

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 4 月 27 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440063

研究課題名(和文) 血清アミロイドA3の分子機構と新規細胞内情報伝達タンパク質mTOC

研究課題名(英文) Serum amyloid A3 and intracellular signaling protein mTOC

研究代表者

富田 毅 (Tomita, Takeshi)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：20302242

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトSAA3はマウスSAA3とはC末端側のアミノ酸配列が大きく異なっている。この部位と特異的に認識する抗体を作成し、ヒト培養細胞の培養に用いた培地からのSAA3の検出を行った。さらにヒトSAA3のリコンビナントタンパク質を作成し、培養細胞への刺激または取り込みの実験を行い、これらの結果をまとめて学術論文上に発表した。一方セラストラマイシン結合タンパク質(mTOC)の解析では、亜鉛フィンガータンパク質(ZFC3H1)がmTOCであることを明らかにした論文を発表した。さらにmTOC結合タンパク質の検索を行い、MTR4などの核タンパク質がmTOCと共免疫沈降されることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this study, structure and functions of human serum amyloid A3 (SAA3) were studied. Although DNA sequence of human SAA3 is very similar to that of mouse SAA3, human SAA3 C terminal amino acid sequence is quite different due to single nucleotide insertion in human SAA3 gene. Human SAA3 specific antibodies were produced by using the C terminus peptide as an antigen. Then, the antibodies were utilized to detect SAA3 contained in culture media. These data were published in an open access journal. The researcher also reported basic analysis of Celastramycin A binding protein (mTOC), known as ZFC3H1. Further analysis of mTOC binding protein was executed to find out that some nuclear proteins including MTR4 were assigned to be mTOC binding factors.

研究分野：細胞生物化学

キーワード：血清アミロイド セラストラマイシン

1. 研究開始当初の背景

血清アミロイド A (SAA) は血清中に含まれる分子量 10kDa のタンパク質である。SAA の 4 つのアイソフォームの内 SAA1, 2, 4 は肝臓で合成され、高密度リポタンパク質 (HDL) の構成成分として機能する。一方、SAA3 は脂肪細胞や肺上皮細胞などで、TNF α などの炎症性サイトカイン刺激に応じて合成されるものであり、HDL には含まれない。マウスを用いた先行研究から、マウスががん組織により影響を受けている状態 (担癌状態) において SAA3 が重要な役割を果たしていることが示されている。具体的には、がん組織 (腫瘍原発巣) では腫瘍細胞の引き起こす炎症反応がさかんであり、TNF α 、TGF- β などのサイトカインシグナルが絶え間なく放出されている。血流に乗り、肺へと到達したこれらのタンパク質は、肺血管内皮細胞や肺上皮細胞を刺激し、S100A8 や SAA3 の発現上昇を引き起こす。これらのタンパク質にはケモカイン用の生理機能があり、血流を循環するがん細胞や免疫担当細胞の肺組織への生着を誘導する。すなわち、SAA3 はがん細胞の遠隔臓器への転移を起しやすくさせている要因の一つであると考えられる。(SAA3 による転移前土壌形成) 担がんモデルマウスの実験では、SAA3 中和抗体投与により、血中の SAA3 の生理活性を抑制することが可能であり、がん転移を抑制することに成功している。

さらに引き続いて行われた先行研究では、SAA3 は細菌由来エンドトキシンセンサー受容体である TLR4/MD-2 の内因性リガンドとして作用することが示されている。TLR4 は自然免疫の中心的存在であり、外来性異物に特異的な分子構造を認識して、体内の免疫反応を惹起することから、パターン認識受容体とも呼ばれており、近年まで、内因性の分子がリガンドとして機能するとは考えられていなかった。そのため TLR4/MD-2 複合体がどのような分子メカニズムで SAA3 を認識するのかといった点は、基礎的な生物化学から創薬・医学までの幅広い研究分野から興味を持たれている。この問題に取り組むために、まず SAA3 そのものについて研究する必要性が認められた。

一方セラストラマイシンは、東北大学・薬学部・倉田祥一郎教授により見出されたベンゾイルピロール型低分子有機化合物である。ショジョウバエ幼虫個体培養系を用いた、抗菌ペプチド産生抑制スクリーニングによって約 2 万のライブラリーから得られた、「日本発」の化合物である。いくつかのヒト・マウス由来培養細胞において、セラストラマイシンは IL8・SAA3 などの炎症性サイトカインの発現上昇を抑制した。このことはセラストラマイシンが何らかの細胞内シグナリングをブロックすることにより、炎症性サイトカインの発現抑制を引き起こしていると考えられ、セラストラマイシン結合タンパク質が

SAA3 の発現制御に関わっていると考えられた。そこで、セラストラマイシン結合タンパク質を同定し、その生化学的性質・生理機能の詳細を明らかにする研究を行うことを着想した。

2. 研究の目的

ヒト SAA3 のキャラクタリゼーションを行い、その基本的性質を明らかにする。セラストラマイシン結合タンパク質を同定し、その生化学的性質を明らかにするための基本的な解析を行う。

3. 研究の方法

ヒト SAA3 抗体 (ウサギ由来のポリクローナル抗体およびマウス由来のモノクローナル抗体) を用いた ELISA を作成し、培養細胞抽出液または培養上清におけるヒト SAA3 を定量した。セラストラマイシン結合タンパク質のスクリーニングはリコンビナントタンパク質をスライドガラス上にコートしたプロテインチップを用いて行った。

4. 研究成果

ヒト SAA3 の転写産物の配列解析を行い、LU99 細胞等のいくつかのヒト由来細胞株においては、SAA3 は SAA2 との融合遺伝子の形で発現していることが明らかとなった。(下図 1. 参照)

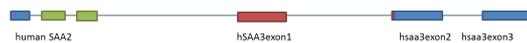


図 1. SAA2/SAA3 融合遺伝子の構造。ヒト SAA2 はエクソン 1 - 4 で構成されるが、融合遺伝子では SAA2 のエクソン 3 (緑のボックス) が SAA3 のエクソン 1 (赤のボックス) と結合している。SAA2 エクソン 3 と SAA3 エクソン 1 は 130kb 離れている。

培養上清を用いた、免疫沈降 ELISA 法によるヒト SAA3 の検出実験では、T47D 細胞培養上清 1L あたり 200pg という極めて微量の標的タンパク質を検出することができた。さらにリコンビナント SAA3 または SAA3 ペプチドタンパク質を用いた研究を行い、SAA3 と酸化 LDL 受容体との結合定数を求めた。論文投稿時に、レフェリーから SAA3 と CD36 との結合についても検討することを求められたため、SAA3 と CD36 との結合実験を培養細胞および表面共鳴プラズモン (SPR) を用いて行った。これらの実験結果から、SAA3 は CD36 にも結合することが明らかとなった。一方セラストラマイシン結合タンパク質のスクリーニングでは、ビオチンラベルを施したセラストラマイシンをプロテインチップ上に適用させたのちにビオチンの検出を行い、結合タンパク質の候補因子を抜き出した。(図 2 参照)

さらにこれらの因子を siRNA で個別にノックダウンさせたものに関してセラストラマイシンによる TNF-IL8 シグナリング阻害率を

実験的に求めた。この阻害率を指標として候補因子のさらなる絞り込みを行い、最終的に ZFC3H1 がセラストラマイシンに結合すること、セラストラマイシンにより TNF 依存的な IL8 発現調節を行っていることが明らかにされた。そこで、ZFC3H1 をセラストラマイシン結合タンパク質 (mTOC = Target of Celastramycin) と呼ぶこととし、その機能について詳細に検討した。

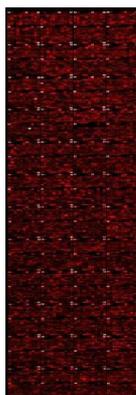


図 2. ビオチン化したセラストラマイシンをハイブリダイズさせたプロテインチップ。蛍光ラベルを結合させたアビジンをさらにハイブリダイズさせることにより標識セラストラマイシンの検出を行っている。

mTOC は約 2000 アミノ酸からなる大型タンパク質であり、中心に亜鉛フィンガードメインを一つ含む。アミノ酸配列には直接的にこのタンパク質の生理機能を想定させるような特徴的なものは見られない。またこれまでにこのタンパク質に焦点を当てた論文も報告されていない。(2016 年 11 月に RNA 分解の調節因子であることが報告された) ポリペプチド中にはいくつかのドメイン構造を持って存在し、N 端と C 端ではその様相が全く異なることから、mTOC は複数の生理機能を持っているタンパク質であると想定している。siRNA を用いて mTOC をノックダウンした細胞株の解析では、細胞質における NF- κ B のリン酸化や核移行は mTOC ノックダウンにより影響を受けなかった。RNA ポリメラーゼの ChIP アッセイの結果から、mTOC ノックダウンでは RNA ポリメラーゼの転写開始地点へのリクルートが減少していることが明らかとなった。このことから、mTOC は転写因子に働きかけることにより、間接的に転写の制御を行っていると考えられる。

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 8 件)

1. Deguchi A., TOMITA T., Ohto U., Takemura K., Kitao A., Akashi-Takamura S., Miyake K., Maru Y.; Eritoran inhibits S100A8-mediated TLR4/MD-2 activation and tumor growth by changing the immune microenvironment. **Oncogene** 35, 1445-1456 (2016)

2. 肺がんへの転移と S100A8、富田 毅、丸義朗、生体の科学 67 巻 5 号、460-461 医学書院 (2016)

3. Cai Y., Yoneda M., TOMITA T., Kurotani R., Okamoto M., Kido T., Abe H., Mitzner W., Guha A., Kimura S.; Transgenically-expressed secretoglobin 3A2 accelerates resolution of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. **BMC Pulmon. Med.** (2015) 15:72

4. TOMITA T., Ieguchi K., Sawamura T., Maru Y.; Human serum amyloid A3 (SAA3) protein, expressed as a fusion protein with SAA2, binds the oxidized low density lipoprotein receptor. **PLOS ONE** 10, e0118835 (2015)

5. Maru Y., TOMITA T., Deguchi A., Ieguchi K., Takita M., Tsukahara F., Takemura K., Kitao A., Gusovsky F.; Anti-inflammatory treatment for seemingly non-inflammatory disorders. **Endocr. Metab. Immune. Disord. Drug Targets** 15, 83-87 (2015)

6. TLR4/MD-2 の蛋白質内因性リガンドと癌転移の分子基盤、富田 毅、丸義朗、医学のあゆみ 253 巻 11 号、1099-1103、医歯薬出版 (2015)

7. TOMITA T., Ieguchi K., Coin F., Kato Y., Kikuchi H., Oshima Y., Kurata S., Maru Y.; ZFC3H1, a zinc finger protein, modulates IL-8 transcription by binding with Celastramycin A, a potential immune suppressor. **PLOS ONE** 9, e108957 (2014)

8. 臓器連関とがん転移前土壌形成、富田 毅、丸義朗、細胞工学 33 巻 5 号、508-511、秀潤社 (2014)

[学会発表](計 3 件)

1. Tomita T. “Characterization of Celastramycin Binding Protein” The 3rd Homeostatic Inflammation International Symposium 2015 年 1 月 29 日 東京

2. 出口敦子、富田 毅、丸義朗 “内因性 TLR4 リガンドによる転移前微小環境の形成”第 73 回日本癌学会学術総会 2014 年 9 月 25 - 27 日 横浜

3. Ieguchi K., Tomita T., Maru Y. “Breakdown of the Eph/ephrin system in vascular endothelial cells causes lung metastasis” The 18th International Vascular Biology Meeting 2014 年 4 月 14—17 日 京都

[図書](計 1 件)

Tomita T., Deguchi A., Maru Y. Chapter 4
(pp76-104), Cancer Metastasis and Stem
Cell/Niche (Takanori Kawaguchi ed.) Bentham
Science Publisher 2016 年

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：ヒト血清アミロイド A 融合遺伝子及び
ヒト血清アミロイド A 融合タンパク質

発明者：丸 義朗、富田 毅

権利者：学校法人東京女子医科大学

種類：特許

番号：特願 2014-12551

出願年月日：2014 年 6 月 18 日

国内外の別：日本国内

6 . 研究組織

(1)研究代表者

富田 毅 (Tomita Takeshi)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：20302242