

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 25 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660078

研究課題名(和文)血栓形成と止血剤の研究を支援する血液凝固酵素の高反応性基質ペプチド

研究課題名(英文)Application of substrate peptide of Factor XIII expression and clot formation

研究代表者

人見 清隆(Hitomi, Kiyotaka)

名古屋大学・創薬科学研究科・教授

研究者番号：00202276

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：血液凝固ではフィブリンが血液凝固第13因子(以下FXIII)により重合を受けて完了する。FXIIIの体内分布をマウス切片で本酵素に対する高反応性の基質ペプチド配列(F11)による活性検出を試み、RNAと蛋白質の発現様式を明らかにした。ペプチドの有効活用を検討し、F11ペプチドのフィブリンへの架橋阻害を試みた。有効濃度は低いものの競合阻害し、またペプチドを取り込んだフィブリンは、通常とは異なる架橋様式を示した。またメダカを用いた相当する遺伝子欠損個体の作製を、疾患モデル生物の確立のために試みた。

研究成果の概要(英文)：Factor XIII is an enzyme which is responsible for cross-linking of fibrin upon clot formation. We had obtained the specific substrate peptide (F11) to this enzyme so far. In this study, we investigated the expression pattern of FXIII at enzymatic activity, mRNA, and protein level using F11 peptide, RNA probe and antibody. Then, to attempt the utility of the F11 peptide upon clot formation as a regulatory molecule, we tried the inhibitory effect of the peptide and the pattern of cross-linking in the co-presence of F11 peptide upon cross-linking of fibrin. Furthermore, as establishment of the model animal for drug screening on clot formation, gene for FXIII (orthologue) in medaka (*Oryzias latipes*) was identified and we produced gene-deficient medaka by gene-editing system.

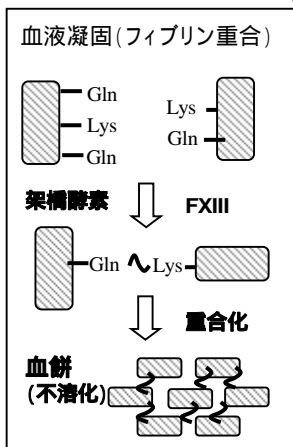
研究分野：分子細胞生物学

キーワード：タンパク質架橋 血液凝固 メダカ

1. 研究開始当初の背景

血液凝固は多段階の化学反応を経て、最終的にフィブリンが血液凝固第十三因子 (Factor XIII; 以下 FXIII) によって共有結合レベルで架橋重合を受けて不溶化し、「かさぶた形成」として凝固が完了する。この最終段階においてフィブリンに作用する FXIII は、トランスグルタミナーゼと呼ばれる蛋白質修飾酵素である。トランスグルタミナーゼは、ヒトでは8種類の組織分布の異なるアイソザイムからなる、カルシウム依存性の蛋白質架橋化 (特定のタンパク質中のグルタミン残基とリジン残基もしくは一級アミンとの間に共有結合形成) を触媒する酵素ファミリーである。

本課題の実施までに我々は、これまで本酵素 (FXIII) に対する、12個のアミノ酸配列からなる、高反応性のペプチド基質配列 (F11: DQMMLPWPVAVKL) をランダムなペプチドを提示するファージライブラリから取得していた。この (ペプチド) 配列は、



他のトランスグルタミナーゼアイソザイムとは反応しない特異的な配列である。また、本来の FXIII の基質である蛋白質群よりも高い反応性を有している。そのため、これまで酵素活性測定等に応用してきた。

本研究課題は、血液凝固の最終段階を支配する Factor XIII としての発現分布を遺伝子並びに蛋白質レベルで血漿のみでなく全組織について解析すると共に、この基質ペプチド配列のさらなる活用を目指したものである。血液凝固の異常がもたらす疾患は脳梗塞等に表されるように突然に重篤な症状をもたらすことが多い。しかし FXIII は骨(軟骨)組織由来の細胞株での発現も報告される中、血液以外での発現はありえないとして、全く解析が行われていない。また、ペプチドの有効活用としては、凝固反応の制御の可能性が考えられる他、止血作用を促進する物質の探索も必要な中で、フィブリンに代替するような化合物としての可能性を求めて行った。

本研究課題を開始するにあたり、得られてきたペプチド (配列) をこうした課題に有効的に活用できないかとの着想に至り、またトランスグルタミナーゼとしての FXIII の機能解析に応用できるモデル生物を確立すれば、一連の血液凝固酵素の生理機能解析が血液凝固を支援する研究に資すると考えられた。

2. 研究の目的

先に記した基質ペプチド (配列) の有効な活用法として、これまでの FXIII への高い特異性と反応性を有するペプチド配列 F11 を、血液凝固を調節する因子として活用するためには、まずその特性を明らかにする必要がある。そのためペプチドの阻害剤としての可能性を調べることで、凝固時にペプチドを加えてフィブリンとの反応性があるかどうかを明らかにすることを目的とした。

FXIII は血漿で見出され、その機能から血液中のみでの発現が解析されてきたことから、他の組織における発現はないのか (骨関連の細胞株での発現が報告されており) 他組織での発現が血栓形成など血液凝固に影響する可能性がないかということを探るために、全組織をくまなく発現解析することを目的とした。これまで我々は、他のアイソザイムで発現様式を具に明らかにしてきており、そのような活性の全組織での解析、RNA レベルと蛋白質レベル (抗体検出) における FXIII の発現様式を明らかにすることを目的とした。

また、血液凝固研究を支援する目的として、遺伝子欠損変異体を作製することを試みた。ノックアウトマウスは、因果関係は不明であるが、流産が多いためにホモ欠失変異体の維持は困難である。メダカは脊椎動物で血液凝固形成については哺乳類に近く、卵による世代交代をするために、個体の維持が容易で解析がしやすい。本研究の一つとして、近年創薬科学分野でモデル生物として多用されているニホンメダカ (*Oryzias latipes*) を対象に、FXIII に相当する遺伝子の単離からタンパク質レベルでの生化学的解析と変異体作製についても加えて目的とした。

3. 研究の方法

実験実施については、以下の3つにおおまかに分けて行った。

(1) フィブリン強化あるいは重合阻害をめざした、高反応性基質ペプチドの活用法

基質ペプチドは、天然の基質よりも高い反応性を有することから、親和性の高さを期待し、過剰量のペプチドを FXIII によるフィブリン架橋化の際に共存させて、阻害効果があるかどうかを検討した。

また、ペプチド配列内には架橋部位のグルタミン残基 (まず酵素が反応中間体をつくるために反応の律速となる) の他に、リジン残基も有していて、反応条件においては、これらは別々の基質分子 (フィブリン) に架橋結合できることが予測される。そのため、このペプチドをフィブリン架橋の中に混在させて、天然のフィブリン架橋物 (かさぶた) と異なる、生化学的な性状を示すのではないかと期待して、電気泳動等によってその変化を検討した。

(2) 血液凝固に関わるトランスグルタミナーゼ FXIII の全組織内分布

血液凝固は FXIII による最終反応で生じる

ため、血漿に存在はするものの、骨組織を含めてその他の組織での存在や、全組織における発現分布を調べて、従来では見出だせていない発現様式がないかを解析した。この際、他のトランスグルタミナーゼのアイソザイムとの交差性を重要視して、特異的なプローブの設計と反応条件に留意した。

また、FXIII の解析はマウスのみならず、(3) に述べるメダカについても抗体作製によって行った。高反応性基質ペプチドを用いた、活性測定のみならず、全組織間をくまなく調べられるよう、超薄組織切片を作製して、ジゴギンゲニン標識した RNA プローブを作製し *in situ* hybridization を行うと共に、Factor XIII 抗体による組織片での反応を調べた。また明確な結果は得られなかったものの、蛍光ペプチドを用いての *in situ* での活性検出も試みた。

(3) 血液凝固モデル動物の確立を目指した、メダカオルソログの生化学的解析と遺伝子欠損個体の作製

魚類は血液凝固に関してヒトとの類似性がある。そこでモデル生物としてのメダカを対象に、対象となる類似遺伝子を得て (OITGB と命名)、その遺伝子を用いた組換えタンパク質の作製を、大腸菌発現系および昆虫細胞発現系によって行った。精製した組換え蛋白質を用いて動力学的反応様式など、基本的な生化学的性状を解析し、抗体を作製して発現分布を解析した。また、近年遺伝子欠損の有効な技術として飛躍的な発展を遂げつつある、ゲノム編集法をメダカに適用した。受精卵に操作を施し、遺伝子変異個体を作製した (ヘテロ変異体のみを得ており、期間内に系統を遺伝子純化するまでには至らなかったため、その後も進行中である)。

4. 研究成果

研究の方法に記したように、主に3つの項目に分けて実施した結果を記述する。

(1) 血液凝固を調節する分子の創出を目指しての、高反応性基質ペプチドの活用

基質ペプチド F11 は、高反応性ペプチドとして FXIII の基質となるために、大量に反応系に導入すれば競合的に阻害することが予想される。この阻害反応はこれまでも予備的な結果として得ていた (但し、配列中にリジン残基を含むため、自己架橋を防ぐ意味でこれをアラニンに変えたものを用いていた)。その分子を反応系中に共存させたところ、0.2mM 以上の濃度で、フィブリン分子の架橋阻害が起こった。今後は、組換え型 FXIII を得て、F11 ペプチドとの共結晶構造解析などのアプローチをとれば、より詳細な相互作用と有効な阻害剤・活性制御剤開発への情報提供が可能ではないかと考えられる。

フィブリン分子は、鎖、鎖、鎖からなるが、鎖どうしの架橋と鎖が架橋され

てさらに加わる。*in vitro* での凝固反応で、F11 ペプチドを加えた場合、ネガティブコントロールの F11QN (グルタミン残基をアスパラギン残基に置換したもの) に加えて優位に競合阻害が見られた。つまり、架橋されない鎖と鎖の存在量が、ペプチドの存在に伴って増大した。しかしながら、有効な濃度が mM というもので実用には遠いため、単なる競合阻害剤ではなく、酵素への修飾機能を付与するなどの工夫が必要とわかった。

なお、ペプチド内にはリジン残基が存在するが、上に記した競合阻害の場合には自己架橋 (ペプチド内部でのグルタミン残基とリジン残基間の架橋) を防ぐために、リジン残基をアラニン残基に置換されているものを用いたので、競合阻害のみが観察された。そこで、あえてリジン残基を残したペプチドも作製して同じ反応をしたところ、次のような事実も判明した。

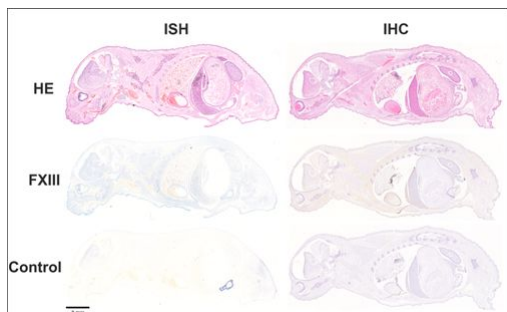
すなわち、F11 が介在して、通常のフィブリン架橋とは異なる架橋重合が行われていることを見出した。この架橋は、ペプチド内のリジン残基を変換したペプチドを架橋化の際に共存させた場合には見られないことから、この F11 ペプチドが「橋渡し」として介在しており、この時のフィブリンは天然の架橋とは異なる重合パターンが生じていると考えられた。すなわち、このペプチドが十分にフィブリンに取り込まれていることがわかった。今後はこの新たな架橋重合体が、プラスミンなどの線溶分解酵素系に対して抵抗性を持つことを期待しており、安定性の増大されるフィブリン架橋産物の産生を求めて解析を進めたいと考えている。

(2) Factor XIII の全身切片での発現分布解析

マウスを対象にして、RNA レベル (*in situ* hybridization)、蛋白質レベル (免疫組織染色)、活性レベル (高反応性基質ペプチドを用いた *in situ* activity) について、試みた。血漿のみならず、他組織での発現 (すでに骨組織由来の細胞株においてはあるものの未だ検討がきちんとされたことはないため) があるかどうかを検討してするために、それぞれの検出において反応条件を検討して進めた。

また、FITC 標識したペプチドを用いての *in situ* 活性検出については明確な結果を得られなかった (特定の組織での活性が明確には得られず、非特異的な結合も多かった)。これまでに、他のアイソザイム (TG1, TG2, TG3, TG6) については、有効な解析結果を得ていたので意外な結果であった。おそらく、血漿の成分が切片に混在したこと、他と比して組織での凍結後の活性の維持が難しいのかもしれない。

RNA レベルおよび蛋白質での結果でも特異的にどこかの血管等の組織での高い発現はなかった。血漿以外で活性を持って（骨組織という従来の報告もあるが）、血栓形成との関わりはないと考えられる。



マウス全組織切片による血液凝固酵素 FXIII の発現分布解析

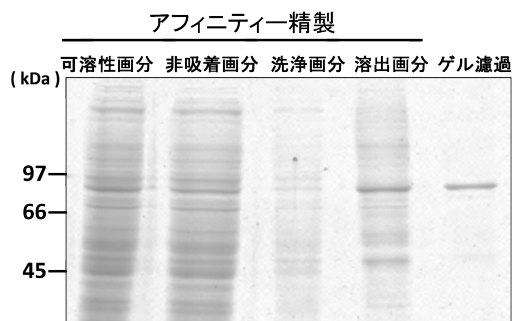
HE:ヘマトキシリンエオシン染色

ISH: in situ hybridization (RNA 発現)

IHC: 免疫組織化学的染色 (蛋白質発現)

(3) モデル生物としてのメダカ (*Oryzias latipes*) を用いた FXIII 欠損個体の作製

創薬スクリーニングに多用されてきているメダカには、ヒト FXIII のオルソログ (類似遺伝子) が存在する。これを OITGB と命名して cDNA 遺伝子を得た。定法に基づいて、大腸菌発現系 (BL21 株) による発現、および昆虫細胞バキュロウイルス発現系によって組換え蛋白質発現を行った。前者よりも後者の方が、活性のある蛋白質が多く発現したため、大量調製を行った。解析の結果、ヒト FXIII と同様に、血液凝固のカスケードで作用するプロテアーゼ、トロンビンによる限定分解を受けて活性化した。よって、魚類においても、同様の血液凝固カスケードが生じ、ヒトと同様な血液凝固システムが構築されており、この最終段階の酵素を欠損 (調節) させることで、十分モデルとして成立することが示唆された。得られた組換え蛋白質を用いて動力学的な解析を行った。

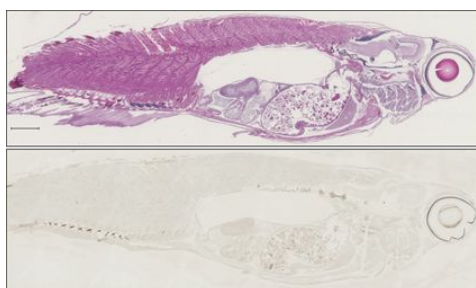


メダカ血液凝固酵素の精製単離

(大腸菌では不可能な発現をバキュロウイルス-昆虫細胞系での発現によって解決し、精製を行なえた)

特異的な抗体を得ることができたので、抗

体染色を組織切片について行った。その結果、マウスと異なって、明確な発現が軟骨組織等に見られた。ヒトの軟骨細胞 (株) では、FXIII が発現して何らかの機能を有していることが報告されており、今回の結果はそれを支持する。また、ウェスタンブロッティングにおいては、血漿における発現に加えて、「えら」にも見られたが、これは魚類特有のものであり、それ以上の解析は行っていない。しかしながら、これまで血漿と骨のみの存在が哺乳類では報告されていたので、新たな知見として今後別課題として新機能の解析を求めて進めることも検討している。



メダカにおける血液凝固酵素の発現分布 (上が HE 染色、下が免疫化学的染色)

加えて、ゲノム編集法 (CRISPR-CAS9 システム) による、遺伝子欠損個体の作製を行った。メダカでの FXIII に相当する遺伝子配列を切断しうる sgRNA (guide RNA) を発現するようにベクター構築し、Cas9mRNA とともに受精卵に注入した。受精卵内で、特異的なゲノム編集 (ターゲット遺伝子の改変) が行われていることを確認し、塩基配列決定して変異個体を作製できる個体 (ヘテロ変異個体) を得た。年度内にこれらを掛け合わせて完全変異 (ホモ個体) を作製するまでには至らなかったため、表現型等の解析は未実施であるが、今後別課題研究による支援のもとで研究を続行して、血液凝固不全のモデル生物としての確立をめざしていく。

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 1 件)

Myneni VD, Hitomi K., Kaartinen M. Factor-XIII transglutaminase acts as a switch between preadipocyte proliferation and differentiation. 124, 1344-1353, Blood, (2014) doi: 10.1182/blood-2013-12-543223

[学会発表] (計 4 件)

阿部奈都美、大橋慎太郎、辰川英樹、人見清隆 タンパク質架橋化酵素の組織分布解析 日本農芸化学会創立 90 周年・中部支部創立

60周年記念第171回例会 名古屋大学シンポジオン・名古屋市 2014年10月

小河亮太、堀水里麻、菊田紋華、高田佑紀、辰川英樹、人見清隆

Biochemical characterization of OITGB among transglutaminase family members in medaka (*Oryzias latipes*) 第20回小型魚類研究会 慶應義塾大学薬学部(芝共立キャンパス) 東京都港区 2014年9月

大橋慎太郎、阿部奈都美、辰川英樹、人見清隆 タンパク質架橋化酵素の生体内組織分布解析 日本農芸化学会中部支部第168回例会 名古屋大学シンポジオン・名古屋市 2013年10月

小河亮太、渡邊優子、菅沼名津季、菊田紋華、辰川英樹、人見清隆 モデル生物としてのメダカにおけるタンパク質架橋化酵素ファミリーに関する解析 第86回日本生化学会大会 2013年9月 パシフィコ横浜・横浜市 (鈴木紘一メモリアル賞受賞)

〔その他〕

ホームページ等

哺乳類のトランスグルタミナーゼの発現部位に関してホームページを公開している。

http://www.ps.nagoya-u.ac.jp/lab_pages/biochemistry/transglutinases_database.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

人見 清隆 (HITOMI KIYOTAKA)

名古屋大学・大学院創薬科学研究科・教授
研究者番号：00202276

(2) 研究分担者

なし ()

(3) 連携研究者

黒田 俊一 (KURODA SHUNICHI)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・教授
研究者番号：60263406

神谷 典穂 (KAMIYA NORIHO)

九州大学・工学研究院・教授
研究者番号：50302766

(4) 研究協力者

辰川 英樹 (TATSUKAWA HIDEKI)

小河 亮太 (OGAWA RYOTA)

堀水 里麻 (HORIMIZU RIMA)