

平成21年5月14日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19790554

研究課題名（和文） SLPI における転写調節機構の分子生物学的解析

研究課題名（英文） Molecular analysis of transcriptional function of SLPI

研究代表者

榊原 智博（SAKAKIBARA TOMOHIRO）

東北大学・病院・助教

研究者番号：80422111

研究成果の概要：肺組織に存在するタンパク分解酵素阻害である SLPI は様々な肺疾患に関与する可能性がある。その機能を解明するために、SLPI 結合タンパク質の候補である TaxREB107 に関して、SLPI との結合を確認し、さらに新規 SLPI 結合タンパク質を検索した。しかし実験結果において、SLPI と TaxREB107 との結合は証明されず、また新規 SLPI 結合タンパク質も同定できなかった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,600,000	0	1,600,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	330,000	3,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：SLPI、結合タンパク質

## 1. 研究開始当初の背景

吸器疾患は極めて多岐にわたり、肺癌、肺線維症、肺感染症などいずれも難治性の疾患で、今後日本において患者数は増加するものと考えられている。それぞれの疾患において喫煙や感染などの刺激により気道、肺胞の炎症、修復などが繰り返し起こり、疾患の発症機序に関与していることが推測されているが、その分子生物学的な発症機序は不明のままである。気道内に分泌されるタンパク質である Secretory leukocyte protease inhibitor

(SLPI) はセリン蛋白分解酵素阻害物質の一つで、気道、肺胞上皮の炎症、修復、維持に重要な働きをしていることが示されている (*Respir Res.* 1; 87, 2000, *Am J Respir Cell Mol Biol.* 23; 364, 2000)。さらに我々の SLPI ノックアウトマウスを用いた研究では、リポポリサッカライド投与によるエンドトキシンショックモデル実験において、ノックアウトマウスは有意差をもって死亡率が高く SLPI の感染防御、抗炎症作用における重要な働きを示唆している。また近年 SLPI の持

つ抗炎症作用の分子生物学的機構として、蛋白分解酵素阻害作用以外にも核内に移動して、転写レベルで様々な遺伝子の発現を調節していることが示唆されている(*JEM*, 202; 12, 2005)。このように SLPI は蛋白分解酵素阻害作用以外に転写調節機能を持っている可能性があり、その機能を分子生物学的に解明することにより、肺線維症、肺感染症など炎症を基礎とした呼吸器疾患の病態解明へとつながるものと考えられる。

SLPI の機能解明のため、これまでの研究において SLPI 結合タンパク質の同定をアフィニティー精製法を用いて試み、結合タンパク質の候補として Tax responsive element binding protein 107(TaxREB107)を同定した。TaxREB107 はヒト T 細胞白血病ウイルス 1 (HTLV-1) の Tax タンパク質の活性化因子として同定され、HTLV-1 のゲノム上の Tax responsive element に結合して HTLV-1 の増殖、感染 T 細胞の腫瘍化などにおいて役割を果たしていると考えられている。しかし T 細胞以外の細胞、組織においても核内に移行して、遺伝子のエンハンサーなどに結合して、遺伝子の転写制御を担っていることも示唆されている (*BBRC*, 252; 1998, *Gene*, 278; 2001, *BBA*, 1642; 2003)。以上から SLPI は単独でまたは他のタンパク質と共役して、本来の蛋白分解酵素阻害作用以外に、転写レベルで遺伝子発現の調節をしている可能性がある。

## 2. 研究の目的

SLPI の転写制御機能を解析し、ひいては呼吸器疾患の分子生物学的機構の解明を目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) SLPI と TaxREB107 の結合の証明

まず SLPI 同定蛋白質の候補として同定した TaxREB107 について結合の確認実験を *in vitro* で行った。方法は Blot overlay assay 法を用いた。まず GST 融合 TaxREB107 を発現させた大腸菌を培養し、その細胞溶解物の蛋白質を SDS-PAGE により分離、PVDF 膜に転写する。次に MBP 融合 SLPI を大腸菌に発現、精製して前述の PVDF 膜にバッファー中で結合させる。そして結合の有無を抗 MBP 抗体で確認した。

### (2) 抗 SLPI 抗体の作成

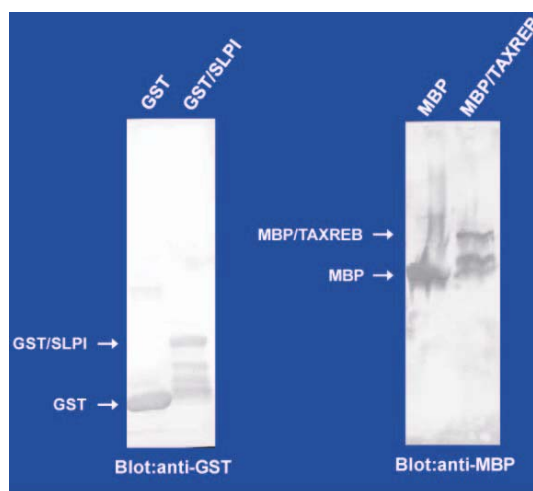
GST 融合 SLPI 蛋白を大腸菌に発現、グルタチオンセファロースを用いて精製。その後ウサギに免疫して、その血清から抗 SLPI 抗体を精製した。

### (3) SLPI 結合タンパク質の再同定

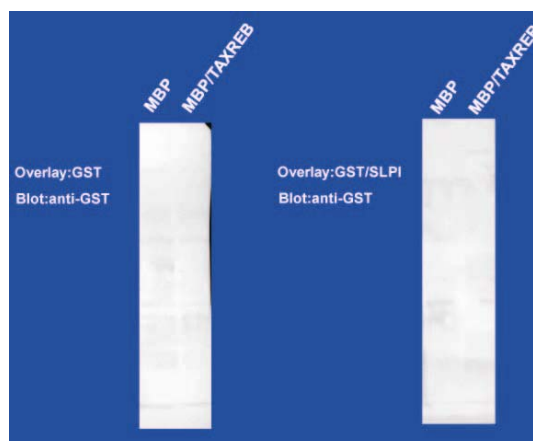
まず GST 融合 SLPI タンパク質を大腸菌に発現させ精製した。次にマウスから肺を取りだし、ホモジナイズしてマウス肺タンパク質抽出物を得た。このマウス肺タンパク質抽出物と、GST 融合 SLPI タンパク質をバッファー内でインキュベーションし、SLPI と結合するタンパク質を GST 融合 SLPI タンパク質に結合させる。その後グルタチオンセファロースを用いて、SLPI と結合タンパク質候補との複合体を精製し、そのタンパク質を SDS-PAGE により分離し、CBB 染色でタンパク質を可視化する。

## 4. 研究成果

### (1) SLPI と TaxREB107 の結合



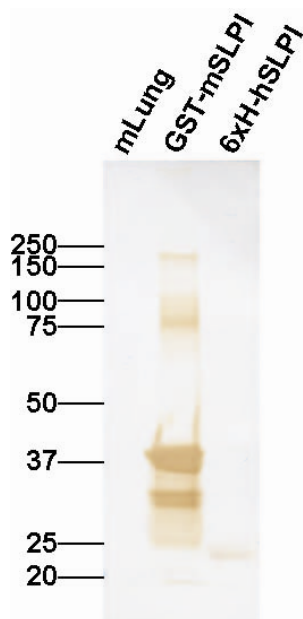
まず GST、GST 融合 SLPI、MBP、MBP 融合 TaxREB107 を大腸菌に発現させ、それぞれの発現を抗 GST 抗体、抗 MBP 抗体を用いて確認した。



MBP、MBP 融合 TaxREB107 を発現させた大腸菌溶解物を SDS-PAGE 後に PVDF 膜に転写して、GST、GST 融合 SLPI で Overlay したあとに抗 GST 抗体で免疫プロットを行ったが、結合は確認できなかった。

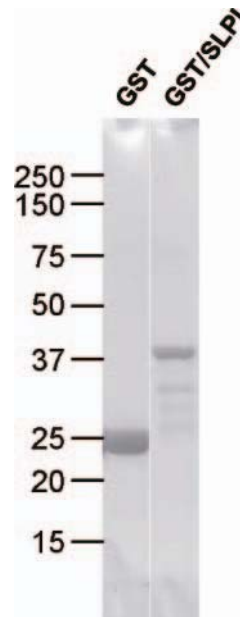
### (2) 抗 SLPI 抗体の作成

SLPI 結合タンパク質を同定するために、まず抗 SLPI 抗体の作成を試みた。GST 融合 SLPI をウサギに免疫して血清から抗 SLPI 抗体を精製した。その後免疫プロット法で抗体を確認した。しかし元々の抗原である GST 融合 SLPI とヒスチジン融合 SLPI には反応を認めしたが、肺組織タンパク質 (SLPI を含む) に対する反応性は認めなかった。



### (3) SLPI 結合タンパク質の再同定

SLPI 結合タンパク質を再同定するために Pull down 法を用いて、実験を行った。GST、GST 融合 SLPI を大腸菌に発現させ精製し、それぞれのタンパク質をグルタチオンセファロースに結合させる。その後マウス肺のタンパク抽出物を用いて、結合タンパク質の同定を試みた。SDS-PAGE 後に可視化されたタンパク質は GST、GST 融合 SLPI そのもので、結合タンパク質の候補は同定できなかった。



以上 2 年間の実験結果から、当初は TaxREB107 は SLPI 結合タンパク質の候補であったが、アフィニティー精製法では非特異的に結合していた可能性が高く、肺組織において SLPI 結合タンパク質は、極めて少数、少量のみ存在するか、またはアフィニティー精製法、Pull down 法では検出できない可能性が示唆された。また抗 SLPI 抗体の作成を試みたが、肺組織に発現する SLPI を認識する抗体は作成されず、SLPI そのものの抗原性が低い可能性が示唆された。

### 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 2 件)

①福原達朗、榎原智博、ほか 6 名、Successful treatment of carcinomatous meningitis with gefitinib in a patient with lung adenocarcinoma harboring a mutated EGF receptor gene, Tohoku J Exp Med, 4 月号、359-363、2008、査読有

②榎原智博、ほか 7 名、Adenocarcinoma With Epidermal Growth Factor Receptor Gene Mutations in Three Siblings, Journal of Thoracic Oncology, 3 月号、311-313、2008、査読有

6. 研究組織

(1) 研究代表者

榊原 智博 (SAKAKIBARA TOMOHIRO)

東北大学・病院・助教

研究者番号：80422111