

研究題目 組織の線維化を促進する転写共役因子の機能解析

研究組織

研究代表者：仲矢道雄（九州大学大学院薬学研究院）

共同研究者：小迫英尊（徳島大学先端酵素学研究所）

【1】研究の概要

[1-1]本研究の目的・概要

線維化とは、炎症や老化時に出現する筋線維芽細胞という細胞群によって組織にコラーゲンなどの細胞外マトリックスタンパク質が過剰に産生された状態である。我々は、転写共役因子の一つである分子[以下、Fibrosis-promoting factor(FPF)と定義]が筋線維芽細胞による細胞外マトリックスタンパク質の過剰産生に関与することを見出した。しかしながら、その上流、下流分子は明らかではない。そこで本共同利用では、プロテオーム解析による FPF を介したシグナル伝達経路の解明を目指した。

[1-2]研究の方法・経過

FPF に結合する分子をプロテオーム解析によって網羅的に探索した。具体的には、筋線維芽細胞に Flag-FPF をレトロウイルスを用いて発現させ、anti-Flag 抗体での免疫沈降後にトリプシン消化し、質量分析を行った。その結果、多くのパラスペックル蛋白質が、FPF と結合することを見出した。パラスペックルとは、核内に存在する非膜系オルガネラであり、遺伝子発現の制御に関わると考えられている。そこで次に、同定されたそれぞれのパラスペックル蛋白質をノックダウンし、FPF のノックダウン時と同じく、線維化因子の産生が有意に減少する分子を探索した。その結果、パラスペックル蛋白質である RNA 結合タンパク質の一つをノックダウンすると、コラーゲンなどの線維化因子の産生が、FPF ノックダウン時と同じく、有意に減少することが明らかとなった。そこで続いて、anti-FPF 抗体によって免疫沈降を行い、PRM (parallel reaction monitoring) 解析を行ったところ、内在性の FPF と本 RNA 結合タンパク

質の結合を検出することが出来た。

【2】研究成果

[2-1]本共同研究で明らかになった研究成果

上記の[1-2]研究の方法・経過に記載した結果から、本共同研究によって FPF は、パラスペックルにおいて特定の RNA 結合タンパク質と相互作用し、コラーゲンなどの線維化因子の産生を促進すると考えられた。これまで FPF は、転写共役因子として知られてきたが、本研究によりパラスペックルにも局在する分子であることが初めて明らかになった。

[2-2]本共同研究による波及効果及び今後の発展性

FPF は、その生理的機能およびその上流、下流分子は殆ど明らかになっていなかった。そのような研究動向の中、我々は本共同研究によって、FPF が核内の非膜系細胞内オルガネラであるパラスペックルに局在する多くの RNA 結合タンパク質と結合することを見いだした。これまで、筋線維芽細胞においてパラスペックルを介した線維化因子産生メカニズムは報告されていない。従って、本研究をさらに発展させれば、これまで殆ど分かっていなかったパラスペックルを介した線維化因子産生メカニズムの大意が明らかになり、筋線維芽細胞、線維化研究にブレークスルーをもたらすことが期待される。

【3】主な発表論文等

[3-1]論文発表

1) [雑誌]著者名. 題名. 雑誌名 巻: 頁 - 頁, 発行年.

1. Kotaro Kasai, Yuma Horii, Takanori Hironaka,

Kyosuke Mae, Tomoyuki Ueno, Akiomi Nagasaka, and **Michio Nakaya**

Increased Expression of Heparan Sulfate 6-O-sulfotransferase-2 Promotes Collagen Production in Cardiac Myofibroblasts.

BPB report. 4:85-91 (2021)

2. Noburo Takizawa, Takanori Hironaka, Kyosuke Mae, Tomoyuki Ueno, Yuma Horii, Akiomi Nagasaka, and **Michio Nakaya**

GPRC5B promotes collagen production in myofibroblasts.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 561:180-186 (2021)

3. 山内佑斗, 堀井雄真, **仲矢道雄**

「筋線維芽細胞と線維化」

臨床免疫・アレルギー科 77(2) 131-137 (2022)

2) [書籍] 著者名. 題名. In: 編集者名・編書籍名. 出版社, 発行地, 頁-頁, 発行年
該当なし

[3-2] 学会発表

1) 発表者名. 題名. 学会名, 発表地, 発表月日, 発表年

1. **仲矢道雄**

「新規線維化因子の探索」

第二回細胞死コロキウム, オンライン (東京)

2021年11月18日

2. **仲矢道雄**

「細胞死を起点とした線維化研究」

日本 Cell Death 学会第 29 回学術集会, オンライン (東京)

2021年7月26日

[3-3] 成果資料等

【4】 今後の課題等

今後の課題、その他等

本研究により FPF がパラスペックルにおいて特定の RNA 結合タンパク質を介してコラーゲンなどの線維化因子の産生を促進することを見出した。一方で FPF の上流分子は未だ同定されていない。そこで今後は FPF の上流分子をプロテオーム解析によって同定したい。

我々は細胞外の硬さが、インテグリン等の受容体を介して細胞内に伝達され、アクチン重合

を介して FPF を核移行へと導くことを見出している。そこで、筋線維芽細胞に TurboID-FPF を発現させ、硬い (50KPa) ハイドロゲルプレートあるいは柔らかい (1KPa) ハイドロゲルプレート上で培養し、BioID (近位依存性ビオチン標識) 法によってそれぞれの培養環境下での FPF との結合分子を網羅的に同定する。そして、硬さの違いによって結合変化が認められた分子を選別すること等により FPF の上流分子を同定したいと考えている。