

平成 30 年 5 月 17 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26350958

研究課題名(和文) 神経再生におけるcellular Factor XIII 活性化機構の解明

研究課題名(英文) Activation mechanism of the cellular Factor XIII for nerve regeneration

研究代表者

杉谷 加代 (SUGITANI, Kayo)

金沢大学・保健学系・助教

研究者番号：20162258

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク架橋酵素であるFactor XIII(FXIII)は、血液だけでなく様々な組織や細胞にも分布が見られる。しかし、血液凝固過程でのトロンピン切断による活性化が組織中でも起こるのか、その活性化機構については不明である。今回、ゼブラフィッシュ視神経を損傷する実験系において、軸索再生過程において酵素活性のあるFXIII A-subunit (FXIII-A) が自然に発現上昇することを利用し、神経組織での活性化機構について調べた。その結果、損傷神経組織ではFXIII-A mRNAの5'領域が一部欠如した短いタイプのものが多数出現し、このことがトロンピンを介さない活性化機構の存在を示唆した。

研究成果の概要(英文)：Factor XIII-A (FXIII-A), also known as cellular transglutaminase, plays important roles in mediating cross-linking reactions in various tissues. Previous research has shown that FXIII-A was immediately upregulated in the fish retina and optic nerve after nerve injury. However, the activation mechanism of the FXIII-A remains unclear. Here, we investigated the activation mechanism of the FXIII-A using zebrafish CNS regeneration system. Thrombin mRNA was undetectable in zebrafish optic nerve and retina both before and after optic nerve injury. Sequence analysis of FXIII-A 5'-RACE products showed that most of clones derived from intact retina showed full sequence of FXIII-A, however, many clones derived from injured retina showed short sequences of FXIII-A which lacked exon 1-2 region. Therefore, unlike plasma FXIII-A, activation of FXIII-A in injured retina and optic nerve does not need the cleavage by thrombin, may occur the directly production of activated FXIII-A protein.

研究分野：神経化学、分子生物学、臨床検査学

キーワード：Factor XIII-A CNS regeneration optic nerve retina cellular Factor XIII zebrafish activation peptide repair

1. 研究開始当初の背景

Factor XIII (FXIII) は、血液凝固の最終段階で働いてフィブリンを重合するタンパク架橋酵素、トランスグルタミナーゼファミリーの一つとして知られる。この FXIII の酵素活性中心を担う A サブユニット(FXIII-A) は、血液凝固作用だけでなく 2 量体として様々な組織や細胞にも存在し、Cellular FXIII (cFXIII) として血液凝固以外の生理作用を有することが報告されている。中枢神経が損傷を受けた際にダメージを修復する過程においても FXIII-A の活性化が起こることが、金魚視神経を用いた実験系で確認された (Sugitani et al., 2012)。魚類では中枢神経が損傷を受けても修復・再生が可能で、視神経を実験材料として用いた場合、再生視神経が約 1 ヶ月で視蓋に到達し、その後、数カ月の経過で完全に視覚機能が回復する。金魚視神経を実験的に損傷させると、視神経および網膜での FXIII-A の活性化により、網膜神経節細胞から新たな神経突起を形成し、視神経損傷局所においては伸長した軸索の伸展を促進する作用を有していた。しかし、ここでの FXIII-A がどのように活性化しているのかについては不明であった。

2. 研究の目的

血液中の FXIII の活性化については、酵素の活性中心を担う FXIII の A-subunit の一部 (Arg37-Gly38 部分) に凝固のカスケード反応で活性化されたトロンピン作用し Activation peptide と呼ばれるペプチドが乖離すると、FXIII が酵素活性を有する活性化型 FXIII に変化することが証明されている。しかし、組織や細胞における FXIII-A の活性化については、明確な知見が得られておらず、特に、この視神経再生過程での FXIII-A の活性化機構については不明である。本研究では、生体内、特に神経再生における FXIII-A の発現・活性化機構の解明を目指す。また同時に FXIII-A の生理学的機能については、まだ解明すべき不明な点が多い。

3. 研究の方法

中枢神経軸索の再生が可能な魚類の中でもゼブラフィッシュを用いた。これは、視神経を損傷させると生理的に修復のプロセスがスタートし FXIII-A 活性化が誘導されること、また、遺伝子の発現状態を調べる上で、遺伝子のデータベースが最大限に利用できることの利点が挙げられる。ゼブラフィッ

シュ視神経の実験的損傷モデルを作製し、以下のように実験を進めた。

(1) 網膜・視神経での視神経損傷前後での FXIII-A の発現の増減および局在 : FXIII-A 酵素活性染色、免疫染色、*In situ* hybridization (ISH) およびリアルタイム PCR 法などにより、視神経損傷後から治癒に至る間の経時的な FXIII-A の変動について解析を行った。

(2) 視神経損傷後に発現増加する FXIII-A 遺伝子のクローニング : ゼブラフィッシュ視神経損傷前 (コントロール群) と損傷後の視神経および網膜を摘出し、total RNA を抽出後、逆転写反応により cDNA を合成し、5'RACE 反応によりその塩基配列を解析した。

(3) FXIII-A 遺伝子の領域特異的な増減の検索 : 損傷を受けていないコントロール群とは異なる 5'側の欠如した短いタイプの FXIII-A が確認されたため、これを確認するために欠如部分と酵素活性中心部分の 2 組のプライマーを設定し、各々の視神経修復過程における発現についてリアルタイム PCR で検索した。

(4) 網膜、視神経組織におけるトロンピンの発現の有無 : 視神経損傷前後における網膜、視神経でのトロンピンについて mRNA の発現の有無を RT-PCR 方により確認した。

(5) 5'側の欠如した短いタイプの FXIII-A が実際にフルレングスの FXIII-A にくらべて作用に異なる点があるのか、金魚網膜組織片培養を用いた FXIII-A 強制発現実験を行った。

4. 研究成果

(1) 視神経損傷が誘導する網膜および視神経における FXIII-A の発現について

損傷視神経での FXIII-A の発現

In situ activity assay にて FXIII-A の酵素としての活性変化について FITC 標識特異的ペプチド基質を用いて調べた (図 1)。

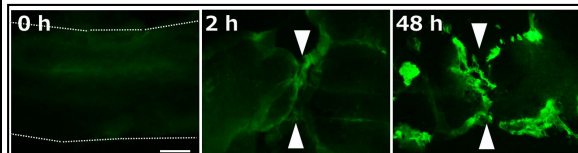


図 1 Zebrafish 視神経損傷前後の *In situ* FXIII-A activity assay. は損傷 (crush) 部位を示す。(Scale bar, 50 μ m)

視神経損傷前 (無処置コントロール, 0 h) と視神経をクラッシュした後の視神経について未固定の状態での longitudinal section を作製し、FITC 蛍光標識基質を作用させたところ、視神経損傷前のコントロール (0 h) は、ほと

んど蛍光が観察できず FXIII-A 酵素活性は確認できなかった。しかし、視神経をクラッシュして2時間後 (2 h)、48 時間後 (48 h) と損傷後の時間経過と共に蛍光が増強し、FXIII-A の活性が増強していることが示された。特に、損傷を受けた局所での活性化が強いという結果が得られた。

網膜での FXIII-A の発現変化について

視神経損傷後に網膜から経時的に total RNA を抽出し、リアルタイム PCR による FXIII-A mRNA の変動について調べた (図 2)。この時、プライマーは2組用いた。1つは酵素活性中心をコードする領域 (オレンジ)、もう一つはトロンピンにより切断される領域をコードする 5' 先端領域 (青色) である。その結果、同じ遺伝子でありながら、酵素活性中心をコードする領域は視神経損傷7日後をピークに発現の増加が見られるのに比べ、5' 先端領域についてはほとんど変化が見られないという結果が得られた。

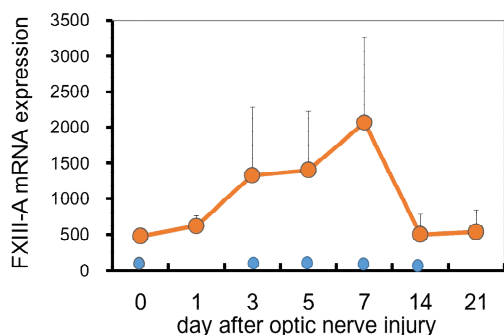


図 2 Zebrafish 網膜由来のサンプルを用いた Real time PCR の結果.

上記の結果を確認するため、ゼブラフィッシュ網膜を使った FXIII-A の *In situ* hybridization を実施し、視神経損傷前後で比較した。この時、2種類のプローブを用意した。Probe 1 は、トロンピンによる切断で FXIII-A が活性化された際に除去される部分をコードする領域であり、Probe 2 は、酵素活性中心の一部をコードする領域である。

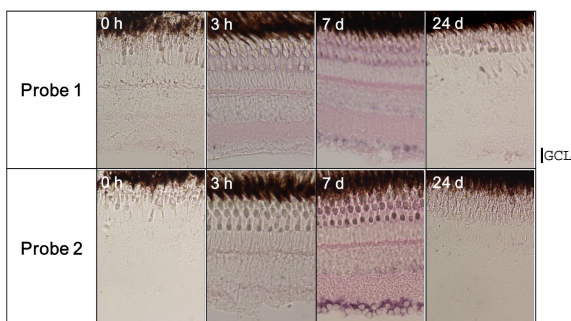


図 3 Zebrafish 網膜組織における FXIII-A *In situ* hybridization. 0h, 3h, 7d, 24d は視神経損傷後の経過時間を示す。GCL, ganglion cell layer. (Scale bar, 40µm)

その結果、図 3 で示されるように、酵素活性中心をコードする領域から成る Probe 2 では、損傷7日後に網膜神経節細胞層 (GCL) に強いシグナルが観察されるのに対し Probe 1 では非常に弱いシグナルしか得られなかった。

(2) 視神経損傷後に発現増加する FXIII-A 遺伝子のクローニング結果

zebrafish の FXIII-A 遺伝子は 15 の Exon からなる。視神経無処置のコントロール視神経および網膜から抽出した total RNA をサンプルとした 5'RACE 反応の結果、クラッシュ後のサンプル由来の cDNA では 5' 側の先端が欠如し Exon3 から cDNA がスタートしていることが確認され、翻訳されるアミノ酸を推測するとトロンピンの切断部分よりもあとの領域である 162 番目のメチオニンから翻訳されていることが推定された。

(3) 網膜、視神経組織におけるトロンピン発現について

zebrafish の視神経損傷前 (コントロール, 0 d) と損傷後 (1 d, 3 d) の視神経 (ON) および網膜 (Retina) の各組織より total RNA を抽出し、トロンピンの mRNA 発現について RT-PCR による解析を行った。その結果、視神経および網膜由来のサンプルでは損傷前後ともにトロンピンの発現は確認できなかった。陽性コントロールの zebrafish 肝臓 (Liver) 由来のサンプルでは、目的のトロンピンのバンドが確認できた (図 4)。

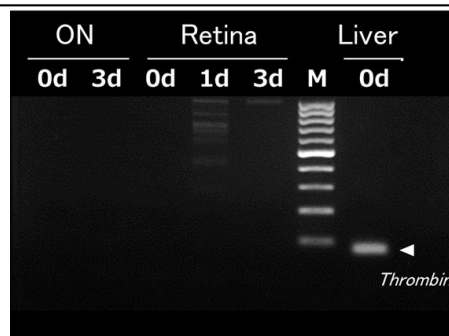


図 4 Zebrafish 視神経損傷前後の各サンプルにおける RT-PCR 法によるトロンピン mRNA の発現。

(4) 金魚網膜組織片培養を用いた FXIII-A cDNA の強制発現実験について

以上の結果より、視神経損傷後に発現する短いタイプの FXIII-A cDNA はトロンピンの作用がなくても酵素活性のある FXIII-A タンパクの発現に寄与すると推定された。そこで、これを確認するため金魚の未処置 (視神経を損傷させていない) 網膜の組織培養を用いて、2 種類の FXIII-A 遺伝子の強制発現実験を行

った。1つはFXIII-A cDNAの全長(F13-L)であり、もう1つはエキソン1-2領域を欠く改変された短鎖FXIII-A遺伝子(F13-S)である。本実験ではpEGFP-C1 plasmid vectorを用いLipofectamine 2000を使って強制発現を行った。Mockは対照としてベクターのみを強制発現させた。Mockについては有意な神経突起伸長を示さなかったが、FXIII-A過剰発現網膜組織片は2つのタイプともにMockと比較して、神経突起伸長が促進された(図5)。特に、F13-S過剰発現系ではF13-Lよりも、より長い神経突起を有する網膜組織片の割合が有意に増加するという結果が得られた(図5)。

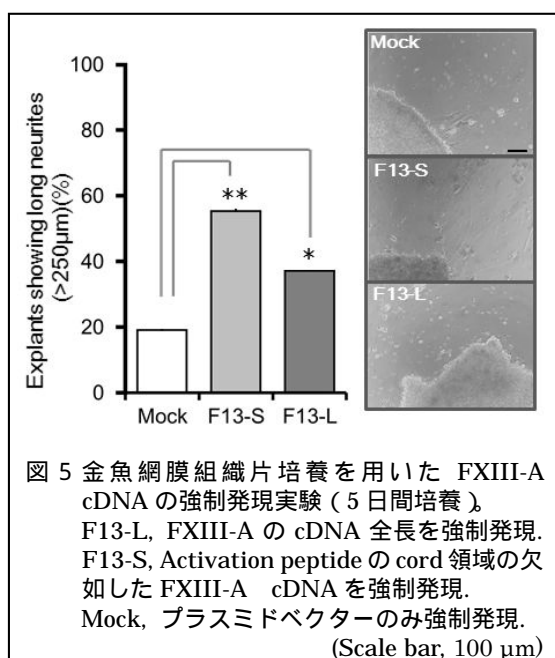


図5 金魚網膜組織片培養を用いたFXIII-A cDNAの強制発現実験(5日間培養)。F13-L, FXIII-AのcDNA全長を強制発現。F13-S, Activation peptideのcord領域の欠如したFXIII-A cDNAを強制発現。Mock, プラスミドベクターのみ強制発現。(Scale bar, 100 µm)

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15件)

Sugitani K, Koriyama Y, Sera M, Arai K, Ogai K, Wakasugi K. (2017) A novel function of neuroglobin for neuroregeneration in mice after optic nerve injury. *Biochem Biophys Res Commun.* 493:1254-1259. DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.09.127. 査読有

Kitamura KI, Andoh T, Okesaku W, Tazaki Y, Ogai K, Sugitani K, Kobayashi I, Suzuki N, Chen W, Ikegame M, Hattori A. (2017) Effects of hyperglycemia on bone metabolism and bone matrix in goldfish scales. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 203:152-158. DOI: 10.1016/j.cbpa.2016.09.010. 査読有

Sugitani K, Koriyama Y, Ogai K, Wakasugi K, Kato S. (2016) A Possible Role of Neuroglobin in the Retina After Optic Nerve Injury: A Comparative Study of Zebrafish and Mouse Retina. *Adv Exp Med Biol.* 854:671-675. DOI: 10.1007/978-3-319-17121-0_89. 査読有

Hisano S, Koriyama Y, Ogai K, Sugitani K, Kato S. (2016) Nitric Oxide Synthase Activation as a Trigger of N-methyl-N-nitrosourea-Induced Photoreceptor Cell Death. *Adv Exp Med Biol.* 854:379-384. DOI:10.1007/978-3-319-17121-0_50. 査読有

Ogai K, Hisano S, Sugitani K, Koriyama Y, Kato S. (2016) Cell Fate of Müller Cells During Photoreceptor Regeneration in an N-Methyl-N-nitrosourea-Induced Retinal Degeneration Model of Zebrafish. *Adv Exp Med Biol.* 854:685-692. DOI: 10.1007/978-3-319-17121-0_91. 査読有

Koriyama Y, Ogai K, Sugitani K, Hisano S, Kato S. (2016) Geranylgeranylacetone Suppresses N-Methyl-N-nitrosourea-Induced Photoreceptor Cell Loss in Mice. *Adv Exp Med Biol.* 854:237-243. DOI: 10.1007/978-3-319-17121-0_32. 査読有

Tanii H, Sugitani K, Saijoh K. (2016) Anti-Inflammatory and Antioxidant Effects of Repeated Exposure to Cruciferous Allyl Nitrile in Sensitizer-Induced Ear Edema in Mice. *Med Sci Monit Basic Res.* 22:20-26. DOI: 10.12659/MSMBR.897771. 査読有

Koriyama Y, Hisano S, Ogai K, Sugitani K, Furukawa A, Kato S. (2015) Involvement of neuronal nitric oxide synthase in N-methyl-N-nitrosourea-induced retinal degeneration in mice. *J Pharm Sci.* 127:394-396. DOI: 10.1016/j.jphs.2015.02.008. 査読有

Sugitani K, Ogai K, Koriyama Y, Kato S. (2014) Reciprocal Changes in Factor XIII and Retinal Transglutaminase Expressions in the Fish Retina During Optic Nerve Regeneration. *Adv Exp Med Biol.* 801:759-764. DOI: 10.1007/978-1-4614-3209-8_95. 査読有

Ogai K, Nakatani K, Hisano S, Sugitani K, Koriyama Y, Kato S. (2014) Function of Sox2 in ependymal cells of lesioned spinal cords in adult zebrafish. *Neurosci Res.* 88:84-87. DOI: 10.1016/j.neures.2014.07.010. 査読有

Ogai K, Kuwana A, Hisano S, Nagashima M, Koriyama Y, Sugitani K, Mawatari K, Nakashima H, Kato S. (2014) Upregulation of Leukemia Inhibitory Factor (LIF) during the

Early Stage of Optic Nerve Regeneration in Zebrafish. PLoS One. 27;9(8):e106010. DOI:10.1371/journal.pone.0106010. 査読有

Koriyama Y, Sugitani K, Ogai K, Kato S. (2014) Heat shock protein 70 induction by valproic acid delays photoreceptor cell death by N-methyl-Nnitrosourea in mice. J Neurochem.130:707-719. DOI: 10.1111/jnc.12750.5 査読有

Koriyama Y, Kamiya M, Arai K, Sugitani K, Ogai K, Kato S. (2014) Nipradilol promotes axon regeneration through S-nitrosylation of PTEN in retinal ganglion cells. Adv Exp Med Biol. 801:751-757. DOI: 10.1007/978-1-4614-3209-8_94. 査読有

Ogai K, Nishitani M, Kuwana A, Mawatari K, Koriyama Y, Sugitani K, Nakashima H, Kato S. (2014) Regeneration-associated genes on optic nerve regeneration in fish retina. Adv Exp Med Biol. 801: 441-446. DOI: 10.1007/978-1-4614-3209-8_56. 査読有

Koriyama Y, Sugitani K, Ogai K, Kato S. (2014) Neuritogenic activity of trichostatin A in adult rat retinal ganglion cells through acetylation of histone H3 lysine 9 and RAR β induction. J Pharmacol Sci. 124: 112-116. DOI: org/10.1254/jphs.13171SC. 査読有

[学会発表](計 10 件)

Sugitani K, Ogai K, Koriyama Y, Kato S. The role of FXIII-A activation following zebrafish optic nerve injury and its involvement in wound healing. 第 95 回日本生理学会大会. サポートホール高松 (香川県高松市) 2018/3/28.

Sugitani K, Ogai K, Koriyama Y, Kato S. Alternative splicing for activation of coagulation factor XIII-A in the fish retina and optic nerve after optic nerve injury. 第 94 回日本生理学会大会. アクトシティ浜松 (静岡県浜松市) 2017/3/28.

杉谷 加代. 中枢神経再生とタンパク架橋反応. シンポジウム「環境と健康」河鹿荘ロイヤルホテル (石川県加賀市) 2016/12/18.

Sugitani K, Koriyama Y, Ogai K, Kato S. Activation of coagulation Factor XIII-A in the retina and optic nerve and its functional roles after optic nerve injury. XVII International Symposium on Retinal Degeneration RD2016, Kyoto International Conference Center Kyoto, Japan. Sep 19-23, 2016.

Koriyama Y, Furukawa A, Fukuyama Y, Sugitani K. Protective effect of talaumidin

against retinal ganglion cell death through Erk and Akt pathway. XVII International Symposium on Retinal Degeneration RD2016, Kyoto International Conference Center Kyoto, Japan. Sep 19-23, 2016.

Sugitani K, Koriyama Y, Ogai K, Kato S. Mechanism of non-enzymatic activation of Factor XIII-A in zebrafish retina and optic nerve after optic nerve injury. 第 58 回日本神経化学学会大会. 大宮ソニックシティ(埼玉県大宮市) 2015/9/13.

Sugitani K, Koriyama Y, Ogai K, Wakasugi K, Kato S. A comparative study of Neuroglobin expression in mouse and zebrafish retina after optic nerve injury. XV International Symposium on Retinal Degeneration RD2014, Asilomar Conference Center Pacific Grove, California, U S, July 13-18, 2014.

Koriyama Y, Ogai K, Sugitani K, Hisano S, Kato S. Heat shock protein 70 induction delays photoreceptor cell death by N methyl Nnitrosourea in mice. XV International Symposium on Retinal Degeneration RD2014, Asilomar Conference Center Pacific Grove, California, U S, July 13-18, 2014.

Hisano S, Koriyama Y, Ogai K, Sugitani K, Kato S. nNOS/NO as a trigger of the MNU induced photoreceptor cell death. XV International Symposium on Retinal Degeneration RD2014, Asilomar Conference Center Pacific Grove, California, U S, July 13-18, 2014.

Ogai K, Hisano S, Sugitani K, Koriyama Y, Kato S. Changes of EGF and HB EGF during photoreceptor regeneration in MNU induced retinal degeneration model using zebrafish. XV International Symposium on Retinal Degeneration RD2014, Asilomar Conference Center Pacific Grove, California, U S, July 13-18, 2014.

[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
<http://neuro.w3.kanazawa-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉谷 加代 (SUGITANI, Kayo)
金沢大学・保健学系・助教
研究者番号：20162258

(2) 研究分担者

郡山 恵樹 (KORIYAMA, Yoshiki)
鈴鹿医療科学大学・薬学部・准教授
研究者番号：70397199
(平成27年度より研究分担者)

(3) 研究分担者

北村 敬一郎 (KITAMURA, Kei-ichiro)
金沢大学・保健学系・教授
研究者番号：80283117
(平成27年度より研究分担者)

(4) 研究協力者

野田 昌晴 (NODA, Masaharu)
基礎生物学研究所・教授
研究者番号：60172798

新谷 隆史 (SHINTANI, Takafumi)
基礎生物学研究所・准教授
研究者番号：10312208

加藤 聖 (KATO, Satoru)
金沢大学・健康増進科学センター・
研究協力員
研究者番号：10019614

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