

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19590778

研究課題名（和文） 組織線維化の過程における III 型コラーゲンの転写調節機構の解析

研究課題名（英文） The isolation study of transcriptional regulation protein for human typeIII collagen gene expression in the process of tissue fibrosis.

研究代表者

住吉 秀明 (SUMIYOSHI HIDEAKI)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：60343357

研究成果の概要：肝硬変をはじめとする病的な組織線維化に関わり、かつ遺伝子転写調節機構の解明の進んでいない III 型コラーゲンの転写調節タンパクについて解析した。転写活性発現に最も重要である転写因子 BBF と、新たに見いだされた特異的転写抑制に関わる転写因子 GS 5 について、二次元電気泳動上での泳動位置を確認し、部分精製をからめてスポットを特定できた。BBF については一部アミノ酸シーケンスを確認し現在精査している。生体内の解析に繋げるため、肝硬変モデルマウスを作成した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：肝臓学（C）

1. 研究開始当初の背景

肝硬変などに代表される組織線維症は慢性で難治性の疾患である。線維化を及ぼす主体はコラーゲン線維の増生であるが、その遺伝子転写調節機構については殆ど解っていない。特に III 型コラーゲンについては、重要な主要線維性コラーゲン分子種であるにも関わらず、他のコラーゲンとプロモーター構造が異なっており、解っていない事が多い。最も重要な転写因子としては転写開始点上流-63~-80bp にある B 領域と呼ばれる DNA 配列に結合する BBF という分子量 95kDa のタンパク質が報告されているが、まだ単離は

されていない。これは普遍的な転写因子であり、転写の特異性に対する関わりについては不明である。またルシフェラーゼを用いたプロモーターアッセイでは各細胞株の III 型コラーゲン発現の有無に関わらず、普遍的に転写活性が検出される矛盾が多く見られる。この点に関して、我々はプロモーター活性があるのにも関わらず、実際の III 型コラーゲン発現のない A204 細胞に、分子量約 40～53kDa の新規 DNA 結合タンパク質が存在するのを発見し、GS 5 と名付けた。また III 型コラーゲンを発現する RD 細胞を形質転換したところ III 型コラーゲン発現能を失った変異体が得

られ、その核タンパク中には GS 5 がみられるようになっていた。この新規転写因子は BBF の結合配列と全く同じ領域に結合し、熱安定性など他にも BBF と類似する物性がみられた。またこの転写抑制は本来の型コラーゲン遺伝子のみ起こっており、プラスミドやトランスジーン由来の外挿プロモーター上では転写活性が検出された。このことから本例は、染色体上の位置関係にも依存する遺伝子抑制機構があり、我々の発見した新規 DNA 結合タンパク質は、これに関わっていると考えられた。我々はこのタンパク質を単離することにより、新たなコラーゲン遺伝子転写調節機構を解明する事を目指し、本実験を計画した。

2. 研究の目的

平成19年度

(1) 型コラーゲン発現に重要な役割を果たすことが示されている転写因子BBFとGS5を多く発現しているA204細胞から5'伸張型発現cDNAライブラリーを作成し、プロモーター部位の結合配列DNAや、二次元電気泳動上のスポットより推測されるアミノ酸配列を基にスクリーニングを行い、BBFとGS5の単離を試みる。

(2) 型コラーゲンの強いプロモーター活性持ちながら、実際には型コラーゲンを発現していないA204細胞、プロモーター活性と実際の発現を示すRD細胞、さらに形質転換処理によって実際の発現を示さなくなったRD垂株の核タンパク質分画の二次元電気泳動法を行い、発現プロファイルを比較する。

(3) 二次元ゲル上での各DNA結合因子の位置決めを行ない、該当するスポットをアミノ酸配列決定等のキャラクタライズを行う。

平成20年度

(4) 前年度の結果をうけて、A204の核タンパク質分画をヘパリンアガロースカラム、イオン交換HPLC、特異的結合配列を含むDNAアフィニティカラムにより部分精製を行う。

(5) RD株と型コラーゲンを発現しなくなった垂株間でプロモーター領域のメチル化状態を調べる。

(6) 四塩化炭素による肝硬変モデルマウスや創傷治癒モデルマウスなどの個体レベルにおける線維化モデルをセットアップし、型コラーゲンの発現量の増大する事を確認し、上記実験結果の情報があれば個体レベルの事例とすり合わせを行う。これらの方法によりコラーゲン増生のメカニズムの解明を進める予定である

3. 研究の方法

平成19年度

(1) 5'伸張型発現cDNAライブラリー作成と、

BBF及びGS5因子のスクリーニング。型コラーゲン転写抑制にはたらく新規DNA結合タンパク質GS5を最も多く発現しているA204細胞からmRNAを抽出、精製し、出来るだけ5'側まで伸長した長鎖cDNAを作成した。cDNA作成はClontech社のSMARTcDNA合成システムにランダムプライム法を組み合わせて行なった。このcDNAを3フレーム発現型ファージベクターに挿入方向を揃えて組み込んで良質の発現型cDNAライブラリーを作成した。これに対し型コラーゲン転写開始点上流-50~-90bpのDNAをタンデムに繋げた断片をプローブとし、本領域と特異的に結合するタンパク質をサウスウエスタン法によりスクリーニングした。スクリーニングの方法はこの他にも、精製した核タンパク質のアミノ酸情報に基づいて作成したDNAオリゴマーを用いたハイブリダイゼーション法によっても行われた。

(2) 二次元電気泳動パターンの比較。G418薬剤耐性への形質転換の影響で型コラーゲン非発現型となったRD垂株と元来のRD株、A204株から核タンパク分画を抽出し、透析脱塩を行った後二次元電気泳動を行い、パターンの比較を行なった。さらに量の少ないものを調べるために銀染色も行った。

(3) 二次元ゲル上のDNA結合因子の位置決め。核タンパク質の二次元電気泳動について目的となるDNA結合タンパク質がどの位置にスポットされるか、切り出した後リフォールディングを行い、ゲルシフト法にてDNA結合活性画分の位置決めを行った。同定された位置にあるスポットをスポットカッターで切り出し、MALDI-TOF-MSにより、Mass解析を行った。また、BBFのスポットと思われるものについて、ABIプロテインシーケンサー社製により、アミノ酸配列解析を行った。

平成20年度

(4) 核タンパク質の部分精製。A204の核タンパク質分画を、ヘパリンアガロースカラムで部分精製した。カラムへの結合は100mM NaClの条件で行い、溶出は400mM NaClの条件で行った。DNA結合分画の確認を行った後、イオン交換HPLCを陰イオン担体SP、陽イオン担体DEAEそれぞれについて行った。カラムへの結合は50mM NaClの条件で行い、50~500mMのグラジエントにより溶出を行った。別に特異的結合配列を含むDNAによる部分精製を行った。型コラーゲン転写開始点上流-50~-90bpのDNAをPCRにより、片側をビオチンラベルした。これをアビジンカラムに結合させてものをアフィニティカラムとし、ゲルシフト法の条件で核タンパクと結合反応を行った後、カラムを洗浄することなく400mM KClの条件で溶出した。これを繰り返し行いDNA結合活性の有無をモニタ

ーした。

(5) プロモーター領域の DNA メチル化の解析。 RD 株とその亜株のそれぞれについて、プロモーター領域の DNA メチル化状態の違いを重硫酸塩によるメチルシトシンからウラシルへの塩基変換を検出することにより比較する。

(6) マウスモデルの作製。マウスを用いて四塩化炭素の継続的投与による肝硬変の線維化モデルを作製した。線維化した肝臓と正常の肝臓で組織切片を作製し、組織染色と in-situ hybridization によって、コラーゲン遺伝子の活性化を確認した。線維化のモデルはマウス背部皮膚創傷治癒例でも行われ、同様のモデルを作成した。

4. 研究成果

(1) サウスウエスタン法による BBF と GS 5 のスクリーニング。

発現型 cDNA ライブラリーからサウスウエスタン法を用いたスクリーニングで有力な cDNA クローンの同定には至らなかった。その理由として、BBF と GS 5 は DNA 結合認識配列がゆるく、DNA binding buffer 中にサケ精子 DNA をキャリアーとして加えたところ、シグナルが消失し、キャリアーなしでは高いバックグラウンドを生じた。一次スクリーニングで単離したサンプルは二次スクリーニングでは再現性を示せなかった。このため、cDNA を用いたアプローチは核タンパクの部分精製結果を待ってそのアミノ酸配列を基にする方法を取ることにした。

(2) 二次元電気泳動パターンの比較。

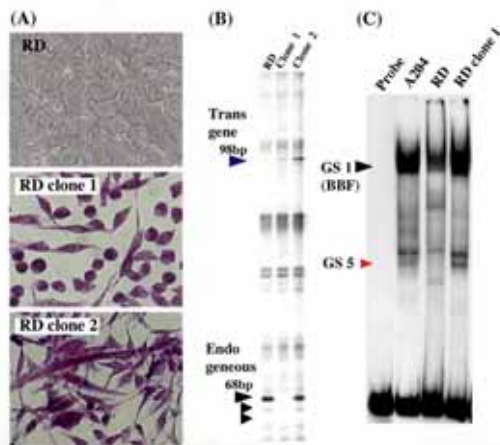


図1 (A) RD細胞は型コラーゲンを発現している横紋筋肉腫細胞である。これを G418 耐性株に形質転換すると2種類の形態の異なる細胞が得られた。(B) Clone 1 亜株はトランスジーンされた型コラーゲンプロモータは働いているが、細胞内在の型コラーゲン転写活性が失われている。(C) ゲルシフト法で Clone 1 亜株は型コラーゲン転写に重

要な普遍的転写因子 BBF のほかに GS 5 が見られるようになった。型コラーゲンのプロモーター活性を持ちながら実際の型コラーゲン発現が無い横紋筋肉腫細胞 A204 にも同じ因子が存在した。

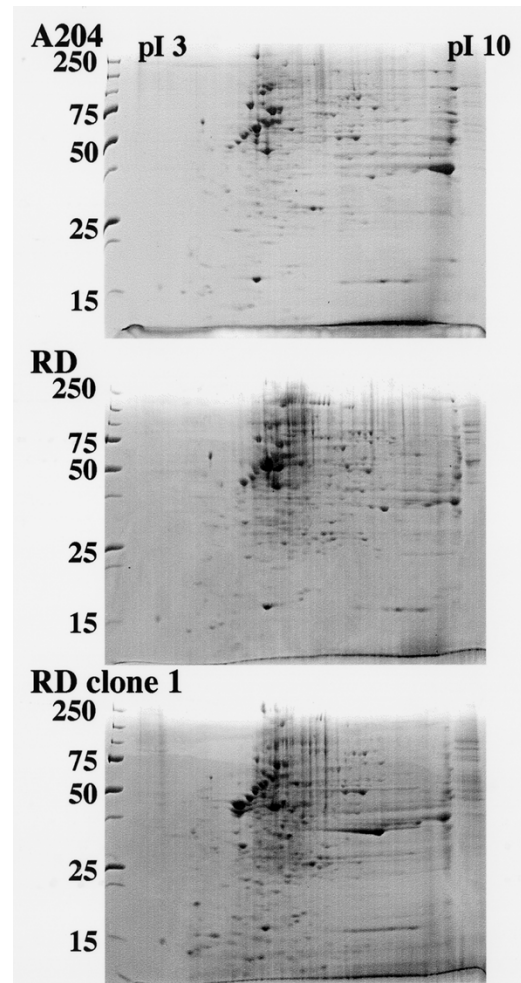


図2 型コラーゲン非発現型となった変異 RD 細胞株と、RD 細胞親株の全核タンパク質を二次元電気泳動法により、プロファイリングを行った。RD 変異株の全核タンパク質のパターンは、親株よりむしろ型コラーゲン発現状態の似る A204 細胞株に相似していた。

(3) 二次元ゲル上の DNA 結合因子の位置決め。核タンパク質の二次元電気泳動についてさらに、ゲルを区画別に切り出した後タンパクのリフォールディング操作を行い、ゲルシフト解析から、各 DNA 結合活性画分の位置決めを行った。その結果、型コラーゲン遺伝子発現に重要な普遍的転写因子 BBF と特異的新規転写抑制因子(GS 5)の二次元ゲル上の展開位置が同定できた。

(図3参照)

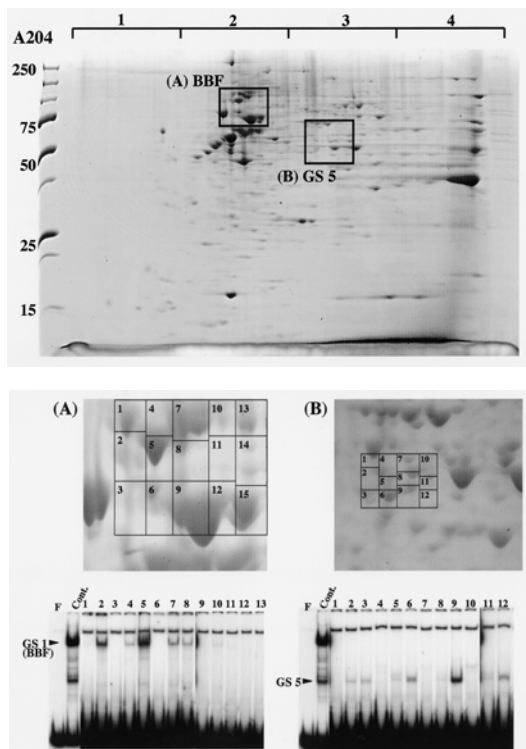


図3 二次元ゲル上の切り出し解析より割り出されたBBFとGS 5の泳動位置。上図AとBの拡大を下に示し、さらに細かい切り出し解析を行った。BBFは(A)-5、GS 5は(B)-9の区画に最も強いDNA結合活性があることがゲルシフト法にて確認できた。

BBFについては、(B)-9の区画にあるスポットを同定できた。スポットを切り出し、Mass解析を行ったが、既知のデータベースから有意な情報を見いだすことが出来なかった。アミノ酸シーケンサーでは11個のアミノ酸配列が解析できた。その配列はELATDGINGFNで、高等哺乳類には、報告がなかったが、*Anabaena variabilis* Multi-component transcriptional regulatorのN末と10個のアミノ酸が一致するなど、無視できない相同性があり、現在も確認を行っている。

この11アミノ酸を基にしてデジェネレーションオリゴを作成し、ハイブリダイゼーションによってライブラリーのスクリーニングを行った。しかしながらこの方法でも有力なクローン同定には至っていない。BBFの分子量は95kDaであり、この11アミノ酸はN末であることから、5'伸張クローンが得られにくいことが考えられた。そのため、さらに核タンパク質の精製を進め、部分分解を経て、より内側の配列情報を得てスクリーニングを拡大することを行っている。

(4) 核タンパク質の部分精製。A204細胞の核タンパク抽出液をヘパリンアガロ

ースにて一次精製した。続いてSP(陰イオン)、DEAE(陽イオン)カラムを用いたHPLCにより精製を試みた。しかし、どちらの精製法でもサンプルの希釈によってDNA結合活性の喪失が見られた。そのためフラクションを沈殿し、変性溶解、再構成を経てDNA結合活性分画を得た。BBFとGS 5はそれぞれ分離できたが、変性状態でしか回収できないことに加え、なお多数のタンパクが含まれ、完全な同定は困難であった。それに対して、DNAアフィニティカラムでは、通常のゲルシフトアッセイの結合条件下でBBFとGS 5を濃縮する事ができた。現在それぞれの濃縮分画を二次元電気泳動により比較し、濃度差のあるスポットを解析することを行っている。

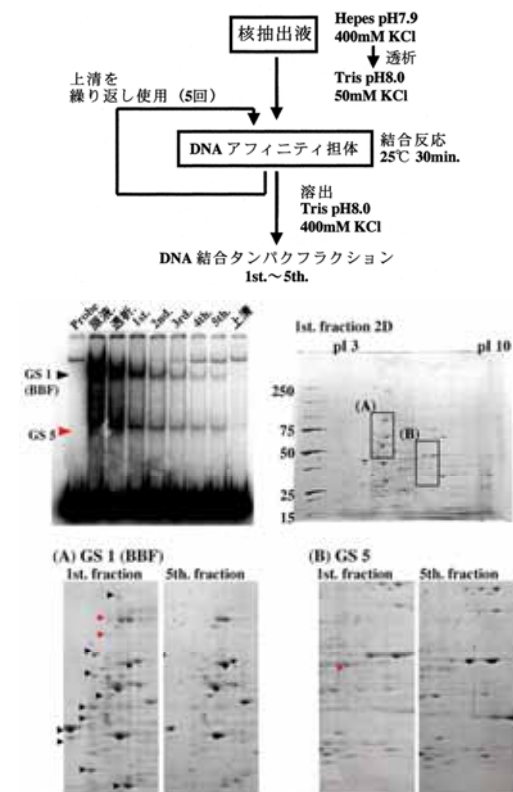


図4 DNAアフィニティカラムの条件。結合配列を含むDNAを担体上に固定し、核タンパク質抽出液を結合させ、溶出した。BBFとGS 5がnativeな形で得られ、これを繰り返すと核タンパク質抽出液BBFとGS 5が除去されていく。最初の溶出液と5回目の溶出液を二次元電気泳動下で比較すると様々な候補スポットが得られた。赤矢印はBBFとGS 5と目されるスポットを示す。

(5) RD細胞株と、型コラーゲン非発現型となった垂株間でプロモーター領域のメチル化を調べたところ、RDと、

亜株間で特に差異は認められなかった。このことから本ケースでの遺伝子の不活性化の要因にメチル化は関わっていないものと考えられた。

(6) ICRマウスに継続的に四塩化炭素を投与することによって肝硬変モデルマウスを作製した。各種コラーゲンの発現上昇はin-situ ハイブリダイゼーションにより確認できた。これらは切片、RNA抽出体の形で検体として確保している。

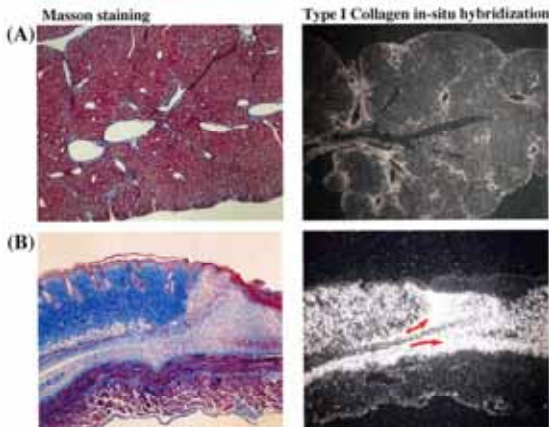


図5 四塩化炭素投与による肝硬変モデル(上)とマウス背部皮膚創傷治癒モデル(下)いずれも普段コラーゲン発現をあまり行っていない細胞が活性化することでコラーゲン高度発現するような変化を観察できた。

BBFと新規転写因子GS5は多数の類似点があり、タンパクの同定によってその関係が示されることが期待される。GS5は転写活性が不活性化された株のみに見られることと、転写制御はリンクしていると考えられ、本実験の成果が待たれている。実験の成果(4)で示されたDNAアフィニティカラムのスポットについて、今後より詳細なアミノ酸配列等が明らかになれば、作成されたcDNAライブラリーも有効に活用することが出来るようになり、これら因子の同定に繋がれると考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 5 件)

(1) Matsuo, N., Tanaka, S., Yoshioka, H., Koch, M., Gordon, M., K., and Ramirez, F. :Collagen XXIV (Col24a1) gene expression is a specific maker of osteoblast differentiation and bone formation: Connective

Tissue, Res., 49, 68-75, 1998, 査読有

(2) Abe, H., Ina, K., Kitamura, H., Sumiyoshi, H., Tatsukawa, S., Yoshioka, H., and Fugikura, Y. :Role of the CXCL12/CXCR4 axis in milky spots of rats bearing ascetic-type hepatoma: Anatomical Science International, 2009, 査読有

(3) Hagiwara, S., Iwasaka, H., Matsumoto, S., Noguchi, T. and Yoshioka, H. : Coexpression of HSP47 gene and type I and type III collagen genes in LPS-induced pulmonary fibrosis in rats, Lung, 183, 31-37, 2007, 査読有

(4) Hagiwara, S., Iwasaka, H., Matsumoto, S., Noguchi, T. and Yoshioka, H. : Association between heat stress protein 70 induction and decreased pulmonary fibrosis in an animal model of acute lung injury, Lung, 185, 287-293, 2007, 査読有

(5) Ohnishi, S., Sumiyoshi, H., Kitamura, S. and Nagaya, N. : Mesenchymal stem cells attenuate cardiac fibroblast proliferation and collagen synthesis through paracrine actions, FEBS Letters, 581, 3961-3966, 2007, 査読有

〔学会発表〕(計 10 件)

(1) 岡本修、藤原作平、住吉秀明、松尾哲孝、吉岡秀克、高橋直哉、保住健太郎、野水基義 :細胞外マトリックスタンパク質デルマトポンチンは表皮細胞接着活性を持つ : 第40回日本結合組織学会・第55回マトリックス研究会 2008年5月29-31日、駒場エミナース(東京)

(2) 住吉秀明、松尾哲孝、吉岡秀克 :皮膚創傷治癒過程をモデルとした組織線維化のメカニズムの解析 : 第40回日本結合組織学会・第55回マトリックス研究会 2008年5月29-31日、駒場エミナース(東京)

(3) 松尾哲孝、田中静子、住吉秀明、吉岡秀克、Ramirez Francesco :マウス24型コラーゲン $\alpha 1$ 遺伝子の発現調節機構の解析 : 第40回日本結合組織学会・第55回マトリックス研究会 2008年5月29-31日、駒場エミナース(東京)

(4) 住吉秀明、松尾哲孝、吉岡秀克 :創傷治癒におけるコラーゲン産生と癒着との関連 : 第31回日本分子生物学会・第81回日本生化学会 2008年12月9-12日、神戸ポートアイランド(神戸)

(5) 松尾哲孝、田中静子、住吉秀明、吉岡秀克、Ramirez Francesco :マウス24型コラーゲン $\alpha 1$ 遺伝子の発現調節機構の解析 : 第31回日本分子生物学会・第81回日本生化学会 2008年12月9-12日、神戸ポートアイランド(神戸)

(6) 住吉秀明、松尾哲孝、調恒明、吉岡秀克：
III 型コラーゲン遺伝子の転写調節機構 Vol. 3：
第 39 回日本結合組織学会・第 54 回マトリックス研究会 2007 年 5 月 9-11 日、
北とぴあ（東京）

(7) 松尾哲孝：線維性コラーゲン遺伝子の発現調節機構の解析（骨特異的に発現している新規コラーゲン遺伝子 (Col24a1) を中心に）：
第 31 回蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム 2007 年 9 月 20-22 日、
ゆふいん七色の風（由布院）

(8) 住吉秀明：皮膚創傷治癒過程をモデルとした組織線維化のメカニズムの解析：
第 31 回蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム 2007 年 9 月 20-22 日、
ゆふいん七色の風（由布院）

(9) 松尾哲孝、田中静子、住吉秀明、吉岡秀克、Ramirez Francesco：マウス 24 型コラーゲン $\alpha 1$ 遺伝子の発現調節機構の解析：
第 30 回日本分子生物学会・第 80 回日本生化学会 2007 年 12 月 11-15 日、
パシフィコ横浜（横浜）

(10) 住吉秀明、松尾哲孝、吉岡秀克：皮膚創傷治癒過程をモデルとした組織線維化のメカニズムの解析：
第 30 回日本分子生物学会・第 80 回日本生化学会 2007 年 12 月 11-15 日、
パシフィコ横浜（横浜）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

住吉 秀明 (SUMIYOSHI HIDEAKI)
大分大学・医学部・助教
研究者番号：60343357

(2) 研究分担者

松尾 哲孝 (MATSUO NORITAKA)
大分大学・医学部・准教授
研究者番号：10284788

吉岡 秀克 (YOSHIOKA HIDEKATSU)
大分大学・医学部・教授
研究者番号：00222430

濱中 良志 (HAMANAKA RYOUJI)
大分大学・医学部・助教
研究者番号：60274750

岡本 修 (OKAMOTO OSAMU)
大分大学・医学部・講師
研究者番号：40284799