

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570137

研究課題名(和文) C マンノシル化糖修飾による新規細胞増殖制御の分子機構研究

研究課題名(英文) C-Mannosyl peptides regulate fibroblast cell proliferation

研究代表者

井原 義人 (IHARA, YOSHITO)

和歌山県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：70263241

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：C-マンノシル(C-Man)化TSRペプチドによるTGF- $\beta$ 誘導性細胞増殖に対する抑制作用の制御機構について解析を行った。C-Man化ペプチドは細胞内でHsc70やミオシン-1cと特異的に結合した。C-Man化ペプチドは、TGF- $\beta$ 存在下で標的分子の一つであるHsc70とSmadの結合を増強することにより、TGF- $\beta$ /Smad経路の抑制を通じて細胞増殖を制御するという新たな分子機構が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In cultured fibroblast NRK49F cells, TGF- $\beta$ -induced cell proliferation was suppressed by C-mannosyl (C-Man) peptides through the downregulation of TGF- $\beta$ /Smad signaling pathway. In the cells, target proteins bound to the C-Man peptides were purified by using synthesized C-Man-WSPWC-biotin and avidin-conjugated beads, then characterized by MS finger printing analysis. The target proteins were identified as Hsc70 and myosin 1c. We found that Hsc70 is involved in the regulation of TGF- $\beta$ -induced Smad signaling. The suppressive effect of the C-Man peptides on the TGF- $\beta$ -induced Smad signaling is regulated through the enhanced interaction between Smads and Hsc70, suggesting a novel inhibitory effect of C-Man peptides on TGF- $\beta$ -induced cellular proliferation signaling in the cells.

研究分野：生物学

キーワード：糖質 糖タンパク質 マンノース 細胞増殖 TGF-

### 1. 研究開始当初の背景

タンパク質は生体内で様々な翻訳後修飾を受けるが、その半数以上を占めると考えられる糖質あるいは糖鎖による修飾は、タンパク質機能の調節において重要な役割を担っている。タンパク質の糖修飾は、N-グリカンやO-グリカン、O-GlcNAc修飾のように生合成機構や細胞機能の解析のよく進んでいるものもあるが、未だ解明されていないものも多い。

C-マンノシル(C-Man)化は、1994年に発見された比較的新しいタイプの糖修飾である。C-Man化は、マンノースがトリプトファン(W)のインドール環のC2炭素と直接C-C結合するという点がユニークである。C-Man化されるトリプトファンは多くの場合、タンパク質構造中のWXXWというモチーフの第一番目のWである。WXXWモチーフは、Thrombospondin type 1 repeat (TSR)と呼ばれる機能ペプチドモジュールの一部であることが知られ、その機能としてヘパリンやヘパラン硫酸プロテオグリカン、コラーゲンなどと結合して細胞の接着や細胞間シグナルの制御に関与することが注目されている。

C-Man化の標的タンパク質としては、リボヌクレアーゼ、IL-12、エリスロポエチン受容体などのサイトカイン受容体や、トロンボスポンジンや補体などのTSRファミリータンパク質が知られている。しかしながら、これらの標的タンパク質におけるC-Man化の役割や機能など、その生物学的意義についてはほとんど解析されていなかった。

申請者は、これまでの研究でC-Man-WやC-Man-W含有ペプチドの精密化学合成物を用いて抗C-Man-W特異抗体の作製に成功し、糖尿病II型発症モデルとして知られるZucker fatty ラットの動脈血管組織において、C-Man化標的タンパク質のトロンボスポンジンのレベルが増加することを報告した。また、化学合成したC-Man化TSR由来ペプチドを用いて、C-Man-WSPWがマクロファージ細胞株において、リポポリサッカライドのシグナル伝達を増強することを見出し、自然免疫機構への関与についても明らかにした。一連の研究から、C-Man化が様々な細胞機能の制御に関わることが予想され、合成C-Man化ペプチドの生物機能探索のためのツールとしての可能性が示唆された。

### 2. 研究の目的

我々が発見したC-Man化TSRペプチドによるトランスフォーミング増殖因子- (TGF- )誘導性細胞増殖に対する抑制制御の知見をもとに、C-Man化ペプチドあるいはTSRドメインのTGF- $\beta$ シグナルに対する新たな作用機構を明らかにし、TGF- が関与する線維芽細胞増殖機構や組織線維化に対するC-Man化ペプチドのもつ生物学的意義の解明を目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) C-Man化TSRペプチドおよびドメインの調製

C-Man化TSRペプチド(C-Man-WSPWなど)やその誘導体は、我々の既報に従い化学合成により調製した。また、ヒト-トロンボスポンジン-1 cDNAを鋳型にMyc+His-Tag標識融合タンパク質としてTSRドメインをほ乳類細胞で発現させる遺伝子発現ベクターを設計構築した。HEK細胞に発現ベクター導入し、分泌型タンパク質として産生させ、目的タンパク質を細胞培地からイオン交換やアフィニティ・クロマトグラフィーにより調製した。

#### (2) TGF- 誘導性細胞増殖の解析

ラット線維芽細胞NRK49Fを用いて、C-Man化TSRペプチドやC-Man化TSRドメインが、TGF- 誘導性の細胞増殖に与える影響について、細胞生物学的あるいは生化学的手法で解析した。NRK49F細胞を、通常培養条件(培地[DMEM+10%FCS]、37°C、5%CO<sub>2</sub>)で一晩培養の後、培地の組成をDMEM+1%FCSに変更し、TGF- (80 pM)を添加して培養を継続した。この培養条件に種々の濃度(0-10  $\mu$ M)のC-Man化ペプチド(C-Man-WSPW、C-Man-WSP、C-Man-WSなど)やC-Man-W、コントロールペプチド、あるいはC-Man-TSRドメインを加えて細胞増殖に対する影響を解析した。細胞増殖はクリスタルバイオレットを用いた比色定量法で評価した。

#### (3) TGF- シグナル伝達の解析

C-Man化TSRペプチドが、TGF- 誘導性のシグナル伝達に与える影響については、Smad経路を中心にNRK49F細胞を用いて解析した。Smadの活性化状態については、Smadのリン酸化を指標に、特異抗体を用いたイムノプロット法で解析を行い、リン酸化Smadの核移行については、免疫蛍光染色法を用いた形態学的解析法により評価した。また、Smad結合分子の解析などには、種々の特異抗体を用いた免疫沈降やイムノプロット法などによる生化学的手法を用いた。

#### (4) C-Man化TSRペプチド結合分子の解析

C-Man化TSRペプチド特異的に結合する分子については、細胞抽出サンプル中のタンパク質の中で、C-Man-WSPWC-biotinあるいはコントロールのWSPWC-biotinに結合したものを化学架橋剤(DSP)で処理し、アビジンビーズで単離の後、電気泳動で展開後に銀染色で解析した。C-Man化ペプチドに特異的に結合したと考えられる銀染色陽性バンドについては、トリプシンによるゲル内消化物について、マスフィンガープリンティング解析とデータベースをもとにしたMASCOT解析により、結合分子の同定を試みた。なお、結合候補タンパク質については、各々の特異抗体を用いたイムノプロット解析で結合分子であることを確認した。

(5) マウス肺線維症モデルの解析  
動物個体レベルでの C-Man 化 TSR ペプチドによる TGF- $\beta$  シグナルの抑制制御について、マウス肺線維症モデルを用いた研究を行った。C57BL/6J 雄マウス (9 週齢) に、0.075U のプレオマイシンを気管内投与した。投与 3 日後に 3 群に分け、WSPW あるいは C-Man-WSPW ペプチド (10  $\mu$ mol/50  $\mu$ L)、もしくは溶媒 (0.4% ジメチルスルホキシド (DMSO)/生理食塩水 50  $\mu$ L) を再度気管内投与した。その後、プレオマイシン投与から 2 週間の時点でマウスを頸椎脱臼により屠殺、肺サンプルの採取を行った。得られたサンプルを用いて、TGF- $\beta$  シグナルに関連する分子の発現やリン酸化レベルについて生化学的解析を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) C-Man 化 TSR ペプチドの TGF- $\beta$ 誘導性細胞増殖への影響

C-Man 化 TSR ペプチド (C-Man-WSPW) は、NRK49F 細胞における TGF- $\beta$  誘導性の細胞増殖を抑制した (図 1)。C-Man 化ペプチドのアミノ酸部分を短縮させると、この細胞増殖抑制活性が認められなかったことから、C-Man 化とともに WXXW のテトラペプチド部分が機能的に必要であることもわかった。

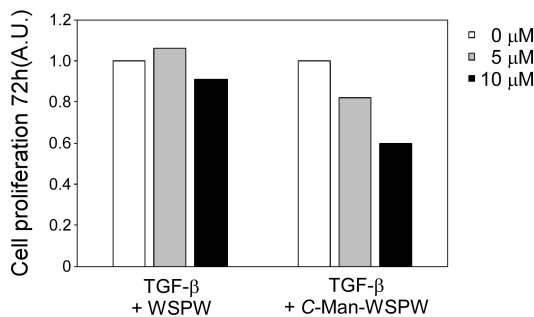


図 1 TGF- $\beta$  依存性の細胞増殖に対する C-Man-WSPW ペプチドの影響

##### (2) C-Man 化 TSR ペプチドの TGF- $\beta$ に対する影響

C-Man 化ペプチドの TGF- $\beta$  誘導性のシグナル伝達機構への影響について解析を行った。C-Man 化ペプチドは TGF- $\beta$  による Smad2/3 のリン酸化を抑制することが明らかとなった (図 2)。また、C-Man 化ペプチドは、TGF- $\beta$  により発現誘導されるコラーゲン I などの標的タンパク質の産生を抑えることも明らかとなった。このことから、C-Man 化ペプチドは TGF- $\beta$  /Smad 経路を抑制することが明らかとなった。

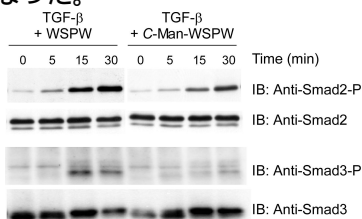


図 2 C-Man-WSPW ペプチドは Smad2/3 を介して TGF- $\beta$  シグナルを抑制する

##### (3) C-Man 化 TSR ペプチドの細胞に対する作用機構の解析

C-Man 化ペプチドは、 $[^{125}I]$ で放射線標識した TGF- $\beta$  の細胞表面受容体に対する結合を直接的には阻害しなかった。次に、C-Man-WSPWC-biotin と WSPWC-biotin を用いて、C-Man 化ペプチドの細胞内への取り込みについて蛍光細胞染色法により解析した。その結果、TGF- $\beta$  処理した細胞において、C-Man-WSPWC-biotin は WSPWC-biotin より多く細胞内に取り込まれることがわかった。次に、C-Man 化ペプチド特異的に結合する細胞内分子の探索を行った。

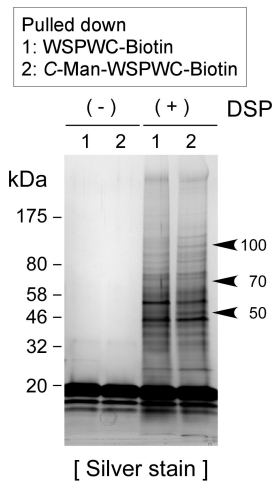


図 3 C-Man-WSPW ペプチド特異的な結合標的分子の探索・同定

C-Man-WSPWC-biotin と WSPWC-biotin をプローブとして、両者に結合する細胞内タンパク質を化学架橋剤 (DSP) 存在下で単離し、電気泳動法にて展開後、銀染色を行い、結合分子の比較解析を行った。その結果、C-Man 化ペプチドに多く結合した複数の分子量サイズのタンパク質を検出した (図 3)。

それらについて、マスフィンガープリンティング解析を行ったところ、Hsc70、ミオシン-1c が同定され、各々が特異抗体により確認された。Hsc70-siRNA を用いた実験から、Hsc70 は TGF- $\beta$  による Smad2 のリン酸化と核内移行の制御に促進的に作用することが示唆された。また、C-Man 化ペプチドは TGF- $\beta$  刺激のもとで、Hsc70/Smad2,3 の複合体形成の増強を介してシグナル抑制を制御することが示唆された (図 4)。

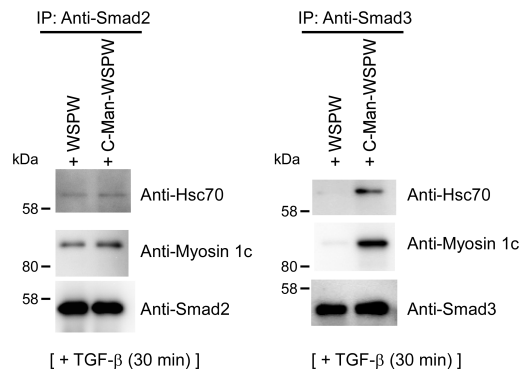


図 4 C-Man-WSPW ペプチドは TGF- $\beta$  処理による Hsc70-Smad2/3 相互作用を促進する

##### (4) マウス肺線維症モデルの解析

プレオマイシンによるマウス肺線維症モデルを作製した。ペプチド投与後の肺サンプルについて、抗リン酸化 Smad3、抗 Snail、コラーゲン I、フィブロネクチンなどの抗体を用いてイムノプロット解析を行ったが、

C-Man-WSPW と WSPW ペプチドの間で、有意な差異は認められなかった。ただし、本実験におけるサンプル収集時点で、予想されたプレオマイシンによる肺組織の傷害が認められなかったことから、実験手技の問題が示唆された。一連の研究により、C-Man 化ペプチドによる TGF- $\beta$  誘導性細胞増殖に対する抑制機構を線維芽細胞のレベルで明らかにしたが、今後は動物個体レベルでの TGF- $\beta$  シグナル制御について、さらに詳細な検証が必要と考えられた。

#### (5) まとめ

C-Man 化 TSR ペプチドは TGF- $\beta$ /Smad シグナル経路を抑制することで、線維芽細胞における TGF- $\beta$  誘導性細胞増殖の抑制を行うことがわかった。また、C-Man 化ペプチドは、TGF- $\beta$  の受容体への結合には影響せず、細胞内に取り込まれて働くことが明らかとなった。細胞内における C-Man 化ペプチドの結合標的分子を探索したところ、ミオシン-1c と Hsc70 が同定された。Hsc70-siRNA を用いた Hsc70 発現抑制により、細胞内の TGF- $\beta$  シグナルが阻害されることから、Hsc70 は TGF- $\beta$  シグナルの制御に重要な役割を果たすことがわかった。また、C-Man 化ペプチドは TGF- $\beta$  刺激のもとで、Hsc70/ミオシン-1c/Smad2,3 の複合体形成の増強を介してシグナル抑制を制御することが考えられた。C-Man 化ペプチドの TGF- $\beta$  シグナルに対する作用について、マウス肺線維症モデルを用いて解析を試みたが、プレオマイシン投与量や解析時期の選定に関する問題などから、C-Man 化ペプチドによる個体レベルでの TGF- $\beta$  依存性細胞機能への影響については明確な結論は得られなかった。本研究により、C-Man 化ペプチドのもつ TGF- $\beta$  シグナル抑制機構が示されたことで、今後の研究がタンパク質 C-Man 化によるがんの転移・浸潤や臓器・組織線維化の未知なる制御機構の解明にも繋がるものと期待される。

#### 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 3 件)

Prakoura N, Politis PK, Ihara Y, Michalak M, Charonis AS.: Epithelial calreticulin up-regulation promotes profibrotic responses and tubulointerstitial fibrosis development. *Am J Pathol* 183, 1474-1487, 2013. 査読有  
Inadomi C, Murata H, Ihara Y, Goto S, Urata Y, Yodoi J, Kondo T, and Sumikawa K.: Overexpression of glutaredoxin protects cardiomyocytes against nitric oxide-induced apoptosis with suppressing the S-nitrosylation of

proteins and nuclear translocation of GAPDH. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 425, 656-661, 2012. 査読有  
Takahashi M, Miyata S, Fujii J, Inai Y, Ueyama S, Araki M, Soga T, Fujinawa R, Nishitani C, Ariki S, Shimizu T, Abe T, Ihara Y, Nishikimi M, Kozutsumi Y, Taniguchi N, and Kuroki Y.: In vivo role of aldehyde reductase. *Biochim. Biophys. Acta - General Subjects*, 1820, 1787-1796, 2012. 査読有

#### [学会発表](計 12 件)

Ihara Y, Ikezaki M, Inai Y, Matsui I-L, Manabe S, and Ito Y.: C-Mannosylated TSR-derived peptides modulate TGF-signaling in cultured lung epithelial-derived cells. Society for Glycobiology (SFG) & Japanese Society of Carbohydrate Research (JSCR) 2014 Joint Annual Meeting, November 16-19, 2014, Honolulu, Hawaii, USA

池崎みどり, 松井仁淑, 室井栄治, 渋川幸直, 和田芳直, 眞鍋史乃, 伊藤幸成, 井原義人: 「C-Man-TSR 由来ペプチドが TGF- $\beta$ /Smad3 シグナルに与える影響」第 33 回日本糖質学会、2014 年 8 月 10-12 日、名古屋大学豊田講堂(愛知県名古屋市)

池崎みどり, 松井仁淑, 室井栄治, 渋川幸直, 和田芳直, 眞鍋史乃, 伊藤幸成, 井原義人: 「TGF- $\beta$ /Smad3 シグナルにおける C-Man-TSR 由来ペプチド結合標的分子の影響」第 87 回日本生化学会大会、2014 年 10 月 15-18 日、国立京都国際会館(京都府京都市)

井原義人, 池崎みどり, 井内陽子, 松井仁淑, 眞鍋史乃, 伊藤幸成: 「EMT 誘導に関わる TGF- $\beta$  シグナルの C-マンノシル化による制御機構」第 45 回日本結合組織学会/第 60 回マトリックス研究会合同学術大会、2013 年 6 月 28 -29 日、和歌山県立医科大学(和歌山県和歌山市)

井原義人: 「タンパク質の C-マンノシル化糖修飾と細胞機能制御」第 23 回日本メイラード学会(特別講演)、2013 年 11 月 29 日、グランフロント大阪北館(大阪府大阪市)

池崎みどり, 井内陽子, 松井仁淑, 室井栄治, 渋川幸直, 和田芳直, 眞鍋史乃, 伊藤幸成, 井原義人: 「C-Man-TSR 由来ペプチドによる TGF- $\beta$  シグナル制御分子の探索」第 60 回日本生化学会近畿支部例会、2013 年 5 月 18 日、大阪大学吹田キャンパス(大阪府吹田市)

池崎みどり, 井内陽子, 松井仁淑, 室井栄治, 眞鍋史乃, 伊藤幸成, 井原義人: 「線維芽細胞と上皮細胞における C-Man-TSR ペプチドの TGF- $\beta$  シグナル

制御」第32回日本糖質学会、2013年8月5-7日、大阪国際交流センター（大阪府大阪市）

池崎みどり、井内陽子、松井仁淑、眞鍋史乃、伊藤幸成、井原義人：「上皮系細胞形態に対するC-マンノシル化TSRペプチドの影響」第86回日本生化学会大会、2013年9月11-13日、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

Ihara Y.: Modulation of TGF-signaling through thrombospondin type 1 repeat (TSR) derived-peptides with C-mannose. Shandong-Wakayama Medical and Nursing Symposium 2012（招待講演）, November 6, 2012, Wakayama, Japan

Ihara Y., Ikezaki M., Inai Y., Matsui I-L., Muroi E., Shibukawa Y., Wada Y., Manabe S., and Ito Y.: The search for proteins bound to C-mannosylated TSR-derived peptides involved in the regulation of TGF- signaling in cultured fibroblasts. The 2012 Joint Meeting of the Society for Glycobiology and American Society for Matrix Biology, November 11-13, 2012, San Diego, USA

井原義人：「C-マンノシル化糖修飾による細胞増殖の調節」第10回糖鎖科学コンソーシアムシンポジウム（招待講演）2012年11月29-30日、東京コンファレンスセンター（東京都港区）

池崎みどり、井内陽子、松井仁淑、室井栄治、渋川幸直、和田芳直、眞鍋史乃、伊藤幸成、井原義人：「TGF- シグナル制御に関わるC-Man-TSR由来ペプチドの標的分子の探索」第31回日本糖質学会年会、2012年9月17-20日、鹿児島市民文化ホール（鹿児島県鹿児島市）

〔図書〕(計1件)

Ihara Y., Inai Y., Ikezaki M., Matsui I-L., Manabe S., Ito Y.: C-Mannosylation: Modification on Tryptophan in Cellular Proteins, Glycoscience: Biology and Medicine, 1091-1099, 2014.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

井原 義人 (IHARA, Yoshito)  
和歌山県立医科大学・医学部・教授  
研究者番号：70263241

### (2) 研究分担者

井内 陽子 (INAI, Yoko)  
和歌山県立医科大学・医学部・助教  
研究者番号：20316087

池崎 みどり (IKEZAKI, Midori)

和歌山県立医科大学・医学部・助教  
研究者番号：40549747

### (3) 連携研究者

眞鍋 史乃 (MANABE, Shino)  
独立行政法人理化学研究所・基幹研究所・専任研究員  
研究者番号：60300901