

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25650036

研究課題名(和文) プロサイモシンの核シャトルによるレシピエント細胞リプログラミング機構解明

研究課題名(英文) Reprogramming of a neuroprotective phenotype in recipient cells via a shuttle action of prothymosin-alpha, a multifunctional damage-associated molecular patterns between nuclear and extracellular.

研究代表者

松永 隼人 (MATSUNAGA, Hayato)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(薬学系)・客員研究員

研究者番号：20437833

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：プロサイモシン (ProT) は多機能性の核タンパク質であり、神経細胞からストレス誘発性に細胞外遊離する。細胞外ProT は、自然免疫受容体であるTLR4/MD2と新規に同定した細胞膜タンパク質を介する受容体機構を有すると共に、ある種の細胞においては再度核内に移行する。この核シャトル機構を有するレシピエント細胞において、ProT 処置により神経保護性のサイトカインの発現上昇が認められたことから、細胞コミュニティの秩序維持に寄与することが推測される。脳梗塞などのストレス負荷時におけるProT の脳保護機構には、受容体シグナルと核シャトルによる直接的エピゲノム性遺伝子発現制御が重要だと考えられる。

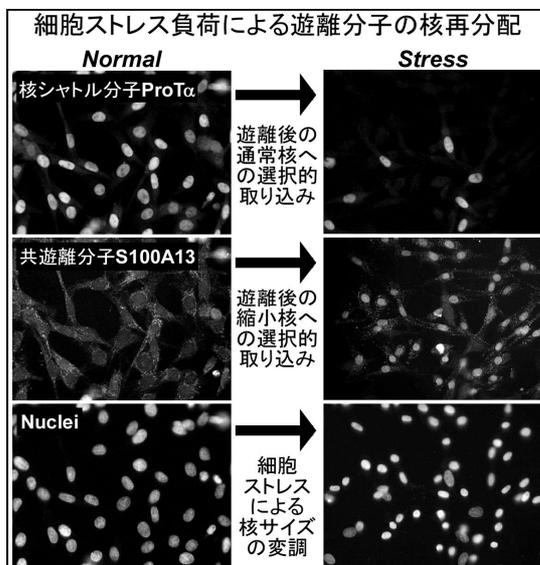
研究成果の概要(英文)：Prothymosin-alpha (PTMA), a nuclear protein has a multitude of cell-protective functions against cell stress in nuclear, intracellular, and extracellular. Stress-induced extracellular release of ProT is observed in neurons among components of brain cells. Extracellular PTMA is a ligand for the two types of receptors: a TLR4/MD2 involved in innate immunity response and novel identified cell membrane proteins, whereas extracellularly released PTMA is reimported to the nucleus in a certain type of cells. Neuroprotective cytokines were upregulated by the exogenous PTMA treatment in recipient cells bearing nuclear shuttle action of PTMA, suggesting that recipient cells would be involved in the maintenance for the cell communities. Neuroprotective mechanisms of PTMA against brain stresses, such as an ischemic stroke have been proposed to require for the cell membrane receptor signaling pathway and the direct epigenomic regulation of gene expression via a nuclear shuttling of PTMA.

研究分野：機能生物化学

キーワード：DAMPs 生理活性物質 受容体 核シャトル 脳・神経

1. 研究開始当初の背景

DAMPs (Damage-associated molecular patterns)は、自然炎症時に細胞死を介して受動的に細胞外遊離され、病原体センサーに認識される秩序制御分子群である。また、病態時における慢性炎症への寄与が明らかとなっており、その制御基盤の解明は重要な課題である。申請者は、脳神経系における自己保護性 DAMPs の研究から、ネクローシス制御タンパク質プロサイモシン (ProT) を発見し、著明な時空間的虚血脳保護機構を見出すと共に、ProT が脳コミュニティを維持する責任分子であるという視点を獲得に至った。さらには、脳神経保護性 DAMPs である ProT のストレス誘発性に駆動する非小胞性遊離機構の全容をほぼ明らかとしている。ProT は、種々の生物において高度に保存された核タンパク質であり、核、細胞質、細胞外と存在場において多様な活性を有している。重要な点は、細胞外 ProT が細胞核内に再移行するという知見を得たことにある。



本結果を受け、「宿主神経細胞由来遊離 ProT は、核内にシャトルすることで周辺レシピエント細胞の表現型をシンクロナイズさせる」との着想を得て、本研究構想に至った。

2. 研究の目的

DAMPs は、ストレスに応じて細胞外遊離し、受容体に作用することで細胞の運命決定を担う分子である。その多くは細胞毒性に寄与する炎症性分子として機能するが、申請者はメンブレントラフィックに依存せず細胞外遊離する ProT を神経保護性新規 DAMPs として同定し、その細胞外遊離と受容体機構を明らかとしてきた。ProT は核移行シグナルを有する核タンパク質であり、ストレスにより宿主細胞である神経細胞から迅速に遊離する。驚くべき事に、遊離 ProT がアストロサイトの核に取り込まれる核シャトル分子であることを見出した。本研究では、「核シ

ャトルした ProT は、レシピエント細胞の表現型をシンクロナイズさせる力の因子」とであると仮説を立て、レシピエント細胞における細胞膜受容体を介した制御機構と細胞核シャトル機構による遺伝子発現機構の基盤解明を行う。

3. 研究の方法

(1) 核シャトル可能な標識 ProT の生産
 個体レベルでも安定して核シャトルが観察できる標識 ProT の生産を行った。大腸菌発現 GST-TEV プロテアーゼ認識配列融合 ProT を作製し、TEV プロテアーゼにより GST-tag の除去を行った後にクロマトグラフを行い高純度の ProT を多量に精製する系を構築した。本精製 ProT リコンビナントは、N 末端のメチオニンが存在せず、2 番目のアミノ酸であるセリンがアセチル化されており、生体内に存在する ProT と同等の配列であることに特徴がある。本 ProT の Biotin 標識体を作製し、核シャトルレシピエント細胞の特定と ProT の新規細胞膜受容体同定に使用した。

(2) ProT 核シャトルレシピエント細胞の特定と受容体シグナリング解析

脳神経系細胞の初代培養細胞、細胞株に対する Biotin 標識 ProT の細胞核内取り込みイメージング解析から、アストロサイトがレシピエント細胞として存在することを明らかとした。興味深いことに、アストロサイトへの核シャトルは、ProT の遊離が誘発される血清除去ストレス負荷時に認められ、血清存在時にはほとんど認められなかった。神経細胞、ミクログリアにおいては、細胞内に取り込まれるが、核内にまで移行する事は無く、受容体シグナリングを介して作用することが示唆され、ミクログリアにおける標的-シグナルが自然免疫受容体-インターフェロン系であることを qPCR 解析から明らかとした。ProT は、脳虚血性細胞死保護のみならず、網膜虚血性細胞死に対しても著明な保護効果を有するが、網膜神経細胞株である N18-RE-105 細胞においては、血清存在の有無にかかわらず 20 分以内の迅速な核シャトルが観察された。N18-RE-105 細胞に対しては、ProT が受容体機構を介すると思われる神経細胞死保護活性を有することから、受容体機構と核シャトル機構の 2 つの系を持つ細胞であることが予想された。

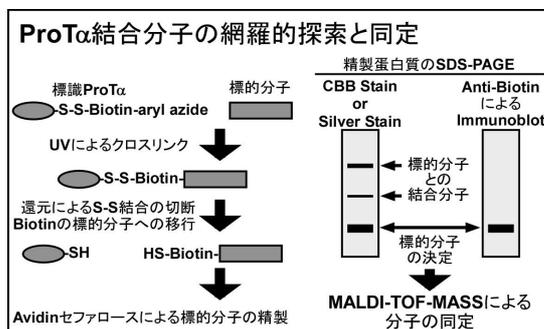
(3) 細胞膜候補受容体 TLR4/MD2 との結合

ミクログリア細胞に対して ProT は、受容体シグナリングを介して作用し、また、そのシグナルが自然免疫受容体 (TLR4/MD2)-インターフェロン系であることを明らかとした。本結果を受けて、リガンド ProT と受容体 TLR4/MD2 との相互作用をバイオセンサーである QCM を用いて動力学的に計測した。さらに、ProT の細胞外遊離担体である S100A13

の TLR4/MD2 への結合についても検討を行うと共に、ProT -TLR4/MD2 相互作用への増強効果についても検討を行った。また、*in silico* 解析にて ProT と TLR4/MD2 との相互作用様式の予測を行い、ProT の C 末端領域が受容体への結合に必須であることが提示され、本予測は QCM を用いた wet 実験の結果と一致した (発表雑誌論文)。

(4) ProT の新規細胞膜受容体同定

これまでに ProT の神経細胞死保護効果は、G_i 共役受容体シグナルを介することを明らかとしている。これを受けて、G_i を含む細胞膜の構成体である Lipid Rafts を N18-RE-105 細胞株から OptiPrep™ を用いた密度勾配遠心法にて精製し、その画分から Biotin 標識 ProT と結合する分子の同定に成功した。



さらに、組換えタンパク質受容体との相互作用解析、受容体阻害実験による ProT の神経保護効果消失効果を確認することにより、G_i 共役受容体シグナルを介する神経細胞死保護機構の鍵分子を明らかにした。

(5) レシピエント細胞における細胞表現型解析

細胞外 ProT を即時に核内に取り込む N18-RE-105 細胞株を用いて DNA マイクロアレイ解析を行った。興味深い事にレシピエント細胞群はインターロイキン、インターフェロン、グロースファクター系シグナルが賦活化されており、これまでに *in vivo* における神経保護能に関与すると推測してきたシグナル群と高い相関を得た。

4. 研究成果

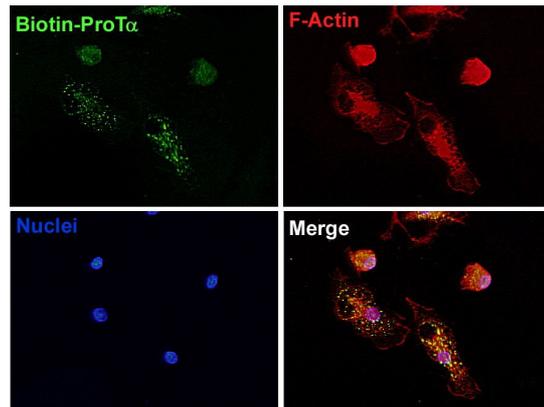
(1) ProT の核シャトルイメージング

高純度 ProT リコンビナント精製の系を確立し、Biotin 標識 ProT を作製し、培養細胞における外来性 ProT のイメージングに成功した。初代培養における神経細胞、ミクログリアにおいては、インターナリゼーションと核周辺への局在が認められたが、核へのシャトルまでは観察されなかった。ProT の遊離は細胞ストレスによって誘発され、通常時の ProT は核内に保持されている。血清除去ストレス負荷時のアストロサイトにおいて核シャトルが観察された。これまで、*in*

in vivo においてアストロサイトは、ProT の遊離機構を欠失していることを明らかとしたが、細胞外 ProT シグナル受容細胞としての立ち位置は不明であった。本結果は、アストロサイトが ProT 核シャトルを介したレシピエント細胞として脳虚血ストレス時細胞コミュニティを制御する可能性を示唆するものである。

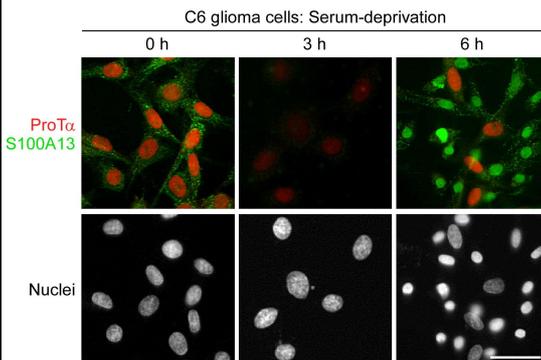
Microglia における

外来性 ProT α の細胞内取り込み



すなわち、神経細胞、ミクログリアは主として受容体機構を介したシグナリング、アストロサイトは核シャトルを介したシグナリングで脳秩序を維持するというものである。

ProT 遊離機構を有するアストロサイト培養株化 C6 グリオーマ細胞において、血清除去ストレス負荷における ProT の局在変化の経時変化を追うと、ストレスによって誘発された ProT と細胞外遊離担体 S100A13 の遊離と核内への再分配が観察される。

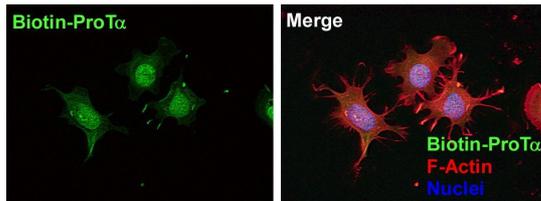


ProT が核シャトルした細胞においては、細胞は健全な核の形態を示すのに対し、S100A13 が核に局在する細胞群では核の密度の上昇が観察され細胞死を引き起こしていることが推測される。ProT が核シャトルされることが細胞死を防ぐのか、S100A13 が核移行することが細胞死を誘発するののかの因果関係の解明は今後の課題である。

外来性 ProT の迅速な核シャトルが認められる細胞の同定に成功した。網膜神経細胞由来の N18-RE-105 細胞株であり、本細胞は自然免疫受容体以外の ProT 受容体を発現している可能性が示唆されており、さらには

添加 20 分で細胞外から核内に ProT がシャトルされることから、2つの ProT 作用機構を有する細胞であることが推測される。以降の、ProT 新規細胞膜受容体同定と DNA マイクロアレイによる外来性 ProT 誘発性の遺伝子発現解析には、本細胞を使用した。

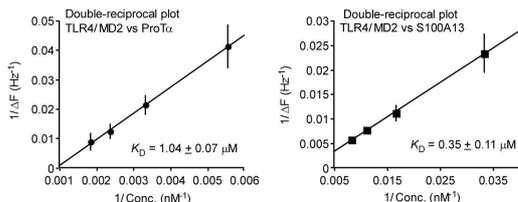
N18-RE-105細胞株における外来性ProTαの核シャトル



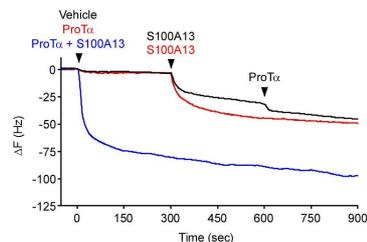
(2) TLR4/MD2 に対する ProT と S100A13 の結合

ProT の細胞膜受容体の1つとして自然免疫受容体である TLR4/MD2 を明らかとし、その下流シグナルとしてインターフェロン系が存在することを明らかとしてきた。加えて、マウス由来の TLR4/MD2 と ProT リコンビナントを用いた相互作用解析にてその結合を動力学的に明らかにしてきた。本研究では、ヒト由来リコンビナントによる TLR4/MD2 との相互作用解析と ProT 細胞外遊離担体 S100A13 についても TLR4/MD2 に対する同様の解析を行った。

TLR4/MD2とProTαの結合 TLR4/MD2とS100A13の結合



ProTα-S100A13複合体のTLR4/MD2に対する結合増強



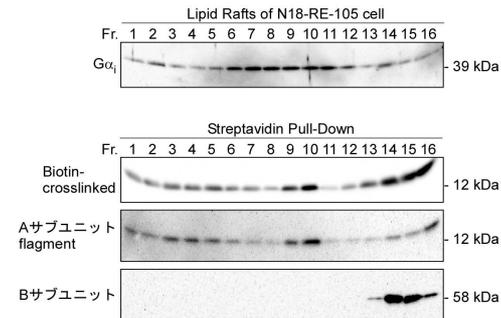
TLR4/MD2 への解離定数 (K_D) をバイオセンサー-QCM を用いて算出すると S100A13 が ProT と比較して約 3 倍程度親和性が高いことが明らかとなった。さらには、ProT -S100A13 の順、または S100A13-ProT の順で TLR4/MD2 に累積結合させた場合と比較して、累積添加と等量の ProT -S100A13 複合体を添加した場合の方がより受容体と結合することが明らかとなった。本結果は、S100A13 と共に細胞外遊離した ProT が単体ではなく、S100A13 との複合体として TLR4/MD2 に作用することを強く示唆するものである。ProT 単

体による受容体シグナルと S100A13 との複合体による受容体シグナルの差異、さらには S100A13 単体による受容体シグナルの解明は、今後の課題である。

(3) 新規 ProT 細胞膜受容体の同定

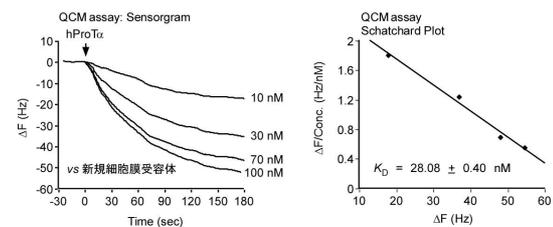
N18-RE-105 細胞株から G_i を含む細胞膜の構成体である Lipid Rafts を精製し、その 16 本の画分から Biotin 標識 ProT と結合する分子の探索を行ったところ、細胞膜タンパク質のサブユニットを 2 種同定する事に成功した。

Gα含有Lipid Rafts画分におけるBiotin-ProTα結合タンパク質の同定

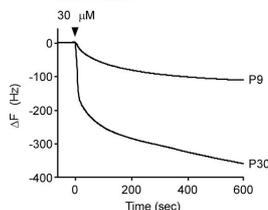


新規同定受容体のリコンビナントに対する ProT の結合を QCM にて解析したところ、その解離定数は 30 nM 程度であることが明らかとなった。さらには、ProT の神経細胞死保護活性を有する ProT 由来ペプチド P30 (ProT の 49-78 アミノ酸配列) P9 (ProT の 52-60 アミノ酸配列) Pα (ProT の 51-56 アミノ酸配列) のいずれも本受容体と結合することを明らかとした。

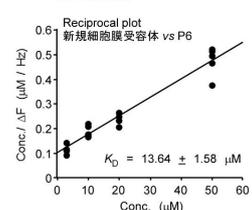
新規細胞膜受容体に対するProTα相互作用の動力学的解析



ProTα由来P30、P9ペプチドの受容体結合



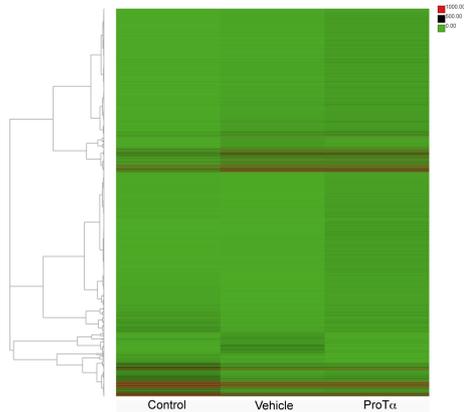
ProTα由来P6ペプチドの受容体結合



In vivo における受容体阻害実験によって ProT の神経保護効果消失効果を確認しており、さらには、ProT とその由来ペプチドの神経保護活性の用量依存性が本同定受容体との結合強度と相関が見られることから、本受容体が ProT の神経保護活性の主要鍵分子であることが推定される。

(4) 外来性 ProT による遺伝子発現変動解析

ProT の細胞核内シャトル機構、新規細胞膜受容体機構の 2 つの系を有する N18-RE-105 細胞株において、外来性 ProT 処置による遺伝子発現変動を DNA マイクロアレイにて解析した。検体は、コントロール(血清含有培地)、Vehicle (無血清培地)、ProT 処置 (無血清培地 + ProT : 1 μM) の 3 群である。全て処置後 3 時間後のサンプルを使用した。信頼性の低いデータの除去を行い (フィルタリング) 39,439 の抽出プローブを得た。フィルタリングにて得られたプローブ群から、シグナル値の最小値と最大値の比率が 2 倍以上のプローブの抽出を行ったところ、5,391 の抽出プローブを得た。階層クラスタリング解析を行い、遺伝子間の相関により類似性を樹形図及び、ヒートマップで表示し発現パターンの特徴を捉えた。



次にサイトカインに着目し、インターロイキン、ケモカイン、インターフェロン、グロースファクターのキーワードでヒットする分子の発現比較を行った。

Interleukinのワードを含む分子群の比較			
GeneSymbol	Control	Vehicle	ProT alpha
AW493563	16.04884967	18.2450704	35.87840711
Il1b	13.03079227	24.83390097	37.54521284
Il3	16.61739068	26.68786875	33.84965044
Il4i1	355.8954345	995.7418733	1162.919268
Il12rb2	10.83228546	28.35894204	30.1992641
Il12b	18.2700424	13.20064492	30.30986082
Il4	5.193073576	5.709603839	27.48025973
Il25	9.823678364	9.82242754	38.49011291
Ilrak2	34.44505882	18.44043139	62.19452617
Il1f10	24.37674811	15.20019086	31.55337423
Il17ra	40.85149896	33.4338312	14.34775657
Il4ra	133.0409622	75.69868943	53.7678237
Il2	33.11049015	16.33014154	12.98087259
Il6	1238.628687	578.4825519	593.3541526

発現変動の認められた複数のインターロイキンにおいて、ProT 処置依存的に発現増加が示された。

Chemokineのワードを含む分子群の比較			
GeneSymbol	Control	Vehicle	ProT alpha
Ccr6	21.42712053	29.05167036	56.40341943
Cxcr2	20.32764647	27.03423291	62.70302809
Ccl7	15.43361726	49.77819063	76.32745126
Ccl2	271.4805535	1364.043253	1659.080661
Cxcl10	1296.730113	3103.434999	3421.845808
Cxcl2	10.23503823	46.84171682	47.63258039
Ccl27a	17.68917957	10.51844503	34.55185394
Ackr4	5.268272182	5.646574375	30.60265899
Cxcl10	6.22774773	8.071638331	29.54030549
Ccr3	30.69189946	16.78363218	55.92779058
Ccl1	29.03107068	20.79599319	43.70573478
Cmtm2a	49.60873381	27.82837942	80.12020078
Ackr2	34.47443564	16.79883704	42.49123213
Cxcr3	86.24411806	11.67057912	108.5207329
Cxcr5	41.14340679	8.935289244	29.09025905

発現変動が認められたケモカイン、ケモカイン受容体の多くは、コントロールと比較して血清除去ストレスにより発現減少するが、ProT 処置により発現減少が抑制される傾向にあった。

Interferonのワードを含む分子群の比較			
GeneSymbol	Control	Vehicle	ProT alpha
Ifna7	18.18134084	36.94396643	102.6993786
Ifi44	28.21589633	34.98336453	61.531076
Ifn13	21.60198833	34.31431021	60.50474184
Gm2518	12.81788603	18.61863379	29.15235986
Ifnk	13.7290261	8.990764614	33.89671426
Ifit2	20.48923197	16.16550953	45.50691867
Ifi204	20.67805701	6.664326537	25.40474301
Igtp	456.1675256	246.3030018	218.9524436
Ifng	63.41746239	5.129964342	20.10931878

発現変動の認められたインターフェロン、インターフェロン発現誘導因子の多くは、ProT 処置依存的に発現増加が示された。

Growth Factorのワードを含む分子群の比較			
GeneSymbol	Control	Vehicle	ProT alpha
Fgf1p1	11.86949926	18.62279978	40.36704591
Hdgl1	9.841081643	30.09631599	84.60291591
Fgf22	20.09189207	28.35772799	51.19704108
Hgf	7.494888159	19.14180644	36.41861039
Igf2os	33.94833527	49.2242521	72.43150417
Egf	45.29648464	62.76019177	100.3791908
Fgf2	15.02264245	21.675447	33.20373257
Fgfr4	10.90971869	25.48854407	39.43651017
Fgf20	8.974011126	19.06266608	25.65761612
Igf2r	103.7207743	204.5417723	246.7908353
Mst1	15.45104001	32.70510853	27.00404502
Igf2bp3	132.0694288	293.2615822	288.3851426
Ltbp1	11.532702	46.72692159	46.14689118
Epo	17.25009344	12.68243864	36.11704608
Fgf8	11.6168521	14.40748772	43.92219798
Tgfr2	6.227321572	5.233138414	36.21750965
Fgf14	24.45224524	11.21403312	28.81974514
Fgf10	28.28012297	5.743273511	16.0893111
Tgfr2	34.8505152	14.30635955	21.8770828
Fgfr2	72.48492771	137.1205927	5.45269638
Btc	90.91245844	35.26920602	27.21707988
Fgf12	52.96454894	25.80327546	34.29251471
Pdgfrb	26.19947389	10.0272806	14.85937655
Fgf11	420.6250327	170.6619573	212.9007391
Fgf21	531.7544337	141.1251838	142.8500698
Igf1	166.8702327	5.340386301	7.679058183
Eps8	78.96450706	14.43597745	20.47463298
Fgf1	1991.166808	892.2283164	982.2725228

発現変動の認められた複数のグロースファクターにおいて、ProT 処置依存的に発現増加がすることが示された。

本解析に用いた N18-RE-105 細胞株は、少なくとも ProT の細胞核内シャトル機構、新規細胞膜受容体機構の2つの系を有する細胞であることから、ProT 処置による遺伝子発現変動が、受容体を介するのか、直接的に核内の遺伝子発現調節機構を制御するのかを明らかにする必要がある。また、qPCR による発現変動の再現性の確認も必須である。既に本細胞において、核内にシャトルされた ProT がヒストンと結合することを明らかとしているが、どの遺伝子を内包するヌクレオソームなのかをシャトルした ProT を利用した ChIP-seq を行い同定する必要があると考える。

本研究結果と今後の研究展開により、第一に核シャトルした ProT のエピゲノム性制御を明らかにすることで「直接的な核内情報伝達駆動の分子機構」が提示できると考える。第二に、DAMPs の新たな機構として分類可能であると考え。第三に、本機構の生物学的意義として、「対細胞ストレス戦略として、核タンパク質が細胞核間を伝播し、細胞形質を自己保護に向けて制御する」との仮説を証明できる。将来的に ProT のリプログラミング機構や受容体シグナル機構を模倣する化合物の創製は、脳梗塞といった脳神経系疾患のみならず、細胞外 ProT 活性が確認されている免疫系の疾患にも寄与する可能性を有し、エピゲノム創薬やペプチドミメティクス創薬に繋がる高い可能性を有する。

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4件)

Kijogi CM, Khayeka-Wandabwa C, Sasaki K, Tanaka Y, Kurosu H, Matsunaga H, Ueda H. Subcellular dissemination of prothymosin alpha at normal physiology: immunohistochemical vis-a-vis western blotting perspective. *BMC Physiol*. 査読有, 2016 Mar 1;16:2. DOI: 10.1186/s12899-016-0021-4.

Ueda H, Halder SK, Matsunaga H, Sasaki K, Maeda S. Neuroprotective impact of prothymosin alpha-derived hexapeptide against retinal ischemia-reperfusion. *Neuroscience*. 査読有, 2016 Mar 24;318:206-18. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2016.01.007.

Halder SK, Matsunaga H, Ishii KJ, Ueda H. Prothymosin-alpha preconditioning

activates TLR4-TRIF signaling to induce protection of ischemic retina. *J Neurochem*. 査読有, 2015 Dec;135(6):1161-77. DOI: 10.1111/jnc.13356.

Omotuyi O, Matsunaga H, Ueda H. Evidence for ProT -TLR4/MD-2 binding: molecular dynamics and gravimetric assay studies. *Expert Opin Biol Ther*. 査読有, 2015;15 Suppl 1:S223-9. DOI: 10.1517/14712598.2015.1005597.

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松永 隼人 (MATSUNAGA, Hayato)
長崎大学・医歯薬学総合研究科(薬学系)・
客員研究員
研究者番号: 20437833

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

植田 弘師 (UEDA, Hiroshi)
長崎大学・医歯薬学総合研究科(薬学系)・
教授
研究者番号: 00145674