

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

科学研究費助成事業

研究成果報告書



平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：34413

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460082

研究課題名(和文) シトクロムc-LRG複合体の構造とその生理機能の解明

研究課題名(英文) Elucidation of structure and physiological function of the cytochrome c-LRG complex

研究代表者

井上 晴嗣(Inoue, Seiji)

大阪薬科大学・薬学部・教授(移行)

研究者番号：70183184

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：機能未知の血清タンパク質の一つであるロイシンリッチ α 2-グリコプロテイン(LRG)は、自己のシトクロムc(Cyt c)と強く特異的に結合する。本研究において、LRGはCyt cの電子伝達活性を阻害するように結合することがわかった。また、臓器不全を伴うような疾患では、血中にCyt c-LRG複合体が出現し、この複合体がG-CSF発現に関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Leucine-rich α 2-glycoprotein (LRG), one of the serum proteins with unknown function, bind tightly and specifically to autologous cytochrome c (Cyt c). In the present study, LRG was found to bind to Cyt c in the manner that inhibit the electron transport activity of Cyt c. In the pathogenesis of diseases with organ dysfunction, the Cyt c-LRG complex appeared in the blood and the complex was suggested to be involved in the G-CSF expression.

研究分野：生化学

キーワード：生体分子 蛋白質 生理活性

1. 研究開始当初の背景

ヒトの血漿タンパク質の一つである **Leucine-rich a₂-glycoprotein (LRG)** は、1985 年にそのアミノ酸配列が報告されているにも関わらず、その機能に関しては全く報告されていなかった。我々は、これまで毒ヘビ血液中に存在する 3 種類のホスホリパーゼ A₂ (**PLA₂**) 阻害タンパク質 (**PLI**) について、その構造や機能を研究してきた。この 3 種類の **PLI** のうち、ヘビ毒 II 型塩基性 **PLA₂** を特異的に阻害する **PLIb** は、ロイシンリッチリピート構造 (**LRR**) をもつ糖タンパク質であり、ヒト **LRG** と 33% の相同性を示すことがわかった。**PLIb** と同様に血漿タンパク質であることと互いに高い相同性を示すことから、**LRG** は **PLIb** のヒトホモログであり **PLA₂** 阻害タンパク質として機能していると考えた。そこで、マウス血清から **LRG** を精製し、**PLA₂** 阻害活性を調べたが、残念ながらヒトおよびヘビ毒 **PLA₂** に対する阻害活性はみられなかった。

我々が **LRG** に注目した頃には **LRG** に関連した報告は全くなかったが、2002 年に **LRG** は好中球に多く含まれ、好中球の分化マーカーになること、**LRG** は腸管膜リンパ節における高内皮性細静脈細胞で特異的に発現していることなどが報告され、**LRG** は生体防御に何らかの役割を果たしている可能性が考えられた。最近では、二次元ゲル電気泳動と質量分析を利用したプロテオミクス技術の発展に伴い、疾病プロテオーム解析が広く行われ、**LRG** が急性虫垂炎の診断マーカーになること、肺がん患者の血清で **LRG** が 6 倍程度増加していること、膵臓がん患者の血漿で **LRG** が約 3 倍増加していること、卵巣がん患者の血清で **LRG** が約 3.4 倍増加していること、特発性正常圧水頭症、アルツハイマー病、進行性核上性麻痺、認知症を伴うパーキンソン病では脳脊髄液中の **LRG** が約 2~5 倍に増加していることなど、種々の病態に伴う **LRG** 量の増加が次々に報告されている。また最近、**LRG** は内皮細胞の **TGFb** 受容体に作用して、**TGFb** シグナリングを調節することによって血管新生を促進し、**LRG** 抗体は異常血管新生に関与する病態に対する治療に応用できる可能性が示唆された。

我々は、ヒト培養肝癌細胞 **HepG2** 細胞において **IL-6** 刺激によって **LRG** 生合成が促進されること、リポ多糖 (**LPS**) 投与マウスにおいて肝臓での **LRG** 生合成が促進されることなどを見だし、**LRG** は急性期タンパク質として機能することを明らかにした。

一方、**Cyt c** の **ELISA** 系を用いた定量を血清が阻害することから、血清には **Cyt c** と結合するタンパク質が存在し、しかもそれが **LRG** であることが報告された。我々はこの報告に基づいて、ウマ **Cyt c** と精製したヒト **LRG** との相互作用を **Biacore** を用いて解析した。その結果、ヒト **LRG** はウマ **Cyt c** と非常に強く結合し (解離定数 K_d は約 10^{-13} M)、

エラブウミヘビ **Cyt c** とはそれより弱く (K_d は約 10^{-10} M)、酵母 **Cyt c** とは全く結合しないことがわかった。一方、タンビマムシ **PLIb** もウマ **Cyt c** と結合したが (K_d は 10^{-10} M)、その結合はエラブウミヘビ **Cyt c** との方が強かった (K_d は約 10^{-12} M) ことから、これらの結合には種特異性があることがわかった。また、**PLIb** と **Cyt c** との結合が **PLIb** と II 型塩基性 **PLA₂** との結合 (K_d は約 10^{-9} M) よりも強かったことから、**LRG** と **PLIb** の本来のリガンドは **PLA₂** ではなく自己の **Cyt c** であることが示唆された。

LRG が急性期タンパク質として働き、自己の細胞外 **Cyt c** と非常に強く結合するということは、炎症によりアポトーシスやネクロトーシスによって死んだ細胞から漏出した自己の細胞外 **Cyt c** が **LRG** と結合することによって何らかの生理機能を持っていることが予想される。そこで、我々は、**LRG** の生理作用を明らかにするため、理化学研究所発生再生科学総合研究センターと共同で **LRG** ノックアウトマウスを作製した。**LRG** ノックアウトマウスに **Cyt c** を投与すると、速やかに血液中から除去されるのに対して、野生型マウスでは投与した **Cyt c** と血中の **LRG** が複合体を形成して血液中に留まることがわかった。また、このとき野生型マウスでは血中 **G-CSF** 量が増加し、骨髄中の好中球数が増加したのに対して、**LRG** ノックアウトマウスでは **G-CSF** 量も好中球数も増加しなかった (投稿準備中)。ホルミルペプチドやミトコンドリア DNA が **DAMPs** (**Damage-associated molecular patterns**) と呼ばれる内因性の **Danger signal** として、パターン認識受容体を介して好中球を活性化し、好中球の遊走や脱顆粒を引き起こすことが報告されているので、**Cyt c** は **LRG** と複合体を形成することによって **Danger signal** として免疫細胞に作用して **G-CSF** の発現を促進すると考えている。

2. 研究の目的

本研究では、**Cyt c** と **LRG** の相互作用を複合体の立体構造の解明によって明らかにする。また、**Cyt c-LRG** 複合体の作用を解明するとともに、複合体の受容体を同定し、**Cyt c** が **LRG** と複合体を形成することによって **DAMPs** として機能することを明らかにする。また、実際の疾病で **Cyt c-LRG** 複合体が形成されていることを確認し、早期バイオマーカーとして利用できるかどうか検討する。

本研究により、**Cyt c** が細胞外で **Danger signal** として機能することが明らかになれば、**Cyt c** は細菌から植物、動物に至るまで共通に存在し、電子伝達体として機能するが、真核生物から多細胞生物に至る進化の過程でミトコンドリア内、細胞内、細胞外でそれぞれ全く異なる役割を果たす多機能性を獲得したと考えられ、タンパク質の機能獲得に関する重要な学術的知見が得られる。また、

LRGはCyt cと複合体を形成することによって初めて細胞外シグナル分子としてのスイッチが入ることになり、このようなシグナル分子の例はこれまで報告されたことがなく、学術的価値が高いと考えられる。

3. 研究の方法

(1) Cyt c と LRG の相互作用解析とその複合体の構造解析

NHS-Activated Sepharose 4FF (GE Healthcare)にウマ Cyt c を固定化した Cyt c 固定化アフィニティーカラムを作製した。「献血血液の研究開発等での使用に関する指針」に基づく公募によって、日本血液製剤機構から血液製剤製造過程で得られるヒト献血血液画分を提供していただき、0.15M NaCl を含む 20mM リン酸緩衝液(pH7.4)で平衡化した Cyt c 固定化カラムに添加した。同緩衝液でカラムを洗浄後、0.5M NaCl を含む 0.1M 酢酸緩衝液(pH4.0)でカラムに吸着したタンパク質を溶出させた。LRG は抗ヒト LRG 抗体(ABL)を用いたウェスタンブロットにより検出した。濃縮した LRG 画分を 20mM トリス緩衝液(pH8.0)に透析後、同緩衝液で平衡化した Resource Q (GE Healthcare)カラムに添加し、0~0.5M NaCl を含む同緩衝液の直線濃度勾配により溶出させて LRG の最終精製標品を得た。一方、ヒト Cyt c 発現ベクターである pBTR1 (Addgene)を大腸菌に形質転換し、培養した菌体から組換えヒト Cyt c を精製した。精製した約 3 mg のヒト LRG を 250 unit の N-Glycosidase F (Roche)で 24 時間反応させて脱糖鎖化した後、約 1 mg の組換えヒト Cyt c を加え、Cyt c-LRG 複合体を形成させた。この複合体を Resource Q カラムを用いたイオン交換カラムクロマトグラフィーで精製して濃縮後、ハンプトン社のタンパク質結晶化解析スクリーニングキットを用いて、結晶化条件を検討した。

また、Expi293 Expression System (Gibco)を用いた哺乳類細胞発現系を用いて組換えヒト LRG を産生させた。HepG2 細胞から Total RNA を抽出後、PrimeScript RT reagent Kit (Takara)を用いて逆転写し、ヒト LRGcDNA を PrimeSTAR Max DNA polymerase (Takara)を用いて増幅させた。pHEK293 Ultra Expression Vector I (Takara)と LRGcDNA を In-Fusion Cloning (Takara)で組換えて LRG 発現プラスミドを作製した。このプラスミドを Expi293F 細胞に ExpiFectamine 293 Reagent を用いてトランスフェクションし、7 日間培養した。7 日後の培養上清を Cyt c 固定化カラムに添加し、上述のように組換え LRG を精製した。

Cyt c および Cyt c-LRG 複合体の電子伝達活性の測定には、還元型 Cyt c の 550 nm における吸光度変化を利用して測定した。酸化型 Cyt c の還元反応には最終濃度 0.5 mM の Dithiothreitol (DTT)を加えた後の 550 nm

の吸光度増加の時間変化により測定した。また、還元型 Cyt c の酸化反応には、ウシ心臓由来 Cytochrome c oxidase (Sigma-Aldrich)を添加した後の 550 nm の吸光度減少の時間変化により測定した。

(2) 種々の細胞に対する Cyt c-LRG 複合体の作用

C57BL6 マウス的大腿骨から骨髓細胞を採取し、10%FBS を含む RPMI1640 培地中、細菌培養用シャーレで 10 日間培養して骨髓マクロファージを調製した。また、マウス腹腔内を PBS で洗浄して得られた細胞を 10% FBS を含む RPMI1640 培地で培養して腹腔マクロファージを調製した。なお、ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)細胞は東洋紡から購入し、HepG2 細胞はヒューマンサイエンス研究資源バンク(HSRRB)から購入した。

96 穴マイクロプレートで細胞を培養し、種々の濃度の Cyt c、Cyt c-LRG 複合体を添加し、一定時間後に培地を回収するとともに細胞から Isogen II (ニッポン・ジーン)を用いて Total RNA を抽出した。PrimeScript RT Reagent Kit with gDNA Eraser (Takara)を用いて逆転写後、GAPDH, b-Actin, LRG, G-CSF, IL-6 などの遺伝子の発現をリアルタイム PCR 装置を用いて定量した。

(3) 種々の疾患モデルマウスにおける Cyt c-LRG 複合体の検出

C57BL6 マウス的大腿部に 50%グリセロール溶液 200 μ L を 4 カ所に分けて筋肉注射して、横紋筋融解症を誘発させた。24 時間後に血液を回収するとともに肝臓から Total RNA を抽出した。

四塩化炭素をオリーブオイルで 20 倍に希釈した溶液を C57BL6 マウスに体重 1 g あたり 10 μ L 腹腔内投与して、肝傷害を誘発させた。24 時間後に血液を回収するとともに肝臓から Total RNA を抽出した。

回収した血漿 1 μ L を Native PAGE で分離し、PVDF 膜に転写して抗マウス LRG 抗体 (ABL 社)を用いたウェスタンブロットを行い、遊離の LRG と Cyt c-LRG 複合体を検出した。肝臓 Total RNA については逆転写後、リアルタイム PCR で GAPDH, b-Actin, LRG, G-CSF, IL-6 などの遺伝子の発現を調べた。

4. 研究成果

(1) Cyt c と LRG の相互作用解析とその複合体の構造解析

日本血液製剤機構から提供していただいたヒト献血血液画分について、ウェスタンブロットによる検討を行ったところ、図 1 に示すように Fraction IV ペースト画分に LRG が多く含まれていることがわかった。しかし、Fraction IV ペーストを Cyt c 固定化カラムに添加したところ、カラムに吸着せず、LRG が 40%エタノール処理によって変性していたことがわかった。Cyt c 固定化カラムへの

吸着を調べることで、未変性の LRG が最大量含まれる画分は、Eff. I 画分であることが判明した。

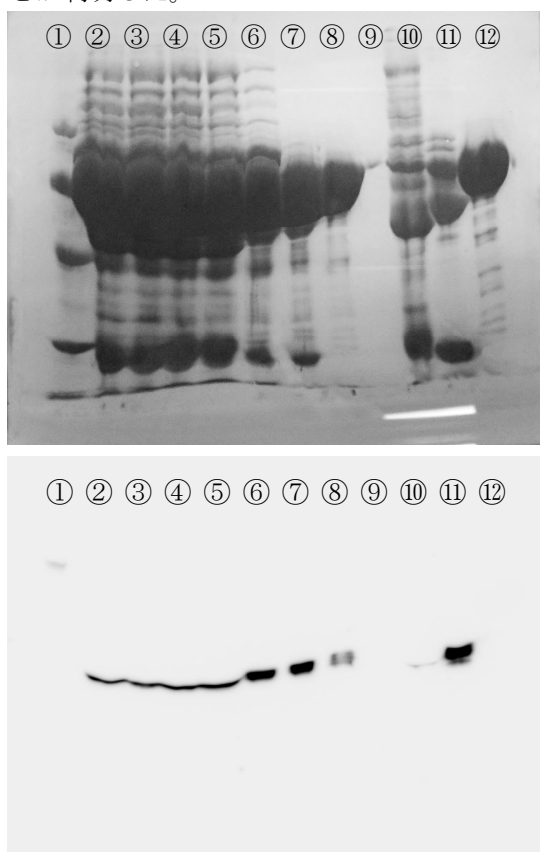


図 1. 血漿画分のウェスタンブロットによる解析 CBB 染色(上)、抗 LRG 抗体を用いた検出(下) ①分子量マーカー、②プール血漿、③脱クリオ血漿、④脱 PTC 血漿、⑤Eff. I、⑥Filt. II+III、⑦カラム通過 II+III、⑧Filt. IV、⑨Filt. V、⑩Fr. II+III ペースト、⑪Fr. IV ペースト、⑫Fr. V ペースト

そこで、日本血液製剤機構から Eff. I 画分 500mL を提供していただき、Cyt c 固定化カラムに添加し、吸着画分を Resource Q カラムを用いたイオン交換カラムクロマトグラフィーによって精製し、最終的に約 3 mg のヒト LRG 精製標品を得た。一般的に糖タン

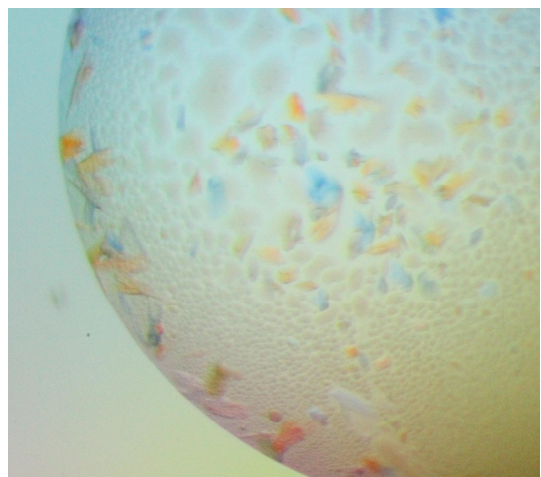


図 2. Cyt c-LRG 複合体の結晶

パク質は糖鎖の不均一性により結晶化が難しいことが知られている。そこで、LRG 精製標品を N-Glycosidase F を用いて脱糖鎖化した後、ヒト組換え Cyt c を添加して、Cyt c-LRG 複合体を形成させた。この複合体を Resource Q カラムクロマトグラフィーで精製し濃縮後、結晶化スクリーニングキットで結晶化条件を検討したところ、図 2 に示すように、0.2M 硫酸アンモニウム、36 % PEG4000 の条件で結晶が生じた。しかし、残念ながらこの結晶は脆く、X 線照射で崩壊した。

一方、ヒト LRGcDNA を pHEK293 Ultra Expression Vector に組み込み、Expi293F 細胞にトランスフェクションして、7 日間培養し、培地から組換え LRG を Cyt c 固定化カラムを用いて回収した。Resource Q カラムで精製し、ヒト組換え Cyt c を添加して、最終的に 240 mL の培地から 3.3 mg の Cyt c-LRG 複合体が得られたので、現在、結晶化の条件を検討している。

Cyt c と LRG の結合には、Cyt c の 8 位、13 位、72 位、73 位、79 位の正電荷が重要であり、LRG は Cyt c 分子上の露出したヘム c を取り囲むように結合すると予想されている。そこで、Cyt c の電子伝達活性が LRG の結合によって阻害されるかどうか調べた。その結果、図 3 に示すように、LRG は DTT による酸化型 Cyt c の還元反応速度を約 1/3 に減少させるとともに、Cytochrome c oxidase による還元型 Cyt c の酸化反応速度を約 1/250 に減少させた。

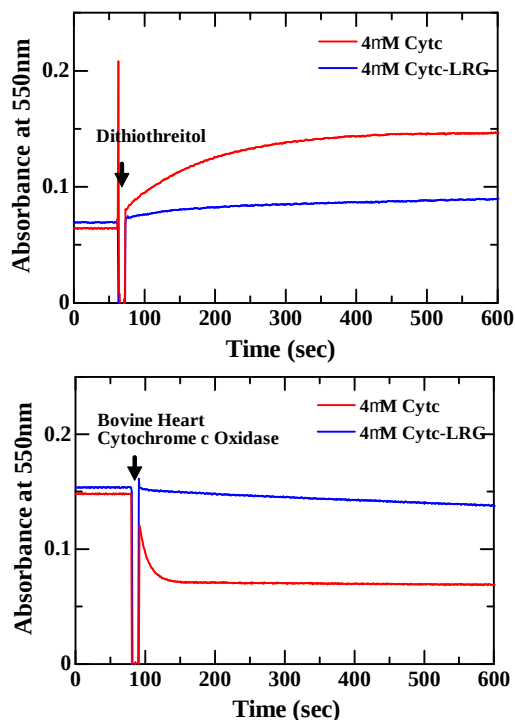


図 3. Cyt c の電子伝達活性に及ぼす複合体の影響 DTT による酸化型 Cyt c の還元反応(上)、Cyt c oxidase による還元型 Cyt c の酸化反応(下)

(2) 種々の細胞に対する Cyt c-LRG 複合体の作用

野生型マウスと LRG ノックアウトマウスに対して Cyt c を投与すると、野生型マウスでは、血中 G-CSF が増加し、骨髓中の好中球が増加するのに対し、ノックアウトマウスでは血中 G-CSF 量も好中球数も変化が見られないことがわかっている。そこで、骨髓マクロファージ、腹腔マクロファージ、HUVEC 細胞、HepG2 細胞などについて、Cyt c-LRG 複合体を添加し、G-CSF の産生が促進されるかどうか検討した。腹腔マクロファージ、HUVEC 細胞、HepG2 細胞については、元々 G-CSF がほとんど発現しておらず、Cyt c-LRG 複合体による発現誘導も見られなかった。骨髓マクロファージについては、高濃度(1 nM 以上)の Cyt c-LRG 複合体で G-CSF の産生が促進されたが、再現性が悪く、現在も検討中である。

また、野生型マウスに Cyt c を投与すると肝臓での LRG 発現が促進され、血中 LRG 濃度が増加することがわかっている。しかし、HepG2 細胞に Cyt c や Cyt c-LRG 複合体を添加しても LRG の産生は促進されないことがわかった。HepG2 細胞での LRG 発現は IL-6 によって促進されることがわかっているため、Kupffer 細胞などが Cyt c-LRG 複合体を認識し、IL-6 などのサイトカインを発現して、肝細胞の LRG 発現を促進すると考えられる。そこで、Kupffer 細胞の単離と培養について検討中である。

(3) 種々の疾患モデルマウスにおける Cyt c-LRG 複合体の検出

インフルエンザ脳症、新生児仮死、移植片対宿主病、血球貪食症候群、敗血症、劇症肝炎、劇症膵炎、術後、熱傷、横紋筋融解症などの臓器不全を伴う疾患では、血中 Cyt c 濃度が上昇することが知られている。そこで、50%グリセロール 200 mL を大腿筋に筋肉注射して、横紋筋融解症を起こした。筋肉注射

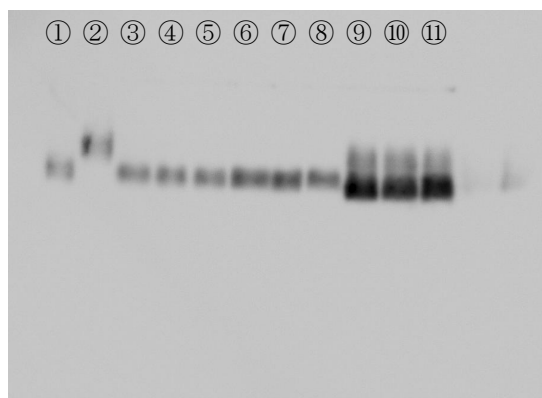


図 4. 横紋筋融解症による血清中での Cyt c-LRG 複合体の形成 ①LRG ②Cyt c-LRG 複合体 ③④⑤50%グリセロール注射前の血清 ⑥⑦⑧PBS を筋肉注射 24h 後の血清 ⑨⑩⑪50%グリセロールを筋肉注射 24h 後の血清

24h 後の血清を Native PAGE によって解析した結果(図 4)、PBS を筋肉注射したコントロールと比較し、50%グリセロールを筋肉注射したマウスでは、Cyt c-LRG 複合体のバンドが検出されるとともに、血中の遊離 LRG 量の顕著な増加が認められた。この遊離 LRG の増加は肝臓で新たに合成された LRG と考えられ、肝臓における LRG 発現をリアルタイム PCR で調べた結果、図 5 に示すように、PBS を筋肉注射したもの 비해、50%グリセロールを筋肉注射したものでは約 2.5 倍の発現上昇が見られた。

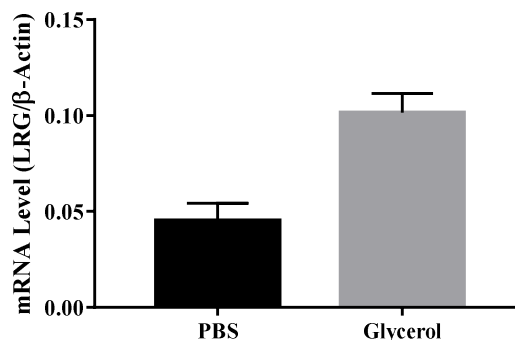


図 5. 横紋筋融解症による肝臓での LRG 発現の上昇

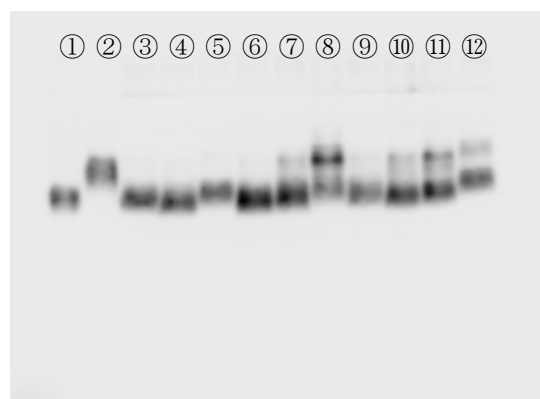


図 6. 四塩化炭素誘発劇症肝炎による Cyt c-LRG 複合体の形成 ①LRG ②Cyt c-LRG 複合体 ③④⑤⑥オリーブオイル投与群 ⑦⑧⑨⑩⑪⑫四塩化炭素投与群

次に、四塩化炭素誘発劇症肝炎によって、Cyt c-LRG 複合体が形成されるかどうか調べた。図 6 に示すように、オリーブオイルに溶解した四塩化炭素を腹腔内投与して劇症肝炎を誘発したマウスでは、血清中に Cyt c-LRG 複合体が認められ、オリーブオイルのみを腹腔内投与したものでは複合体は見られなかった。

以上の結果、劇症肝炎や横紋筋融解症などの細胞死を伴う疾患では、細胞死に伴って血液中に Cyt c が放出され、血中 LRG と結合して複合体が形成されることがわかった。Cyt c-LRG 複合体の検出が疾患の早期バイオマーカーとなる可能性が考えられるとともに、疾患の重症度の目安になると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 0 件）

〔学会発表〕（計 2 件）

- ① 中村舞音、松村有紗、矢野可央里、藤井忍、福永理己郎、池田潔、井上晴嗣、マウスロイシンリッチ α_2 -グリコプロテインとシトクロム *c* の相互作用、第 87 回日本生化学会大会、2014 年 10 月 16 日、国立京都国際会館
- ② 溝端彩花、藤井忍、福永理己郎、井上晴嗣、哺乳類細胞発現系を用いた組換えヒトロイシンリッチ α_2 -グリコプロテインの生産と精製、第 66 回日本薬学会近畿支部大会、2016 年 10 月 15 日、大阪薬科大学

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.oups.ac.jp/kenkyu/kenkyuushitu/kisoyakugakukyokucenter.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

井上 晴嗣 (INOUE, Seiji)

大阪薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：70183184