

S19 リボソームタンパク質多量体—C5a 受容体システムの多彩な役割

山本哲郎

熊本総合医療リハビリテーション学院顧問

Diverse roles of ribosomal S19 oligomer-C5a receptor system

Tetsuro Yamamoto

Kumamoto College of Medical Care & Rehabilitation

関節リウマチにおける部位特異的な白血球浸潤像とそれを作り出す分子メカニズム：S19 リボソームタンパク質のリボソーム外機能

関節リウマチの白血球浸潤像には面白い特徴がある。関節液には多核球が主に浸潤している一方で、滑膜の肉芽巣には単球/マクロファージが浸潤して多核球はほとんど存在しない。この浸潤像の違いを作り出している分子機構を解明する研究を開始したことが、補体系さらには S19 リボソームタンパク質との出会いとなった。

まず関節液の方であるが、細胞を除いた遠心上清の中に、多核球と単球を共に走化させる因子と単球の走化だけを阻害する因子とが共存していた。つまり、この 2 因子の共存が多核球選択的な浸潤像を作り出しているのである。白血球走化因子の方は、既知のごとく補体 C5a であった。また、単球走化抑制因子を単離してアミノ酸配列を解析したところ、驚くべきことに C4a であった¹⁾。C4a は単球自身から走化抑制因子を遊離させることに寄与している^{2,3)}が、この最終的な抑制因子はまだ同定できていない。

一方、滑膜肉芽巣の抽出液からは、単球を選択的に走化させるタンパク質分子が分離された。アミノ酸配列を解析するとともに組換えタンパク質を調製して確認実験を行ったところ、この分子は、なんと S19 リボソームタンパク質という細胞内

タンパク質合成装置リボソーム小サブユニットの構成成分のひとつが、トランスグルタミナーゼの酵素作用で分子間架橋されて多量体化したものであった⁴⁾。S19 リボソームタンパク質は、システイン残基を含まない 145 アミノ酸残基から構成される分子量 1 万 5 千 5 百の単純タンパク質で、リボソーム生合成に関与している。図 1 に示すように、架橋化は 122 番目のリジン残基と 137 番目のグルタミン残基の間で起きるが、2 分子間の架橋は 1 本だけであるため、2 量体のみならず多量体も形成され、共に走化活性を獲得する⁵⁾。

mRNA に対する翻訳機能と関係のないこの S19 リボソームタンパク質多量体の単球走化活性は「リボソームタンパク質のリボソーム外機能」という概念に含まれるものである。また、トランスグルタミ

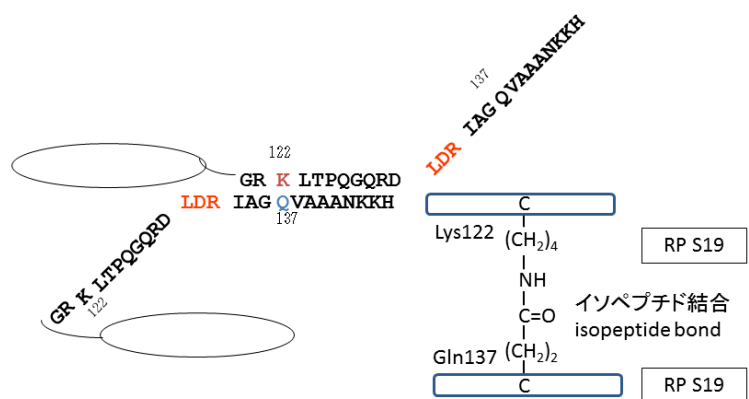


図 1. S19 リボソームタンパク質架橋化 2 量体の模式図

ナーゼは、 Ca^{++} 依存性で活性中心にシステイン残基を持つ酵素で、細胞内に普遍的に存在するものは 2 型トランスグルタミナーゼと呼ばれる。血漿中に存在する凝固 XIII 因子も前駆体型のトランスグルタミナーゼである。

S19 リボソームタンパク質多量体と C5a 間の受容体の共有

白血球は走化因子が細胞膜上の受容体に結合することで遊走を始める。我々は、上記の研究以来、C5a を、走化性を有する正の対照分子として実験に用いていた。ある実験で、思いもよらず、C5a 受容体ブロッカーが S19 リボソームタンパク質多量体の単球走化活性も阻害したことを契機に、S19 リボソームタンパク質多量体の受容体も C5a 受容体であることが明らかになった。驚いたことに、S19 リボソームタンパク質が多量体化すると、抗 C5a 抗体も交差反応するようになることも分かった⁶⁾ (図 2)。

C5a 受容体は 7 回膜貫通型の G タンパク質共役型受容体で、C5a は分子内の少なくとも二か所で C5a 受容体と結合することが報告されていたので、それを参考に、変異組換え体や合成ペプチドを用いて S19 リボソームタンパク質分子内の C5a 受容体に結合する二か所を同定した⁷⁾。S19 リボソームタンパ

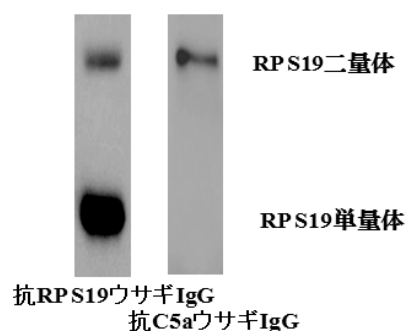


図 2. S19 リボソームタンパク質の 2 量体化によって出現する抗 C5a 抗体に対する交差反応性
ウエスタンブロット法による観察結果を示す。(文献 6 改変)

ク質多量体も C5a と同様に C5a 受容体に対して二段階で結合する (図 3)。二段目の結合が受容体を活性化するが、その際の C5a 分子内の結合部位はカルボキシ末端の $\cdot\text{Leu72}\text{-Gly73}\text{-Arg74}\text{-COO}\cdot$ である。それに対応する S19 リボソームタンパク質の分子内部位は、カルボキシ末端ではなく、 $\cdot\text{Leu131}\text{-Asp132}\text{-Arg133}\cdot$ (図 2 内の LDR) で、Asp132 の β カルボキシル基が C5a の Arg74 (カルボキシ末端) の α カルボキシル基と同じ作用を担っていると考えられる (図 4)。

この事実を見出した当時は、C5a はタンパク質と

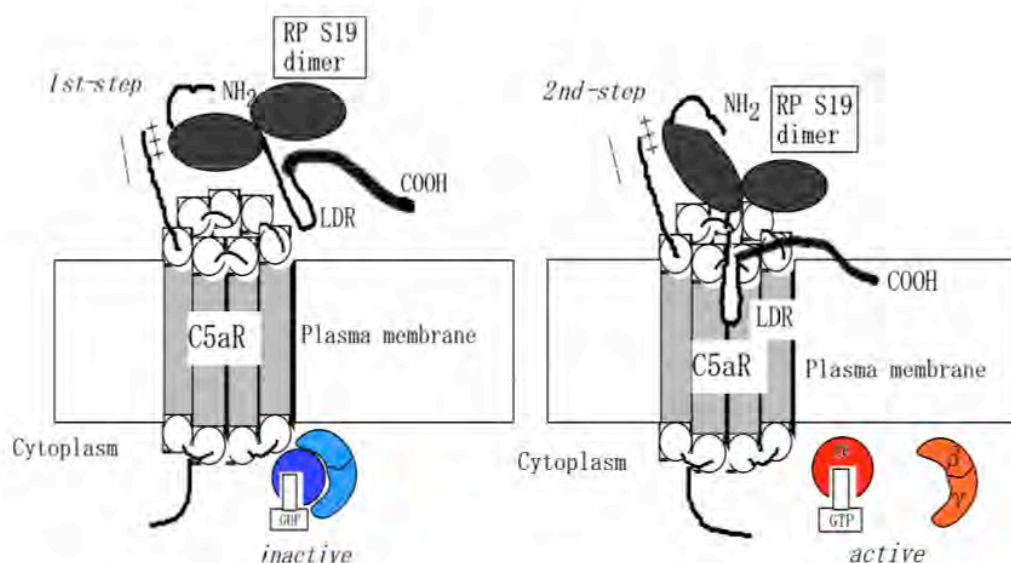


図 3. S19 リボソームタンパク質 2 量体による単球 C5a 受容体の活性化機構

しての立体構造が明らかになっていたが、S19 リボソームタンパク質は古細菌の分子しか分かっていなかった。そこで、古細菌の分子をもとにヒト S19 リボソームタンパク質の構造モデルを作ってみたところ、C5a 受容体に結合する二か所の間隔が C5a の場合に比べて過剰に長いことが分かった⁸⁾。このために S19 リボソームタンパク質の単量体は C5a 受容体に結合することができず、2 量体化して二か所の結合部分が異なるサブ分子から一つずつ供給されることで距離が狭まって受容体に結合できるようになると推察される。

S19 リボソームタンパク質多量体の多核球 C5a 受容体に対するアンタゴニスト作用とその作用を担う S19 リボソームタンパク質の分子内構造

ところで、C5a 受容体は単球と多核球に存在し、C5a は単球と多核球に強い走化活性を示す。それなのに、S19 リボソームタンパク質多量体は単球にだけ走化性を発揮する。実は、S19 リボソームタンパク質多量体は、単球の C5a 受容体にはアゴニストとして作用する一方で、多核球の C5a 受容体にはアンタゴニストとして作用するという二重性を持っていた⁹⁾。このアンタゴニスト作用に切り替えるスイッチは、S19 リボソームタンパク質のカルボキシ末端部 12 アミノ酸残基が担っていた¹⁰⁾。この部分を C5a につないだ C5a/RPS19 キメラ分子 (Gly73 は Asp に変異) は、S19 リボソームタンパク質多量体と同じように、単球に選択的な走化性を発揮するようになった¹¹⁾ (図 5、図 6)。

正常ヒト血漿中に存在する S19 リボソームタンパク質と、血液凝固反応に伴うその多量体化

我々は以前に、血漿中には存在せず、血液あるいは血漿を凝固させた血清中に出現する単球選択的な走化因子があることに気づいていた。この因子は抗 C5a 抗体で吸収される一方で、C5a よりも分子量が数倍大きい奇異な分子であった¹²⁾。血液凝固に

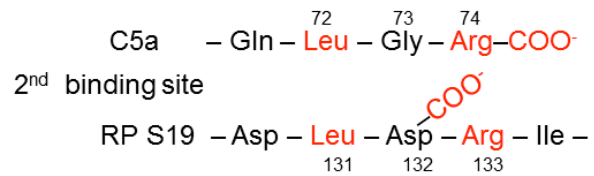


図 4. C5a 受容体を活性化する機能を持つ C5a と S19 リボソームタンパク質多量体の分子内構造

受容体活性化に必要なアミノ酸残基とカルボキシル基を赤で示している。

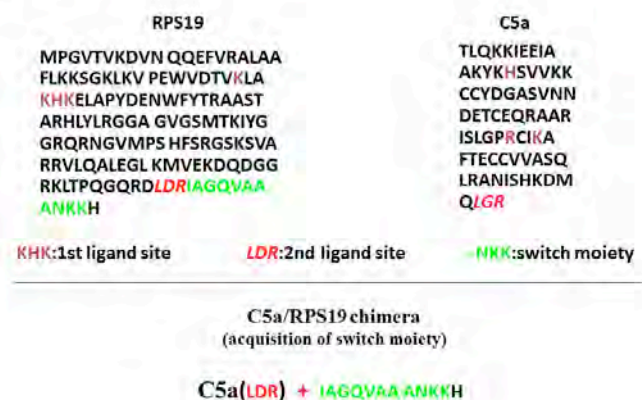


図 5. アンタゴニストスイッチを含む S19 リボソームタンパク質と C5a の機能部位のアミノ酸配列 (上段) と、C5a にアンタゴニストスイッチをつないだ C5a/RPS19 キメラ分子の構造 (下段)

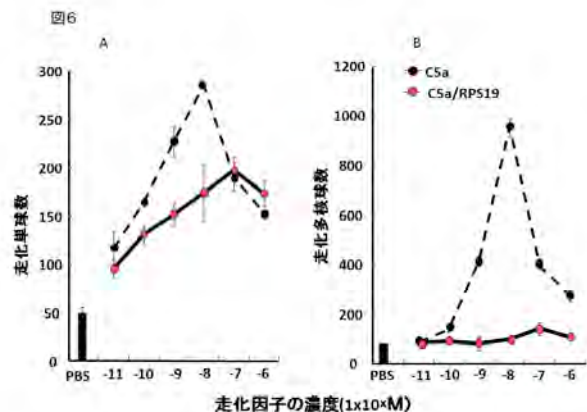


図 6. C5a/RPS19 キメラ分子の単球特異的走化活性 A は単球に対する走化活性、B は多核球に対する走化活性を、濃度を対数変化させて測定したもので、実線が C5a/RPS19 キメラ分子、破線が C5a を示す。Y 軸は走化した白血球の数を示す。(文献 11 改変)

伴って出現するので、凝固に関与する酵素の阻害剤をいろいろ加えてみたところ、トランスグルタミナーゼのひとつである活性型 XIII 因子の阻害剤により生成が抑制された¹³⁾。これらの性格は S19 リボソームタンパク質多量体に酷似している。そこで、健康者血漿やワーファリン投与中の患者血漿などを用いて詳細に調べたところ、なんと、S19 リボソームタンパク質が、単量体として、正常の血漿中に、しかも凝固因子であるプロトロンビンと複合体を形成して存在していることがわかった。そして、血液凝固反応を経て形成された S19 リボソームタンパク質は、血清中では多量体化していた (図 7A)。S19 リボソームタンパク質は、プロトロンビンの γ カルボキシグルタミン酸ドメインと結合しており、この複合体形成による分子量の増加で腎臓糸球体での濾過を免れていると考えられる。ワーファリン投与患者においては、プロトロンビンが γ カルボキシグルタミン酸化されていないため、S19 リボソームタンパク質の血漿濃度が激減しているわけである¹⁴⁾ (図 7B)。

血液凝固の過程でプロトロンビンは活性化した血小板の表面でセリンプロテアーゼ型凝固因子の活性

化カスケード反応を受けてトロンビンに活性化される。トロンビンはフィブリノーゲンをフィブリンに変換すると共に XIII 因子を活性化する。活性型 XIII 因子はフィブリンを架橋化して強固なゲルを形成すると共に、血小板表面で S19 リボソームタンパク質を架橋多量体化する¹⁵⁾。こうして生成された S19 リボソームタンパク質多量体は単球/マクロファージを凝血塊に向けて走化させて凝血塊を貪食処理させる (図 8)。つまり、血液凝固機構には、後に凝血塊を処理させるための分子機序が埋め込まれていると考えられる。

この考えを実験的に検証するために、モルモットから採血した血液を二分し、片方には抗 S19 リボソームタンパク質 IgG を、他方には蛍光標識した対照 IgG を、それぞれ混入させた後に凝固させ、同重量のこれら二つの凝血塊をセットでモルモットの腹腔に挿入した。そして 3 日後に凝血塊を取り出して重量を比較することで凝血塊吸収の程度を比較した。図 9 に示すように、抗 S19 リボソームタンパク質 IgG が混在する方の凝血塊吸収は常に遅延していた。光学顕微鏡や電子顕微鏡で観察すると、対照 IgG 凝血塊に見られるマクロファージによる表層の被覆と

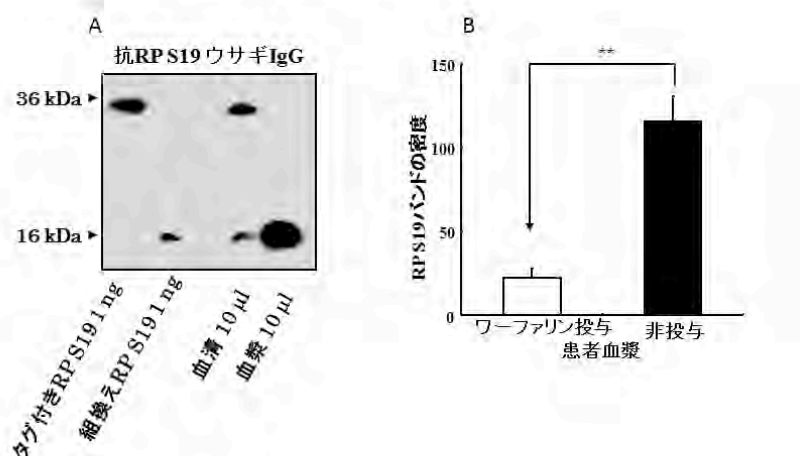


図 7. 正常ヒト血漿および血清中の S19 リボソームタンパク質 (A) と、ワーファリン投与患者血漿における S19 リボソームタンパク質濃度の減少 (B)

A はウエスタンブロット法による観察結果を示す。タグ付き RP S19 は、S19 リボソームタンパク質と同程度の分子量を持つタグ分子を付けた組換え S19 リボソームタンパク質である。組換え RP S19 は、野生型の組換え S19 リボソームタンパク質で、対照として用いた。B は、ウエスタンブロット法による観察されたバンドの強さをデンストメータで数値化した結果である。類似の循環器病患者で、ワーファリン投与中の患者 (6 名) 血漿と非投与患者 (6 名) 血漿との比較である。(文献 14 改変)

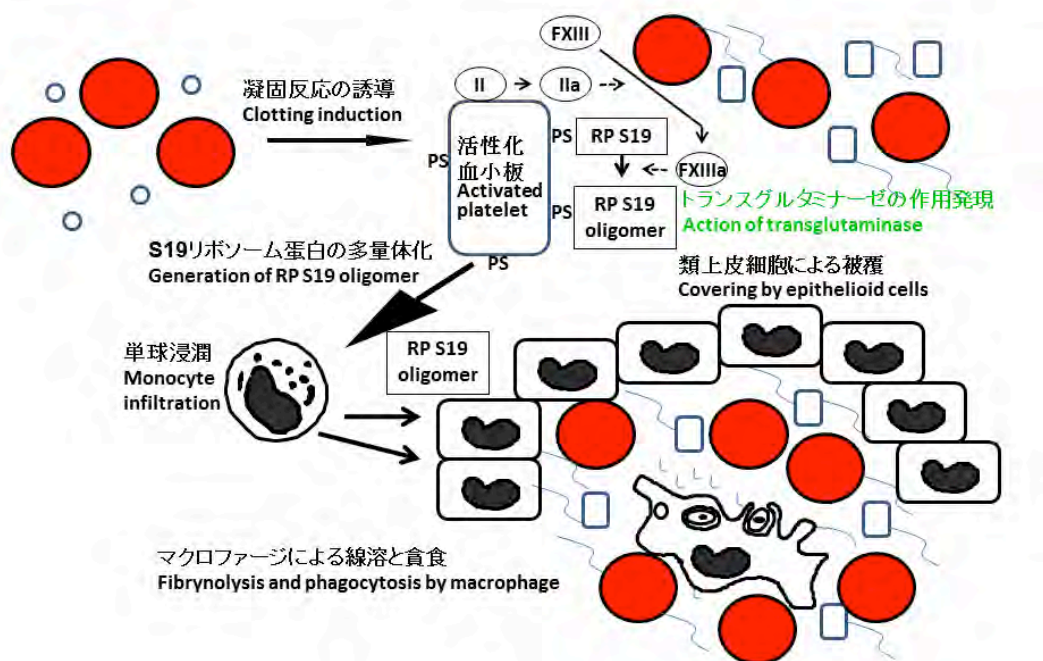


図 8. 血液凝固過程における S19 リボソームタンパク質の多量体化と、その単球走化作用による凝血塊の吸収機構

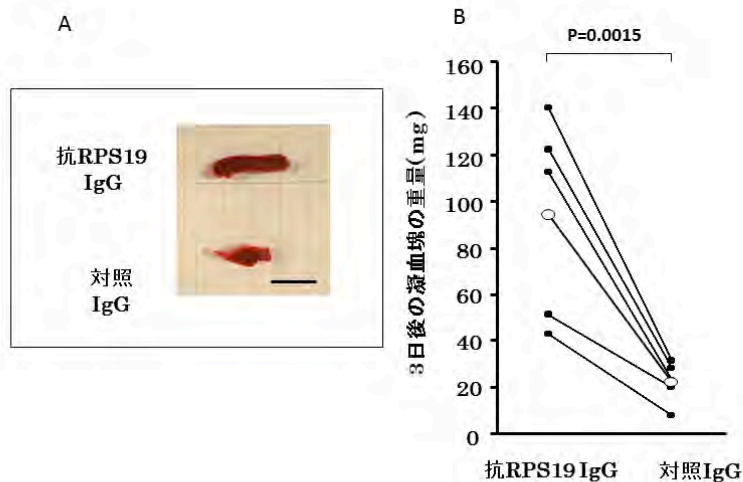


図 9. 抗 S19 リボソームタンパク質抗体による凝血塊吸収の抑制

モルモット腹腔内挿入後 3 日目に回収された、抗 S19 リボソームタンパク質 IgG を混じた凝血塊と蛍光標識対照 IgG を混じた凝血塊の肉眼写真 (A) と、5 例の重量測定の結果と平均重量 (白丸) (B) を示す。凝血塊中の S19 リボソームタンパク質多量体の機能を抑制すると、凝血塊の吸収が遅延する。(文献 16 改変)

内部での赤血球の貪食が、抗 S19 リボソームタンパク質 IgG 凝血塊では著しく抑制されていた¹⁶⁾。後述する Gln137Glu-S19 リボソームタンパク質遺伝子ノック・イン・マウス由来の凝血塊と野生型マウス

由来の凝血塊をマウス腹腔に挿入した同様の実験においても、凝血塊中の S19 リボソームタンパク質多量体の機能が抑制されると、マクロファージの細胞性線溶機構による凝血塊の吸収が遅延するという結

果が再現できた¹⁷⁾。

アポトーシス過程におけるS19リボソームタンパク質の多量体化とその細胞外への遊離

血液凝固に伴ってS19リボソームタンパク質多量体が生成されることを上述したが、関節リウマチ肉芽巢の中に凝血塊があるわけではない。我々は、細胞内でもS19リボソームタンパク質多量体が生成される機構があると考えた。当時、アポトーシスという細胞の死に方が注目を浴びており、その過程で細胞内の2型トランスグルタミナーゼの活性が上昇することが報告されていた。

我々は、数種類の株化培養細胞と数種類の異なるアポトーシス刺激の組み合わせの全例において、S19リボソームタンパク質がアポトーシスの過程で細胞内で多量体化され、細胞外に放出されることを明らかにすることが出来た^{18,19)}。図10に、AsPC-1細胞を43℃で50分間熱処理することでアポトーシスを誘導した実験例を示す。アポトーシスの進展に伴って細胞内トランスグルタミナーゼの活性が上昇

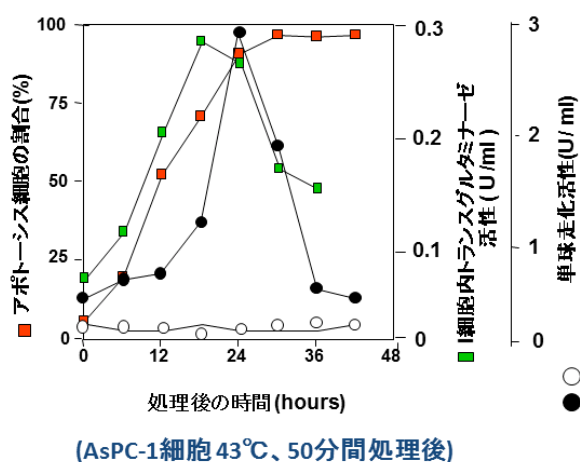


図 10. アポトーシス過程における細胞内トランスグルタミナーゼ活性の上昇と S19 リボソームタンパク質多量体の細胞外遊離

S19 リボソームタンパク質多量体の細胞外遊離は、培養液の単球走化活性を形態学的極性化測定法を用いて観察した。(文献 19 改変)

し、24 時間目を極期とする S19 リボソームタンパク質多量体の細胞外遊離が、培養上清中の単球に対する走化活性として観察された。

更にこの研究中に、アポトーシス過程の細胞から放出された S19 リボソームタンパク質多量体が、オートクリン的にその細胞のアポトーシスを促進していることを偶然見つけた。なんと、アポトーシス刺激を受けた細胞は C5a 受容体遺伝子を発現させて細胞表面に C5a 受容体を持つように変化していたのである²⁰⁾。

これらの事実は、アポトーシス刺激を受けた細胞は、S19 リボソームタンパク質多量体の放出を介して、自らのアポトーシスが実行されるタイミングと、アポトーシス細胞を貪食処理する単球/マクロファージが動員されてくるタイミングとを同期させていることを示している。

S19 リボソームタンパク質多量体による自然免疫反応と応答免疫反応の連結

実際に、アポトーシス刺激をした細胞を実験動物の皮内に接種すると、速やかに単球/マクロファージが浸潤して接種細胞は貪食処理されてしまった。そこで、このアポトーシス細胞を貪食したマクロファージを追跡してみると、リンパ管を通して局所のリンパ節に移行していた。マクロファージは T リンパ球に対する抗原提示能をもっている。事実この動物は、数日後には、アポトーシスに用いた細胞に対する抗体を産生していた²¹⁾。

ウイルスに感染した細胞は自らアポトーシスに陥ることが知られている。アポトーシスに陥った感染細胞から遊離される S19 リボソームタンパク質多量体は、そのような感染細胞をマクロファージに貪食処理させる自然免疫反応と、感染細胞由来の抗原に対して起こす応答免疫反応とを連結させて、効果的な生体防御反応に仕立て上げていると理解することができる²²⁾ (図 11)。同様の機構が、癌免疫においても重要な役割を果たしていることを、マウスを用

いた実験で明らかにした^{23,24)}。

S19 リボソームタンパク質多量体による多核球のアポトーシス促進とマクロファージの動員を介した急性炎症反応の収束

ところで、多核球は生体から分離すると自動的にアポトーシスに陥る。急性炎症の終焉においても、浸潤した多核球はその現場でアポトーシスに陥り、その後に浸潤したマクロファージに食食処理される。我々は、この局面においても S19 リボソームタンパク質多量体が重要な役割を担っていると考えた。

予想通り、正常ヒト末梢血から分離した多核球に S19 リボソームタンパク質多量体に対する中和抗体を共存させておくとアポトーシスの進行が遅れた。白血病由来の株化細胞である HL-60 に Gln137Asn-S19 リボソームタンパク質遺伝子を導入すると S19 リボソームタンパク質の多量体形成が障害されるが、この変異 HL-60 から分化させた多核球の場合にも、アポトーシスの進行が明らかに遅延した²⁵⁾。この Gln137Asn-S19 リボソームタンパク質遺伝子 HL-60 由来多核球と野生型 HL-60 由来多核球とをマウスの皮内に接種して経過を比較した。野生型多核球の接種局所には単球/マクロファージが浸潤して、接種多核球は速やかに除去されたが、遺伝子変異多核球では、マクロファージの浸潤が明らかに弱く、72 時間後においても接種多核球は集塊のまま残存した (図 12)。

カラゲニンという海藻の多糖類をマウスの胸腔に注入すると、3 時間目ごろから多核球が浸潤を始め、24 時間ほどで浸潤白血球が消失して治癒するという簡便な急性胸膜炎が起こる。カラゲニンとともに S19 リボソームタンパク質多量体に対する中和抗体を胸腔内に注入したところ、24 時間後にも大量の多

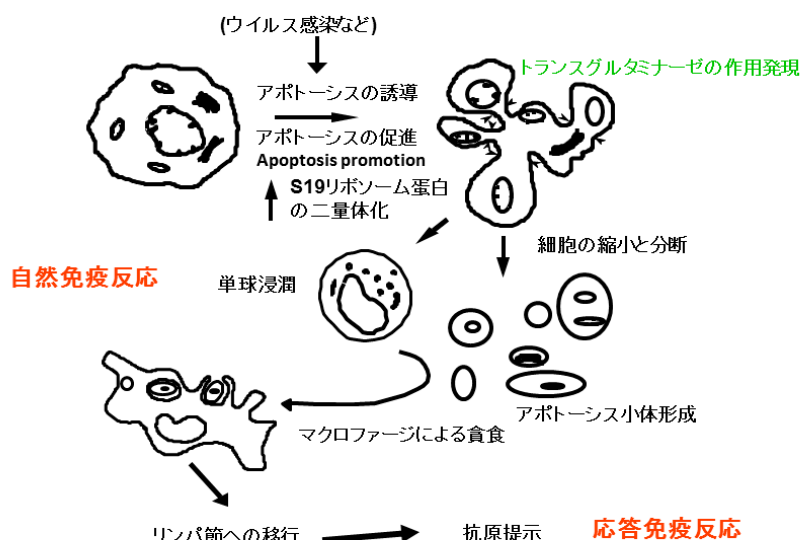


図 11. S19 リボソームタンパク質多量体による自然免疫反応と応答免疫反応の連結

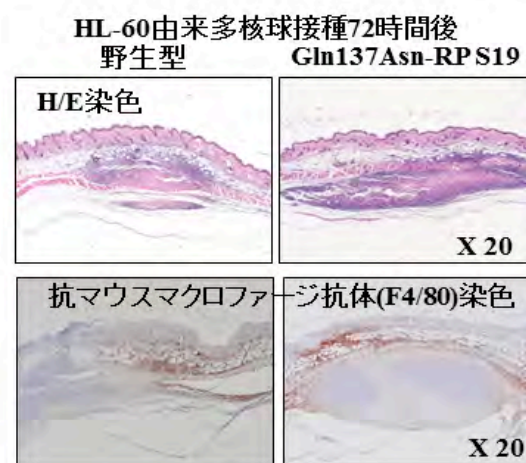


図 12. Gln137Asn-S19 リボソームタンパク質遺伝子改変 (Gln137Asn-RP S19) HL-60 細胞由来多核球の貪食除去の遅延
野生型 HL-60 由来多核球と遺伝子改変 HL-60 由来多核球 (Gln137Asn-RPS19) をマウス皮内に接種後 72 時間目の組織像を示す。上段はヘマトキシリン・エオジン染色を、下段は抗マウスマクロファージ抗体 (F4/80 単クローン抗体) で浸潤マクロファージを褐色に染色する免疫組織化学法を用いている。(文献 25 改変)

核球が胸水中に残存すると共に、肺実質にまで炎症が拡大した²⁵⁾。

上述のごとく、S19 リボソームタンパク質多量体の架橋化は 122 番目のリジン残基と 137 番目のグルタミン残基の間で起こる⁵⁾。そこで、マウスの S19 リボソームタンパク質遺伝子を、137 番目のグルタミンをグルタミン酸に変異させた S19 リボソームタンパク質人工遺伝子に置き換えたノック・イン・マウスを作成した。このマウスでは、リボソームの機能は正常で、S19 リボソームタンパク質のリボソーム外機能だけが選択的に失われていると考えられる (図 13)。このマウスの胸腔にカラゲニンだけを注入したところ、24 時間後にも胸水中に多核球が残存し、肺実質にまで炎症が拡大していた (図 14)。このマウスにおいて、S19 リボソームタンパク質多量体と同じ機能を持つ上記の C5a/RPS19 をカラゲニンとともに胸腔内に注入したところ、24 時間目の胸膜炎も肺実質の炎症も抑制された²⁵⁾。

したがって、S19 リボソームタンパク質多量体は、急性炎症を終焉させ、残存多核球による過剰な組織破壊を防止する役割も持つと考えることができる (図 15)。多核球は急性炎症を主宰する白血球と位置付けられている。多核球の C5a 受容体が C5a の作用を受けた場合には、多核球は、浸潤したり、血管透過性を亢進させたりして、急性炎症を促進する。一方、同じ多核球の C5a 受容体が、S19 リボソームタンパク質多量体の作用を受けた場合には、多核球はアポトーシスに陥って、急性炎症は終焉することになる。

赤芽球成熟における S19 リボソームタンパク質多量体と C5a 受容体の役割

話題が大きく変わるが、赤血球が出来るには赤芽球が脱核しなければならない。この過程でアポトーシスの機構が一部流用されているという説がある。しかも、前赤芽球から赤芽球そして脱核して網状赤

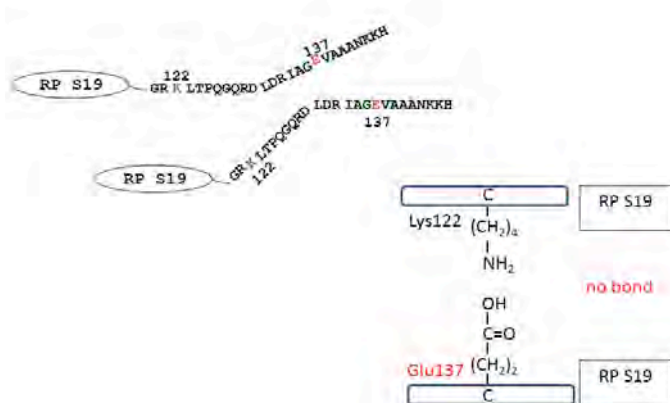


図 13. ノック・イン・マウスにおいてリボソーム外機能を選択的に消失した Gln137Glu- S19 リボソームタンパク質の模式図

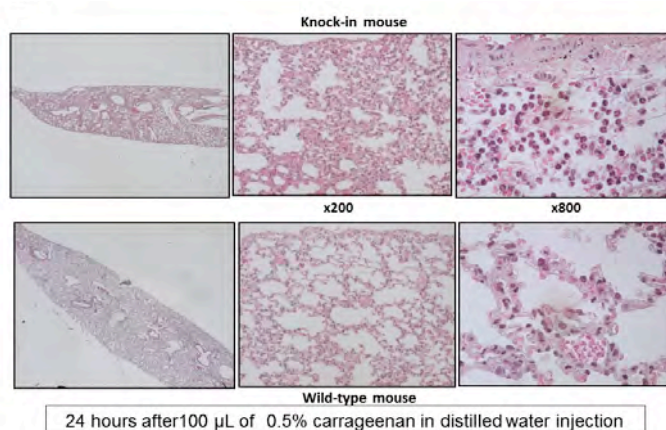


図 14. Gln137Glu- S19 リボソームタンパク質遺伝子ノック・イン・マウスにおけるカラゲニン胸膜炎の増悪
0.5%カラゲニンを胸腔内に注射後 24 時間目の肺の組織像 (ヘマトキシリン・エオジン染色) を示す。上はノック・イン・マウスで、下は野生型マウスの例である。

血球になる成熟過程は、骨髓のマクロファージの表面に接触した状態、すなわち赤芽球造血島で進行し、放出された核 (pyrenocyte)はその育成役マクロファージ (nursing macrophage)が貪食処理する。我々はこの過程が、アポトーシス細胞がマクロファージに貪食される上記の過程とよく似ていると考えた。

そこで、臍帯血から分離した赤芽球や、K562 という赤白血病由来の株化細胞を hemin 存在下で分

化させた赤芽球を使って調べてみると、赤芽球はトランスグルタミナーゼを持っていて、S19 リボソームタンパク質多量体を生成して放出することがわかった。しかも、赤芽球は C5a 受容体も産生していた²⁶⁾ (図 16)。そこで、K562 由来の赤芽球と HL-60 から分化させたマクロファージと一緒に培養すると、造血島の形成が観察され、しかも、S19 リボソームタンパク質多量体を中和する抗体や C5a 受容体ブロッカーでその造血島形成は阻害された²⁷⁾。また、ヒト、ブタ、モルモツ

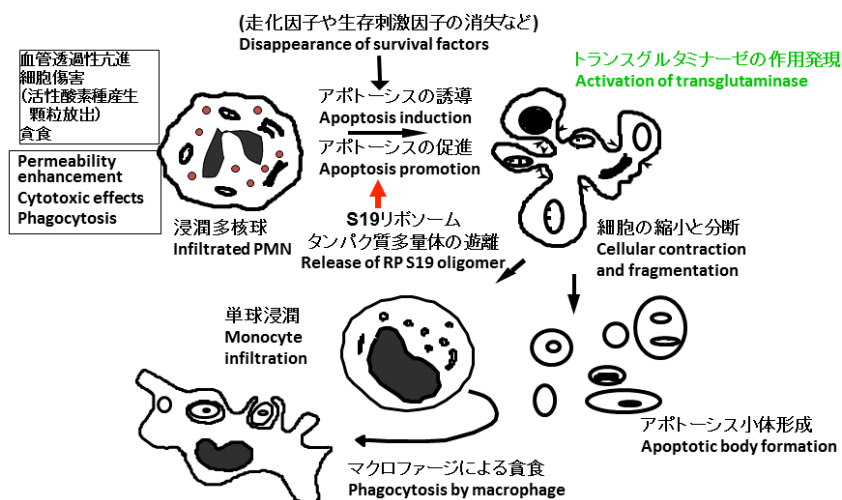


図 15. S19 リボソームタンパク質多量体による多核球アポトーシス促進とマクロファージ動員を介した急性炎症反応の収束機構

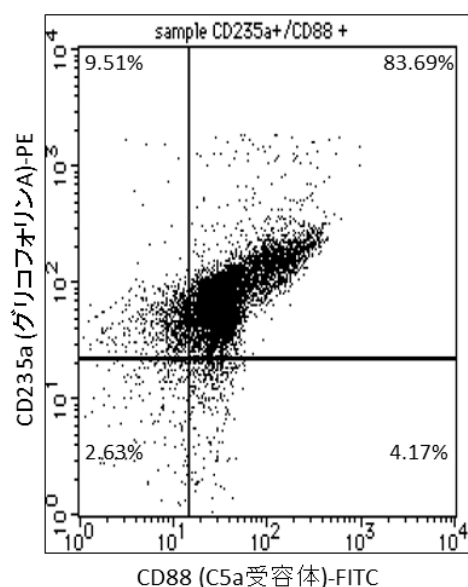


図 16. ヒト臍帯血赤芽球膜における C5a 受容体の存在

臍帯血から分離した赤芽球を用いておこなった細胞表層のグリコフォリン A と C5a 受容体 (CD88) についての FACS 解析結果を示す。赤芽球のマーカであるグリコフォリン A を持つ細胞の 90% が、C5a 受容体を有していた。(文献 26 改変)

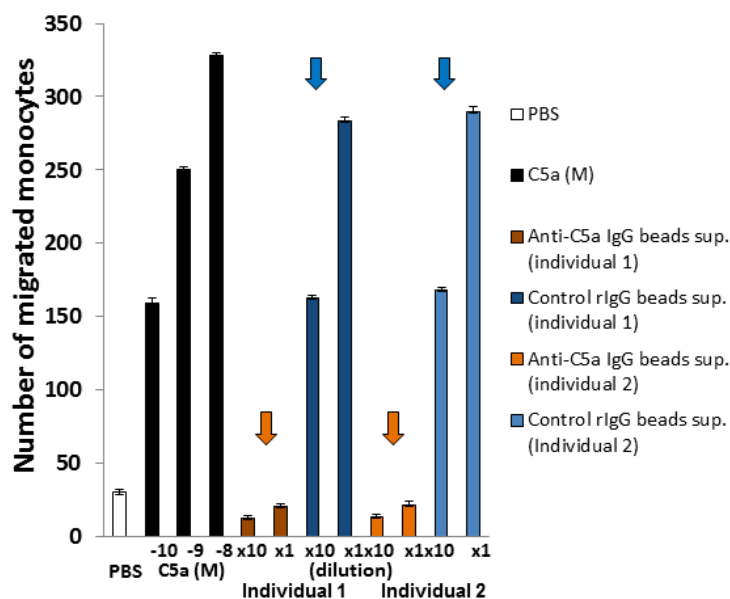


図 17. 正常ヒト骨髓液における S19 リボソームタンパク質多量体の存在

骨髓液の単球特異的な走化活性の存在とその抗 C5a 抗体 (抗 S19 リボソームタンパク質多量体抗体として使用) による抑制結果を、2 例の正常ヒトについて示す。走化因子の対照としては C5a を用いた。

トの骨髓組織液中にはS19リボソームタンパク質多量体が存在していた（図 17）。そして、モルモットを瀉血して造血亢進状態に導くと、骨髓のS19リボソームタンパク質多量体の濃度は8倍ほどに上昇した。そこで、瀉血状態のモルモットにS19リボソームタンパク質多量体を中和する抗体やC5a受容体ブロッカーを投与したところ、通常は4日目には回復してしまう貧血状態が依然として持続していた²⁶⁾（図 18）。

これらの結果は、赤芽球の成熟過程では、S19リボソームタンパク質多量体とC5a受容体を軸としたアポトーシス細胞の貪食処理に類似した分子機構が機能していることを示している（図 19）。K562細胞内の遺伝子発現を人為的に変化させた実験の結果から、この分子機構の中では、S19リボソームタンパク質多量体-C5a受容体系によるGタンパク質シグナル調節因子3（regulator of G protein signaling 3）の遺伝子発現がとくに重要であること

も明らかになった。

骨髓の赤芽球造血島では、育成役マクロファージから多数の細胞突起が伸びて多くの赤芽球と接触していることが電子顕微鏡により観察されている。S19リボソームタンパク質多量体のC5a受容体への結合が、自由細胞型マクロファージの場合には遊走を引き起こすように、局在した育成役マクロファージの場合には細胞突起の走化的な伸長を引き起こすと推察している。

海馬形成と機能維持におけるS19リボソームタンパク質多量体-C5a受容体系の役割

数年前に、脳海馬の第3アンモン角の神経細胞と歯状回顆粒状神経細胞の軸索突起が作るシナプスにC5a受容体が存在しているという報告が出た。歯状回顆粒状神経細胞は、成体になっても再生して入れ替わっていて、空間認識に関する記憶に関与していることが知られている。我々は、ここでもS19リボ

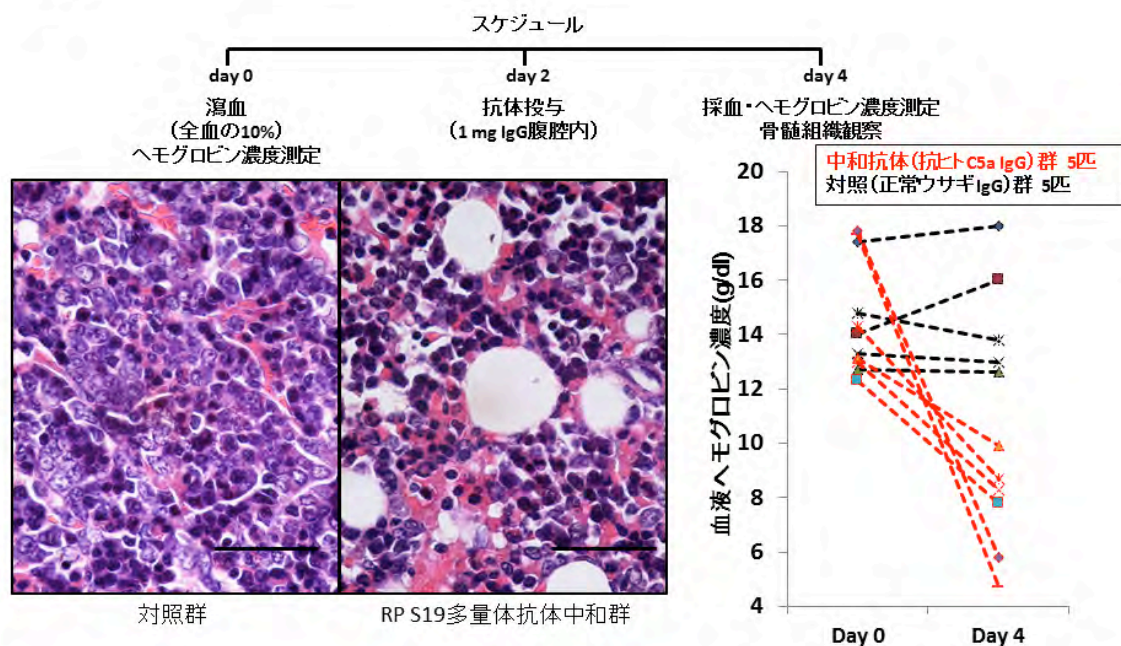


図 18. モルモットを瀉血して惹起した骨髓の造血反応と、その反応による末梢血貧血の改善の、抗S19リボソームタンパク質多量体抗体投与による抑制

上段のスケジュールのように、瀉血後、腹腔内にS19リボソームタンパク質多量体中和抗体（抗C5a抗体を使用）あるいは対照の正常ウサギIgGを投与して、両群間の骨髓組織を末梢血のヘモグロビン濃度を比較した。骨髓中のS19リボソームタンパク質多量体の機能が止まると、造血が抑制され、貧血が持続する。（文献 26 改変）

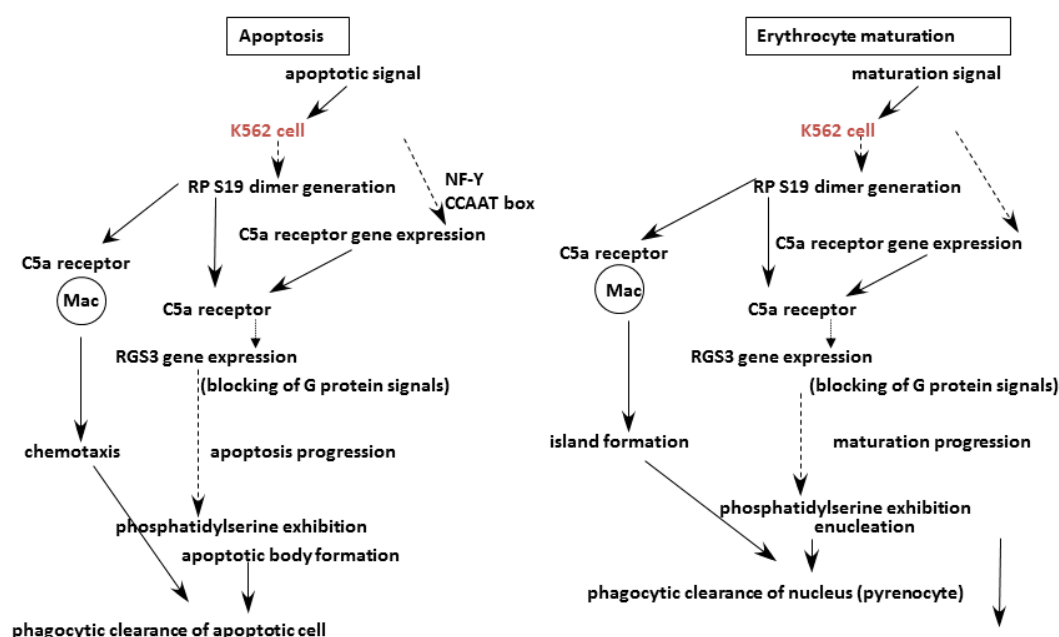


図 19. K562 細胞培養系におけるアポトーシスと赤血球成熟間の分子機構の類似性

K562 細胞を 0.5 mM MnCl_2 刺激によってアポトーシスに誘導した場合と、30 μM hemin 刺激によって赤芽球へ分化させた場合に観察されたそれぞれの分子機構を、比較的に示している。C5a 受容体遺伝子の発現は、nuclear factor Y (NF-Y) が仲介していると考えられる。C5a 受容体に S19 リボソームタンパク質多量体が結合した際に、regulator of G protein signaling 3 (RGS 3) 遺伝子が発現して G タンパク質を介した細胞内シグナル伝達を抑制することで、アポトーシス進行と赤血球成熟の進行を共に促進していると考えられる。

ソームタンパク質多量体—C5a 受容体系が機能しているのではないかと考えた。

そこで、モルモットの海馬と大脳皮質の抽出液を作って単球特異的な走化活性を調べてみたところ、活性は海馬の方だけに存在していた。更に、海馬抽出液の単球走化活性を、上記の S19 リボソームタンパク質多量体を生成できない Gln137Glu-S19 リボソームタンパク質遺伝子ノック・イン・マウスと野生型マウスの間で比較したところ、前者は後者の 3 分の 1 (濃度/活性曲線を用いた比較) に減少していた (図 20) (機序は不明であるが、Gln137Glu-S19 リボソームタンパク質は、野生型 S19 リボソームタンパク質と異なり、単量体で、S19 リボソームタンパク質多量体の 3 分の 1 程度の走化活性を有するので、この活性は単量体の Gln137Glu-S19 リボソームタンパク質によるものと考えている)。これらの実験から、海馬選択的な S19 リボソームタンパク質多

量体の存在が明らかになった。この実験の過程で、Gln137Glu-S19 リボソームタンパク質遺伝子ノック・イン・マウスの海馬が小さいことに気付いた。そこで海馬の重量を比較したところ、ノック・イン・マウスでは野生型マウスの 70% の重さしかなく、海馬の低形成 (あるいは萎縮) が認められた (図 21)。

ヒトにおける海馬機能低下の症状として、短期記憶の障害や精神的ストレスに対する耐性低下が知られている。そこで、行動学的な手法を使ってマウスを調べたところ、ノック・イン・マウスには空間記憶障害があり、しかも簡単に不安感情に陥る性格を持っていることが明らかになった²⁸⁾ (図 22)。

このようなことから、海馬における成人性神経細胞新生においても、S19 リボソームタンパク質多量体が重要な役割を果たしているものと考えられる。海馬の歯状回顆粒状神経細胞の成人性神経細胞新生において、その軸索である苔状線維が、海馬第 3 ア

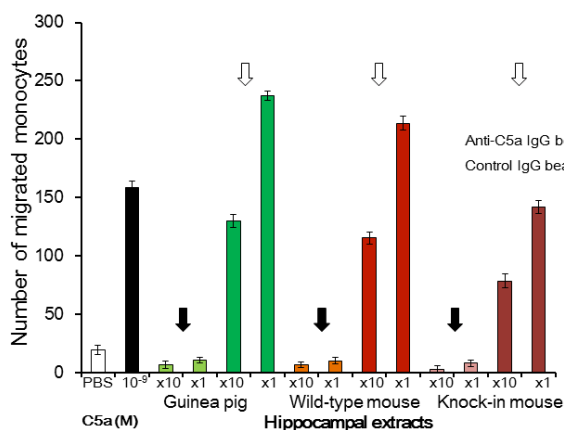
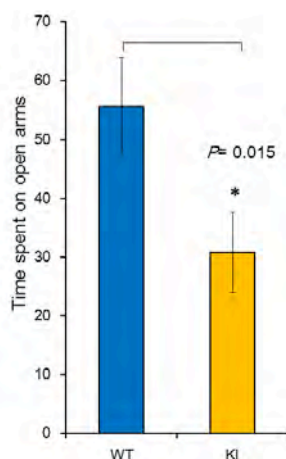


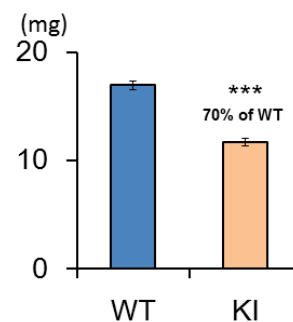
図 20. 海馬における S19 リボソームタンパク質多量体の存在

モルモット (Guinea pig)、野生型マウス (Wild-type mouse) 及び Gln137Glu-S19 リボソームタンパク質遺伝子ノック・イン・マウス (Knock-in mouse) から海馬を分離して抽出液を調製し、抗 C5a 抗体ビーズ (Anti-C5a IgG beads) あるいは対照 IgG ビーズ (Control IgG beads) による吸収をおこなった後、上清試料中に含まれる単球走化活性を、濃度を変えて (x1, x10) 測定した。走化因子の対照としては C5a を用いた。



22. Gln137Glu-S19 リボソームタンパク質遺伝子ノック・イン・マウスに見られる過剰恐怖心反応

高い位置に配置された十字型迷路に置かれたマウス (右写真) が、壁のない迷路の方で過ごす時間の長さを、野生型マウス (WT) と Gln137Glu-S19 リボソームタンパク質遺伝子ノック・イン・マウス (KI) との間で比較した。恐怖心が好奇心を凌駕すると、壁のない迷路の方で過ごす時間が減少すると考えられる。



Wild type: 11 mice (22 hippocampi) 16.9 ± 1.8 mg
Knock-in: 10 mice (20 hippocampi) 11.7 ± 1.6 mg

21. Gln137Glu-S19 リボソームタンパク質遺伝子ノック・イン・マウスにおける海馬の低形成 (あるいは萎縮)

野生型マウス (Wild-type, WT) 11 匹と Gln137Glu-S19 リボソームタンパク質遺伝子ノック・イン・マウス (Knock-in, KI) 10 匹の海馬の重量を比較した結果を示す。

ンモン角領域 (CA3) の錐体細胞に向かって伸びていき、錐体細胞の樹状突起とシナプスを形成する。この方向性を持った軸索の伸展に、S19 リボソームタンパク質多量体-C5a 受容体系が、ガイダンス系として関与すると推察している。

S19 リボソームタンパク質多量体-C5a 受容体系の、多核球と単球における細胞内シグナル伝達系の相違

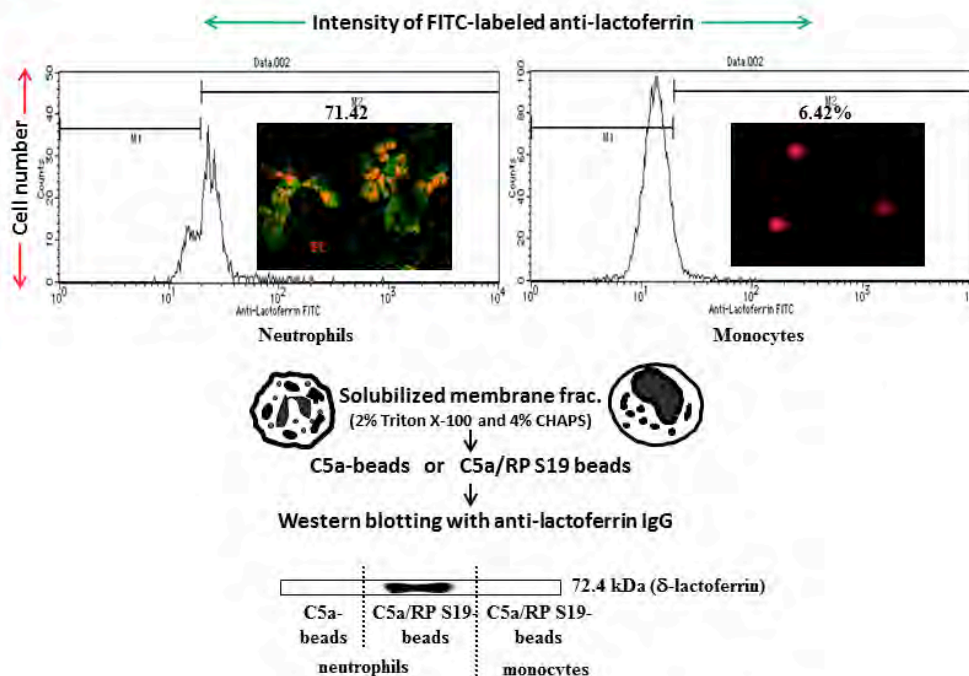
こうなると、単球/マクロファージと、多核球やアポトーシス刺激細胞あるいは赤芽球の間で S19 リボソームタンパク質多量体の機能が異なっている分子メカニズムを明らかにする必要にせまられる。我々は、上述のごとく、S19 リボソームタンパク質のカルボキシ末端部位の 12 アミノ酸残基がアンタゴニストへ

の切り替え機能を持っていたことから、このカルボキシ末端部位と結合する細胞内分子が、多核球やアポトーシス刺激細胞に存在しているために、走化性シグナルの発生が抑制される一方で、アポトーシスが促進するのではないかと考えた。

そこで、多核球を、C5a を作用させたものと C5a/RPS19 を作用させた 2 群に分けて、これらの走化因子と C5a 受容体との複合体と一緒に分離されてくる細胞内の分子を比較した。C5a/RPS19 の場合のみ δ ラクトフェリンという分子が分離された。 δ ラクトフェリンは、ラクトフェリンと異なって、細胞内に局在して転写因子として機能する分子である。 δ ラクトフェリンは多核球では産生されていたが、単球中には存在しなかった (図 23)。さらに δ ラクトフェリンは δ アネキシン A3 という分子と会合した。 δ アネキシン A3 も、多核球では産生されていたが単球中には存在しなかった。HL-60 という未熟な白血球系の株化細胞は、培養条件を変えると多核球

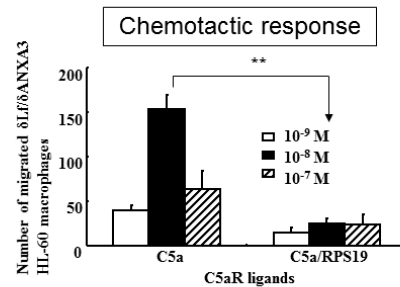
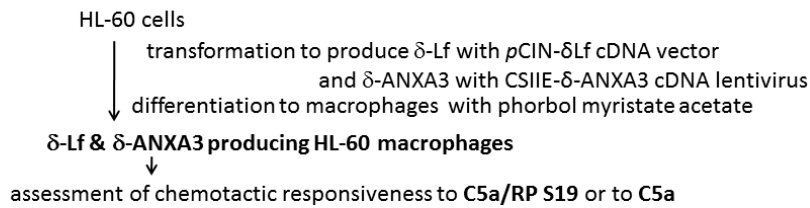
様にも単球様にも分化させることができる。RNA 干渉法を用いて δ ラクトフェリンを作れない多核球様細胞を調製したところ、単球と同じように、C5a に対しても C5a/RPS19 に対しても走化性を示すように変化していた。逆に、強制発現ベクターを用いて、 δ ラクトフェリンと δ アネキシン A3 の両方を産生する単球様細胞を調製したところ、多核球と同じように、C5a に対しては走化できるが、C5a/RPS19 に対しては走化できないように変化していた (図 24)。

上述のごとく、 δ ラクトフェリンは核に移行して転写因子として機能することが知られている。 δ ラクトフェリンが発現させる遺伝子を調べたところ、その多くがアポトーシス促進機能を持つもので、G タンパク質シグナル調節因子 3 も含まれていた。つまり、 δ ラクトフェリンと δ アネキシン A3 を持つ多核球の場合は、C5a 受容体と結合した S19 リボソームタンパク質多量体あるいは C5a/RPS19 の C 末端部位が δ ラクトフェリンと δ アネキシン A3 の会合



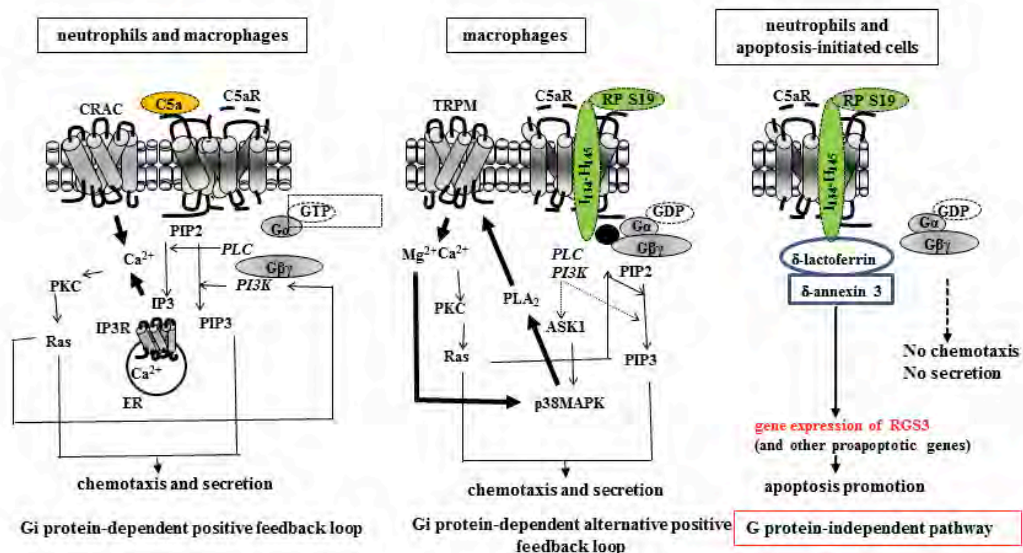
23. 多核球選択的な δ ラクトフェリンの存在

上段は、蛍光標識した抗ラクトフェリン抗体を用いた FACS 解析と免疫細胞化学の結果を、多核球 (Neutrophils) と単球 (Monocytes) を比較して示す。下段は、多核球と単球の抽出液について、抗ラクトフェリン抗体を用いたウエスタンブロット法による比較解析した結果を示す。



24. δ ラクトフェリンおよび δ アネキシン A3 産生性への形質変換がもたらす HL-60 マクロファージの C5a/RP S19 に対する走化反応の欠如

HL-60 細胞に、 δ ラクトフェリン cDNA ベクター(pCIN- δ Lf cDNA vector)と δ アネキシン A3 cDNA ウイルス(CSIIIE- δ -ANXA3 cDNA lentivirus)を挿入してこれら 2 種類のタンパク質を強制発現させた後、phorbol myristate acetate 存在下でマクロファージに分化させ、C5a と C5a/RPS19 に対する走化性を測定した。これら 2 種類のタンパク質が存在すると、マクロファージ系の細胞でも、C5a/RPS19 に対する走化が選択的に抑制される。



25. S19 リボソームタンパク質多量体-C5a 受容体系の細胞細内シグナル伝達経路に関する多核球と単球における相違

左図は、多核球と単球共有の C5a-C5a 受容体経路を示す。中央と右図は、我々が明らかにしてきた S19 リボソームタンパク質多量体-C5a 受容体系の細胞細内シグナル伝達経路を、多核球と単球それぞれについて示す。

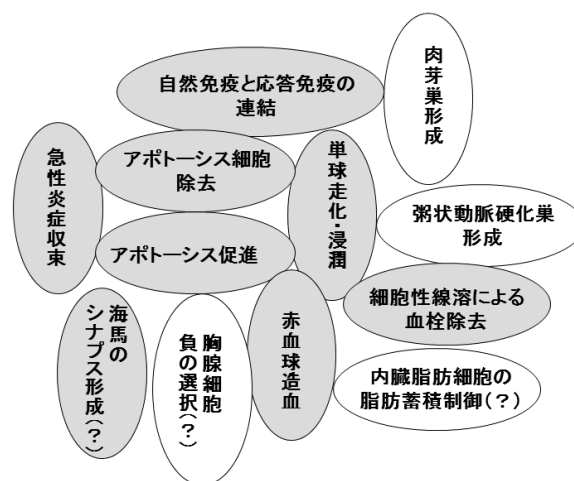
体に結合してしまうことで、C5a 受容体からの走化シグナルの発生が妨げられる一方で、その δ ラクトフェリンが核に移行して G タンパク質シグナル調節因子 3 などの遺伝子を発現させることで、アポトーシスを促進すると考えられる。一方、 δ ラクトフェリンも δ アネキシン A3 も持たない単球の場合は、S19 リボソームタンパク質多量体が結合した C5a 受容体から走化性シグナルが発せられて遊走することになるわけである。

S19 リボソームタンパク質多量体が C5a 受容体に結合した際の細胞質内シグナル伝達経路に関して、これまでに我々が明らかにした範囲内の、多核球と単球における違いを図 25 に示す。図の右側に示しているように、S19 リボソームタンパク質多量体の C5a 受容体への結合は、G タンパク質共役性の機構に関してはアンタゴニストとして作用する一方で、 δ ラクトフェリンという転写因子を介する経路に関してはアゴニストとして作用する機構が存在すると考えられる。 δ ラクトフェリンは、Ser10 残基の、N-acetyl glucosamine (GlcNAc) 修飾とリン酸化修飾との切り替えにより転写因子としての機能が調節されているという考えがある。我々の予備実験の結果でも、S19 リボソームタンパク質多量体-C5a 受容体による δ ラクトフェリンを介したアポトーシス促進作用は、脱 GlcNAc 酵素 (O-GlcNAcase) の阻害剤で抑制された。多核球や赤芽球の C5a 受容体の近傍には脱 GlcNAc 酵素が存在していて、C5a 受容体に S19 リボソームタンパク質多量体が結合した際に活性化されて δ ラクトフェリン Ser10 残基の脱 GlcNAc 化を引き起こすと推察している。

[まとめ]

S19 リボソームタンパク質は、リボソームの構成成分であるのみならず、血漿タンパク質としても存在する。単球/マクロファージ選択的白血球浸潤、血液凝固、アポトーシス、急性炎症終焉、赤芽球成熟あるいは海馬における成人神経新生などの過程にお

いて、トランスグルタミナーゼの作用を受けて多量体化され、図 26 に示すような多彩なリボソーム外機能を発揮する。このリボソーム外機能は、全て、細胞膜の C5a 受容体への結合を介して発揮される。C5a 受容体からのシグナル伝達は、G タンパク質シグナル系以外に、転写因子を介した系も関与していると考えられる。



26. S19 リボソームタンパク質多量体-C5a 受容体系の多彩なリボソーム外機能
図に示す機能のうち、この総説では網掛けのものを取り上げた。また、(?) が付いた機能に関しては、まだ証拠が不十分である。

[謝辞]

この総説で取り上げた内容は、著者が在職中に、熊本大学大学院生命科学研究部分子病理学分野において、同分野のスタッフや大学院生をはじめ、学内外の多数の共同研究者の参加を得て、行った研究である。全ての共同研究者に深い感謝の意を表する。

[利益相反]

「S19 リボソームタンパク質多量体-C5a 受容体システムの多彩な役割」に関する研究の一部は、国立大学法人熊本大学と中外製薬株式会社間の共同研究「貧血への単球の関与に関する基礎的検討」の中で実施した。

[参考文献]

- 1) Matsubara S, et al. Complement C4 derived monocyte-directed chemotaxis inhibitory factor: A molecular mechanism to cause polymorphonuclear leukocyte predominant infiltration in rheumatoid arthritis synovial cavities. *Am J Pathol.* 138:1279-1291 (1991)
- 2) Tsuruta T, et al. Novel function of C4a anaphylatoxin: Release from monocytes of protein which inhibits monocyte chemotaxis. *Am J Pathol.* 142:1848-1857 (1993)
- 3) Xie P, et al. Inhibitory effects of C4a on chemoattractant and secretagogue functions of the other anaphylatoxins via Gi protein-adenylyl cyclase inhibition pathway in mast cells. *Int Immunopharmacol.* 12:158-168 (2012)
- 4) Nishiura H, et al. Monocyte chemotactic factor in rheumatoid arthritis synovial tissue. Probably a cross-linked derivative of S19 ribosomal protein. *J Biol Chem.* 271:878-882 (1996)
- 5) Nishiura H, et al. Determination of the cross-linked residues in homo-dimerization of S19 ribosomal protein concomitant with exhibition of monocyte chemotactic activity. *Lab Invest.* 79: 915-923 (1999)
- 6) Nishiura H, et al. S19 ribosomal protein cross-linked dimer causes monocyte predominant infiltration by means of molecular mimicry to complement C5a. *Lab Invest.* 78:1615-1623 (1998)
- 7) Shibuya Y, et al. Identification of receptor binding sites of monocyte chemotactic S19 ribosomal protein dimer. *Am J Pathol.* 159:2293-2301 (2001)
- 8) Nishiura H, et al. Base of molecular mimicry between human ribosomal protein S19 dimer and human C5a anaphylatoxin. *Int Immunopharmacol.* 10:1541-1547 (2010)
- 9) Revollo I, et al. Agonist and antagonist dual effect of the cross-linked ribosomal protein dimer in the C5a receptor-mediated respiratory burst reaction of phagocytic leukocytes. *Inflamm Res.* 54:82-90 (2005)
- 10) Shrestha A, et al. Switch moiety in agonist/antagonist dual effect of S19 ribosomal protein dimer on leukocyte chemotactic C5a receptor. *Am J Pathol.* 162:1381-1388 (2003)
- 11) Oda Y, et al. Agonist and antagonist dual effect of C5a-chimera bearing S19 ribosomal protein tail portion on C5a receptor of leukocytes. *J Biochem.* 144:371-381 (2008)
- 12) Kukita I, et al. Fifth component of complement (C5) derived high molecular weight macrophage chemotactic factor in normal guinea pig serum. *Inflammation.* 11:459-479 (1987)
- 13) Okamoto M, et al. Factor XIII-dependent generation of 5th complement component (C5)-derived monocyte chemotactic factor coinciding with plasma clotting. *Biochim Biophys Acta.* 1138:53-61 (1992)
- 14) Nishiura H, et al. Ribosomal protein S19 is present in plasma as a complex with prothrombin. *Eur J Haematol.* 86:436-441 (2011)
- 15) Semba U, et al. A plasma protein indistinguishable from ribosomal protein S19: Conversion to a monocyte chemotactic factor by a factor XIIIa-catalyzed reaction on activated platelet membrane phosphatidylserine in association with blood coagulation. *Am J Pathol.* 176:1542-1551 (2010)

- 16) Ota Y, et al. The presence of ribosomal protein S19-like molecule in guinea pig plasma and its role in blood coagulum resorption. *Exp Mol Pathol.* 90:19-29 (2011)
- 17) Chen J, et al. Role of blood ribosomal protein S19 in coagulum resorption: A study using Gln137Glu-ribosomal protein S19 gene knock-in mouse. *Pathol Int.* 64:543-550 (2014)
- 18) Horino K, et al. A monocyte chemotactic factor, S19 ribosomal protein dimer in phagocytic clearance of apoptotic cells. *Lab Invest.* 78(5):603-617 (1998)
- 19) Nishimura T, et al. Apoptotic cells of an epithelial cell lines, AsPC-1, release monocyte chemotactic S19 ribosomal protein dimer. *J Biochem.* 129:445-454 (2001)
- 20) Nishiura H, et al. S19 ribosomal protein dimer augments metal-induced apoptosis in a mouse fibroblastic cell line by ligation of the C5a receptor. *J Cell Biochem.* 94:540-553 (2005)
- 21) Shrestha A, et al. Acquired immune response as a consequence of the macrophage-dependent apoptotic cell clearance and role of the monocyte chemotactic S19 ribosomal protein dimer in this connection. *Lab Invest.* 79:1629-1642 (1999)
- 22) Yamamoto T. Role of the ribosomal protein S19 dimer and the C5a receptor in pathophysiological functions of phagocytic leukocytes (review). *Pathol Int.* 57:1-11 (2007)
- 23) Taniguchi K, et al. Roles of the ribosomal protein S19 dimer and chemically induced apoptotic cells as a tumor vaccine in syngeneic mouse transplantation models. *J Immunother.* 34:16-27 (2011)
- 24) Taniguchi K, et al. Requirement of acquired immune system in successful cancer chemotherapy with cis-diamminedichloroplatinum [II] in a syngeneic mouse tumor transplantation model. *J Immunother.* 34:480-489 (2011)
- 25) Nishiura H, et al. Involvement of regional neutrophil apoptosis promotion by ribosomal protein S19 oligomers in resolution of experimental acute inflammation. *Pathol. Int.* 63:581-590 (2013)
- 26) Chen J, et al. Involvement of cross-linked ribosomal protein S19 oligomers and C5a receptor in definitive erythropoiesis. *Exp Mol Pathol.* 95:364-375 (2013)
- 27) Nishiura H, et al. Dual functions of the C5a receptor as a connector for the K562 erythroblast-like cell-THP-1 macrophage-like cell island and as a sensor for the differentiation of the K562 erythroblast-like cell during hemin-induced erythropoiesis. *Clin Dev Immunol.* (2012) doi:10.1155/2012/187080
- 28) Chen J, et al. Mutation of the key residue for extraribosomal function of ribosomal protein S19 cause increased grooming behaviors in mice. *Neurosci Lett.* 629:221-226 (2016)