

令和 3 年 5 月 18 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K01945

研究課題名(和文)急性相反応物質としてのFactor XIII-Aの活性化と創傷治癒機構の作動

研究課題名(英文)Activation of Factor XIII-A in the acute phase of post injury and its involvement in wound healing

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) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：組織中のCellular FXIII-A (cFXIII-A)は、通常は不活性化状態であるが、どのように活性化されるかは不明であった。本研究ではcFXIII-Aの発現誘導が起こるゼブラフィッシュ視神経損傷後の網膜を実験材料とし、その活性化機構について調べた。その結果、Heat shock factor 1の発現上昇がより早期に起こりcFXIII-Aの遺伝子に結合することがわかった。この結合部位はcFXIII-Aが活性化する際に切り離される "Activation peptides" 以降の配列と推測され、活性化型のcFXIII-Aが直接的に転写・翻訳されるという発現機構の存在が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血液凝固因子のFactor XIII-Aについては、トロンピンが活性化されることによって"Activation peptides"が切断され、活性化タイプのFXIII-Aに変化することが知られている。ところが、組織中や細胞に存在するcellular FXIII-A (cFXIII-A)の活性化機構については、十分な知見が得られていなかった。今回のゼブラフィッシュの視神経損傷モデルを使用することにより、まず、Heat shock factor 1が視神経損傷後のごく初期の段階で発現増加し、この関与によって、直接、活性化タイプのcFXIII-Aが発現するという、新たな活性化機構が解明された。

研究成果の概要(英文)：Cellular Factor XIII (cFXIII), which is distributed in various tissues and cells, usually exists as an inactive type. Here, we investigated the molecular mechanism of cFXIII gene activation using genetic information from the A-subunit of cFXIII (cFXIII-A). cFXIII-A mRNA, lack of "activation peptides" coding region, is rapidly upregulated in the zebrafish retina after optic nerve injury. Chromatin immunoprecipitation provides direct evidence of enrichment of cFXIII-A genomic DNA bound with heat shock factor 1 (HSF-1), which is immediately upregulated in damaged retina. These findings indicate that rapid HSF-1 binding to the cFXIII-A gene results in an active form of cFXIII-A protein in the zebrafish retina after optic nerve injury without thrombin.

研究分野：神経化学

キーワード：cellular Factor XIII-A heat shock factor 1 optic nerve injury zebrafish retina regeneration activation peptides short type cFXIII-A

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

血液凝固因子として知られる Factor XIII (FXIII) は、その構成の一部で酵素活性ユニットからなる A-subunit (FXIII-A) のダイマーが、骨、肺、脾、精巣など様々な組織中にも cellular FXIII-A (cFXIII-A) として存在することが近年明らかとなってきた。魚類視神経の損傷実験において、cFXIII-A は視神経の損傷直後から網膜で発現上昇し、視神経の再生・修復に与関する重要な分子であることを発見した。しかもこの修復機構により、魚類では視覚機能も完全に回復することが可能である。FXIII-A は、損傷後短時間で起こる急性相反応物質の如く視神経損傷局所で特に強く活性化し、また網膜においても同様に活性上昇が見られるが、この視神経再生過程での FXIII-A の活性化を誘導する分子や何を基質として組織修復機構が作動するかなど、不明な点が多い。

## 2. 研究の目的

cellular FXIII-A が、生体内においてどのように活性化されるのかを解明することが本研究の第一目的である。そこで、cFXIII-A が確実に発現する *in vivo* の実験系として、ゼブラフィッシュの視神経損傷モデルを用いた。ゼブラフィッシュなどの魚類の視神経は、損傷を受けても完全なる修復・再生が可能であり、視覚機能が完全に回復する。この再生過程において、FXIII-A は損傷直後から網膜と視神経の両方に発現上昇が見られ、視神経の再生・修復に与関する再生関連分子の1つであることをこれまでに確認した。このことから、視神経損傷後にどのように網膜において cFXIII-A が活性化するのか、その活性化機構に焦点をしばって解明を試みた。

## 3. 研究の方法

### 1) ゼブラフィッシュ視神経損傷前後のサンプル採取と cFXIII-A の経時的変動について

実験的に視神経をクラッシュし損傷させる。その後、損傷後急性期の FXIII-A の活性上昇初期 (0, 1, 2, 3, ... 日後) の網膜、視神経および視蓋より組織を摘出、total RNA を抽出する。また、眼球 - 視神経 - 視蓋の視覚に与関する一連の組織を摘出後、4% パラホルムアルデヒドで固定し、OCT 包埋後凍結切片用の組織ブロックを作成する。無処置(0 d)をコントロール群とし、リアルタイム PCR によって mRNA レベルの経時変化、*in situ* hybridization や免疫組織化学染色により cFXIII-A の網膜組織内での局在を調べる。

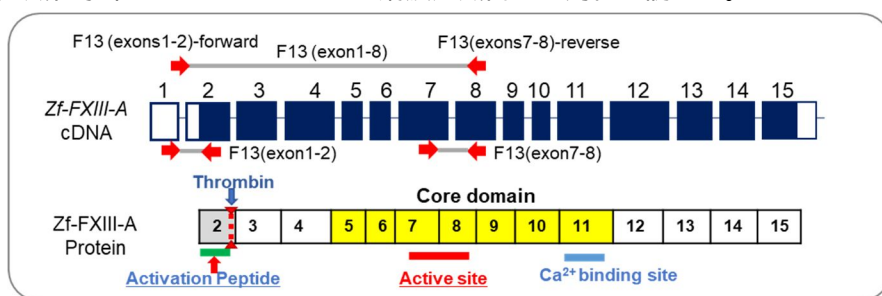


図1 ゼブラフィッシュ FXIII-A 遺伝子およびタンパクの構造の概略

リアルタイム PCR の Primer は、exon 1-2 の領域と exon 7-8 の領域の2か所を設定し解析する。exon 1-2 のコード領域は、活性化タイプの FXIII-A タンパクでは、Activation peptide としてトロンピンにより遊離し切り離される領域であり、exon 7-8 は、酵素の活性中心をコードする領域である (図1)。

### 2) 視神経損傷後の網膜由来サンプルの cDNA のクローニングとその塩基配列の検索

コントロールおよび視神経損傷後の経時的に採取した網膜由来の total RNA をサンプルとして、FXIII-A の cDNA のクローニングとその塩基配列の

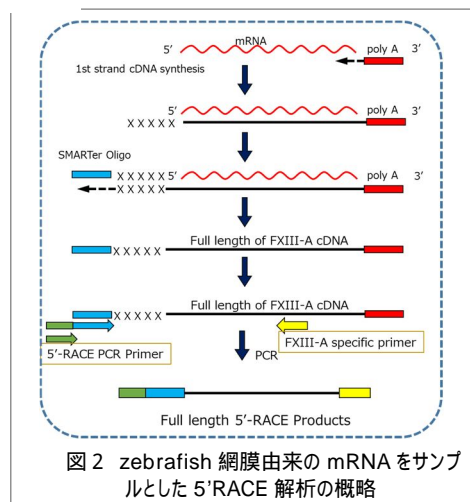
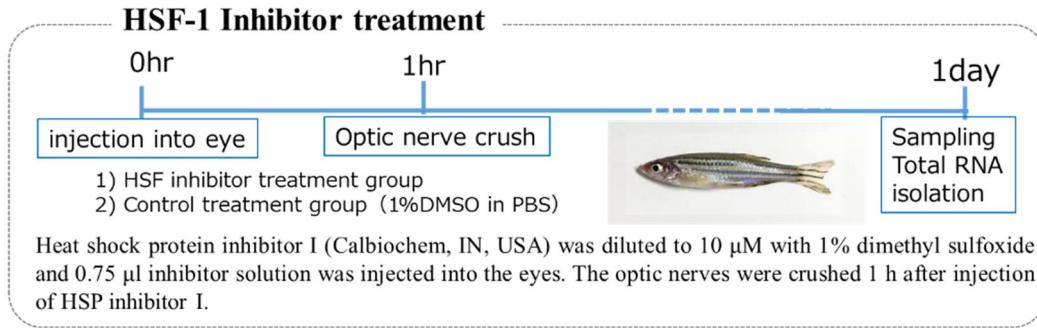


図2 zebrafish 網膜由来の mRNA をサンプルとした 5'RACE 解析の概略

解析を 5'-RACE (rapid amplification of cDNA ends) 法により行う ( 図 2 )。

### 3 ) Heat shock factor 1 (HSF-1) インヒビター投与実験

視神経損傷 1 時間前に眼球内に HSF-1 のインヒビターをインジェクションする。その 24 時間後、網膜を摘出し、total RNA を抽出としてサンプルとし HSF-1 および FXIII-A mRNA の発現について、リアルタイム PCR で解析を行う。( 下図参照)



### 4 ) クロマチン免疫沈降 (Chromatin immunoprecipitation, ChIP) アッセイ

HSF-1 と cFXIII-A 遺伝子の相互関係を調べるために、ChIP アッセイを行った。視神経損傷前と損傷後 24 時間の網膜サンプルをホモジナイズし、ホルムアルデヒド等の試薬で処理後、抗 HSF1 または通常の IgG と結合した磁性プロテイン A/G ビーズを用い免疫沈降を行った。洗浄後、HSF-1 に関連する FXIII-A のゲノム DNA を精製し、リアルタイム PCR により定量した。

## 4 . 研究成果

### 1 ) 視神経損傷後のリアルタイム PCR による網膜での FXIII-A の発現変化

視神経損傷前の網膜と損傷後の網膜から経時的に採取した total RNA を用いて、リアルタイム PCR による cFXIII-A の発現について調べた。この際、プライマーの設定は FXIII-A 遺伝子の exon1-2 の領域と exon7-8 の 2 か所を設定した。exon1-2 は、活性化する際に切り離される領域であり、exon7-8 は、酵素の活性中心をコードする領域である。その結果、exon7-8 については、視神経損傷後 1 日後から有意な発現上昇が観察され、5 日後にピークが見られたのに対し、exon1-2 は変動が見られなかった ( 図 3 )。

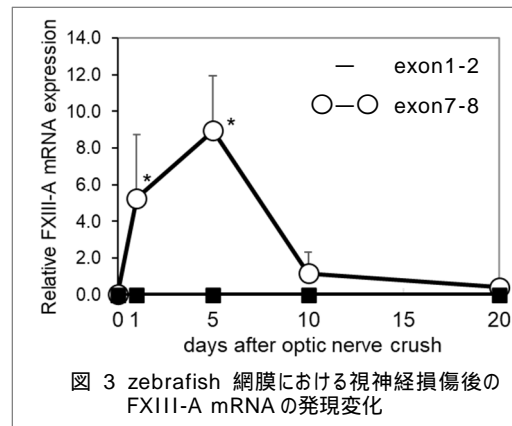


図 3 zebrafish 網膜における視神経損傷後の FXIII-A mRNA の発現変化

### 2 ) Short type cFXIII-A の発現

異なる Primer セットを用いた場合、5'領域に近い exon1-2 の発現はほとんど変化がないのに比べ、酵素活性中心をコードする領域 (exon7-8) では、著明な発現上昇が確認できた。さらに、図 4 に示すように、exon1-8 をコードする領域を PCR によって増幅すると、視神経損傷前では full length の 1,155bp のバンドが確認できる一方、視神経損傷後では経過日数に伴い、800bp の短い DNA 産物が顕著に増加した。

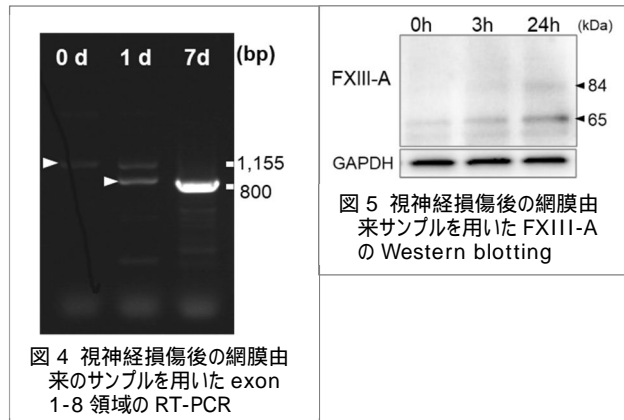


図 4 視神経損傷後の網膜由来のサンプルを用いた exon 1-8 領域の RT-PCR

図 5 視神経損傷後の網膜由来サンプルを用いた FXIII-A の Western blotting

これは、Western blotting によりタンパクレベルでの変化について調べた結果と同様で、full

length で 84kDa の FXIII-A タンパクは、視神経損傷後 24 時間で、65kDa の分子量の小さいものに置き換わっていくことが確認できた ( 図 5 )

### 3 ) 5'RACE 法による short type cFXIII-A のシーケンス解析

視神経損傷後に発現が見られる short type cFXIII-A について、5'RACE 法により詳細に解析を行った。その結果、視神経損傷後に網膜で発現する short type cFXIII-A は、exon 1-2、及び exon 3 の一部を欠如したものであることが判明した。また、この開始直前部分には、HSF binding sequences と呼ばれる配列が 2 箇所存在することが、判明した。

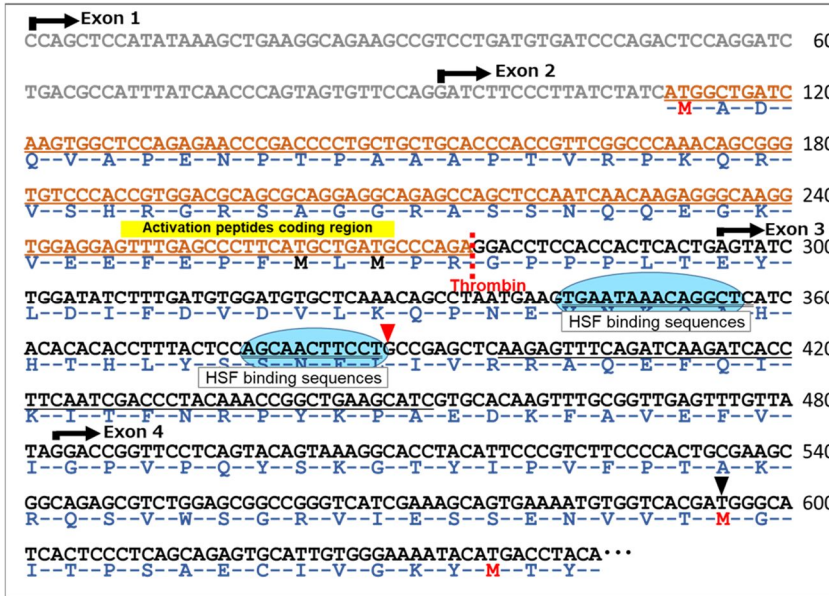


図 6  
5'RACE によるシーケンス解析結果。

損傷した網膜に由来する cFXIII-A の多くのクローンは、赤い矢頭( )から開始のクローンが多く見られた。これは、エクソン 1-2 領域とエクソン 3 の一部を欠如するものであった。この short type cFXIII-A の開始直前部分には HSF 結合配列が 2 箇所確認された。

### 4 ) Heat shock factor 1 (HSF-1)の cFXIII-A 発現への関与について

5'RACE 解析により、cFXIII-A の発現に HSF-1 が関与する可能性が示唆された。そこで、視神経損傷実験の直前にあらかじめ HSF-1 inhibitor の投与を行い、その後、視神経損傷を行って 24 時間後の網膜のサンプルを摘出、total RNA を抽出し、HSF-1 および FXIII-A の mRNA 発現についてリアルタイム PCR により解析を行った。

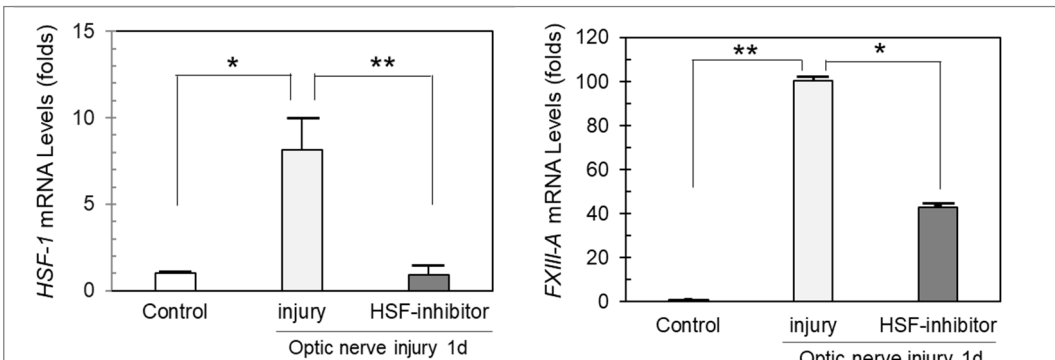


図 7 HSF-1 inhibitor 投与実験

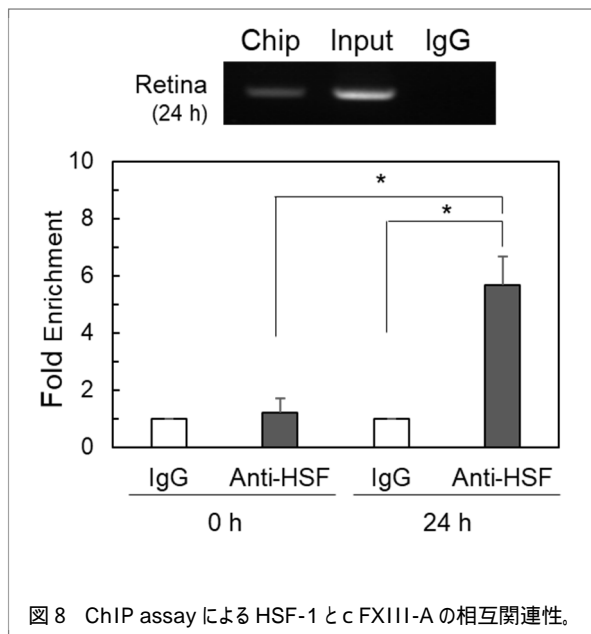
(左図) 視神経損傷 24 時間後の網膜における HSF-1 mRNA 発現は、コントロール(無処置)と比較し約 10 倍に発現が上昇するが、インヒター投与群ではコントロールレベルと変わらなかった。この条件下で、FXIII-A の mRNA 発現レベルを測定したところ、視神経損傷群はコントロール群の約 100 倍の発現を示したのに対し、HSF-1 インヒター投与群では約 40%に発現が抑制されていることがわかった (右図)。

### 5 ) ChIP アッセイによって示唆された HSF-1 誘導の cFXIII-A 発現

視神経損傷前後の網膜をサンプルとして、ChIP アッセイを行った。抗 HSF-1 抗体は、FXIII-A 遺伝子の exon 2 をコードする領域において、IgG コントロール血清と比較し約 5 倍量の FXIII-A 特異的 DNA を沈殿させることが判明した ( 図 8 )

以上の結果より、視神経損傷後に発現する HSF-1 は、FXIII-A ゲノムに結合すること

で、FXIII-A の発現を調節している可能性が示唆された。また、この FXIII-A の cellular FXIII-A としての発現は、トロンビンの関与がなくとも既に Activation peptides が欠如した short type FXIII-A として転写・翻訳され、ダイレクトに活性化タイプの cFXIII-A が損傷網膜で発現している可能性が示唆された。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Sugitani K, Ogai K, Muto H, Onodera K, Matsuoka A, Sugita T, Koriyama Y.	4. 巻 517
2. 論文標題 A Novel Activation Mechanism of Cellular Factor XIII in Zebrafish Retina After Optic Nerve Injury	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun .	6. 最初と最後の頁 57-62
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.07.003.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Sugitani K, Koriyama Y, Ogai K, Furukawa A, Kato S.	4. 巻 1074
2. 論文標題 Alternative Splicing for Activation of Coagulation Factor XIII-A in the Fish Retina After Optic Nerve Injury.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Adv Exp Med Biol.	6. 最初と最後の頁 387-393
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-3-319-75402-4_48.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Tazaki Y, Sugitani K, Ogai K, Kobayashi I, Kawasaki H, Aoyama T, Suzuki N, Tabuchi Y, Hattori A, Kitamura KI.	4. 巻 225
2. 論文標題 RANKL, Ephrin-Eph and Wnt10b are key intercellular communication molecules regulating bone remodeling in autologous transplanted goldfish scales.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.	6. 最初と最後の頁 46-58
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cbpa.2018.06.011.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Sugitani Kayo, Koriyama Yoshiki, Sera Mayuko, Arai Kunizo, Ogai Kazuhiro, Wakasugi Keisuke	4. 巻 493
2. 論文標題 A novel function of neuroglobin for neuroregeneration in mice after optic nerve injury	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 1254 ~ 1259
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2017.09.127	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kitamura KI, Andoh T, Okesaku W, Tazaki Y, Ogai K, Sugitani K, Kobayashi I, Suzuki N, Chen W, Ikegame M, Hattori A.	4. 巻 203
2. 論文標題 Effects of hyperglycemia on bone metabolism and bone matrix in goldfish scales.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.	6. 最初と最後の頁 152-158
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cbpa.2016.09.010.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計6件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Kayo Sugitani, Ayano Konno, Minami Maeda, Kazuhiro Ogai, Yoshiki Koriyama
2. 発表標題 Heat Shock Factor 1 is required for the activation of cellular Factor XIII-A as well as Heat Shock Proteins in early stage of zebrafish optic nerve regeneration
3. 学会等名 第98回日本生理学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 杉谷 加代
2. 発表標題 ゼブラフィッシュ視神経損傷モデルを使った cellular Factor XIII の活性化機構の解析
3. 学会等名 第22回 トランスグルタミナーゼ研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sugitani Kayo, Ogai Kazuhiro, Koriyama Yoshiki.
2. 発表標題 Activation mechanism of heat shock factor 1 induced after zebrafish optic nerve injury
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 K. Sugitani, Y. Koriyama, K. Ogai , S. Kato
2. 発表標題 Mechanism of neuron specific activation of Factor XIII-A after optic nerve injury for wound healing.
3. 学会等名 第61回日本神経化学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 K. Sugitani, Y. Koriyama, K. Ogai , S. Kato,
2. 発表標題 Upregulation of heat shock factor and Factor XIII-A after optic nerve injury in zebrafish.
3. 学会等名 FAOPS2019第9回アジア・オセアニア生理学会連合/第96回日本生理学会大会（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sugitani K, Ogai K, Koriyama Y, Kato S.
2. 発表標題 The role of FXIII-A activation following zebrafish optic nerve injury and its involvement in wound healing.
3. 学会等名 第95回日本生理学会大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

金沢大学医薬保健研究域保健学系 検査技術科学専攻  
lab-science.w3.kanazawa-u.ac.jp



6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	人見 清隆  (Hitomi Kiyotaka)  (00202276)	名古屋大学・大学院創薬科学研究科・教授     (13901)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関