+}$ イオンと相互作用することで高い細胞膜透過を示している可能性が示唆された。そこで、HRGPと $Zn^{2+}$ イオンの結合、細胞膜透過、ならびに細胞内濃度の関係性を調べたところ、HRGPは $Zn^{2+}$ イオンと結合した状態で細胞膜透過をすることで、 $Zn^{2+}$ イオンを細胞内へ輸送していることが分かった(図3)。すなわち、HRGPは $Zn^{2+}$ イオンのトランスポーターとして機能している可能性が示唆された。

上記のように、新しい機能的側面が示唆されたHRGPであるが、このようなHRGPが細胞膜透過した後に、細胞内でどのような機能を示すのかについては未だ不明であった。そこで、HRGPの細胞内機能の解明を目指し、RNA-Seq解析を実施した。 $Zn^{2+}$ イオンの存在/非存在下にてHRGPをヒトHT1080細胞に細胞膜透過させた後、RNA-Seq解析により遺伝子発現変動を調べたところ、 $Zn^{2+}$ イオン単独やHRGP単独処理では発現変動が見られなかった遺伝子群が、 $Zn^{2+}$ イオンとHRGPの共処理によって顕著に発現変動することが明らかになった。GO enrichment解析の結果、 $Zn^{2+}$ イオンとHRGPの共処理によって、ミトコンドリアのATP合成(電子伝達系)に關与する呼吸鎖複合体をコードする遺伝子群の発現量が顕著に低下することが示された(図4)。

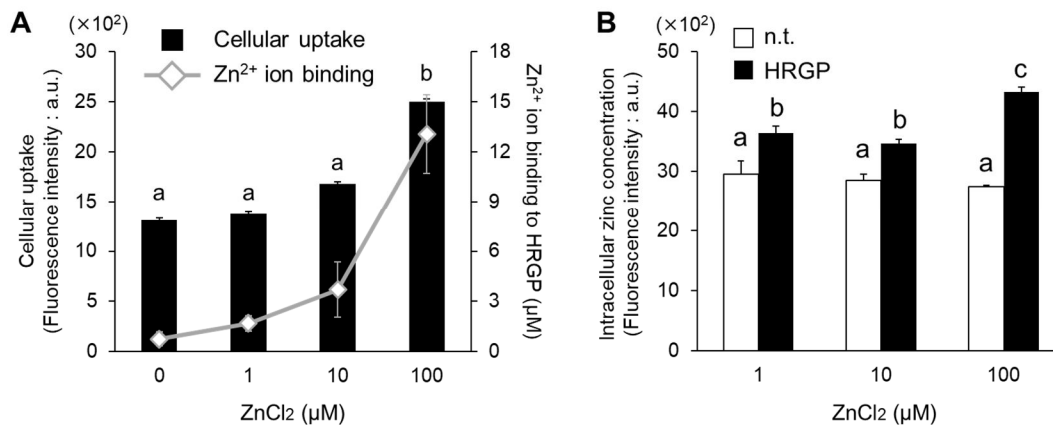
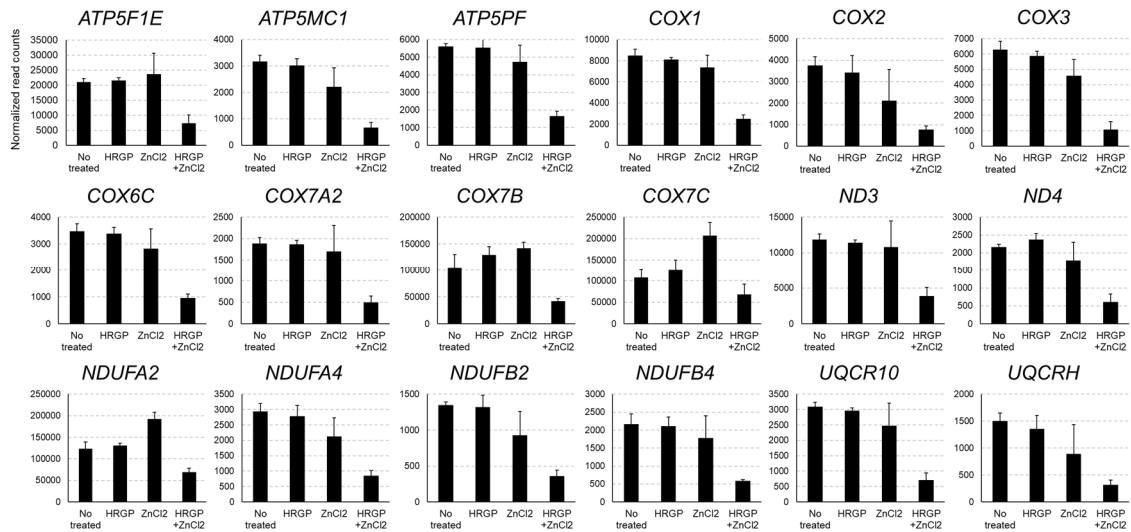


図3 . HRGP による  $Zn^{2+}$ イオンの細胞内輸送

(A) 異なる濃度の $Zn^{2+}$ イオンとHRGP(1  $\mu$ M)を混合した際の、HRGPの細胞膜透過、ならびに $Zn^{2+}$ イオンとHRGPの結合を示す。異符号間は有意差有(Tukey test  $p < 0.01$ )を示す。(B) 異なる濃度の $Zn^{2+}$ イオンとHRGP(1  $\mu$ M)で細胞を処理した際の細胞内 $Zn^{2+}$ イオン濃度を示す。細胞内の $Zn^{2+}$ イオン濃度は $Zn^{2+}$ イオン特異的蛍光プローブであるZnAF-2 DA(五稜化薬株式会社)を用いて定量した。n.t.は未処理、異符号間は有意差有(Tukey test  $p < 0.05$ )を示す。



**図4 . Zn<sup>2+</sup>イオンとHRGPにより発現変動するミトコンドリア呼吸鎖複合体の遺伝子群**

ヒト細胞 (HT1080 細胞) を Zn<sup>2+</sup>イオン (100 μM) と HRGP (1 μM) で単独または共処理した際の遺伝子発現変動を RNA-Seq により解析した。Zn<sup>2+</sup>イオンと HRGP の共処理によって選択的かつ顕著に発現量が低下するミトコンドリアの呼吸鎖複合体の遺伝子群を示す。

#### (4) ヒト血清中における HRGP の機能に関する考察

上記(1)から(3)までの結果を総括すると、ヒト血清中に多量に存在する HRGP は細胞膜透過性ヒスチジン連続タンパク質であると同時に、HRGP は Zn<sup>2+</sup>イオンと結合して Zn<sup>2+</sup>イオンを細胞内へ輸送することで、ミトコンドリアの呼吸鎖複合体の発現量を低下させることが明らかになった。

ミトコンドリアの呼吸鎖複合体は、ミトコンドリア内膜における電子伝達系の担い手であり、好気呼吸 (ATP 合成) に必須のタンパク質複合体である。このようなミトコンドリア呼吸鎖複合体の発現量が低下すると、細胞内のエネルギー産生が減少し、ミトコンドリア機能障害に端を発した神経変性疾患、代謝症候群、老化関連疾患など様々な疾患の原因になることが予想される。すなわち、HRGP は Zn<sup>2+</sup>イオンと共に細胞膜透過をすることで、ミトコンドリア機能障害に起因する疾患のリスク因子としてはたらく可能性が示唆された。

また、正常なヒト血中の Zn<sup>2+</sup>イオン濃度は 10 ~ 20 μM の範囲であるが<sup>[5]</sup>、糖尿病や心血管疾患では血中 Zn<sup>2+</sup>イオン濃度が大きく上昇することが知られている<sup>[6]</sup>。このような血中 Zn<sup>2+</sup>イオン濃度の上昇を伴う疾患においては、HRGP がミトコンドリア機能障害を引き起こすリスクがより高まると予想される。さらに、ミトコンドリア機能障害に起因する神経変性疾患 (パーキンソン病やアルツハイマー病) についても、亜鉛の過剰摂取と関連していることが報告されている<sup>[7]</sup>、本研究の成果を考慮すると、亜鉛の過剰摂取とミトコンドリア機能障害をつなぐ因子として HRGP が働いている可能性が示唆された。

今後は、さまざまなヒト組織由来の細胞株を用いて、HRGP と Zn<sup>2+</sup>イオンの細胞膜透過や、それに続くミトコンドリア機能障害を検証する必要がある。また、HRGP をノックアウトした際に、種々の疾患に与える影響についても表現型解析が求められる。現時点では、本研究成果は HRGP の機能の一側面を明らかにしたに過ぎない。しかしながら、先行研究で示された天然ヒスチジンリッチタンパク質 (マラリア HRP やピロリ菌 HRP) と同様に、ヒトの天然ヒスチジンリッチタンパク質である HRGP についても細胞膜透過性と疾患に関与する挙動を明らかにすることができたことは、ヒスチジン連続タンパク質ファミリーの全容解明において重要な知見であると言える。

#### 5 . 引用文献

- [1] Iwasaki et al. (2015) *J. Control. Release*, **210**: 115-124.
- [2] Iwasaki et al. (2022) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **86**: 321-330.
- [3] Iwasaki et al. (2021) *bioRxiv*, doi.org/10.1101/2021.11.19.469193.
- [4] Poon et al. (2011) *Blood*, **117**: 2093-2101.
- [5] Walsh et al. (1994) *Environ. Health Perspect.*, **102**: 5-46.
- [6] Qu et al. (2020) *Bioact. Mater.*, **5**: 410-422.
- [7] Ringgit et al. (2022) *Sci. Rep.*, **12**: 2574.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Iwasaki Takashi, Shimoda Mayu, Kanayama Haru, Kawano Tsuyoshi	4. 巻 -
2. 論文標題 Histidine-rich protein 2: a new pathogenic factor of Plasmodium falciparum malaria	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2021.11.19.469193	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hori Kosuke, Higashida Shinichi, Osaki Tomohiro, Kawano Tsuyoshi, Inaba Hiroshi, Matsuura Kazunori, Iwasaki Takashi	4. 巻 354
2. 論文標題 Intracellular delivery and photothermal therapeutic effects of polyhistidine peptide-modified gold nanoparticles	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Biotechnology	6. 最初と最後の頁 34 ~ 44
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbiotec.2022.06.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Iwasaki Takashi, Maruyama Aiki, Inui Yurika, Sakurai Toshihiko, Kawano Tsuyoshi	4. 巻 86
2. 論文標題 In vitro transcytosis of Helicobacter pylori histidine-rich protein through gastric epithelial-like cells and the blood-brain barrier	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 321 ~ 330
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/bbb/zbab221	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岩崎崇、金山葉瑠、下田麻由、河野強
2. 発表標題 熱帯熱マラリア原虫が産生するHistidine-rich protein 2の病原性メカニズムの解明
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------