

in vitro エラスチン繊維形成の生化学的解析
Biochemical analysis of an *in vitro* elastic fiber formation

里 史明

目次

論文リスト	p. 1
略語リスト	p. 2
第一章 緒論	p. 3
第二章 試薬リスト	p. 7
第三章 ヒト網膜色素上皮細胞を用いた新規 <i>in vitro</i> エラスチン繊維構築モデルの確立	p. 10
第四章 C 末端領域のフレームシフト変異トロポエラスチンが構築したエラスチン繊維の生化学的解析	p. 40
第五章 トロポエラスチンアイソフォームが構築するエラスチン繊維の特性	p. 59
第六章 総括	p. 73
参考文献	p. 77
謝辞	p. 82

論文リスト

本論文は、学術雑誌に掲載された次の報文を基礎とするものである。

- 1) Hirosh Wachi, Fumiaki Sato, Hayato Murata, Junji Nakazawa, Barry C. Starcher, and Yoshiyuki Seyama.
Development of a new *in vitro* model of elastic fiber assembly in human pigmented epithelial cells., Clinical Biochemistry., **38**, 643-653 (2005).
- 2) Fumiaki Sato, Hiroshi Wachi, Barry C. Starcher, Iori Maeda, Kouji Okamoto, Yoshiyuki Seyama.
Biochemical analysis of elastic fiber formation with a frameshift-mutated tropoelastin at the C-terminus of tropoelastin., Journal of Health Science. accepted.
- 3) Fumiaki Sato, Hiroshi Wachi, Barry C. Starcher, Hayato Murata, Satoshi Amano, Shingo Tajima, and Yoshiyuki Seyama.
The Characteristic of Elastic Fiber Assembled with Recombinant Tropoelastin Isoform., Clinical Biochemistry. accepted.

論文 1)を第三章に、論文 2)を第四章に、論文 3)を第五章に使用した。

略語リスト

ARPE-19; Human retinal epithelial cells, ヒト網膜色素上皮細胞

β -APN; β -aminopropionitril

CCS; Cosmic calf serum

DMEM; Dulbecco's modified eagle medium

DTT; Dithiothreitol

ELISA; Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay 酵素免疫測定法

FBS; Fetal bovine serum ウシ胎児血清

FITC; Fluorescein-5-isotiocyanate

HASMC; Human aortic smooth muscle cells, ヒト大動脈血管平滑筋細胞

HRP; Horseradish peroxidase

IPTG; Isopropyl- β -D-thiogalactoside

NHDF-Neo; 正常ヒト新生児皮膚繊維芽細胞

MAGP; Microfibril-associated glycoprotein

PE 細胞; A bovine ciliary epithelial cells, ウシ網膜色素上皮細胞

RIPA; Radioimmunoprecipitation assay

RT-PCR; Reverse transcription-polymerase chain reaction

TMB; (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine)-substrate reagent

第一章 緒論

臓器、器官あるいは組織は、個々の組織に特有の細胞と間質から構成されている。間質は細胞外マトリックスと呼ばれる巨大分子(コラーゲン、エラスチン、フィブロネクチン、ラミニン、プロテオグリカンなど)の集合体である不溶性繊維(膠原繊維、弾性繊維)や膜(基底膜)として存在している。間質は臓器、器官、組織の形態を保持するだけでなく、細胞との相互作用により、増殖や分化などの細胞機能の調節も行っている。

弾性繊維は、皮膚や肺、動脈、靭帯などの軟部組織において、弾性の保持に大きく寄与しており、この組織の破綻は、様々な障害や病変を引き起こすことが知られている。弾性繊維は、複数の成分が集合、結合している“機能複合体”であり、その“コア”となる成分のエラスチンとエラスチンとのネットワークを形成する微細繊維(マイクロフィブリル繊維; フィブリリンや microfibril-associated glycoprotein、フィビュリンなどから成る)から構成されている。

近年、エラスチンノックアウトマウスにおいて大動脈では内皮傷害が引き起こされることなく内膜肥厚が起こり、生まれて間もなく死亡することが報告された¹⁾。このことより、エラスチンが生命の維持にとって必須のタンパク質であることが証明された。また先天性のエラスチン遺伝子異常疾患として大動脈弁上狭窄症^{2, 3)}や皮膚弛緩症⁴⁾が知られており、大動脈弁上狭窄症ではエラスチン繊維の断片化を伴う動脈平滑筋細胞の異常増殖により冠動脈の狭窄が起こり、

さらに皮膚弛緩症でもエラスチン繊維の断片化が原因となり皮膚の過伸展が引き起こされることが報告されている。これらの報告からエラスチン繊維形成不全が血管や皮膚における疾患の重要な病因を担っていると思われる。

多くの間質成分の遺伝子は、複数の遺伝子でファミリーを形成することにより分子に多様性を与えるが⁵⁾、エラスチン遺伝子はファミリーを形成しない単一の遺伝子である。34個のエクソンから構成されるエラスチンは、選択的スプライシングを受けることによりその分子の多様性を持つ。現在までオルタネイティブスプライシングを受ける部位としてエクソン 22、23、24、26A、32が報告されている⁶⁻⁸⁾。特にヒト皮膚においては、ヒトエラスチンに特異的なエクソン 26Aが新生児からスプライシングされており、さらにエクソン 32も加齢に伴いそのスプライシング産物が増加することが知られている^{9,10)}。しかしながら、これらのスプライシング産物の生物学的役割はほとんど明らかにされていない。

エラスチン繊維形成機序の詳細な機序は未だ不明であるが、次に示すような複雑な過程を経て、繊維を形成すると考えられている。まず 1)エラスチンは、分子量約 68 kDa の可溶性トロポエラスチンとして細胞外に分泌される。2)単量体のトロポエラスチン分子同士が自己集合し多量化する。3)その多量体がマイクロフィブリルと分子間相互作用する。4)リジルオキシダーゼによりトロポエラスチン分子間で架橋形成しエラスチン繊維となる。トロポエラスチン分子間の分子間架橋は、アミン酸化酵素であるリジルオキシダーゼファミリーによりトロポエラスチン分子中に存在するリジン残基の ϵ -アミノ基が特異的に酸化的脱アミノ化されることにより起こる。主にこの架橋にはデスマシン、イソデスマシン

ン、リジノイロイシンが知られている。架橋形成反応は、デスモシン、イソデスモシンの場合、3個のアリジン残基と1個のリジン残基との間でピリジニウム環形成を経て行われる¹¹⁾。

マイクロフィブリル繊維は、10-12 nmの微細繊維であり、その構成成分としてフィブリリン¹²⁾、MAGP¹³⁾、フィビュリン¹⁴⁻¹⁶⁾、プロテオグリカン¹⁷⁾、latent TGF- β binding protein(LTBP)¹⁸⁾などが知られている。また、マイクロフィブリル遺伝子の異常により引き起こされる疾患として、フィブリリン-1遺伝子の異常によるMarfan症候群¹⁹⁾やフィビュリン-5遺伝子異常による皮膚弛緩症¹⁴⁾が知られており、どちらもエラスチン繊維形成に異常が認められている。これらの報告からマイクロフィブリルは、エラスチン繊維の足場タンパク質として重要な役割を果たしていることがわかる。マイクロフィブリルとトロポエラスチンとの結合は数多く報告されており^{16, 17, 20-22)}、トロポエラスチンのC末端領域がマイクロフィブリルとの結合に寄与していると考えられている²³⁻²⁵⁾。また近年、マイクロフィブリルにおけるトロポエラスチンとの結合領域も明らかにされつつある²⁶⁻²⁸⁾。

一方、コアセルベーション⁶⁾と呼ばれるトロポエラスチンの自己集合が、エラスチン繊維形成に重要であることも知られている。水溶液中でトロポエラスチンは、温度の上昇に伴い分子間で集合しミセルを形成することで安定化する²⁹⁾。トロポエラスチンは非常に疎水性の高い分子であり、水溶液中ではトロポエラスチン分子中に存在する疎水性領域が中心部に集まり、親水性領域が外側に配置しミセルを形成する。このミセル形成は、トロポエラスチン分子中に存在す

る疎水性領域の数や配置に大きく影響をされることが知られている³⁰⁾。また、自己集合したトロポエラスチン分子間で架橋を形成することも報告された^{31, 32)}。これらことから自己集合がエラスチン繊維形成において重要な役割を担っていることが推察される。さらに最近、フィブリリン-1の部分配列がトロポエラスチンと結合することでトロポエラスチンの自己集合を促進することも報告され、トロポエラスチン分子の自己集合とフィブリリン-1をはじめマイクロフィブリルタンパクとの関連性も示唆されている³³⁾。

上述したようにトロポエラスチンは複雑な経路を経て、様々な因子の関与を受けることにより繊維を形成する。エラスチン繊維の構築は、生体に必要不可欠な血管や、肺の組織構造の発達とこれら組織の弾性機能にとって非常に重要である。また大動脈弁上狭窄症や皮膚弛緩症で見られるエラスチン繊維の断片化は、エラスチン遺伝子の変異が原因であると考えられており、これらエラスチン繊維の量的、質的变化が血管や皮膚疾患の病因の一つとなると考えられる。そこで本研究は、*in vitro* で比較定量することが可能なエラスチン繊維再構築モデルを作製し、大動脈弁上狭窄症や皮膚弛緩症で見られる遺伝子変異したエラスチン繊維やオルタネイティブスプライシングによるエラスチン繊維の特性を生化学的に解析することを目的とした。

第二章 試薬リスト

培養細胞

ヒト網膜色素上皮細胞 (ARPE-19 細胞)

チャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO-K1)

以上 American Type Culture Collection (ATCC)

ヒト大動脈血管平滑筋細胞 (HASMC 細胞)

KURABO

正常ヒト新生児皮膚繊維芽細胞 (NHDF-Neo)

Takara

培養関連試薬

Dulbecco's modified Eagle medium

CHO-SFM-II

L-Glutamine

Penicillin/streptomycin

Non-essential amino acid

以上 Invitrogen

Fetal bovine serum

Bio West

Fibroblast Growth Medium

Human fibroblast growth factor

Insulin

Gentamicin/amphotericin-B

以上 Takara

8-well LabTek chamber slides

Nunc

上記以外の培養シャーレは、すべて FALCON 製を使用した。

大腸菌タンパク発現関連試薬

IPTG

pTrcHis TOPO vector

以上 Invitrogen

pCi-neo expression vector

Promega

Tryptone extract

Yeast extract

以上 Difco

Urea (生化学用)

Wako

Ni-NTA agarose

Polypropylene column

Mini prep kit

以上 Qiagen

RNA 関連試薬

Guanidine thiocyanate

Fluka

Sodium-N-lauroylsarcosine

Phenol:Chloroform:Isoamylalcohol

以上 Sigma

MLV-Reverse transcriptase

Agarose

Ribonuclease inhibitor

以上 Invitrogen

Nucleotide Mixture

Taq polymerase

以上 Roche

Polymerase chain reaction において primer として用いた oligonucleotide は、Amersham から得た。

タンパク解析関連試薬

Anti-bovine elastin antibody (BA4)	Sigma
Anti-human elastin antibody (MAB2503)	Chemicon
Anti-human fibrillin-1 antibody ³⁴⁾ (FBN-1)	EPC
Anti His-G antibody	
Anti V5-epitope antibody	以上 Invitrogen
Anti-mouse IgG, HRP linked (Fab') 2 fragment	
Anti-rabbit IgG, HRP linked (Fab') 2 fragment	
ECL Western blotting detection reagent	以上 Amersham
Fluorescein-conjugated goat IgG fraction to mouse IgG	ICN
Cy3 conjugated affinity purified secondary antibody	CHEMICON
BCA protein assay reagent kit	
Protein A-Sepharose	以上 PIERCE
Block Ace	大日本製薬
TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine)-substrate reagent	Fermentas
pcDNA3.1/V5-His-TOPO vector	Invitrogen
CENTRICON [®] PLUS-20	Millipore

その他の一般試薬については、和光純薬及び Sigma の特級またはそれに準ずるものを使用した。

第三章 ヒト網膜色素上皮細胞を用いた

新規 *in vitro* エラスチン繊維構築モデルの確立

第一節 緒言

従来 *in vitro* におけるエラスチン繊維形成の研究は、新生児または、幼児由来の軟骨芽細胞や血管平滑筋細胞、肺繊維芽細胞など内因的にエラスチン繊維を形成する細胞が用いられてきた³⁵⁾。その結果、多くの知見を得ることができたが、継代や細胞を播種する密度によりこれらの細胞のエラスチン生合成が変化するため、エラスチン繊維形成能を一定に保つことが非常に困難であった。継代によるエラスチン生合成の低下を避けるため、これらの細胞を用いた研究では初代培養細胞が用いられてきた。

近年、哺乳動物細胞発現用ベクターを用い、ウシ網膜色素上皮細胞(PE 細胞)にエラスチン遺伝子を強制発現させることによりエラスチン繊維形成を解析する *in vitro* モデルが報告された³⁶⁾。このモデルを用いることによりエラスチン繊維形成に重要なトロポエラスチン分子の領域を特定することが可能となった。このモデルはトロポエラスチン分子の機能的な領域を解析するために非常に有用であるが、遺伝子導入効率などの問題から構造の異なるトロポエラスチン分子が構築するエラスチン繊維を比較し定量化することは困難であったため、これらを比較定量できる新たなモデルを確立することが必要となった。

本章では、大腸菌組換えトロポエラスチンを添加しエラスチン繊維を構築させることのできる新たなエラスチン繊維再構築モデルについて検討した。

第二節 試薬及び方法

培養細胞

本実験に使用した培養細胞は、ヒト網膜色素上皮細胞(ARPE-19 細胞)及びヒト大動脈血管平滑筋細胞(HASMC)である。ARPE-19 細胞は、10% cosmic calf serum (CCS)を含む Dulbecco's modified eagle medium (DMEM)に L-glutamine 及び Penicillin/streptomycin を添加した培地で培養した。

また HASMC は、10% Fetal bovine serum (FBS)を含む DMEM に上記と同様の添加物を加えた培地で培養した。細胞は、37°C、5% CO₂ の条件下で培養した。

使用抗体

本実験で使用した一次抗体を以下に示した。

- ・ ウシトロポエラスチン特異的抗体 (BA4)
- ・ ヒトトロポエラスチン特異的抗体 (MAB2503)
- ・ フィブリリン-1 特異的抗体 (FBN-1)³⁴⁾
- ・ 抗 His-G 抗体

また蛍光免疫染色では、Cy3 標識二次抗体及び FITC 標識二次抗体を用い、ウェスタンブロット 法、ELISA では HRP 標識二次抗体を用い検出した。

全 RNA の抽出

全 RNA 抽出は、酸性グアニジンチオシアネート・フェノール・クロロホルム法に準じて、次のように行った。コンフルエントまで培養した細胞を PBS で洗浄し、D 液(4 M グアニジンチオシアネート、25 mM クエン酸ナトリウム、0.1 M 2-メルカプトエタノール溶液)を加えることにより培養細胞を溶解した。その後、フェノール:クロロホルム:イソアミルアルコール(25:24:1)を加え、混合後 4°C、20 分間放置した。4°C、12,000 rpm、20 分間遠心分離することにより RNA と DNA を分離した。遠心分離後の上層を別のチューブに分取し、等量のイソプロパノールを加え、混合後、-20°C、1 時間放置した。同条件の遠心分離により沈殿させた RNA を再び D 液に溶解し、イソプロパノール沈殿を繰り返し行った。沈殿した RNA を 80% エタノールで洗浄後、核酸分解酵素を含まない精製水に溶解、凍結乾燥を行い、使用時まで -80°C で保存した。

Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

トロポエラスチン³⁷⁾、フィブリリン-1³⁸⁾、リジルオキシダーゼ³⁹⁾、フィビュリン-5⁴⁰⁾、GAPDH の遺伝子配列から、それぞれのセンスプライマー、アンチセンスプライマーを設計した(Table 3-1)。逆転写反応は、37°C、1 時間行い、その後 PCR 反応は、95°C、1 分間の変性反応、60°C、30 秒間のアニーリング反応、68°C、3 分間の伸展反応を 30 サイクル繰り返して行った。RT-PCR 後のサンプルを 2%アガロースで電気泳動を行い、それぞれのバンドを検出した。

Table 3-1. 利用したオリゴヌクレオチドプライマー

Primers	Primer sequences	Amplified position
Tropoelastin		
Sense	5'-AGTCGCAGGTGTCCCTAGTG-3'	1248-1788
Antisense	5'-ACCAGCACCAACTCCAAGTC-3'	
Fibrillin-1		
Sense	5'-CACCCCTATGCCAAGTTGATC-3'	2661-3160
Antisense	5'-TGACACTTAAAGCTGCCAATG-3'	
Lysyl oxidase		
Sense	5'-GATATTCCTGGGAATGGCAC-3'	848-1050
Antisense	5'-GCCAGGACTCAATCCCTGTG-3'	
Fibulin-5		
Sense	5'-GCCTGCCGAGGAGACATGAT-3'	153-396
Antisense	5'-TGCACACTCGTCCACATCCA-3'	
Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)		
Sense	5'-GTCATCCATGACAACCTTTGC-3'	562-984
Antisense	5'-TGCTGTAGCCAAATTCGTTG-3'	

ヒトトロポエラスチン、ウシトロポエラスチン cDNA の構築

シグナルシーケンスを欠損したヒトトロポエラスチン及びウシトロポエラスチン cDNA は、次のプライマーを用い PCR 反応により得た。

- Human exon 2 forward; 5'-GGAGGGGTCCCTGGGGCCATTCC-3'
- Human exon 36 reverse; 5'-TCATTTTCTCTTCCGGCCACAAG-3'
- Bovine exon 2 forwaed; 5'-GGAGGGGTCCCAGGAGCTGTTCT-3'
- Bovine exon 36 reverse; 5'-TCACTTTCTCTTCCGGCCACAG-3'

PCR 反応は、95°C、1 分間の変性反応、60°C、30 秒間のアニーリング反応、68°C、3 分間の伸展反応を 30 サイクル繰り返して行った。尚、鋳型として使用したウシエラスチン cDNA はエクソン 13 と 14、またヒトエラスチン cDNA は、エクソン 22 がそれぞれ欠失している。

大腸菌組換えトロポエラスチンの作製

作製したウシ及びヒトトロポエラスチンの cDNA をそれぞれ大腸菌発現用ベクターである pTrcHis-TOPO ベクターに組み込み、このプラスミドで大腸菌を形質転換した。このベクターはタンパク精製のために N 末端側に 6 個のヒスチジン残基からなる His-tag が付加するように設計されている。この大腸菌を TB 培地にて 37°C で培養し、最終濃度 1 mM の IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactoside) で発現を誘導した。その後 37°C、5 時間培養後、菌体を回収、8 M Urea, 100 mM NaH₂PO₄ 含有 10 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) で溶解後、12,000 rpm、20 分間遠心分離しその上清を回収した。回収した上清中のトロポエラスチンを Ni²⁺アフィニティーカラムで精製し、0.25 M 酢酸溶液に対して透析脱塩後、凍結乾燥し、滅菌処理することによりウシトロポエラスチン(BTE)とヒトトロポエラスチン(HTE)を作製した。作製した BTE と HTE は BCA protein assay reagent kit で濃度を測定した。BTE、HTE の分子量は、各タンパクを 100 mM Dithiothreitol (DTT) 含有 SDS-PAGE sample buffer (62.5 mM, Tris, pH 6.8, 0.4% (w/v) SDS, 10% (v/v) glycerol, 0.003% (w/v) bromphenol blue) に溶解し SDS-PAGE 後、クマシーブルー (CBB) 染色及びウエスタンブロット法で確認した。

蛍光免疫染色

ARPE-19 細胞を 8-well LabTek chamber slides に 5×10^4 cell で播種し、10% CCS DMEM で 2 日間培養した。その後、BTE または HTE (5-20 $\mu\text{g/ml}$) を培地中に加え 8 日間培養した。尚、培地交換は、組換えタンパクを各濃度に調整した培地で 2 日間毎に行った。 β -APN (β -aminopropionitril) は、最終濃度 100 $\mu\text{g/ml}$ になるように各培地中に添加した。8 日間培養後、細胞を PBS で洗浄し 2% パラホルムアルデヒド溶液で固定した。再び PBS で洗浄した後、非特異的な結合を防ぐため Block Ace を添加し 5 分間、室温で放置後、Block Ace で希釈した一次抗体 (BA4, MAB2503; 100 倍希釈、FBN-1; 400 倍希釈) を添加し 30 分間室温で放置した。PBS で洗浄後、さらに Block Ace で希釈した蛍光標識二次抗体 (800 倍希釈) を添加し 30 分間室温で放置し、再度 PBS で洗浄後、位相差蛍光顕微鏡 (KEYENCE) により倍率 200 倍で観察した。

デスモシン測定

ARPE-19 細胞を 100 mm-dish に 4×10^6 cell で播種し 10% CCS DMEM で 2 日間培養した。培養方法、BTE、HTE の添加、 β -APN 処理は上記と同様に行った。8 日間培養後、細胞を冷却した PBS で十分洗浄し、細胞画分を 1 mL の冷却した PBS で回収した。回収した画分は 1,200 rpm、5 分間遠心分離し、得られた沈殿を 6 N 塩酸で 110°C、24 時間加水分解後、滅菌精製水で溶解した。加水分解中に含まれるデスモシンは、ラジオイムノアッセイ法で定量した⁴¹⁾。尚、このデスモシン量は加水分解物の全アミノ酸残基数から計算した全タンパク質量で補正した。

ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay)によるエラスチン繊維の半定量

ARPE-19 細胞を 96 穴プレートに 3×10^4 cell になるよう播種し、10% CCS DMEM で 2 日間培養した。その後、上記と同様に BTE または HTE (5-20 μ g/ml) を培地中に添加し 8 日間培養した。 β -APN も同様に終濃度 100 μ g/ml になるように各培地中に添加した。8 日間培養後、細胞を PBS で洗浄し 2% パラホルムアルデヒド溶液で固定し上記と同様の処理をした。Block Ace に 1000 倍希釈した一次抗体を添加し室温で 1 時間放置した。再び PBS で洗浄後、Block Ace に 1000 倍希釈した HRP 標識二次抗体を処理し室温で 1 時間放置した。PBS で洗浄後、TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine)-substrate reagent を添加し 10 分間放置後、0.5 N 硫酸を用い反応を停止した。その後、各ウェルの吸光度(測定波長 450 nm、対照波長 600 nm)をマイクロプレートリーダーで測定した。

RIPA (Radioimmunoprecipitation assay)可溶性画分の採取

ARPE-19 細胞を 30 mm-dish に 1×10^6 cell で播種し上記と同様に培養、BTE、HTE の添加、及び β -APN 処理を行った。細胞を冷却した PBS で十分洗浄後、200 μ l の RIPA buffer (2.5% deoxycholate, 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 2 mM Na_3VO_4 , 40 mM β -glycerophosphate, 10 mM Sodium Molybdate, 10 mM NaF, protease inhibitor cocktail)を添加し細胞画分を採取し、10,000 rpm、15 分間遠心分離し上清を回収した。BCA protein assay reagent kit を用い、得られたサンプルの濃度を測定し 1 \times SDS-PAGE sample buffer に溶解した。等濃度に調整した各サンプルを 7.5% ポリアクリルアミドゲルで SDS-PAGE 後、抗トロポエラスチン抗体(BA4)を用いてウエスタンブロット法で検出した。

第三節 実験結果

ARPE-19 細胞における弾性繊維関連成分の遺伝子発現の確認

ARPE-19 細胞から採取した全 RNA を用い、トロポエラスチン、フィブリリン-1、フィビュリン-5、リジルオキシダーゼの各発現を RT-PCR により確認した。ARPE-19 細胞は、トロポエラスチンを発現せず、その他の弾性繊維関連成分を発現していることを確認した(Figure 3-1)。一方、ヒト大動脈平滑筋細胞 (HASMC)は、全ての弾性繊維関連成分の遺伝子発現が確認できた。また HASMC では、増幅された 2 種類のトロポエラスチン遺伝子のバンドを検出した。すでにヒトエラスチン遺伝子では、エクソン 22 は常にスプライシングされることが知られており、さらにヒト血管でもエラスチン遺伝子のエクソン 22、23、32 がオルタネイティブスプライシングされることが報告されている⁸⁾。今回使用したプライマーは、エラスチン遺伝子エクソン 20 の中間からエクソン 26 の中間までの領域で設計されている。得られた 2 つのバンドから、本章で用いた HASMC では、エラスチン遺伝子エクソン 23 がオルタネイティブスプライシングされていると考えられる。また ARPE-19 細胞の弾性繊維関連遺伝子発現は、以前に報告されているウシ網膜色素上皮細胞の遺伝子発現と類似した³⁶⁾。

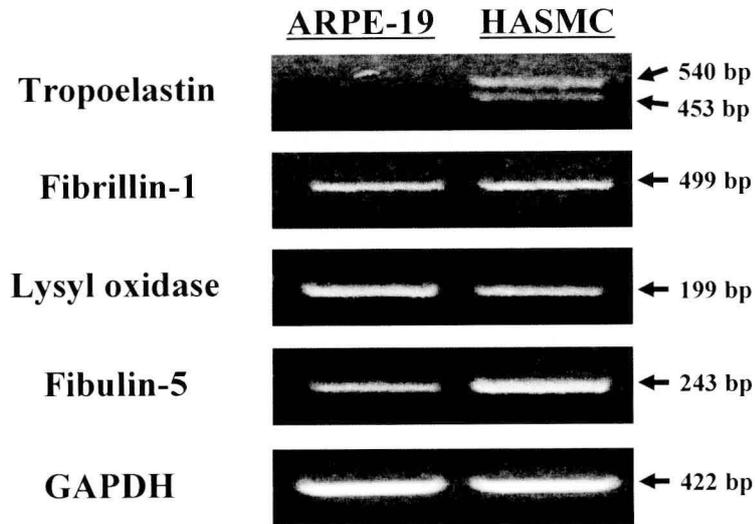


Figure 3-1 ARPE-19 細胞における弾性繊維関連成分の遺伝子発現

ARPE-19 細胞における弾性繊維関連成分の遺伝子発現について各プライマー (Table 3-1) を用い RT-PCR により確認した。得られた産物は 2%アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイドを用い UV 下で観察した。

大腸菌組換えトロポエラスチンの精製

大腸菌組換えウシトロポエラスチン(BTE)及びヒトトロポエラスチン(HTE)はニッケルカラムで精製した。得られた BTE (lane 1)と HTE (lane 2)は SDS-PAGE 後、クマシーブルーで染色を行い、それぞれ単一バンドとして確認できた(Figure 3-2A)。また抗 His-G 抗体(Figure 3-2B)、抗ウシトロポエラスチン抗体(BA4, Figure 3-2C)、抗ヒトトロポエラスチン抗体(MAB2503, Figure 3-2D)を用いたウエスタンブロット法にて、分子量約 68 kDa に BTE を、約 72 kDa に HTE をそれぞれ確認した。また精製した各トロポエラスチンには N 末端側にヒスチジンタグが付加されているため本来の分子量(BTE; 66 kDa、HTE; 68 kDa) より約 4 kDa の分子量の増加が認められた。

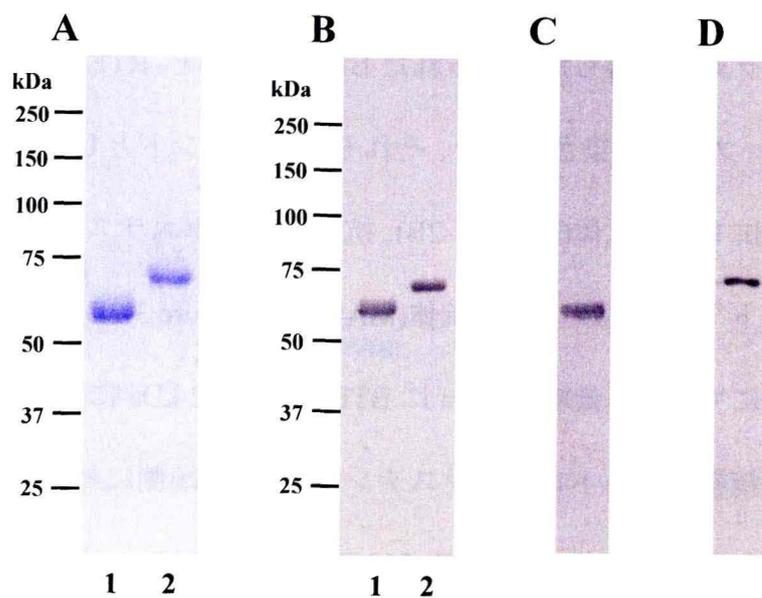


Figure 3-2 大腸菌組換えトロポエラスチンの精製

精製したウシトロポエラスチン(BTE; lane 1)とヒトトロポエラスチン(HTE; lane 2)を SDS-PAGE 後にクマシーブルーで染色した(A)。また抗 His-G 抗体(B)、抗ウシトロポエラスチン抗体 (C)、抗ヒトトロポエラスチン抗体(D)をそれぞれ用いてウエスタンブロット法を行った。尚、各トロポエラスチンは 1 $\mu\text{g}/\text{lane}$ (A) または 500 ng/lane(B,C and D)にそれぞれ調整し電気泳動した。

大腸菌組換えトロポエラスチンを添加した ARPE-19 細胞の蛍光免疫染色

エラスチン繊維は、エラスチン特異的抗体で繊維状に染色されることと、架橋アミノ酸であるデスモシン、イソデスモシンを含有することで特色付けられる。まず、大腸菌組換えトロポエラスチンの添加により構築したエラスチン繊維がエラスチン特異的抗体で繊維状に染色されるかを検討した。BTE または HTE を各々5、10、20 $\mu\text{g/ml}$ の濃度に調整した 10% CCS DMEM 中で ARPE-19 細胞を 8 日間培養後、抗トロポエラスチン抗体及び抗フィブリリン-1 抗体を用い二重蛍光免疫染色を行った結果、トロポエラスチン及びフィブリリン-1 繊維が共に局在していることが観察された(Figure 3-3A)。またエラスチン繊維は、添加2日後から観察され、6日後に飽和状態になることが認められた(Figure 3-3B)。エラスチン繊維は、BTE と HTE の添加濃度依存的に増加したが、フィブリリン-1 繊維では添加した全ての濃度において変化は認められなかった。

A

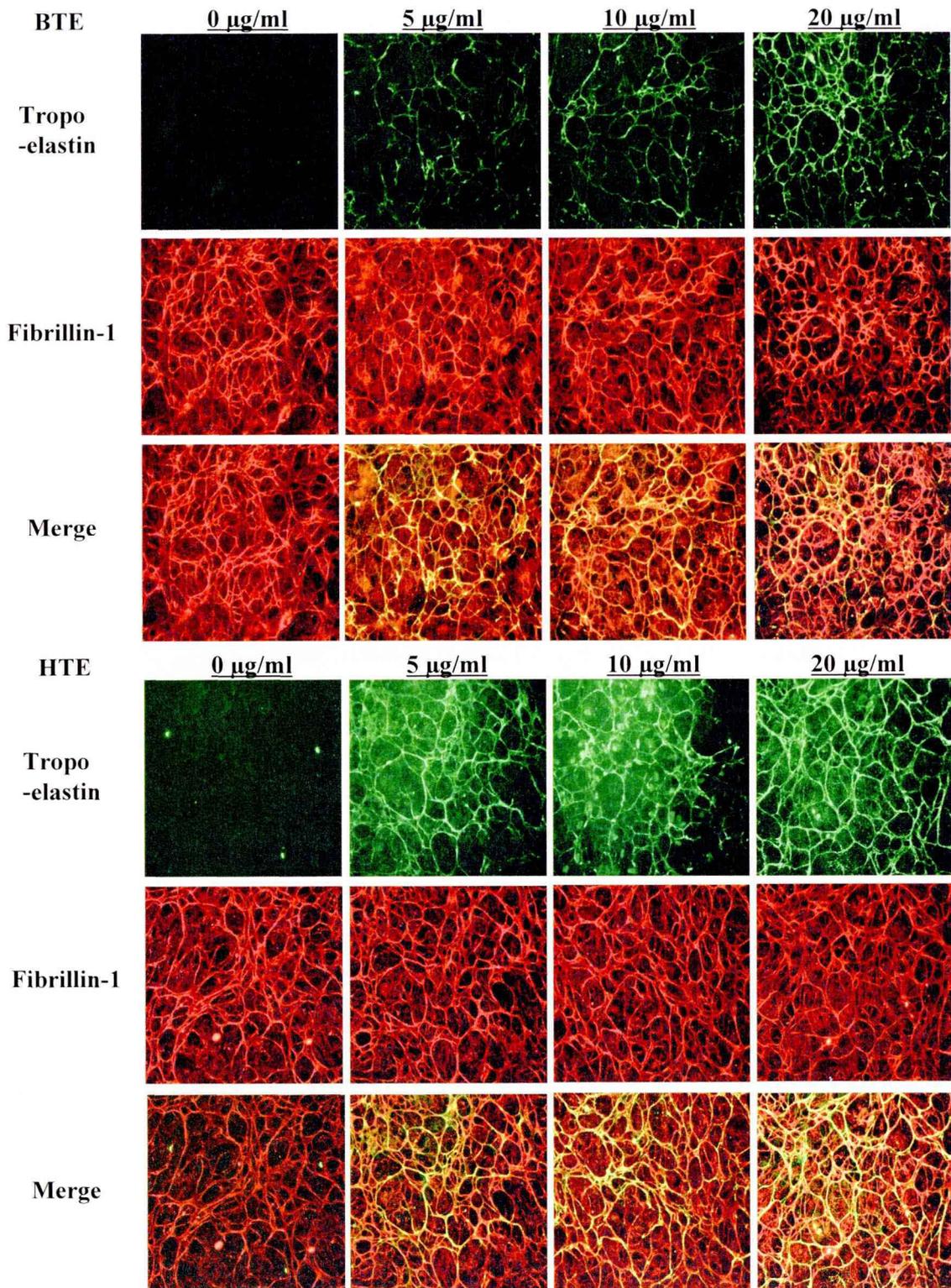


Figure 3-3A

B

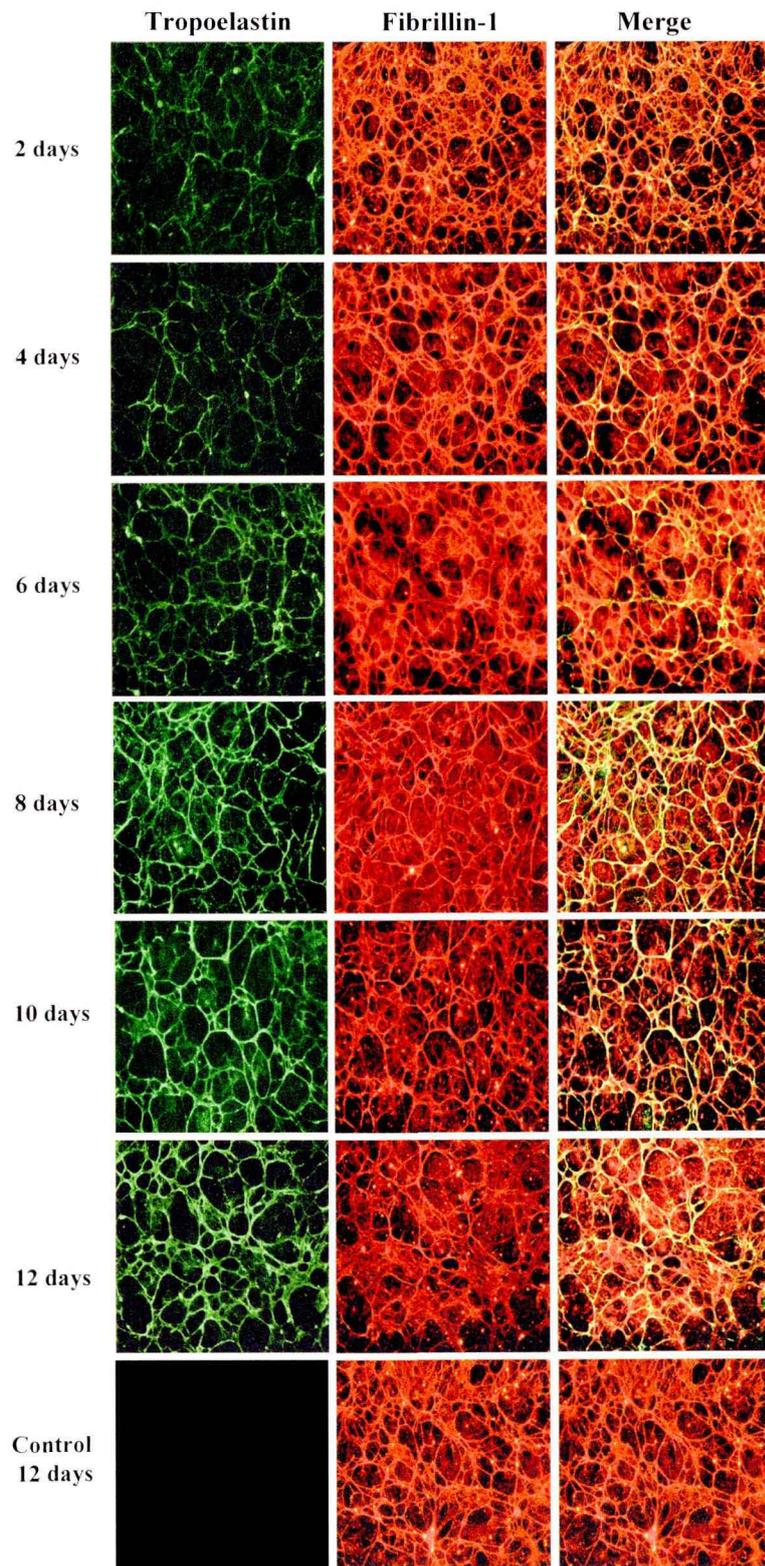


Figure 3-3B

Figure 3-3 ARPE-19 細胞におけるトロポエラスチンとフィブリリン-1 の蛍光免疫染色

(A) BTE 及び HTE (5-20 $\mu\text{g/ml}$) を各々 ARPE-19 細胞に添加し 8 日間培養後、二重蛍光免疫染色を行った。トロポエラスチンの繊維は、BA4(上段)または MAB2503(下段)を用い、またフィブリリン-1 は FBN-1 を用い検出した。

(B) 20 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で HTE を ARPE-19 細胞に添加し、2-12 日間培養し、MAB2503 を用い蛍光免疫染色を行った。尚、位相差蛍光顕微鏡により倍率 200 倍で観察した。

組換えトロポエラスチンが弾性繊維関連成分遺伝子発現に与える影響

組換えトロポエラスチンが、ARPE-19 細胞の弾性繊維関連成分の遺伝子発現に影響を与えるかどうかを検討するため、HTE (20 $\mu\text{g/ml}$)を ARPE-19 細胞に添加し 24 時間、48 時間後にそれぞれ全 RNA を抽出し RT-PCR によりトロポエラスチン、フィブリリン-1、リジルオキシダーゼ、フィビュリン-5 の各遺伝子発現を検討した。その結果、組換えトロポエラスチン添加により ARPE-19 細胞の弾性繊維関連成分の遺伝子発現に影響は見られなかった(Figure 3-4)。また同様に 8 日目においても、それらの遺伝子発現に変化は見られなかった(data not shown)。この結果から大腸菌組換えトロポエラスチンは ARPE-19 細胞の弾性繊維関連成分の遺伝子発現に影響を与えないことを確認した。

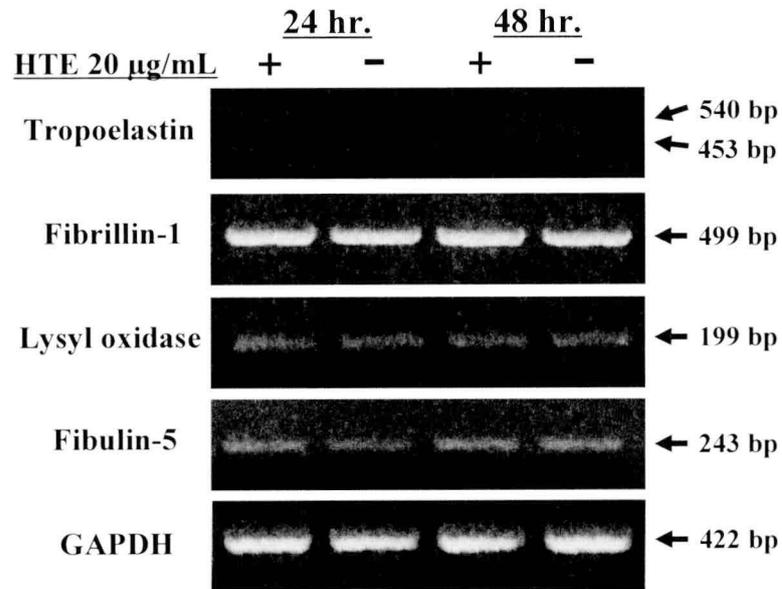


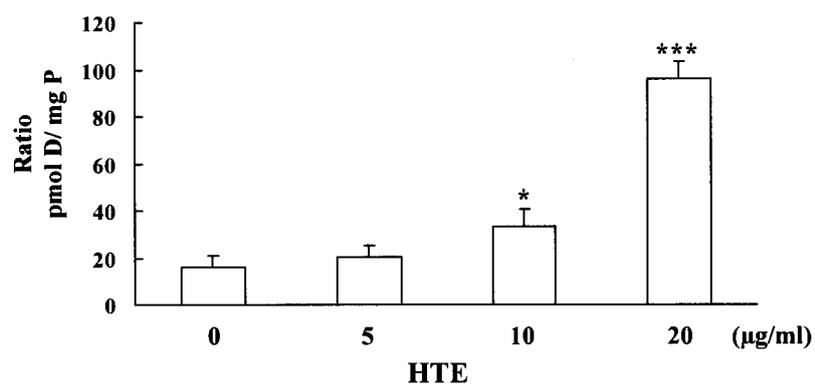
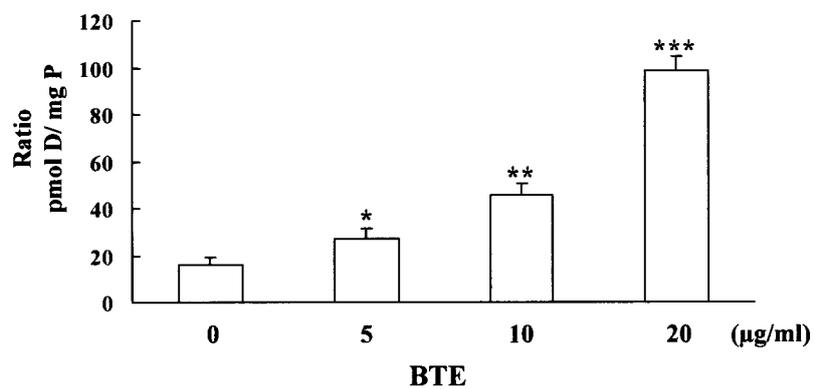
Figure 3-4 組換えトトロポエラスチン添加による ARPE-19 細胞のトロポエラスチン及び弾性繊維関連成分の遺伝子発現

HTE (20 μ g/ml)を ARPE-19 細胞に添加し 24 時間、または 48 時間後にそれぞれ全 RNA を採取した。トロポエラスチン及び弾性繊維関連成分の遺伝子発現の確認は Fig 3-1 と同様に行った。

架橋アミノ酸(デスモシン)の定量

トロポエラスチンはマイクロフィブリル繊維上に沈着し、その後それらが分子間架橋を形成することで不溶性のエラスチン繊維になると考えられている。そこで組換えトロポエラスチンを ARPE-19 細胞に添加し、形成したエラスチン繊維に分子間架橋が存在するか否かを検討した。エラスチン特有の分子間架橋アミノ酸であるデスモシンは、8 日間または 12 日間培養した ARPE-19 細胞では、ほとんど検出されなかったが(Figure 3-5A; 0 $\mu\text{g/ml}$, Figure 3-5B; closed box)、BTE または HTE を添加した ARPE-19 細胞では非常に高レベルで検出された(Figure 3-5A)。このことから蛍光免疫染色で観察されたトロポエラスチンが形成した繊維は、架橋アミノ酸を有するエラスチン繊維であることが確認された。またデスモシンは HTE (20 $\mu\text{g/ml}$)の添加により、少なくとも 4 日目から検出された(Figure 3-5B)。

A



B

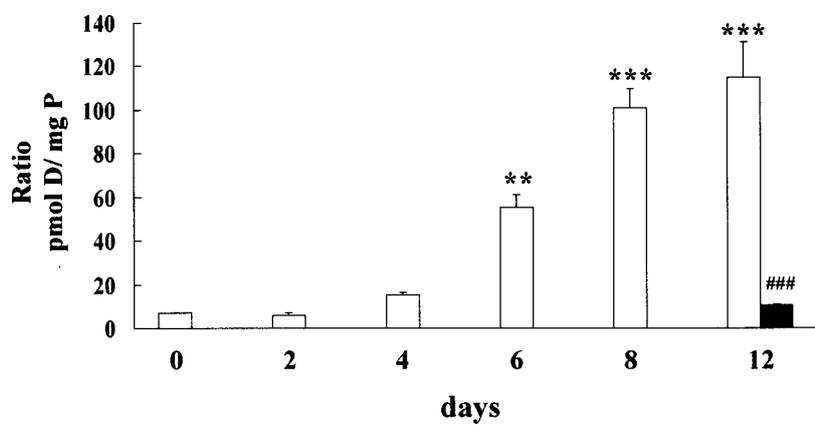


Figure 3-5

Figure 3-5 エラスチン繊維に含まれるデスモシンの定量

BTE または HTE (5-20 $\mu\text{g/ml}$) を各々 ARPE-19 細胞に添加し 8 日間培養した(A)。また、HTE (20 $\mu\text{g/ml}$) を ARPE-19 細胞に添加し 2-12 日間培養した(B)。各時間培養後、細胞画分を遠心し沈殿を 6N 塩酸を用い 110°C で加水分解した。ラジオイムノアッセイ法で加水分解物中のデスモシン(pmol D)を定量した。このデスモシンの値はアミノ酸分析により測定した加水分解物中の全タンパク質量(mg P)で補正しグラフ化した。尚、closed box は、HTE 無添加で 12 日間培養した時のデスモシン量を示している。Means S.E., n=3. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs. BTE 0 $\mu\text{g/mL}$ or HTE 0 $\mu\text{g/mL}$ (A), **p<0.01, ***p<0.001 vs. 0 day, ###p<0.001 vs. 12 days (B)

ARPE-19 細胞におけるエラスチン繊維の半定量

ARPE-19 細胞を 96 穴プレートに播種し BTE または HTE (0-20 $\mu\text{g/ml}$) を添加した。8 日間培養後、細胞を固定し抗エラスチン抗体または、抗フィブリリン-1 抗体をそれぞれに反応させた。二次抗体には HRP 標識二次抗体を使用した。抗体に反応したトロポエラスチン及びフィブリリン-1 は、TMB 試薬を用いて発色させ、それぞれ吸光度を測定しエラスチン繊維を半定量した。抗フィブリリン-1 抗体との反応による吸光度(open circle)に変化は見られなかったが、BTE または HTE を添加した ARPE-19 細胞の抗トロポエラスチン抗体との反応による吸光度(open box)は BTE または HTE の添加濃度依存的に増加した。この結果は蛍光免疫染色の結果と類似したことから、得られた吸光度はエラスチン繊維形成量に相当すると推測された(Figure 3-6)。

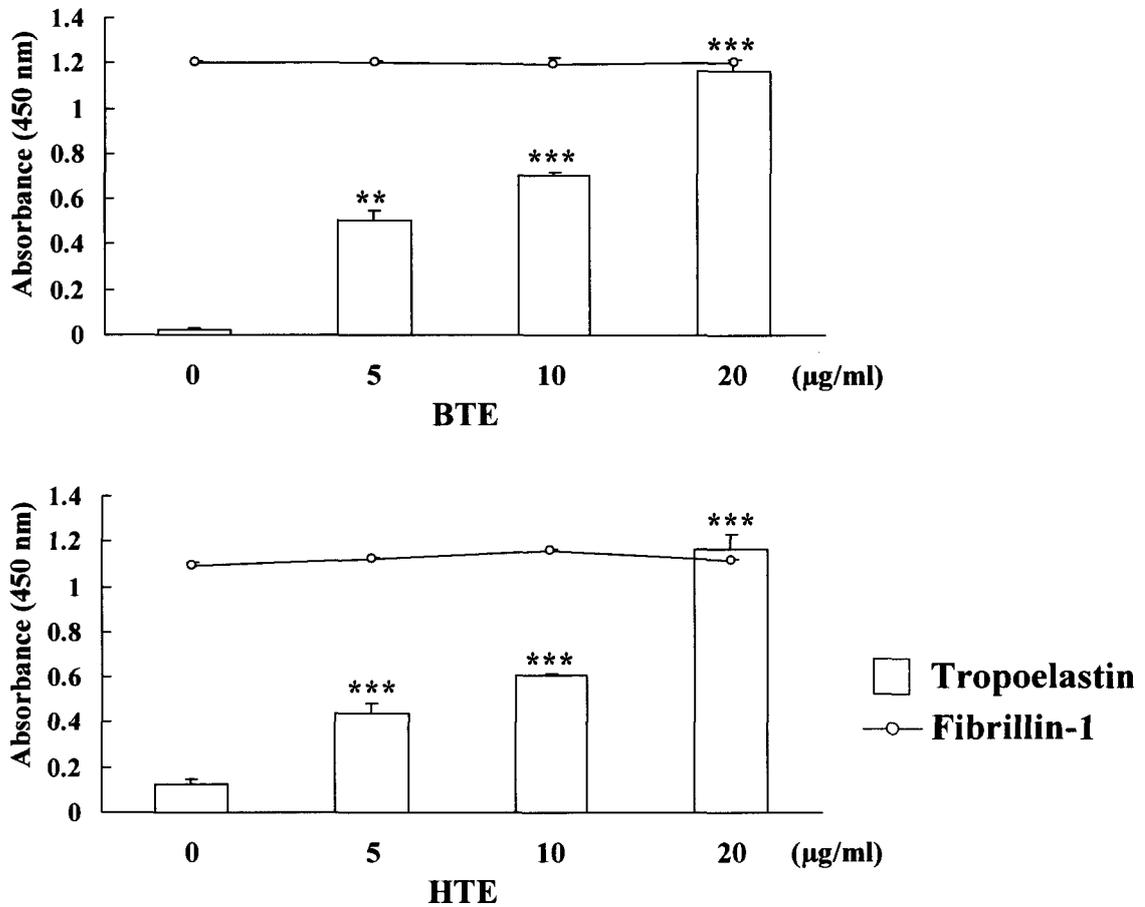


Figure 3-6 ELISA を用いたエラスチン繊維の検出

ARPE-19 細胞を 96 穴に播種し、様々な濃度の組換えトロポエラスチンを含んだ培地で 8 日間培養した。トロポエラスチンの吸光度は、BA4(上段, open boxes) または MAB2503(下段, open boxes)で検出した。またフィブリリン-1 の吸光度は FBN-1 で検出した。

Means S.E., n=3 **p<0.01, ***p<0.001 vs. BTE 0 μg/mL or HTE 0 μg/mL

リジロキシダーゼによるトロポエラスチン分子間架橋形成

ARPE-19 細胞にトロポエラスチンを添加し形成したエラスチン繊維がリジロキシダーゼにより架橋形成されたか否かを検討するため、リジロキシダーゼ阻害薬である β -aminopropionitril (β -APN)存在下(closed box)、非存在下(open box)でそれぞれ ARPE-19 細胞に BTE (20 μ g/ml)を添加し 8 日間培養後、BA4 及び FBN-1 を用いて蛍光免疫染色を行った。その結果、 β -APN 存在下ではフィブリリン-1 繊維の変化は見られなかったが、エラスチン繊維は減少し(Figure 3-7A)、架橋アミノ酸であるデスモシンも検出されなかった(Figure 3-7B, closed box)。

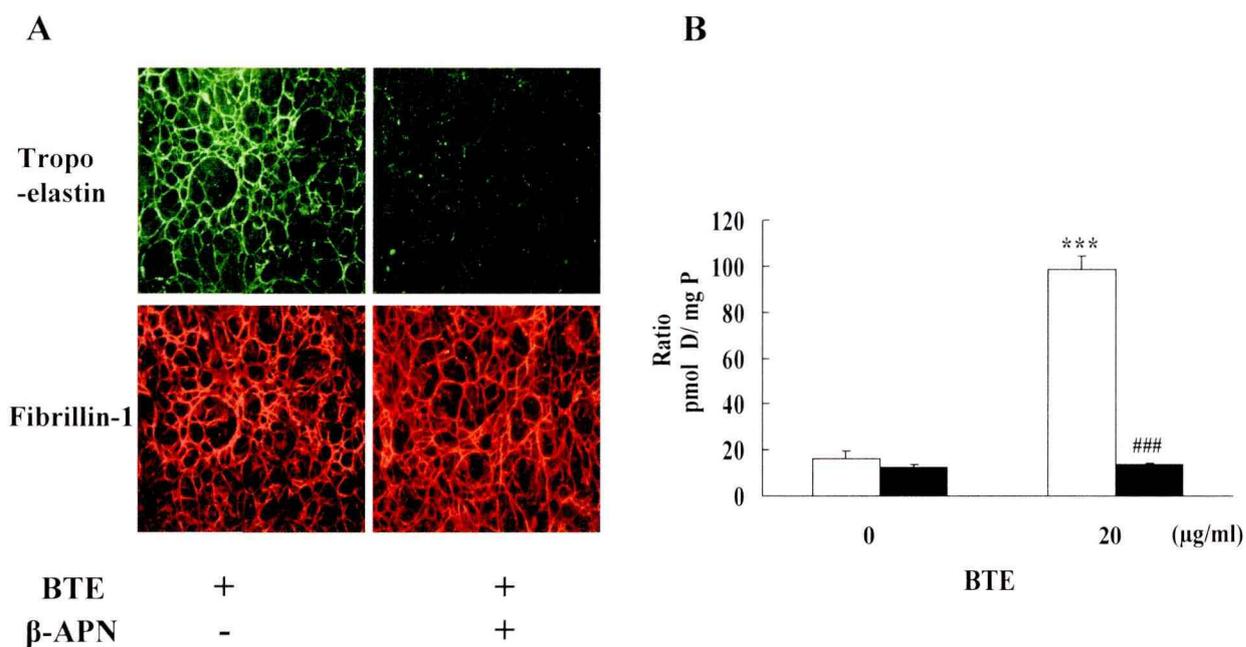


Figure 3-7 β -APN 存在下におけるエラスチン繊維形成

リジロキシダーゼ阻害薬である β -APN 存在下(B, closed box)、非存在下(B, open box)で ARPE-19 細胞に 20 μ g/ml の濃度の BTE を処理し 8 日間培養後、BA4 及び FBN-1 を用いた蛍光免疫染色(A)、さらにデスモシンの定量(B)を行った。

デスモシン量は、全タンパク質量あたりに換算しグラフ化した。Means S.E., n=3.

***p<0.001 vs. BTE 0 μ g/mL, ###p<0.001 vs. BTE 20 μ g/mL

トロポエラスチンとマイクロフィブリルとの複合体及びエラスチン繊維の検出

蛍光免疫染色で観察したトロポエラスチンとマイクロフィブリルの複合体を生化学的に検討するため、BTE (20 $\mu\text{g/ml}$)を添加した ARPE-19 細胞を 8 日間培養後、Radioimmunoprecipitation assay (RIPA) バッファーにより細胞画分及び細胞外マトリックス画分を抽出した。その RIPA 可溶性画分に対し、還元条件下(Figure 3-8, A)、非還元条件下(Figure 3-8, B)で BA4 を用いてウエスタンブロット 法を行った結果、数種のバンドを検出した。1 つは、分子量 68 kDa に検出された単量体、もう 1 つは濃縮ゲルと分離ゲルの間に検出された高分子と推定した(arrow head)。この高分子は、還元条件下で消失することからトロポエラスチンとマイクロフィブリルとの複合体であると考えられた。さらに濃縮ゲルに入り込めない巨大分子(arrow)も検出され、この巨大分子は β -APN 存在下では検出されないことから架橋したエラスチン繊維であると推測した。

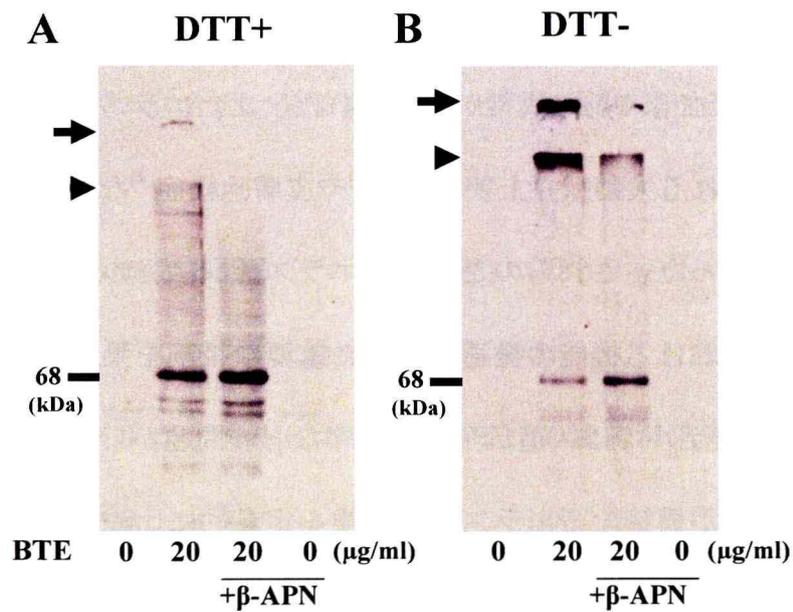


Figure 3-8 RIPA バッファーで抽出したマトリックス複合体の検出

ARPE-19 細胞を β -APN 存在下、非存在下で BTE (20 $\mu\text{g/ml}$) を添加し 8 日間培養後、RIPA バッファーを用い細胞画分及び細胞外マトリックス画分を抽出した。RIPA 可溶性画分はタンパク濃度を一定にし、還元条件下(B)または非還元条件下(A)で SDS-PAGE した後に BA4 を用いたウエスタンブロット法を行った。

第四節 考察

エラスチンノックアウトマウスにおいて動脈平滑筋層の異常肥厚¹⁾や肺胞形成不全⁴²⁾のような血管や肺の異常が認められた。またエラスチン繊維形成不全により引き起こされる大動脈弁上狭窄症^{2, 3)}や皮膚弛緩症⁴⁾などの血管や皮膚の異常も明らかとなった。これらのことからエラスチン繊維の質的、量的変化が血管や肺、皮膚における機能の発達や維持に重要な役割を果たしていると考えられる。PE細胞モデルでは、遺伝子導入効率などの問題から構造の異なるトロポエラスチン分子が構築するエラスチン繊維を定量的に比較することは困難であるため、本章では、大腸菌組換えトロポエラスチンを内因性のトロポエラスチンを発現していないARPE-19細胞に添加することにより *in vitro* でエラスチン繊維を再構築させた。エラスチン繊維は、架橋アミノ酸であるデスモンシンを含有し、エラスチン特異的抗体で繊維状に染色されると定義されている。本章においてARPE-19細胞が形成したマイクロフィブリル繊維に沿って組換えトロポエラスチンの沈着を観察し、さらにその繊維中に架橋アミノ酸であるデスモンシンも検出した。またリジルオキシダーゼ阻害薬である β -APN処理によりこの架橋アミノ酸は検出されなくなった。このことから、ARPE-19細胞に大腸菌組換えトロポエラスチンを添加し再構築した繊維は、リジルオキシダーゼにより架橋を形成したエラスチン繊維であると考えられる。

リジルオキシダーゼは、その補因子として銅イオンを必要とし、 β -APNは、その Cu^{2+} とキレートを形成することによりリジルオキシダーゼを不活性化すると考えられている⁴³⁾。近年、自己集合したトロポエラスチン分子間で架橋を形

成することが報告され^{31,44)}、培養上清中では β -APNによりトロポエラスチンの自己集合は抑制された (unpublished observations)。このことから、リジルオキシダーゼが、トロポエラスチン分子を重合させることにより自己集合を促進すると推察する。

本章において添加 2 日目からマイクロフィブリルへのトロポエラスチンの沈着を確認したが、デスモシンは検出限界以下であった。さらに β -APN 処理によりマイクロフィブリル上へのトロポエラスチンの沈着が阻害されたことからリジルオキシダーゼは、エラスチン繊維形成の初期段階において、トロポエラスチンのマイクロフィブリルへの沈着にも影響する可能性が考えられた。このことは、 β -APN によりリジルオキシダーゼの活性が阻害されたことでトロポエラスチンの重合が減少した結果であると推測された。

本章では、内因性のトロポエラスチンを発現していないヒト網膜色素上皮由来細胞に外因性のトロポエラスチンを添加しエラスチン繊維を再構築する新たなエラスチン繊維構築モデルを確立した。このモデルを応用することで、出生時前診断や遺伝子診断により発見される変異エラスチン遺伝子が構築するエラスチン繊維の特徴を予測することが可能になると思われる。

第四章 皮膚弛緩症で見られる変異エラスチンが構築するエラスチン繊維の生化学的解析

第一節 緒言

前章で述べたようにエラスチン繊維形成の破綻、形成不全は様々な疾患の病因となりうる。エラスチン遺伝子の異常により引き起こされる大動脈弁上狭窄症⁴⁵⁾や皮膚弛緩症⁴⁶⁾では、変異トロポエラスチンの生合成や分泌は見られるがエラスチン繊維を構築することができないためエラスチン繊維形成不全となり動脈の狭窄や皮膚の過伸展が見られる。

皮膚弛緩症は、臓器の傷害に関係なく皮膚の過伸展が特徴的なヘテロな遺伝子疾患である⁴⁷⁾。皮膚弛緩症においてエラスチン遺伝子エクソン 30⁴⁸⁾、32⁴⁶⁾、33⁴⁹⁾に変異が報告されている。特にエラスチン遺伝子エクソン 32 のフレームシフト変異により、トロポエラスチン C 末端領域の 37 個のアミノ酸が新規の 62 個のアミノ酸に変換されてしまう⁴⁶⁾。この変異が見られる患者の皮膚では、エラスチン繊維の断片化やトロポエラスチンのマイクロフィブリル繊維への沈着の減少が観察された。

本章では、皮膚弛緩症で見られる変異トロポエラスチンのエラスチン繊維形成不全を解析することを目的とし、前章で確立したモデルを用い、正常トロポエラスチンと変異トロポエラスチンが構築する繊維を解析し、さらにそれぞれのトロポエラスチンとマイクロフィブリルタンパクとの結合、及び自己集合能を併せて解析した。

第二節 試薬及び方法

培養細胞及び使用抗体

本実験に使用した培養細胞及び抗体は、前章に準ずる。蛍光免疫染色においては、Alexa 488 標識または Alexa 546 標識二次抗体を用いた。

エラスチン遺伝子エクソン 32 のフレームシフト変異エラスチンの構築

皮膚弛緩症で見られるエクソン 32 のフレームシフト変異エラスチン遺伝子 (fmELN) は、エラスチン遺伝子の終始コドンが 3' 末端側に 72 塩基延長している。まずこの延長した 72 塩基を得るため fmELN の変異部分を含むプライマーを作製し、HASMC から採取した全 RNA を用い RT-PCR を行った。全 RNA の採取は前章に準ずる。使用したプライマーには、センスプライマーの 5' 末端に Pst I 制限酵素サイト、アンチセンスプライマーの 5' 末端に Xba I 制限酵素サイトを付加した。以下にその配列を記す。尚、変異部分を下線で示す。

センスプライマー;

5'-AACTGCAGCCGCTAAAGCAGCTAAATACGGTGCTGCTGGCCTTGGAGGTG
TCCTTGGGGTGCCGGGCAC-3'

アンチセンスプライマー;

5'-CATGCTCTAGATTACAAAGGGTTTAC-3'

次に前章で作製した HTE cDNA を、Mlu I 制限酵素サイトと Xba I 制限酵素サイトを
用い pCi neo ベクターに組み込んだ(FL)。RT-PCR により得られた生成物を
制限酵素 Pst I 及び Mlu I で切断後、同様の制限酵素処理をした FL に組み込み
fmELN を得た。前章同様に fmELN で Human exon 2 forward primer 及び Human

exon 36 reverse primer を用いた PCR を行い、その生成物を pTrcHis-TOPO vector に組み込んだ。前章に準じた方法で正常ヒトトロポエラスチン(nTE)及びエクソン 32 フレームシフト変異ヒトトロポエラスチン(fmTE)の作製、精製を行った。

蛍光免疫染色、ELISA、デスモシン定量

蛍光免疫染色、ELISA、デスモシン定量は、前章に準じて行った。またデスモシン定量においては、ARPE-19 細胞を 60 mm シャーレに 1×10^6 cell で播種した。

組換えフィブリン-5 と PET の作製

HASMC の全 RNA を用いて RT-PCR によりフィブリン-5 の cDNA を得た。逆転写反応は、37°C、1 時間行い、その後 PCR 反応は、95°C、1 分間の変性反応、60°C、30 秒間のアニーリング反応、68°C、3 分間の伸展反応を 30 サイクル繰り返して行った。増幅した cDNA を 2%アガロースゲル電気泳動で分離し、目的バンドを検出した。使用したプライマーを以下に示す。

Forward primer; 5'-GCCACCATGCCAGGAATCCCCCGG-3'

Reverse primer; 5'-GAATGGGTACTGCGACACATATATCC-3'

PET cDNA は、Robert P. Mecham 博士 (Washington university, St. Louis)から提供された。フィブリン-5、PET のそれぞれの cDNA は、哺乳動物発現用ベクターである pcDNA3.1/V5-His-TOPO vector に組み込んだ。それぞれのプラスミドを CHO-K1 細胞に Fugene 6 を用い遺伝子導入し、24 時間後に血清を含まない CHO-SFM-II 培地に交換した。その後、さらに 24 時間から 72 時間培養し培養上清を回収し、CENTRICON® PLUS-20 を用いその培養上清を濃縮した。本章では、

この濃縮した培地をコンディションメディウムとして使用した。

Solid phase binding assay 法

Bicarbonate バッファーに希釈した nTE、fmTE(10 µg/ml)をそれぞれ 96 穴プレートに添加し、4°C で一晩放置した。その後、5% Tween 20 含有 PBS(wash バッファー)で数回洗浄し、非特異的な結合を防ぐため 5% スキムミルク含有 PBS を添加した。室温で 1 時間放置後、再び wash バッファーで 3 回洗浄し 0.5% BSA 含有 PBS(dilution バッファー)に希釈したフィブリン-5 及び PET のコンディションメディウムをそれぞれ添加した。37°C で 1 時間放置した後に上記と同様に洗浄し、dilution バッファーに希釈した抗 V5-epitope 抗体(5,000 倍希釈)を添加し、37°C で 1 時間放置した。その後、上記と同様に洗浄し、同様に希釈した抗マウス IgG 二次抗体(5,000 倍希釈)を添加した。室温で 1 時間放置後、数回洗浄し、TMB-substrate reagent で発色させ、30 分後に 0.5 N 硫酸を等量添加し反応を停止させた。それぞれの吸光度をマイクロプレートリーダー(波長 450 nm、対照波長 600 nm)により測定した。

免疫沈降法

nTE 及び fmTE をそれぞれ 100-1000 ng/ml になるように PBS でそれぞれ希釈した。各溶液に濃縮したフィブリン-5 のコンディションメEDIUMを 20 μ l ずつ添加し、さらにそれらの溶液に Protein A-Sepharose を 20 μ l ずつ添加した。4°C で 30 分間攪拌した後、抗 V5-epitope 抗体を 2 μ g 添加し、さらに 4°C で一晩攪拌した。その後遠心分離により得たそれらの共沈物を 0.5% Tween 20 含有 PBS で数回洗浄し、100 mM DTT を含有した 1 \times SDS-PAGE sample buffer に溶解した。得られたサンプルは、10%ポリアクリルアミドゲルで分離し、抗 V5 epitope 抗体または抗 His-G 抗体を用いたウエスタンブロット 法を行った。得られたバンドは、Kodak-1D Image Analysis Software を用い、バンドの面積を測定した。

各種トロポエラスチンのコアセルベーションの測定

トロポエラスチンの濁度は、分光光度計を用い測定波長 400 nm で測定した。分光光度計は、JASCO V-500 Software を用い、測定温度を 30 秒で 0.5°C 上昇するよう設定し、15°C から 45°C の間における各組換えトロポエラスチンの濁度強度を 0.5°C 間隔で測定した。測定に用いた nTE 及び fmTE は、PBS 中に 1 mg/ml で調整した。

第三節 実験結果

エクソン 32 変異トロポエラスチンが構築するエラスチン繊維

皮膚弛緩症患者におけるフレームシフト変異エラスチン遺伝子の模式図を Figure 4-1 に図示した。前章と同様に、大腸菌組換え正常ヒトトロポエラスチン (nTE) 及び、フレームシフト変異トロポエラスチン (fmTE) を作製した。各トロポエラスチンを 5-20 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で ARPE-19 細胞に添加し 8 日間培養後、MAB2503 及び FBN-1 を用いて蛍光免疫染色を行った結果、fmTE の構築したエラスチン繊維(下段)は、nTE が構築した繊維(上段)と比較して減少した(Figure 4-2A)。また ELISA を用いたエラスチン繊維の半定量においても、fmTE が構築するエラスチン繊維量(closed box)は、nTE が構築した繊維量(open box)に比べ、約 50%減少した(Figure 4-2B)。

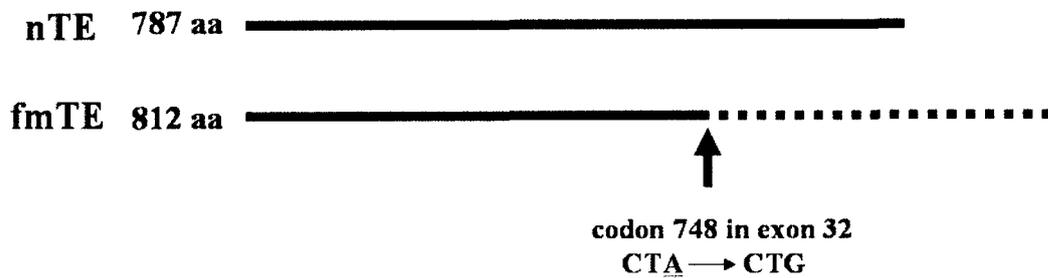


Figure 4-1 皮膚弛緩症患者におけるエラスチン遺伝子エクソン 32 フレームシフト変異

エラスチン遺伝子エクソン 32 中の 748 番目のコドンのアデニン(arrow)の位置でフレームシフト変異が起こり、トロポエラスチン C 末端領域の 37 アミノ酸が新規の 67 アミノ酸(破線)に置換される⁴⁶⁾。aa; アミノ酸

A

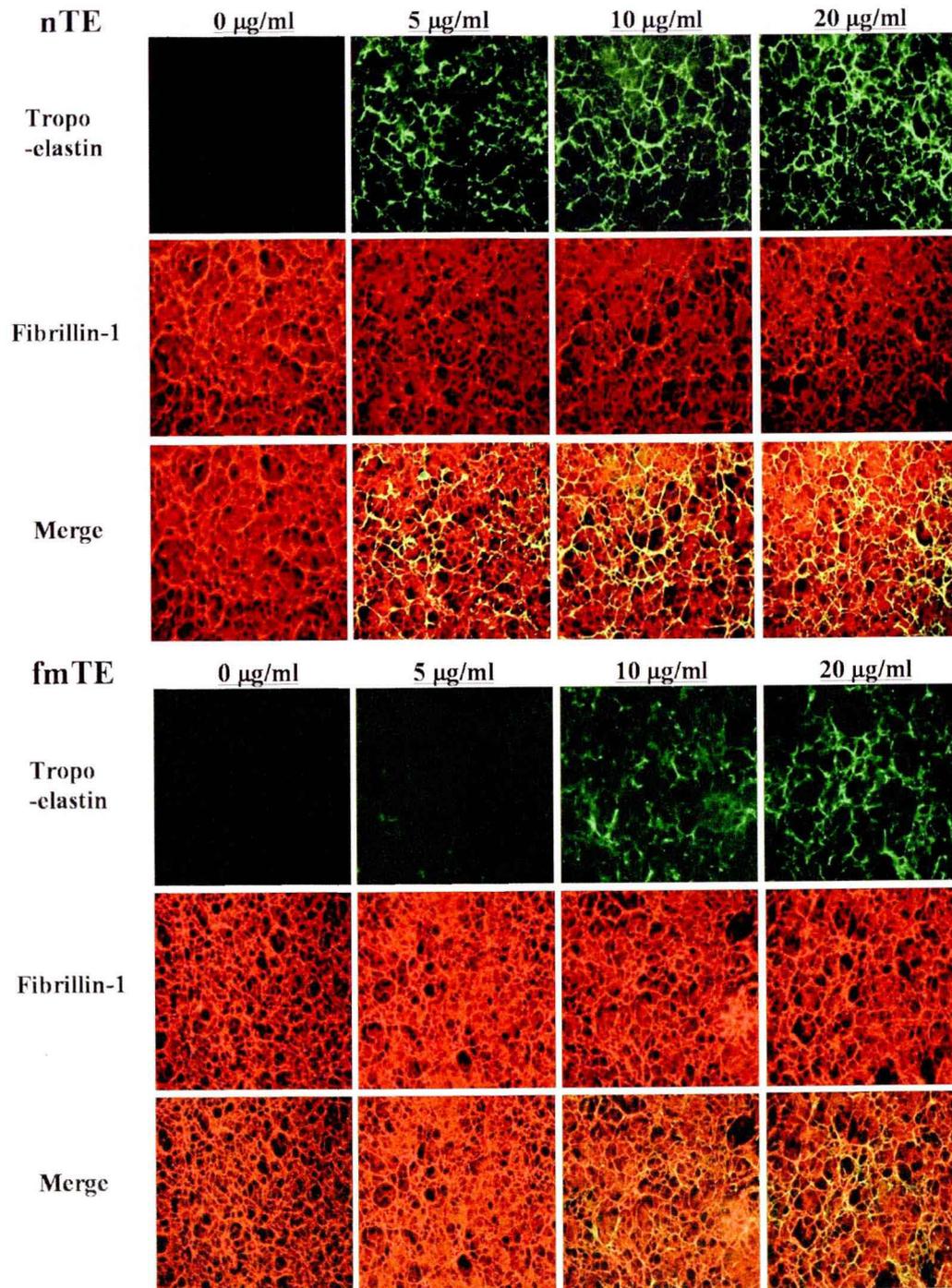


Figure 4-2A

B

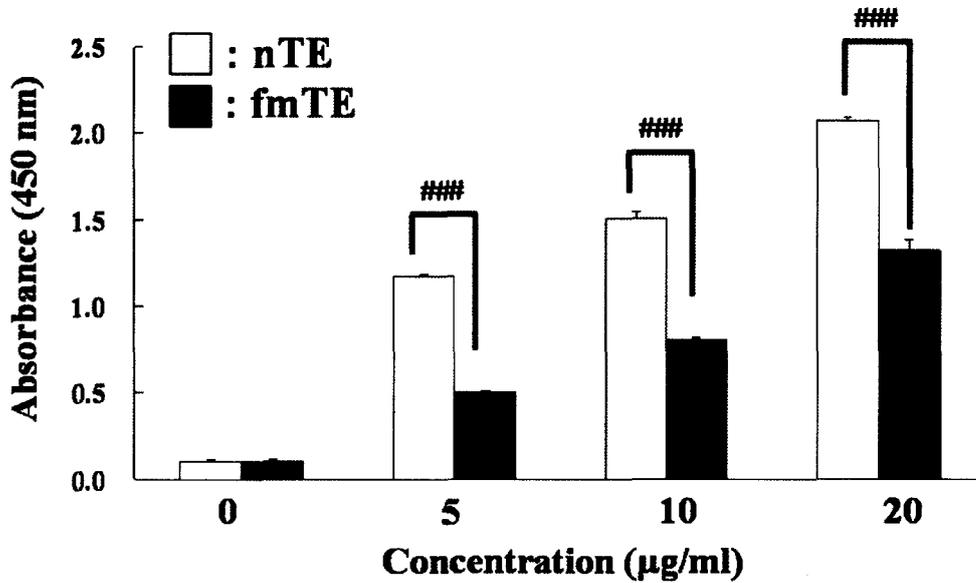


Figure 4-2 エラスチン繊維の蛍光免疫染色と半定量

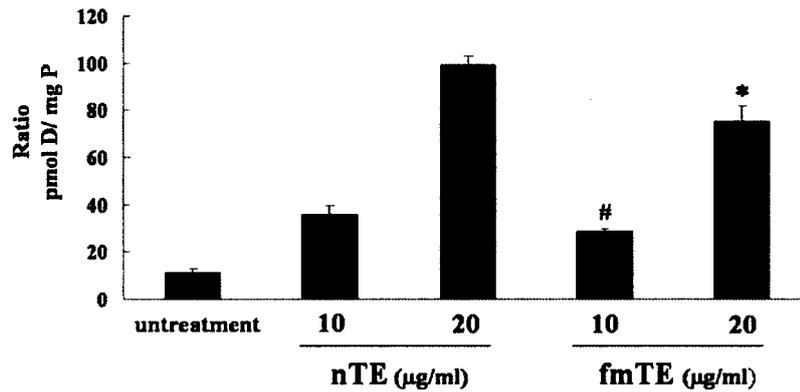
(A) ARPE-19 細胞に 5-20 µg/ml の濃度で nTE または fmTE を添加し、8 日間培養した。その後、抗ヒトトロポエラスチン抗体(MAB2503)及び抗フィブリリン-1 抗体(FBN-1)を用いて二重蛍光免疫染色を行った。観察は、位相差蛍光顕微鏡により倍率 200 倍で観察した。

(B) ELISA を応用しエラスチン繊維の半定量を行った。MAB2503 を用いトロポエラスチンの検出を行った(nTE; open box, fmTE; closed box)。測定波長は 450 nm、対照波長は 600 nm で測定した。Means ± SEM., n=3 ###p<0.001 vs. nTE.

デスモシン定量

ARPE-19 細胞に 10 または 20 $\mu\text{g/ml}$ の濃度でそれぞれのトロポエラスチンを添加し 8 日間培養後、nTE 及び fmTE が構築したエラスチン繊維中に含まれるデスモシン量を定量した。デスモシン量をシャーレ内の全タンパク量で補正した場合(A) fmTE では、nTE に比較し約 20%の減少が認められたが、沈着したトロポエラスチン量で補正した場合(B)、約 50%の増加が認められた(Figure 4-3)。

A



B

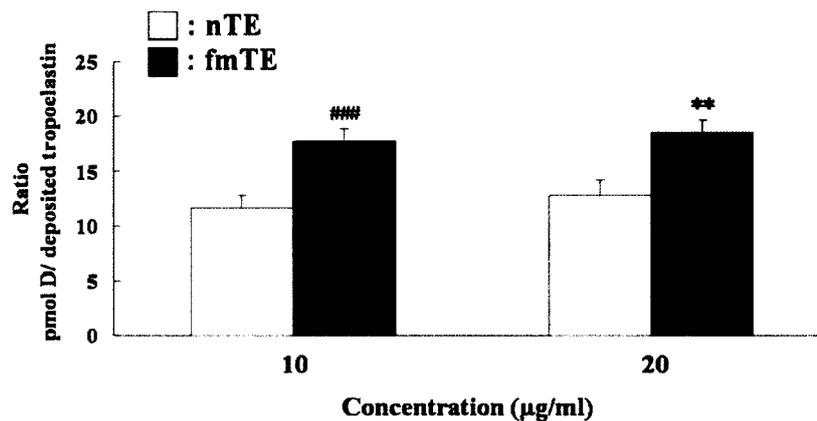


Figure 4-3 デスモシンの定量

ARPE-19 細胞を 60 mm シャーレに 1×10^6 cell で播種し、nTE または fmTE を 10 または 20 $\mu\text{g/ml}$ の濃度でそれぞれ添加し 8 日間培養した。細胞画分を遠心し沈殿を 6N 塩酸を用い 110°C で加水分解した。ラジオイムノアッセイ法で加水分解物中のデスモシン(pmol D)を定量した。このデスモシンの値はアミノ酸分析により測定した加水分解中の全タンパク質量(mg P)で補正(A)、または ELISA により得られたマイクロフィブリルへ沈着したトロポエラスチン量で補正(B)シグラフ化した。Means \pm SEM, n=3. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. 20 $\mu\text{g/ml}$ nTE. # $p < 0.05$, ### $p < 0.001$ vs. 10 $\mu\text{g/ml}$ nTE or fmTE.

Solid phase binding assay 法によるマイクロフィブリルタンパクとトロポエラスチンとの結合

マイクロフィブリルタンパクとそれぞれのトロポエラスチンとの結合を Solid phase binding assay 法で検討した。96 穴プレートに各トロポエラスチンと BSA をそれぞれコートし、コートされたトロポエラスチンまたは BSA に対するフィブリン-5 及び PET の結合を測定した。フィブリン-5 は、近年エラスチン結合タンパクとして発見され、エラスチン繊維形成に重要な役割を果たすことが報告されている^{14, 50)}。またフィブリリン-1 は、マイクロフィブリル繊維の主要成分であり、その遺伝子変異は Marfan 症候群を引き起こすことが知られている¹⁹⁾。コンディションメEDIUM中に含まれるフィブリン-5 と PET は、抗 V5 epitope 抗体を用いたウエスタンブロット法で分子量約 66 kDa と約 42 kDa にそれぞれ確認した(data not shown)。カルシウム存在下(closed box)または非存在下(open box)のどちらにおいても fmTE は、nTE と比較しフィブリン-5 との結合が約 70%減少した(上段)。また fmTE と PET(下段)との結合も nTE と比較し約 30%減少した(Figure 4-4)。

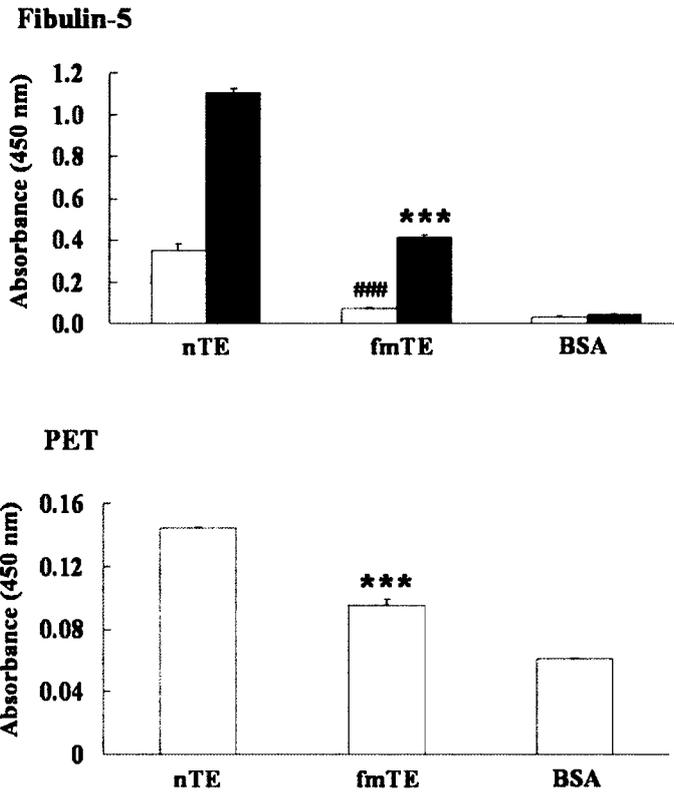


Figure 4-4 固相におけるマイクロフィブリルタンパクとトロポエラスチンとの結合

96 穴プレートに nTE 及び fmTE、BSA (10 $\mu\text{g/ml}$)をそれぞれコートし、フィブリン-5(上段)または PET(下段)との結合を Solid phase binding assay 法で検討した。フィブリン-5 と各トロポエラスチンとの結合は、カルシウム存在下 (closed box)、非存在下(open box)でそれぞれ検討した。測定波長 450 nm、対照波長 600 nm で各プレートの吸光度を測定した。Means \pm SEM., n=3 ***p<0.001 or ###p<0.001 vs. nTE (カルシウムイオン存在下)

免疫沈降法によるマイクロフィブリルタンパクとトロポエラスチンとの結合実験

液相におけるフィブリン-5 とトロポエラスチンとの結合を免疫沈降法で検討した。PBS 中において各トロポエラスチンとフィブリン-5 との複合体を抗 V5 epitope 抗体を用い共沈殿した後、抗 His-G 抗体を用いたウエスタンブロット法で確認した。その結果、フィブリン-5 との結合は各トロポエラスチンの濃度依存的に増加した(Figure 4-5)。そして抗 V5 epitope 抗体で免疫共沈降したトロポエラスチンの量をフィブリン-5 の量で補正した結果、fmTE(closed box)との結合は、nTE(open box)に比較し低濃度から飽和した。fmTE は、固相、液相どちらにおいても nTE よりフィブリン-5 との結合が弱いことを確認した。

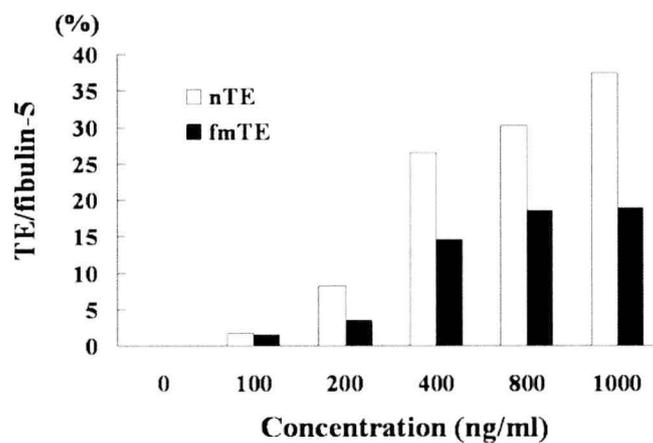
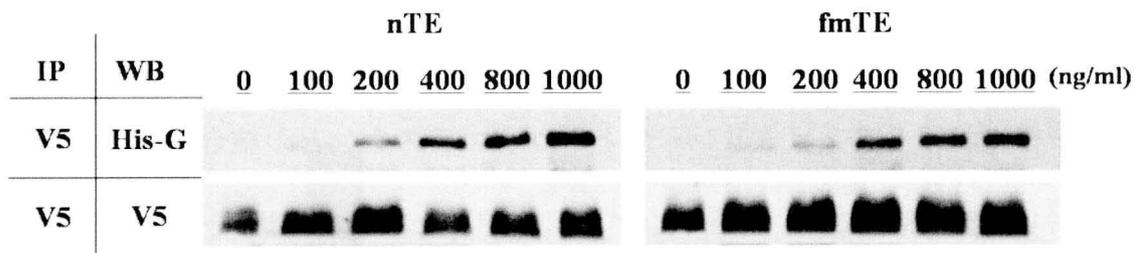


Figure 4-5 液相におけるトロポエラスチンとフィブリン-5 との結合

nTE(open box)または fmTE(closed box)を PBS 中にそれぞれ 100-1000 ng/ml に調整し、フィブリン-5 含有のコンディションメEDIUMを一定量添加した。その後、抗 V5 epitope 抗体を用いそれらの共沈物を回収し、抗 His-G 抗体または抗 V5 epitope 抗体を用いてウエスタブロット法を行った。検出したバンドは、Kodak-1D image Analysis を用いバンド面積を測定し、共沈物中に含まれるフィブリン-5 のバンドの面積値で共沈物中に含まれるトロポエラスチンのバンドの面積値を補正しグラフ化した。

nTE と fmTE の自己集合

in vitro においてトロポエラスチンは、温度の上昇に伴いトロポエラスチン分子同士が集合し自己集合する。自己集合は、トロポエラスチン分子の疎水性度 (Hydrophathy) に関連があることが報告されており、疎水性度が低いほど自己集合が低温から起こることが知られている⁵¹⁾。Kyte-Doolittle らの方法⁵²⁾に従い nTE と fmTE の疎水性度を計算したところ、nTE は 0.62、fmTE は 0.54 であった。疎水性度は、Kyte-Doolittle らが定義した各アミノ酸残基の疎水性度に各アミノ酸数を乗じ、その値を全アミノ酸数で除して計算した。実際、fmTE(triangle)は、nTE(circle)に比較し低温で自己集合の開始が認められた(Figure 4-6)。

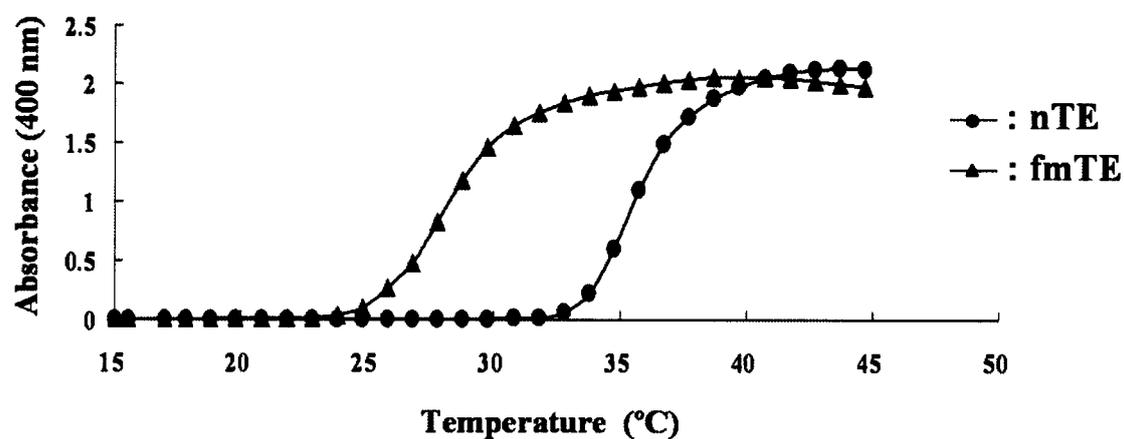


Figure 4-6 nTE と fmTE の自己集合

nTE(circle)及び fmTE(triangle)を PBS 中にそれぞれ 1 mg/ml になるように調整した。分光光度計を用い 30 秒間に 0.5°C の割合で温度を 15°C から 45°C まで上昇させ、30 秒間ごとに各トロポエラスチンの濁度強度を測定した(測定波長 400 nm、対照波長 600 nm)。

第四節 考察

本章では、皮膚弛緩症で見られる変異トロポエラスチン(fmTE)と正常トロポエラスチン(nTE)を作製し、前章で確立したモデルを用いそれらが構築したエラスチン繊維を比較した。併せてそれらの自己集合、マイクロフィブリルタンパクとの相互作用、架橋形成を生化学的に解析した。

fmTE のマイクロフィブリルへの沈着は nTE に比較して約 50%減少した。このことは、トロポエラスチンの C 末端領域の変異によるマイクロフィブリルタンパクとの結合低下が原因であると考えた。トロポエラスチンの C 末端領域は、マイクロフィブリルへの沈着に重要であることが知られており^{23,26)}、また Kozel らも C 末端領域に変異を持つトロポエラスチンを導入したトランスジェニックマウスや PE 細胞モデルを用いた実験から、トロポエラスチンの C 末端領域がエラスチン繊維形成に重要であることを示している^{24, 25)}。本研究においても C 末端領域に変異をもつ fmTE とフィブリン-5 や PET との結合は、nTE に比較して低下したことから、fmTE では、C 末端領域の変異によりマイクロフィブリルへの沈着が減少し、fmTE が構築するエラスチン繊維量が減少したと考えられた。

一方、fmTE が構築したエラスチン繊維中に含まれるデスモシン量は、沈着したトロポエラスチン量で補正した時、nTE 比べて約 50%増加した。トロポエラスチンは、自己集合を介しデスモシン、イソデスモシンを形成することが知られており^{31, 32)}、また自己集合時にトロポエラスチン分子の構造変化が起こり、分子間架橋形成に重要である α ヘリックス構造が増加することも報告されている^{31, 53)}。一般的に自己集合は、その分子中の疎水性領域に依存することが知ら

れているが、本研究では、fmTE の自己集合開始温度は、フレームシフト変異により親水性のアミノ酸残基が増加したにもかかわらず早まった。Toonkool らは、トロポエラスチン分子の粒子径によっても濁度強度が増大することから、濁度強度測定では単なる自己集合の解析は困難であると記している³⁰⁾。これらのことを考慮すると fmTE では、構造変化によりその分子の粒径と分子中に存在する α ヘリックス構造が増加したことで nTE より架橋形成量が増加したと推察した。

本章では、トロポエラスチンの C 末端領域の変化がマイクロフィブリルへの沈着のみならずトロポエラスチン分子の自己集合にも影響を与えることを明らかとした。また本モデルを用いエラスチン繊維を生化学的に解析することはエラスチン繊維形成機序の詳細な解明に役立つと考える。

第五章 トロポエラスチンアイソフォームが構築するエラスチン繊維の特性

第一節 緒言

エラスチンは、オルタネイティブスプライシングによりその分子の多様性を持ち、少なくとも 11 のトロポエラスチンアイソフォームが知られている⁵⁴⁾。ヒトではエクソン 22、23、26A、32 がオルタネイティブスプライシングを受けるエクソンとして報告されている⁶⁻⁸⁾。特にヒトエラスチン遺伝子に特異的なエクソン 26A は、新生児からスプライシングを受けること、また疎水領域でもあるエクソン 32 については、加齢に伴いそのスプライシング産物が増加することが皮膚において知られている^{9, 10)}。エクソン 32 は前章で述べた皮膚弛緩症において変異が見られる領域であり、加齢に伴う皮膚の弾性低下に関与することが推察される⁴⁶⁾。しかしながら、これまでオルタネイティブスプライシング産物の発現解析は多く行われてきたが、トロポエラスチンアイソフォームのエラスチン繊維形成に関する特性は未だ明らかとされていない。

一般的にエラスチン繊維の代謝は非常に遅いことが知られているが、加齢に伴う皮膚の弾性低下は、主に弾性繊維の減少に関与する。エラスチン繊維を分解する酵素には、セリンプロテアーゼ⁵⁵⁾やシステインプロテアーゼ⁵⁶⁾、マトリックスメタロプロテアーゼ^{55, 57)}などが知られている。これら分解酵素の発現は、創傷治癒時や組織のリモデリング時などで強く促進される。エラスチン分解酵素の発現が亢進することによるエラスチン繊維の過剰な分解は、慢性閉塞性肺疾患(COPD)⁵⁸⁾や動脈硬化⁵⁹⁾、関節炎⁶⁰⁾などの慢性化に大きく関与している。し

かしこれまでエラスチン繊維の分解に関する研究はほとんどされていない。

本章では、正常ヒトトロポエラスチン(HTE)、エクソン 26A 欠損トロポエラスチン(Δ 26A)、エクソン 32 欠損トロポエラスチン(Δ 32)を作製し、*in vitro* エラスチン繊維再構築モデルでそれらのトロポエラスチンが構築したエラスチン繊維を比較定量するとともに、エラスチン分解酵素であるエラスターゼに対する抵抗性を検討することで、トロポエラスチンアイソフォームが構築したエラスチン繊維の特性を解析することを目的とした。

第二節 試薬及び方法

細胞及び培養方法

ARPE-19 細胞は、前章までの方法に準じた。正常ヒト新生児皮膚繊維芽細胞 (NHDF-Neo) は、2% ウシ胎児血清含有の Fibroblast Growth Medium にヒト繊維芽細胞成長因子及びインシュリン、ゲンタマイシン/アンホテリシン-B を添加した培地で培養した。

エクソン 26A 欠損及びエクソン 32 欠損エラスチン遺伝子の作製

エクソン 26A 欠損エラスチン遺伝子は、防衛医科大学の多嶋 新吾教授より提供された。エクソン 32 欠損エラスチン遺伝子は、NHDF-Neo の全 RNA を用いた RT-PCR より得た。全 RNA の採取は、前章までの方法に準じる。センスプライマー; 5'-GCTGCTGCCAAAAGCCGCCAGTT-3' とアンチセンスプライマー; 5'-ACCAGCACCAACTGGAAGTC-3' を用い RT-PCR を行った結果、エラスチン遺伝子エクソン 32 が欠損した産物(A)と保存されている産物(B)を得た。得られた PCR 産物のシーケンスは株式会社 BEX に依頼した。(A)を PCR II-TOPO ベクターに組み込み、Pst I 制限酵素サイトと Xba I 制限酵素サイトで切断した(A')。その後前章で用いた FL を同様の制限酵素で切断し、A'を組み込み、エクソン 32 欠損エラスチン遺伝子を作製した。それぞれの cDNA を鋳型とし、前章までと同様にエクソン 2 から終止コドンまでのプライマーを用い PCR を行った。得られた PCR 産物を pTrcHis-TOPO ベクターに組み込み、大腸菌を形質転換した。大腸菌組換えトロポエラスチンを精製した。精製した各トロポエラスチンは、

クマシーブルーによる染色、及び抗 His-G 抗体、MAB2503 を用いたウエスタンブロット法を用い定性確認した(Figure 5-1)。

エラスチン繊維の分解

ARPE-19 細胞を 60 mm シャーレに 1×10^6 cell で播種し、各トロポエラスチンを 10 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で添加しエラスチン繊維を構築させた。8 日間培養後、PBS でよく洗浄し血清を含まない DMEM に エラスターゼを 0.5 unit/ml、1.0 unit/ml の濃度で添加した培地に交換した。37°C、1 時間培養後再び PBS で洗浄し、前章に準じデスモシン定量を行った。デスモシン量(pmol)はアミノ酸分析により測定したシャーレ内の全タンパク質量(mg P)で補正した。グラフは、エラスターゼ未処理時のそれぞれの値を 100%とし、各エラスターゼ濃度処理時の値をそれぞれの未処理時の値に対する割合で示した。尚、精製したブタ臍由来エラスターゼ(305 unit/mg)は、株式会社エーザイから得た。

また蛍光免疫染色、エラスチン繊維の半定量、デスモシンの定量、Solid phase binding assay 法、コアセルベーションの測定は前章に準じた。

第三節 実験結果

第三章で確立した *in vitro* エラスチン繊維再構築モデルでエラスチン繊維を比較定量するため、正常ヒトトロポエラスチン(HTE)、エクソン 26A 欠損トロポエラスチン(Δ 26A)及びエクソン 32 欠損トロポエラスチン(Δ 32)を作製した(Figure 5-1)。各トロポエラスチンを 5-20 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で ARPE-19 細胞に添加し 8 日間培養後、蛍光免疫染色及びエラスチン繊維の半定量を行った。蛍光免疫染色の結果、各トロポエラスチンを 10 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で ARPE-19 細胞に添加した時各トロポエラスチンが構築したエラスチン繊維に大きな差は認められなかった(Figure 5-2A)。この結果は、各トロポエラスチンを 5 または 20 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で添加した場合も同様であった(data not shown)。また ELISA によるエラスチン繊維の半定量においても蛍光免疫染色と同様の結果を得た(Figure 5-2B)。尚、蛍光免疫染色(data not shown)、ELISA(HTE;circle, Δ 26A; triangle, Δ 32; square)において、組換えトロポエラスチンの添加濃度に関係なくフィブリリン-1 繊維は一定であった。

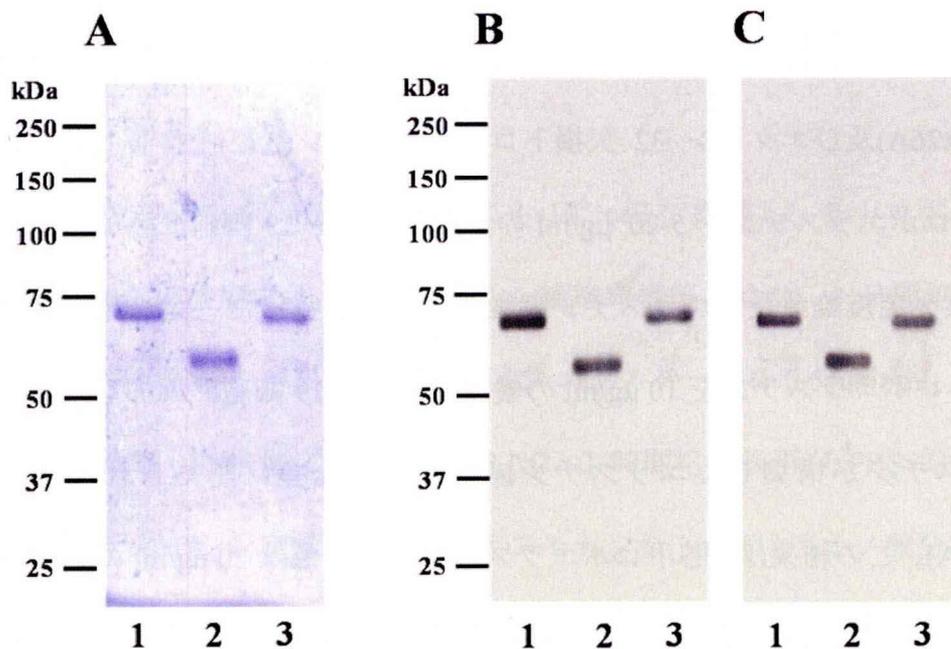
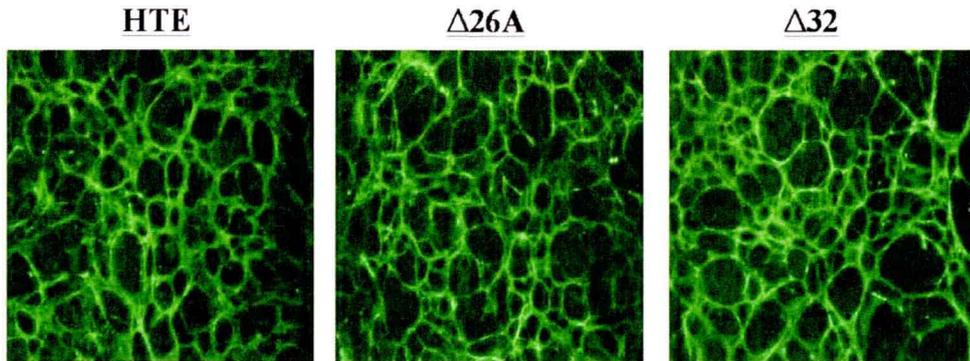


Figure 5-1 組換えトロポエラスチンの作製

精製したヒトトロポエラスチン(HTE; lane 1)、エクソン 26A 欠損トロポエラスチン(Δ 26A; lane 2)及びエクソン 32 欠損トロポエラスチン(Δ 32)を SDS-PAGE 後にクマシーブルーで染色した(A)。また抗 His-G 抗体(B)、抗ヒトトロポエラスチン抗体(C)をそれぞれ用いたウエスタンブロット法を行った。尚、組換えトロポエラスチンは 1 μ g/lane(A)または 500 ng/lane(B,C)にそれぞれ調整し電気泳動した。

A



B

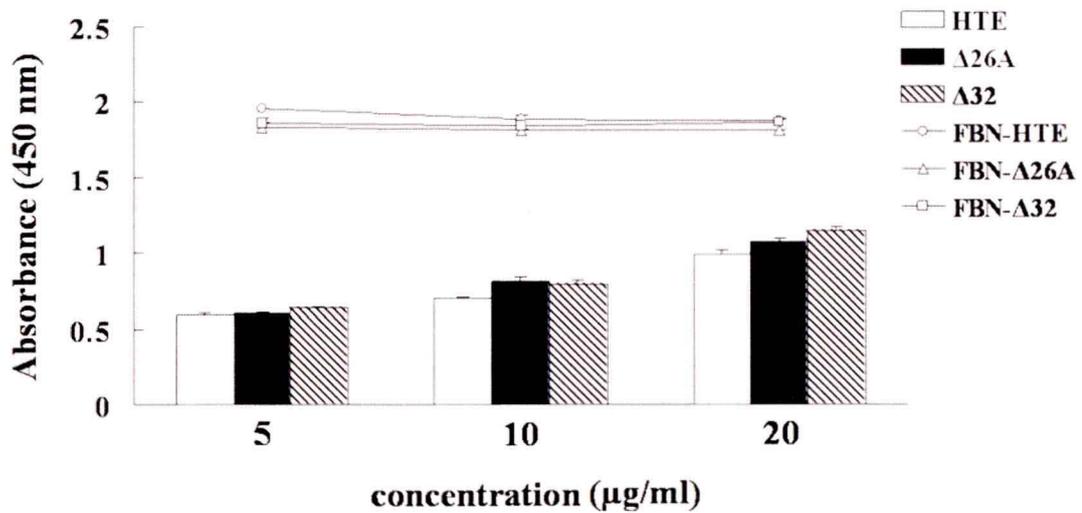


Figure 5-2 エラスチン繊維の蛍光免疫染色と半定量

(A) ARPE-19 細胞に各トロポエラスチン(10 ug/ml)を添加し 8 日間培養後、MAB2503 を用いた蛍光免疫染色を行った。

(B) ARPE-19 細胞を 96 穴プレートに播種後、HTE (open box)、Δ26A (closed box)、Δ32 (hatched box)を各濃度で添加し 8 日間培養後、抗エラスチン抗体 (MAB2503)または抗フィブリリン-1 抗体(FBN-1)を用いた ELISA を行った。(HTE; circle、Δ26A; triangle、Δ32; square)。測定波長 450 nm、対照波長 600 nm で測定した。Means ±SEM, n=3

デスモシンの定量

各トロポエラスチンを 10 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で ARPE-19 細胞に添加し、8 日間培養し構築されたエラスチン繊維に含まれるデスモシン量を測定した。各トロポエラスチンのマイクロフィブリル繊維への沈着量に変化は認められなかったが、このデスモシン量は HTE 添加と比較し、 $\Delta 26\text{A}$ 添加では有意に増加し $\Delta 32$ 添加では有意に減少した(Figure 5-3)。

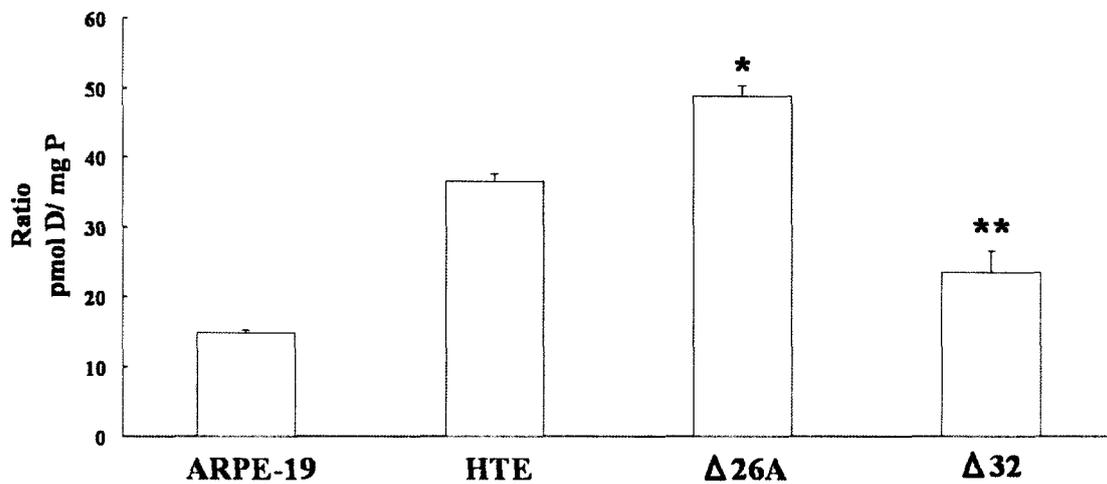


Figure 5-3 デスモシンの定量

ARPE-19 細胞に各トロポエラスチン(10 $\mu\text{g/ml}$)を添加し、8 日間培養した。デスモシン量(pmol)はアミノ酸分析により測定したシャーレ内の全タンパク質量(mg P)で補正しグラフ化した。Means \pm SEM, n=3. *p<0.05, **p<0.01, vs. HTE

トロポエラスチンの自己集合

各トロポエラスチンの自己集合を解析したところオルタネイティブスプライシング産物($\Delta 26A$; triangle、 $\Delta 32$; square)の自己集合開始温度は HTE(circle)に比べ高温であった(Figure 5-4)。

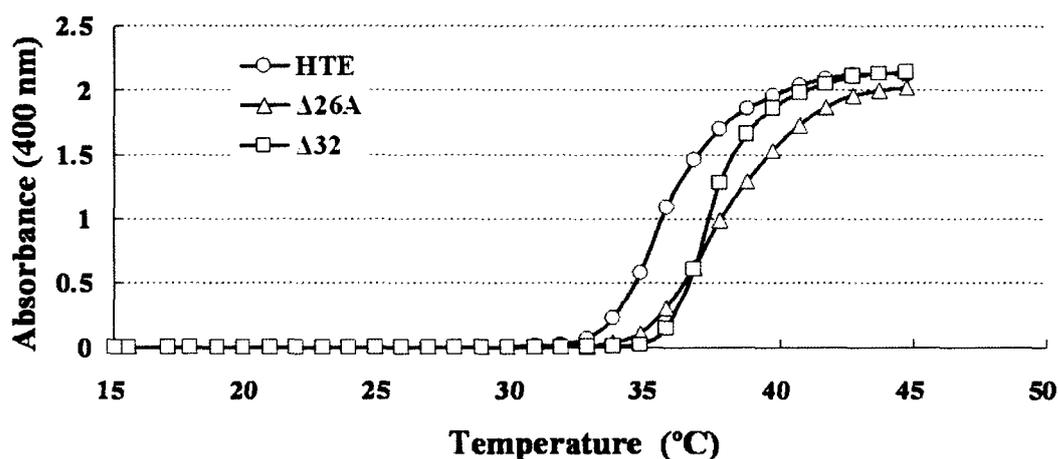


Figure 5-4 トロポエラスチンの自己集合

HTE (circle)、 $\Delta 26A$ (triangle)及び $\Delta 32$ (square)を PBS 中にそれぞれ 1 mg/ml になるように調整した。分光光度計を用い 30 秒間に 0.5°C の割合で温度を 15°C から 45°C まで上昇させ、30 秒間毎にその濁度を測定した(測定波長 400 nm、対照波長 600 nm)。

各トロポエラスチンとマイクロフィブリルタンパクとの結合

96 穴プレートにそれぞれコートした各トロポエラスチンとフィビュリン-5 または PET との結合を Solid phase binding assay 法を用い検討した。その結果、各トロポエラスチンとフィビュリン-5 との結合(上段)は、カルシウム存在下 (closed box)、非存在下(open box)に関わらず、HTE に比較し $\Delta 26A$ では有意に増加し、 $\Delta 32$ では有意に低下した。また各トロポエラスチンと PET との結合(下段)も同様であった (Figure 5-5)。

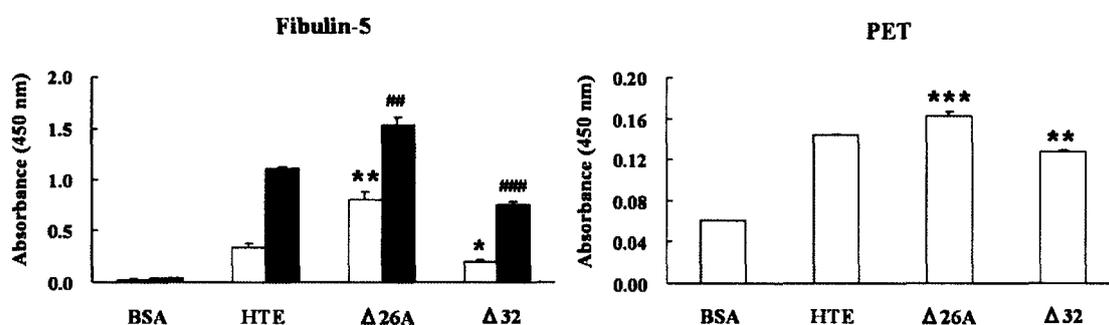


Figure 5-5 マイクロフィブリルタンパクとトロポエラスチンとの結合

96 穴プレートに nTE 及び fmTE、BSA をそれぞれ 10 $\mu\text{g/ml}$ コートし、固相でのフィビュリン-5(上段)または PET(下段)との結合を検討した。フィビュリン-5 と各トロポエラスチンとの結合は、カルシウム存在下(closed box)、非存在下 (open box)でそれぞれ検討した。測定波長 450 nm、対照波長 600 nm で各プレートの吸光度を測定した。Means \pm SEM., n=3 *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 or ##p<0.01, ###p<0.001 vs. nTE (カルシウムイオン存在下)

エラスチン繊維の分解

8日間、ARPE-19細胞に各トロポエラスチン(10 $\mu\text{g/ml}$)を添加しエラスチン繊維を構築させた後、ブタ膵由来エラスターゼを 0.5 unit/ml (closed box)、1.0 unit/ml (hatched box)の異なる酵素活性で添加した DMEM または DMEM (open box)に培地交換し、37°C で1時間培養した。その後前章と同様にデスモシンの定量を行った。各トロポエラスチンで構築したエラスチン繊維はエラスターゼ活性依存的に分解され、残ったエラスチン繊維中のデスモシン量を比較すると $\Delta 26\text{A}$ は、他のトロポエラスチンと比較し分解抵抗性を有した(Figure 5-6)。

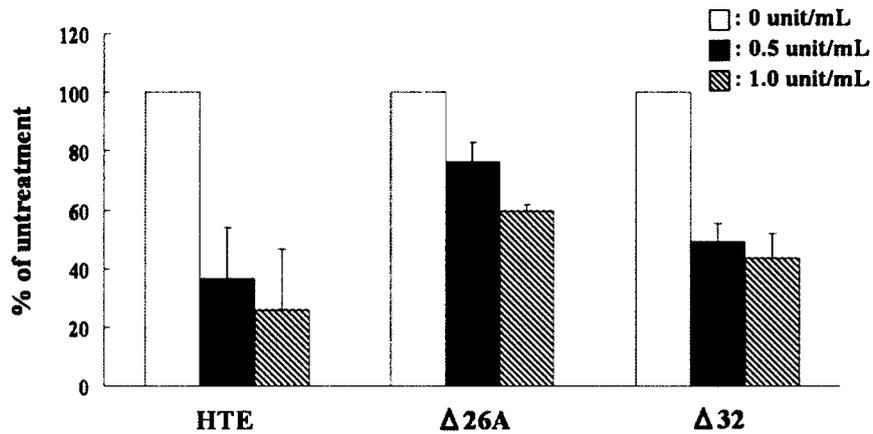


Figure 5-6 エラスチン繊維の分解

ARPE-19 細胞を 60 mm シャーレに播種し、各トロポエラスチン(10 μ g/ml)を添加した。8 日間培養後、PBS で洗浄し 0.5 unit/ml (closed box)、または 1.0 unit/ml (hatched box)の濃度でエラスターゼを含有した DMEM またはエラスターゼを含まない DMEM (open box)に培地交換した。37°C、1 時間培養後、デスモシンを採取し、ラジオイムノアッセイ法でデスモシンを定量した。グラフは、エラスターゼ未処理時のそれぞれの値を 100%とし、各エラスターゼ濃度処理時の値をそれぞれの未処理時の値に対する割合(% of untreated)で示した。Means \pm SEM., n=3

第四節 考察

エラスチン遺伝子のオルタネイティブスプライシングは、皮膚や血管、靭帯、肺などの組織で見られ、それら組織の機能特性を示す要因と考えられる^{7-10, 61)}。これまで、オルタネイティブスプライシング産物の発現解析は多く行われてきたが、それらが構築するエラスチン繊維の特性は未だ明らかとなっていない。本章では、トロポエラスチンアイソフォームの特性を検討するため、これらオルタネイティブスプライシング産物が構築した繊維の特性と構築した繊維のエラターゼに対する抵抗性を *in vitro* エラスチン繊維再構築モデルを用い解析した。

各トロポエラスチンのマイクロフィブリルへの沈着は、ほぼ同程度であったがデスモシン量は、HTE に比較し、 $\Delta 26A$ では有意に増加し、 $\Delta 32$ では有意に低下した。トロポエラスチン分子の分子間架橋は自己集合を介することが知られているが、PBS 中で各トロポエラスチンのコアセルベーションに大きな違いは認められなかった。トロポエラスチンは、温度の上昇に伴い分子中の疎水性領域が疎水結合し集合することで、エントロピーを低下させ水溶液中で安定する。最近、トロポエラスチンと結合するフィブリリン-1 のエクソン 9-17 までの部分配列が、トロポエラスチン分子のエントロピーを低下させることにより自己集合を促進すると報告された³³⁾。本研究において、HTE に比較し $\Delta 26A$ は、フィブリリン-5 やフィブリリン-1 の N 末端配列(PET)と強く結合した。マイクロフィブリルタンパクが存在する培養条件下において、 $\Delta 26A$ は、他のトロポエラスチンよりそれらと強く結合し自己集合が亢進した結果、架橋量が増加した

と推察される。一方、 $\Delta 32$ は、HTE に比較しマイクロフィブリルとの結合が低下していることから、構築するエラスチン繊維量に含まれる架橋量も低下したと考えられる。

$\Delta 26A$ が構築した繊維は、HTE や $\Delta 32$ が構築したエラスチン繊維と比較しエラスターゼに対し強い分解抵抗性を有した。エラスチン繊維の分解に用いたエラスターゼ活性は、単量体の $\Delta 26A$ が完全に分解される活性である(unpublished observations)。この結果はトロポエラスチンとマイクロフィブリルとの結合実験の結果と類似した。マイクロフィブリルは、トリプシンやエラスチン分解酵素の基質となることが知られており⁶²⁾、実際にエラスチン繊維を含む組織をエラスチン分解酵素で処理した時、エラスチン繊維が分解されず残ることがある。このことから Jones らは、マイクロフィブリルは、エラスチンを囲うように取り込むことにより、エラスターゼなどによる酵素の分解からエラスチンを防御していると推察している^{62,63)}。 $\Delta 26A$ は、マイクロフィブリルタンパクと強く結合することからマイクロフィブリル繊維に強く取り込まれ、その結果エラスターゼによる分解に対し抵抗性を示したと考えられた。

本研究の結果から、 $\Delta 26A$ は、マイクロフィブリルと相互作用が強く、構築した繊維はエラスターゼに対する分解抵抗性を持つことを明らかとした。また本モデルは構築させたエラスチン繊維を分解することで、エラスチン繊維分解も解析可能であった。エラスチン繊維の分解を分子レベルで解析することはエラスチン繊維分解亢進が原因で起こる肺気腫や、動脈硬化といった慢性疾患の発生病序や治療法の確立に寄与できることと思われる。

第六章 総括及び結論

1. 内因性のトロポエラスチンを発現せず、他の弾性繊維関連成分を発現するヒト網膜色素上皮細胞を用い、組換えトロポエラスチンを添加することでエラスチン繊維を構築することが可能となった。
2. 皮膚弛緩症患者で見られる変異トロポエラスチンは、自己集合開始温度の低下、及び分子間架橋形成の促進を認めたが、マイクロフィブリルへの沈着が低下することによりエラスチン繊維形成不全を引き起こすことが明らかとなった。
3. エラスチン遺伝子のオルタネイティブスプライシング産物であるエクソン26A 欠損トロポエラスチンは、マイクロフィブリルタンパクとの相互作用が強く、エラスターゼに対する分解抵抗性を持つことが明らかとなった。

以上のことより本研究で確立したモデルは、エラスチン繊維形成機序の解明のみならず変異トロポエラスチンが構築する繊維の特性を知る上でも有用であると考えられる。

エラスチン繊維の形成機序は、未だ詳細に解明されていないが今回の結果から、エラスチン繊維形成初期において Figure 6-1 のような機序を考えた。

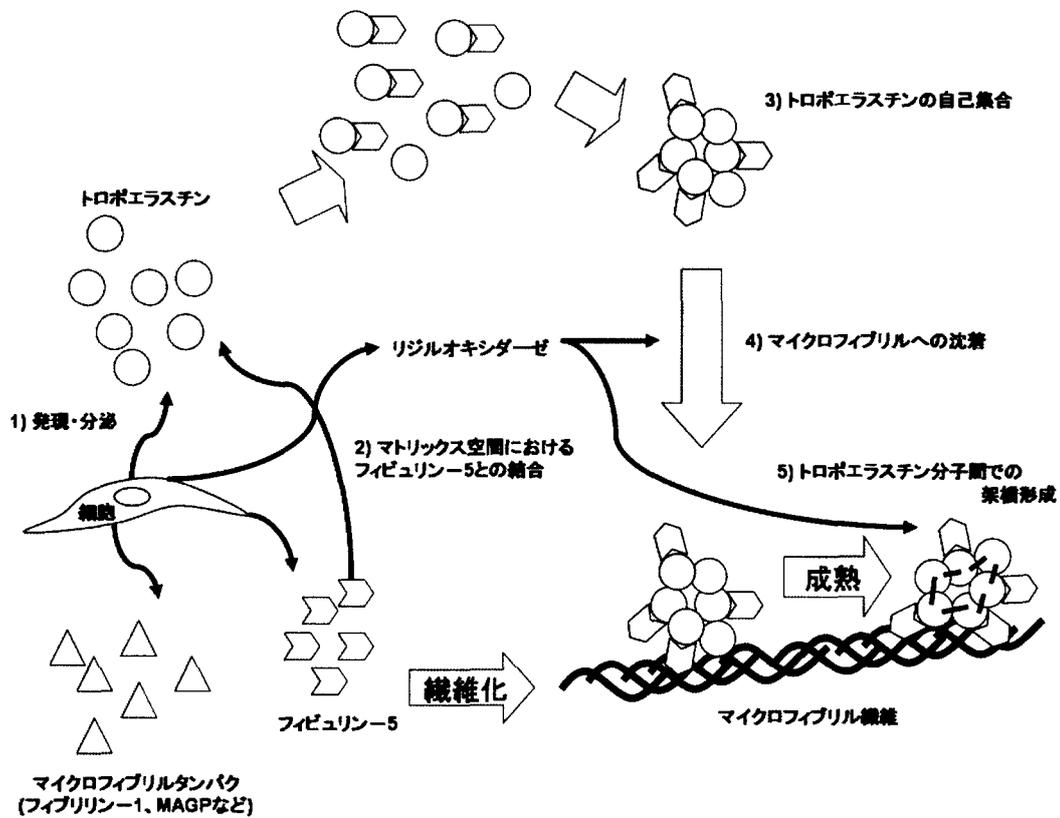


Figure 6-1 エラスチン繊維形成の初期段階モデル

エラスチンは、細胞外に分泌されマトリックス空間においてフィブリリン-5 との結合と自己集合を起こす。その後、マイクロフィブリル繊維へ沈着し、形成した集合体の中でリジロキシダーゼにより架橋を形成することで繊維を構築する。

エラスチンの前駆体であるトロポエラスチンは、細胞外に分泌されマトリックス空間においてフィブリン-5 との結合により自己集合が促進される。マイクロフィブリル繊維へ沈着した後、トロポエラスチンの集合体の中で架橋を形成して繊維を構築する。この時、リジルオキシダーゼは、マイクロフィブリル繊維への沈着とトロポエラスチン分子間の架橋形成に重要な役割を果たしている。

C 末端領域の変異によりマイクロフィブリルタンパクとの結合が低下することはすでに報告されているが、今回の結果から C 末端領域の変異は自己集合にも影響を与えることが示唆された。これは、本研究においての疎水性度の変化からも推察されるようにトロポエラスチン分子の二次構造変化が起因していると考えられる。トロポエラスチン分子の自己集合がその分子中の疎水性領域の数や配置に依存する³⁰⁾ことから、トロポエラスチン分子の立体構造が自己集合に寄与していると思われる。

我々は、ウシトロポエラスチン(BTE)のエクソン 2-15 の部分配列(FH)とエクソン 16-36 までの部分配列(BH)を作製し、それぞれの自己集合を測定したところ、FH は自己集合を起こさず、また BH は自己集合開始温度(~47°C)が BTE(~39°C)と比較し遅かった。これらを同時に存在させ、BTE と同じ疎水性領域数を存在させた場合、その自己集合開始温度は BTE と同じ温度にならなかった(unpublished observations)。構造の異なるトロポエラスチン分子が、個別に自己集合することも報告されている³¹⁾ことから、FH と BH が集合し 1 つの凝集塊を

形成することはないと考えられ、疎水性領域の数ではなく分子全体の立体構造が自己集合に重要であると推察される。これらのことからトロポエラスチン分子全体の立体構造がエラスチン繊維形成に重要な要因であると思われる。

また本研究からマイクロフィブリルタンパクとの強い結合がエラスチンを分解酵素から防御することが示唆された。実際、マイクロフィブリルタンパクとの結合が弱い皮膚弛緩症患者で見られる変異トロポエラスチンやヒトエラスチン遺伝子エクソン 36 欠損トロポエラスチンが構築したエラスチン繊維は、エラスターゼ処理により容易に分解された(unpublished observations)。このことからマイクロフィブリルタンパクとの結合はマイクロフィブリル繊維への取り込みを意味しており、マイクロフィブリル繊維に取り込むことで外部の因子からエラスチンを防御していると思われる。近年、エラスチン繊維の過剰な分解が原因となる肺気腫や、慢性閉塞性肺疾患(COPD)、動脈硬化の患者数は増加している。その原因として、COPD などでは初期診断が困難であること、さらに有効な治療法の確立がなされていないことが考えられる。本モデルを用いたエラスチン繊維分解研究は、これまでのエラスチン繊維抽出物を用いた分解研究とは違い、構築したエラスチン繊維そのものを分解することにより、その機構を分子レベルで検討することが可能であると考えられる。本研究で確立したモデルは、出生前診断や遺伝子診断で判明した変異トロポエラスチンが構築する繊維を生化学的に解析することで、慢性疾患の予防法、遺伝子治療や充填療法などの治療法の確立に大きく寄与すると思われる。

参考文献

- 1) D. Y. Li, B. Brooke, E. C. Davis, R. P. Mecham, L. K. Sorensen, B. B. Boak, E. Eichwald and M. T. Keating, "Elastin is an essential determinant of arterial morphogenesis," *Nature*, **393**, 276-80 (1998).
- 2) Z. Urban, S. Riazi, T. L. Seidl, J. Katahira, L. B. Smoot, D. Chitayat, C. D. Boyd and A. Hinek, "Connection between elastin haploinsufficiency and increased cell proliferation in patients with supravalvular aortic stenosis and Williams-Beuren syndrome," *Am J Hum Genet*, **71**, 30-44 (2002).
- 3) Z. Urban, V. V. Michels, S. N. Thibodeau, H. Donis-Keller, K. Csiszar and C. D. Boyd, "Supravalvular aortic stenosis: a splice site mutation within the elastin gene results in reduced expression of two aberrantly spliced transcripts," *Hum Genet*, **104**, 135-42 (1999).
- 4) Y. Kitano, K. Nishida, N. Okada, T. Mimaki and H. Yabuuchi, "Cutis laxa with ultrastructural abnormalities of elastic fiber," *J Am Acad Dermatol*, **21**, 378-80 (1989).
- 5) C. D. Boyd, R. A. Pierce, J. E. Schwarzbauer, K. Doege and L. J. Sandell, "Alternate exon usage is a commonly used mechanism for increasing coding diversity within genes coding for extracellular matrix proteins," *Matrix*, **13**, 457-69 (1993).
- 6) B. Vrhovski and A. S. Weiss, "Biochemistry of tropoelastin," *Eur J Biochem*, **258**, 1-18 (1998).
- 7) M. J. Fazio, D. R. Olsen, H. Kuivaniemi, M. L. Chu, J. M. Davidson, J. Rosenbloom and J. Uitto, "Isolation and characterization of human elastin cDNAs, and age-associated variation in elastin gene expression in cultured skin fibroblasts," *Lab Invest*, **58**, 270-7 (1988).
- 8) Z. Indik, H. Yeh, N. Ornstein-Goldstein, P. Sheppard, N. Anderson, J. C. Rosenbloom, L. Peltonen and J. Rosenbloom, "Alternative splicing of human elastin mRNA indicated by sequence analysis of cloned genomic and complementary DNA," *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**, 5680-4 (1987).
- 9) M. J. Fazio, D. R. Olsen, E. A. Kauh, C. T. Baldwin, Z. Indik, N. Ornstein-Goldstein, H. Yeh, J. Rosenbloom and J. Uitto, "Cloning of full-length elastin cDNAs from a human skin fibroblast recombinant cDNA library: further elucidation of alternative splicing utilizing exon-specific oligonucleotides," *J Invest Dermatol*, **91**, 458-64 (1988).
- 10) M. Holzenberger, S. A. Levi-Minzi, C. P. Herzog, S. B. Deak, L. Robert and C. D. Boyd, "Quantitation of tropoelastin mRNA and assessment of alternative splicing in human skin fibroblasts by reverse transcriptase-polymerase chain reaction," *PCR Methods Appl*, **3**, 107-14 (1993).
- 11) P. M. Gallop, O. O. Blumenfeld and S. Seifter, "Structure and metabolism of connective tissue proteins," *Annu Rev Biochem*, **41**, 617-72 (1972).
- 12) L. Y. Sakai, D. R. Keene and E. Engvall, "Fibrillin, a new 350-kD glycoprotein, is a component of extracellular microfibrils," *J Cell Biol*, **103**, 2499-509 (1986).
- 13) M. A. Gibson, J. L. Hughes, J. C. Fanning and E. G. Cleary, "The major antigen of elastin-associated microfibrils is a 31-kDa glycoprotein," *J Biol Chem*, **261**,

- 11429-36 (1986).
- 14) H. Yanagisawa, E. C. Davis, B. C. Starcher, T. Ouchi, M. Yanagisawa, J. A. Richardson and E. N. Olson, "Fibulin-5 is an elastin-binding protein essential for elastic fibre development in vivo," *Nature*, **415**, 168-71 (2002).
 - 15) D. P. Reinhardt, T. Sasaki, B. J. Dzamba, D. R. Keene, M. L. Chu, W. Gohring, R. Timpl and L. Y. Sakai, "Fibrillin-1 and fibulin-2 interact and are colocalized in some tissues," *J Biol Chem*, **271**, 19489-96 (1996).
 - 16) E. F. Roark, D. R. Keene, C. C. Haudenschild, S. Godyna, C. D. Little and W. S. Argraves, "The association of human fibulin-1 with elastic fibers: an immunohistological, ultrastructural, and RNA study," *J Histochem Cytochem*, **43**, 401-11 (1995).
 - 17) B. Reinboth, E. Hanssen, E. G. Cleary and M. A. Gibson, "Molecular interactions of biglycan and decorin with elastic fiber components: biglycan forms a ternary complex with tropoelastin and microfibril-associated glycoprotein 1," *J Biol Chem*, **277**, 3950-7 (2002).
 - 18) T. Karonen, L. Jeskanen and J. Keski-Oja, "Transforming growth factor beta 1 and its latent form binding protein-1 associate with elastic fibres in human dermis: accumulation in actinic damage and absence in anetoderma," *Br J Dermatol*, **137**, 51-8 (1997).
 - 19) H. C. Dietz and R. E. Pyeritz, "Mutations in the human gene for fibrillin-1 (FBN1) in the Marfan syndrome and related disorders," *Hum Mol Genet*, **4 Spec No**, 1799-809 (1995).
 - 20) M. Zanetti, P. Braghetta, P. Sabatelli, I. Mura, R. Doliana, A. Colombatti, D. Volpin, P. Bonaldo and G. M. Bressan, "EMILIN-1 deficiency induces elastogenesis and vascular cell defects," *Mol Cell Biol*, **24**, 638-50 (2004).
 - 21) S. A. Jensen, D. P. Reinhardt, M. A. Gibson and A. S. Weiss, "Protein interaction studies of MAGP-1 with tropoelastin and fibrillin-1," *J Biol Chem*, **276**, 39661-6 (2001).
 - 22) T. Sasaki, W. Gohring, N. Miosge, W. R. Abrams, J. Rosenbloom and R. Timpl, "Tropoelastin binding to fibulins, nidogen-2 and other extracellular matrix proteins," *FEBS Lett*, **460**, 280-4 (1999).
 - 23) P. Brown-Augsburger, T. Broekelmann, L. Mecham, R. Mercer, M. A. Gibson, E. G. Cleary, W. R. Abrams, J. Rosenbloom and R. P. Mecham, "Microfibril-associated glycoprotein binds to the carboxyl-terminal domain of tropoelastin and is a substrate for transglutaminase," *J Biol Chem*, **269**, 28443-9 (1994).
 - 24) B. A. Kozel, H. Wachi, E. C. Davis and R. P. Mecham, "Domains in tropoelastin that mediate elastin deposition in vitro and in vivo," *J Biol Chem*, **278**, 18491-8 (2003).
 - 25) B. A. Kozel, C. H. Ciliberto and R. P. Mecham, "Deposition of tropoelastin into the extracellular matrix requires a competent elastic fiber scaffold but not live cells," *Matrix Biol*, **23**, 23-34 (2004).
 - 26) P. Brown-Augsburger, T. Broekelmann, J. Rosenbloom and R. P. Mecham, "Functional domains on elastin and microfibril-associated glycoprotein involved in elastic fibre assembly," *Biochem J*, **318 (Pt 1)**, 149-55 (1996).
 - 27) T. M. Trask, B. C. Trask, T. M. Ritty, W. R. Abrams, J. Rosenbloom and R. P. Mecham, "Interaction of tropoelastin with the amino-terminal domains of

- fibrillin-1 and fibrillin-2 suggests a role for the fibrillins in elastic fiber assembly," *J Biol Chem*, **275**, 24400-6 (2000).
- 28) M. J. Rock, S. A. Cain, L. J. Freeman, A. Morgan, K. Mellody, A. Marson, C. A. Shuttleworth, A. S. Weiss and C. M. Kielty, "Molecular basis of elastic fiber formation. Critical interactions and a tropoelastin-fibrillin-1 cross-link," *J Biol Chem*, **279**, 23748-58 (2004).
 - 29) D. W. Urry, M. M. Long and H. Sugano, "Cyclic analog of elastin polyhexapeptide exhibits an inverse temperature transition leading to crystallization," *J Biol Chem*, **253**, 6301-2 (1978).
 - 30) P. Toonkool, S. A. Jensen, A. L. Maxwell and A. S. Weiss, "Hydrophobic domains of human tropoelastin interact in a context-dependent manner," *J Biol Chem*, **276**, 44575-80 (2001).
 - 31) C. M. Bellingham, M. A. Lillie, J. M. Gosline, G. M. Wright, B. C. Starcher, A. J. Bailey, K. A. Woodhouse and F. W. Keeley, "Recombinant human elastin polypeptides self-assemble into biomaterials with elastin-like properties," *Biopolymers*, **70**, 445-55 (2003).
 - 32) D. Bedell-Hogan, P. Trackman, W. Abrams, J. Rosenbloom and H. Kagan, "Oxidation, cross-linking, and insolubilization of recombinant tropoelastin by purified lysyl oxidase," *J Biol Chem*, **268**, 10345-50 (1993).
 - 33) A. W. Clarke, S. G. Wise, S. A. Cain, C. M. Kielty and A. S. Weiss, "Coacervation is promoted by molecular interactions between the PF2 segment of fibrillin-1 and the domain 4 region of tropoelastin," *Biochemistry*, **44**, 10271-81 (2005).
 - 34) T. M. Ritty, T. Broekelmann, C. Tisdale, D. M. Milewicz and R. P. Mecham, "Processing of the fibrillin-1 carboxyl-terminal domain," *J Biol Chem*, **274**, 8933-40 (1999).
 - 35) R. P. Mecham, "Modulation of elastin synthesis: in vitro models," *Methods Enzymol*, **144**, 232-46 (1987).
 - 36) B. W. Robb, H. Wachi, T. Schaub, R. P. Mecham and E. C. Davis, "Characterization of an in vitro model of elastic fiber assembly," *Mol Biol Cell*, **10**, 3595-605 (1999).
 - 37) Z. Indik, H. Yeh, N. Ornstein-Goldstein, U. Kucich, W. Abrams, J. C. Rosenbloom and J. Rosenbloom, "Structure of the elastin gene and alternative splicing of elastin mRNA: implications for human disease," *Am J Med Genet*, **34**, 81-90 (1989).
 - 38) L. Pereira, M. D'Alessio, F. Ramirez, J. R. Lynch, B. Sykes, T. Pangilinan and J. Bonadio, "Genomic organization of the sequence coding for fibrillin, the defective gene product in Marfan syndrome," *Hum Mol Genet*, **2**, 961-8 (1993).
 - 39) T. J. Mariani, P. C. Trackman, H. M. Kagan, R. L. Eddy, T. B. Shows, C. D. Boyd and S. B. Deak, "The complete derived amino acid sequence of human lysyl oxidase and assignment of the gene to chromosome 5 (extensive sequence homology with the murine ras reversion gene)," *Matrix*, **12**, 242-8 (1992).
 - 40) T. Nakamura, P. Ruiz-Lozano, V. Lindner, D. Yabe, M. Taniwaki, Y. Furukawa, K. Kobuke, K. Tashiro, Z. Lu, N. L. Andon, R. Schaub, A. Matsumori, S. Sasayama, K. R. Chien and T. Honjo, "DANCE, a novel secreted RGD protein expressed in developing, atherosclerotic, and balloon-injured arteries," *J Biol Chem*, **274**, 22476-83 (1999).

- 41) B. C. Starcher and R. P. Mecham, "Desmosine radioimmunoassay as a means of studying elastogenesis in cell culture," *Connect Tissue Res*, **8**, 255-8 (1981).
- 42) D. P. Wendel, D. G. Taylor, K. H. Albertine, M. T. Keating and D. Y. Li, "Impaired distal airway development in mice lacking elastin," *Am J Respir Cell Mol Biol*, **23**, 320-6 (2000).
- 43) S. S. Tang, P. C. Trackman and H. M. Kagan, "Reaction of aortic lysyl oxidase with beta-aminopropionitrile," *J Biol Chem*, **258**, 4331-8 (1983).
- 44) C. M. Bellingham, K. A. Woodhouse, P. Robson, S. J. Rothstein and F. W. Keeley, "Self-aggregation characteristics of recombinantly expressed human elastin polypeptides," *Biochim Biophys Acta*, **1550**, 6-19 (2001).
- 45) D. Y. Li, A. E. Toland, B. B. Boak, D. L. Atkinson, G. J. Ensing, C. A. Morris and M. T. Keating, "Elastin point mutations cause an obstructive vascular disease, supravalvular aortic stenosis," *Hum Mol Genet*, **6**, 1021-8 (1997).
- 46) M. Tassabehji, K. Metcalfe, J. Hurst, G. S. Ashcroft, C. Kielty, C. Wilmot, D. Donnai, A. P. Read and C. J. Jones, "An elastin gene mutation producing abnormal tropoelastin and abnormal elastic fibres in a patient with autosomal dominant cutis laxa," *Hum Mol Genet*, **7**, 1021-8 (1998).
- 47) P. Beighton, "Cutis laxa-a heterogeneous disorder," *Birth Defects Orig Artic Ser*, **10**, 126-31 (1974).
- 48) M. C. Zhang, L. He, M. Giro, S. L. Yong, G. E. Tiller and J. M. Davidson, "Cutis laxa arising from frameshift mutations in exon 30 of the elastin gene (ELN)," *J Biol Chem*, **274**, 981-6 (1999).
- 49) L. Rodriguez-Revenga, P. Iranzo, C. Badenas, S. Puig, A. Carrio and M. Mila, "A novel elastin gene mutation resulting in an autosomal dominant form of cutis laxa," *Arch Dermatol*, **140**, 1135-9 (2004).
- 50) T. Nakamura, P. R. Lozano, Y. Ikeda, Y. Iwanaga, A. Hinek, S. Minamisawa, C. F. Cheng, K. Kobuke, N. Dalton, Y. Takada, K. Tashiro, J. Ross Jr, T. Honjo and K. R. Chien, "Fibulin-5/DANCE is essential for elastogenesis in vivo," *Nature*, **415**, 171-5 (2002).
- 51) M. Miao, C. M. Bellingham, R. J. Stahl, E. E. Sitarz, C. J. Lane and F. W. Keeley, "Sequence and structure determinants for the self-aggregation of recombinant polypeptides modeled after human elastin," *J Biol Chem*, **278**, 48553-62 (2003).
- 52) J. Kyte and R. F. Doolittle, "A simple method for displaying the hydropathic character of a protein," *J Mol Biol*, **157**, 105-32 (1982).
- 53) B. Vrhovski, S. Jensen and A. S. Weiss, "Coacervation characteristics of recombinant human tropoelastin," *Eur J Biochem*, **250**, 92-8 (1997).
- 54) C. D. Boyd, A. M. Christiano, R. A. Pierce, C. A. Stolle and S. B. Deak, "Mammalian tropoelastin: multiple domains of the protein define an evolutionarily divergent amino acid sequence," *Matrix*, **11**, 235-41 (1991).
- 55) Z. Werb, M. J. Banda, J. H. McKerrow and R. A. Sandhaus, "Elastases and elastin degradation," *J Invest Dermatol*, **79 Suppl 1**, 154s-159s (1982).
- 56) J. Potempa, A. Dubin, G. Korzus and J. Travis, "Degradation of elastin by a cysteine proteinase from *Staphylococcus aureus*," *J Biol Chem*, **263**, 2664-7 (1988).
- 57) R. P. Mecham, T. J. Broekelmann, C. J. Fliszar, S. D. Shapiro, H. G. Welgus and R. M. Senior, "Elastin degradation by matrix metalloproteinases. Cleavage site

- specificity and mechanisms of elastolysis," *J Biol Chem*, **272**, 18071-6 (1997).
- 58) J. Rosenbloom, "Elastin: biosynthesis, structure, degradation and role in disease processes," *Connect Tissue Res*, **10**, 73-91 (1982).
- 59) L. Robert, A. M. Robert and B. Jacotot, "Elastin-elastase-atherosclerosis revisited," *Atherosclerosis*, **140**, 281-95 (1998).
- 60) H. S. Jensen, "Elastolytic activity of human monocytes: rheumatological aspects," *Clin Exp Rheumatol*, **10**, 607-12 (1992).
- 61) W. C. Parks, H. Secrist, L. C. Wu and R. P. Mecham, "Developmental regulation of tropoelastin isoforms," *J Biol Chem*, **263**, 4416-23 (1988).
- 62) P. A. Jones and Z. Werb, "Degradation of connective tissue matrices by macrophages. II. Influence of matrix composition on proteolysis of glycoproteins, elastin, and collagen by macrophages in culture," *J Exp Med*, **152**, 1527-36 (1980).
- 63) Z. Werb, D. F. Bainton and P. A. Jones, "Degradation of connective tissue matrices by macrophages. III. Morphological and biochemical studies on extracellular, pericellular, and intracellular events in matrix proteolysis by macrophages in culture," *J Exp Med*, **152**, 1537-53 (1980).

謝辞

本研究に際し、終始御指導と御鞭撻を賜りました星薬科大学臨床化学教室
瀬山義幸教授に謹んで心より感謝致します。

本研究に際し、終始懇篤なる御指導と御鞭撻を賜りました
星薬科大学臨床化学教室 輪千浩史助教授に謹んで御礼申し上げます。

本研究の遂行に当たりご協力ならびに御助言を頂きましたテキサス大学 Barry C.
Stracher 教授に厚く御礼申し上げます。

本研究に際し、ご協力いただきました杉谷英起博士、村田勇人修士、中澤順次
修士、安藤まどか修士、石田麻里絵修士、柴田(里)香世子修士、野中里紗学士、
大山裕之学士、池谷早織学士、鈴木美也子学士をはじめ星薬科大学臨床化学教
室員の皆様に御礼申し上げます。