

平成 2 6 年 6 月 2 3 日現在

機関番号： 3 4 4 1 3

研究種目： 基盤研究(C)

研究期間： 2011 ~ 2013

課題番号： 2 3 5 9 0 0 9 6

研究課題名（和文） L R G ノックアウトマウスの解析による新規シグナル分子としてのシトクロム c の役割

研究課題名（英文） Role of cytochrome c as a novel signaling molecule by the investigation of LRG knock-out mouse

研究代表者

井上 晴嗣 (Inoue, Seiji)

大阪薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号： 7 0 1 8 3 1 8 4

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,000,000 円、（間接経費） 1,200,000 円

研究成果の概要（和文）：機能未知の血清タンパク質の一つであるロイシンリッチ α 2-グリコプロテイン(LRG)は、血液中で細胞外シトクロムc(Cytc)と強く結合して複合体を形成することを見いだした。この結合にはCytcの8位、13位、72位、73位、79位の正電荷が重要であった。Cytc-LRG複合体は、骨髄マクロファージなどの免疫細胞に働いてG-CSFの発現を誘導し、骨髄における好中球の増殖を促進する危険シグナルとして機能すると思われる。

研究成果の概要（英文）：Leucine-rich α 2-glycoprotein (LRG), one of the serum proteins with unknown function, was found to bind tightly and form complex with the extracellular cytochrome c (Cytc). The positive charges of the residues 8, 13, 72, 73, and 79 of Cytc molecule were important to this binding. A Cytc-LRG complex would function as a danger signal that modulates the immune cells such as bone marrow-derived macrophages to induce G-CSF expression, leading to the neutrophil proliferation in bone marrow.

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 薬学・生物系薬学

キーワード： 生体分子 蛋白質 生理活性

1. 研究開始当初の背景

ヒトの血漿タンパク質の一つである Leucine-rich α_2 -glycoprotein (LRG)は、1985年にそのアミノ酸配列が報告されているにも関わらず、その機能に関しては全く報告されてなかった。我々は、これまで毒ヘビ血液中に存在するホスホリパーゼ A₂ (PLA₂)阻害タンパク質(PLI)について、その構造や機能を研究してきた。そして、タンビマムシなどの毒ヘビの血液中には 3 種類の PLI (PLI α 、PLI β 、PLI γ)が存在することを明らかにした。この 3 種類の PLI のうち、ヘビ毒 II 型塩基性 PLA₂ を特異的に阻害する PLI β は、ロイシンリッチリピート構造(LRR)をもつ糖タンパク質であり、ヒト LRG と 33%の相同性を示すことがわかった。PLI β と同様に血漿タンパク質であることと互いに高い相同性を示すことから、LRG は PLI β のヒトホモログであり PLA₂ 阻害タンパク質として機能していると考えた。そこでそれを実証するため LRG を組換えタンパク質として発現させ、LRG に PLA₂ 阻害活性があるかどうか調べることにした。まず、マウス LRG cDNA をクローニングし、大腸菌発現系を用いて組換えタンパク質の産生を試みたが、ほとんどが不溶化し、可溶化できた組換えタンパク質の構造も CD スペクトルではランダム構造を示し、ネイティブな構造を持つタンパク質は得られなかった。そこで、この不溶化した組換えマウス LRG を抗原としてウサギに注射し、抗マウス LRG 血清を得、この抗血清を用いたウェスタンブロットを指標として各種カラムクロマトグラフィーを行うことにより、10mL のマウス血清から 20 μ g のマウス LRG を精製することに成功した。精製した LRG の PLA₂ 阻害活性を調べたが、残念ながらヒト IIA 型 PLA₂、ヒト V 型 PLA₂、およびタンビマムシ塩基性 PLA₂ に対する阻害活性はみられなかった。ヒトの分泌型 PLA₂ はこれ以外にも IB、IIC、IID、IIE、IIF、X などがあり、ヒトとマウス間の違いも考えられることから、LRG が PLA₂ 阻害タンパク質として機能している可能性が否定されたわけではない。

我々が LRG に注目した頃には LRG に関連した報告は全くなかったが、2002 年に LRG は好中球に多く含まれ、好中球の分化マーカーになること、LRG は腸管膜リンパ節における高内皮性細静脈細胞で特異的に発現していることなどが報告され、LRG は生体防御に何らかの役割を果たしている可能性が考えられた。最近では、二次元ゲル電気泳動と質量分析を利用したプロテオミクス技術の発展に伴い、疾病プロテオーム解析が広く行われ、LRG がインフルエンザウィルス感染時に血漿中で増加するタンパク質の一つであること、嚢胞性線維症のマウス小腸では LRG の発現が約 21 倍増加していること、急性宿主片対宿主病 (GVHD) の血漿中で LRG が約 3.5 倍増加していること、肺がん患者の血清で LRG が 6 倍程度増加していること、脾

臓がん患者の血漿で LRG が約 3 倍増加していること、特発性正常圧水頭症では脳脊髄液中の LRG が約 2 倍に増加していることなど、種々の病態に伴う血中 LRG 量の増加が次々に報告されてきた。

我々は、ヒト培養肝癌細胞 HepG2 細胞において IL-6 刺激によって LRG 生合成が促進されること、リポ多糖(LPS)投与マウスにおいて肝臓での LRG 生合成が促進されることなどを見だし、LRG は急性期タンパク質として機能することを明らかにした。

一方、Cyt *c* の ELISA 系を用いた定量を血清が阻害することから、血清には Cyt *c* と結合するタンパク質が存在し、しかもそれが LRG であることが Cummings らにより報告された。我々はこの報告に基づいて、ウマ Cyt *c* をリガンドとするアフィニティーカラムを作製し、ヒト血清を添加したところ、LRG は特異的にカラムに結合し、簡単に精製できることがわかった。そこで、Biacore を用いて Cyt *c* と精製した LRG との相互作用を解析した。ヒト LRG を固定化したセンサーチップにウマ Cyt *c* を添加すると非常に強く結合することがわかった(解離定数 K_D は約 10^{-13} M)。また、エラブウミヘビ心臓から精製した Cyt *c* はウマ Cyt *c* よりも少し弱く結合し(K_D は約 10^{-10} M)、酵母 Cyt *c* は全く結合しないことがわかった。同様にタンビマムシ PLI β についても、Cyt *c* との相互作用を調べたところ、ウマ Cyt *c* と強く結合したことから(K_D は 10^{-10} M)、PLI β はタンビマムシの LRG に相当すると考えられた。また、PLI β に対して酵母 Cyt *c* は弱く結合したが(K_D は約 10^{-6} M)、エラブウミヘビ Cyt *c* はウマ Cyt *c* よりも強く結合したことから(K_D は約 10^{-12} M)、これらの結合には種特異性があることがわかった。また、PLI β と Cyt *c* との結合が PLI β と II 型塩基性 PLA₂ との結合(K_D は約 10^{-9} M)よりも強かったことから、LRG と PLI β の本来のリガンドは PLA₂ ではなく自己の Cyt *c* であることが示唆された。

2. 研究の目的

Cyt *c* はミトコンドリアの電子伝達体タンパク質として機能する以外に、アポトーシスを引き起こす細胞内情報伝達分子としても機能していることが知られている。すなわち、ミトコンドリアから漏れ出た Cyt *c* は Apaf-1 と結合し、カスパーゼ 9 を活性化してアポトーシスを引き起こす。ちょうどミトコンドリアから漏れ出すのと同様に、Cyt *c* はアポトーシスやネクローシスで死んだ細胞から漏れ出し、細胞死のシグナル分子として機能し、白血球の遊走、アポトーシス、食作用などに関わり、生体防御機構の一端を担っているのではないかと考えている。その際に、血液中の LRG は Cyt *c* と複合体を形成し、この複合体が細胞死のシグナル分子として機能する可能性が考えられる一方、LRG は単に Cyt *c* による過剰な防御反応を抑えるために血液

中の Cyt *c* に対するスカベンジャーとして機能する可能性も考えられる。Cyt *c* が細胞死のシグナル分子として機能することが明らかになれば、Cyt *c* は細菌から植物、動物に至るまで共通に存在し、電子伝達体として機能するが、真核生物から多細胞生物に至る進化の過程でミトコンドリア内、細胞内、細胞外でそれぞれ全く異なる役割を果たす多機能性を獲得したと考えられ、タンパク質の機能獲得に関する重要な学術的知見が得られる。

そこで、本研究では、Cyt *c* が LRG の内在性リガンドであるなら、Cyt *c* と LRG がどのような生理的役割を果たしているのかについて検討する。具体的には①LRG ノックアウトマウスの表現型の解析、②LRG と Cyt *c* の相互作用の解明などについて検討した。

3. 研究の方法

(1) LRG ノックアウトマウスの表現型の解析

理化学研究所発生・再生科学総合研究センター(CDB)との共同開発で作製した LRG ノックアウトマウスについて、Cyt *c* の投与による表現型の違いが見られないかどうか検討した。13 週齢の野生型(WT)マウスと LRG ノックアウト(KO)マウスに PBS または PBS に溶解した 50 μ g と 1mg のウマ Cyt *c* を 7 日間連続して腹腔内に投与した後、骨髓細胞を回収した。回収した骨髓細胞は PE 標識抗マウス Gr-1 抗体を用いて標識後、フローサイトメトリー(BD 社製 FACS AriaIII)で解析し、骨髓細胞中の好中球の割合を調べた。また、それぞれ投与したマウスから 7 日後の血液を回収し、抗 Cyt *c* モノクローナル抗体(7H8.2C12, BioLegend 社)および抗マウス LRG 抗体(LRG-322, IBL 社)を用いたウェスタンブロット法により、血液に含まれる Cyt *c* と LRG を解析した。なお、血清中の G-CSF 量は Quantikine ELISA mouse G-CSF Kit (R&D Systems 社)を用いて定量した。

(2) LRG と Cyt *c* の相互作用の解明

大腸菌でヒト Cyt *c* を発現するプラスミド pBTR1 を用いて、Cyt *c* の Lys 残基をそれぞれ Ala に置換した pBTR1 変異体を多数作製した。これらの pBTR1 変異体を用いて大腸菌を形質転換して変異型 Cyt *c* を発現させた後、菌体を 0.5%硫酸アルミニウム存在下で超音波破碎した。変異型 Cyt *c* を含む上清は、CM-Sephadex カラムを用いたイオン交換カラムクロマトグラフィーおよび Resource RPC カラムを用いた逆相 HPLC によって精製した。次に、ヒト血清から Cyt *c* アフィニティーカラムを用いて精製した LRG を CM5 センサーチップに固定化し、BiacoreT100 装置を用いて、これらの変異型 Cyt *c* (0.6~10nM)をアナライトとして添加し、生じる表面プラズモン共鳴の変化を測定し、1:1 結合モデルで解析した。

4. 研究成果

(1) LRG ノックアウトマウスの表現型の解析

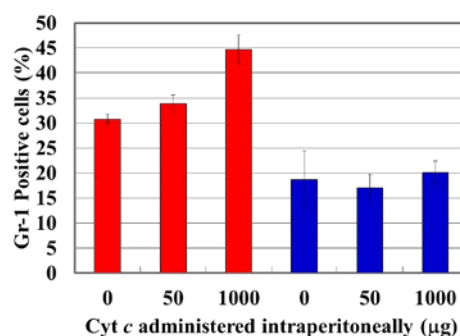


図1. Cyt *c* 腹腔内投与による骨髓細胞中の Gr-1 陽性細胞の割合の変化

図1に示すように、野生型マウスでは Cyt *c* の投与量に依存して好中球の割合が増加したが、LRG ノックアウトマウスでは好中球の増加は見られなかった。このとき、血清中の G-CSF を ELISA で定量することにより、野生型マウスにおける血中 G-CSF 量の増加が、好中球の割合を増加させると考えられた (図2)。実際に経時変化を調べると、投与 1 日後に血中 G-CSF 濃度が上昇し、2 日後に好中球の割合が増加することがわかった。このことは Cyt *c* の臨床応用で見られた白血球増加作用に LRG が関与していることを示唆する。

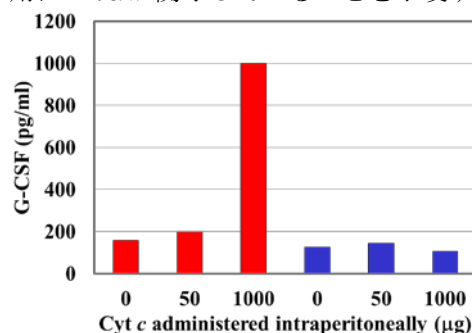


図2. Cyt *c* 腹腔内投与による血中 G-CSF 量の変化

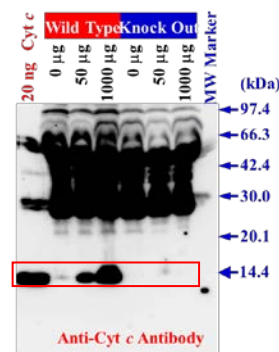


図3. Cyt *c* 腹腔内投与マウス血中 Cyt *c* のウェスタンブロットによる解析

図3に示すように、投与した Cyt *c* は野生型マウス血清でのみ検出され、LRG ノックアウトマウス血清では全く検出されなかった。Cyt *c* を静脈注射後、血中と尿に含まれる Cyt *c* の経時変化を調べたところ、投与した

Cyt *c* は直ちに尿中に排泄され、LRG ノックアウトマウスでは 8 時間後には血中 Cyt *c* が検出できなくなった。一方、野生型マウスでは投与量に応じて Cyt *c* 血中濃度が増加しており、Cyt *c* 投与していない Control でも Cyt *c* が検出されたことを考えると、Cyt *c* は LRG と複合体を形成することによって尿への排出が抑えられていると考えられる。

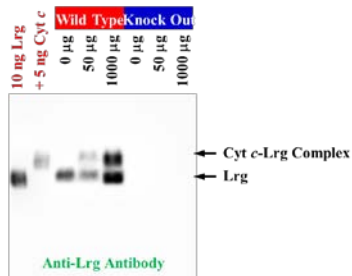


図4. Cyt *c* 腹腔内投与マウス血中 LRG の Cyt *c* との複合体形成

実際に Cyt *c* と LRG が複合体を形成していることは Native 電気泳動によって調べた。図 4 は血清を Native 電気泳動後、LRG 抗体を用いてウェスタンブロットで解析した結果である。LRG に Cyt *c* を加えると複合体を形成し、この複合体は Cyt *c* の正荷電により、Native 電気泳動でのバンドが負電極側にシフトする。これによって LRG と Cyt *c*-LRG 複合体を別々に定量できる。その結果、投与 Cyt *c* 濃度が増加するごとに複合体の量も増加することが確認できた。また、尾静脈投与した Cyt *c* は直ちに血中 LRG と複合体を形成することがわかった。

また、WT マウスにおいて LRG 量が Cyt *c* 投与量に応じて増えており、これは血中 Cyt *c* 量に依存して肝臓での LRG の発現が増加しているからであると考えられる。

以上の結果から、図 5 に示すように死細胞から放出された Cyt *c* は血中で LRG と複合体を形成して Danger signal として機能し、マクロファージなどの免疫系細胞に作用して、G-CSF の発現を促進し、骨髄中の好中球の割合を増加させたのではないかと考えている。LRG ノックアウトマウスでは塩基性で分子量 12kDa の Cyt *c* は糸球体でただちにろ過されて尿として排泄されるため、Danger signal としては機能しないと考えられる。

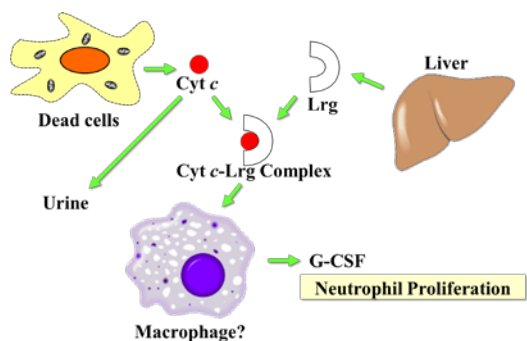


図5. 新規シグナル分子としての Cyt *c*

(2) LRG と Cyt *c* の相互作用の解明

LRG と Cyt *c* は非常に強く結合し(解離定数 K_D は 2~3pM)、K5A, K7A, K22A, K25A, K27A, K39A, K53A, K55A, K86A, K87A, K88A, K99A, K100A の各変異型 Cyt *c* は野生型 Cyt *c* とほぼ同程度の結合を示したが、K8A, K13A, K72A, K73A, K79A では解離定数が大きくなり、結合が低下することがわかった。特に K8A の解離定数は 265pM、K72A は 734pM となり、これら 2 つの Lys 残基が Ala に置換すると、結合力が 100 倍以上弱くなることがわかった (図 6)。

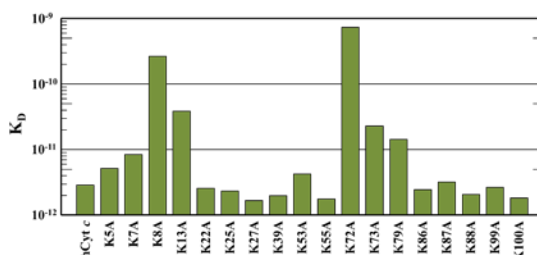


図6. ヒト LRG と変異型 Cyt *c* の解離定数 (K_D)

以上の結果から、Cyt *c* の 8 位、13 位、72 位、73 位、79 位の正電荷が LRG との相互作用に重要であり、これらの残基は Cyt *c* の露出したヘム *c* を取り囲む領域に位置しているので、この領域に LRG が結合すると考えられる (図 7)。

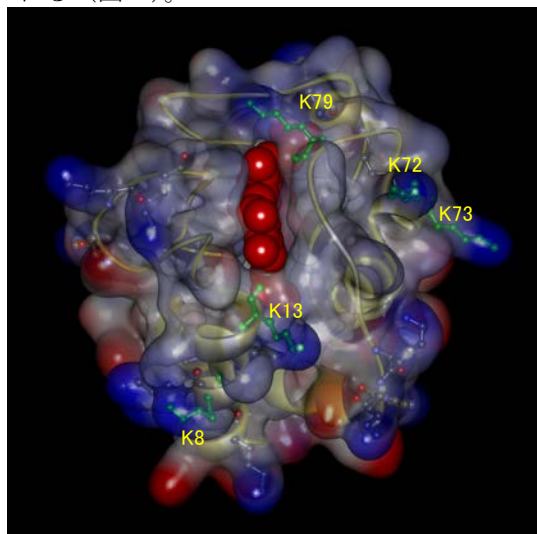


図7. Cyt *c* 分子上での予想される LRG の結合部位

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

- ① 井上晴嗣、村上弦大、伊狩光、土屋孝弘、藤井忍、福永理己郎、池田潔、新規シグナル分子としての細胞外シトクロム *c* の役割、日本薬学会第 133 年会、2013 年 3 月 28 日、横浜
- ② 西村恵子、宮地由香里、村上弦大、伊狩光、土屋孝弘、藤井忍、福永理己郎、池田

潔、井上晴嗣、新規シグナル分子としての細胞外シトクロム *c* の機能、第 86 回日本生化学会大会、2013 年 9 月 12 日、横浜

- ③ 矢野可央里、松村有紗、藤井忍、福永理己郎、池田潔、井上晴嗣、ロイシンリッチ α_2 -グリコプロテインとシトクロム *c* の相互作用、第 86 回日本生化学会大会、2013 年 9 月 12 日、横浜

- ④ 井上晴嗣、松村有紗、矢野可央里、藤井忍、福永理己郎、池田潔、ロイシンリッチ α_2 -グリコプロテインとシトクロム *c* の相互作用、日本薬学会第 134 年会、2014 年 3 月 28 日、熊本

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.oups.ac.jp/kenkyu/kenkyuushitu/seika.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

井上 晴嗣 (INOUE, Seiji)
大阪薬科大学・薬学部・准教授
研究者番号：70183184