

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：34417  
研究種目：基盤研究(B)（一般）  
研究期間：2019～2021  
課題番号：19H03439  
研究課題名（和文）生体組織の伸縮性を生み出すしくみの研究  
  
研究課題名（英文）Mechanism of tissue elasticity development  
  
研究代表者  
中邨 智之（NAKAMURA, Tomoyuki）  
  
関西医科大学・医学部・教授  
  
研究者番号：20362527  
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：我々の生体組織の伸縮性は、弾性線維という細胞外マトリックスが担っている。弾性線維の分解・劣化が肺気腫、動脈中膜硬化などの老化関連疾患や皮膚のたるみなどの直接原因となる。本研究では、弾性線維形成因子の中でもKOマウスの表現型から最も重要と考えられるFibulin-4の機能を重点的に研究し、Fibulin-4がエラスチン架橋酵素LOXの活性そのものに必須であることを見出した。またその詳細な分子機構を明らかにした。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

LOXはエラスチンのみならずコラーゲンの架橋も行う酵素であり、細胞外マトリックス形成の鍵となる分子である。これまで報告の無いメカニズムによってLOXが活性化されることが明らかとなり、細胞外マトリックスの強さや伸縮性の調節機構について新たな考え方を提示するものとなった。

研究成果の概要（英文）：Elastic fibers, an extracellular matrix, are responsible for the elasticity of our tissues. Degradation and deterioration of elastic fibers are the direct cause of aging-related diseases such as emphysema and arterial sclerosis, as well as sagging skin. In this study, we focused on the function of Fibulin-4, which is considered to be one of the most important elastogenic proteins based on the phenotypes of KO mice, and found that Fibulin-4 is essential for the activity of the elastin cross-linking enzyme LOX. We also revealed the molecular mechanism of LOX activation by Fibulin-4.

研究分野：細胞外マトリックス

キーワード：細胞外マトリックス

## 1. 研究開始当初の背景

弾性線維は、伸び縮みする組織(皮膚・動脈・肺など)に多くあって、その伸縮性を担う細胞外マトリックスである。皮膚のたるみだけでなく、心疾患予後悪化因子である動脈中膜硬化、高齢者の主要疾患である肺気腫も弾性線維の劣化・断裂が直接原因と考えられているため、弾性線維の劣化予防と再生は高齢化社会における極めて重要な課題である。しかし弾性線維のターンオーバーは極めて遅く、弾性線維の再生は困難と考えられてきた。

弾性線維形成には(1)ミクロフィブリルという線維の束が形成され、(2)エラスチンタンパク質がミクロフィブリルに沈着し、(3)エラスチンどうしが架橋される、というプロセスがある。我々はそれぞれのプロセスに必要な分泌タンパク質(弾性線維形成タンパク質)を見出し、報告してきた。これら弾性線維形成タンパク質の機能を明らかにすることが、弾性線維形成を理解し、その再生を可能にするものと期待できる。

## 2. 研究の目的

本研究では、弾性線維形成タンパク質の中でも特に Fibulin-4 の機能解明を目指した。エラスチンとコラーゲンの架橋を行うリシルオキシダーゼ(LOX)という酵素のノックアウトマウスと Fibulin-4 ノックアウトマウスの表現型は全く同じであり、どちらも生下時に肺気腫、動脈と横隔膜の破裂を来して死亡することから、Fibulin-4 が LOX の機能と関わりがあることが示唆されていた。これまでに Fibulin-4 が LOX プロドメインに結合することを見出していたが、それが LOX の機能にどのように関わるのかを解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

まず LOX タンパク質の精製法を確立した。DEAE FF カラムによく結合するが塩濃度を上げるだけでは溶出されず、溶出には 6M 尿素と高塩濃度の両方を必要とすることを見出した。透析後、Sephacryl S-200 カラムで精製を行うが、ここでも分子量に従って溶出されることは無く、尿素を用いてはじめて溶出されるという LOX の性質を利用して精製度を 90%以上に上げることに成功した。

LOX の活性は  $^3\text{H}$  ラベルしたリジンを加えて作成したトロポエラスチンを基質として測定した。エラスチンの架橋産物であるデスモシンとイソデスモシン、コラーゲンの架橋産物であるピリジノリンは HPLC で測定した。

精製 LOX 中の分子内架橋 Lysine Tyrosyl Quinone (LTQ) の定量解析は、LOX をフェニルヒドラジンと反応させた後で Asp-N, Trypsin, Lys-C で限定分解し、LC-MS/MS (Orbitrap 質量分析器) により行った。

精製 LOX 中の銅イオンの定量は ICP-MS により行った。

## 4. 研究成果

まず Fbln4 KO マウスの大動脈中 LOX は SDS-PAGE での流れ方が野生型マウス由来 LOX と比べてやや遅いことを見出した。これは Fbln4 KO の培養線維芽細胞 (Fbln4 KO MEF) に強制発現させた LOX についても同様であったため、Fibulin-4 は LOX の何らかの翻訳後修飾に関わると考えられた。

次に Fibulin-4 の有無による LOX の翻訳後修飾の変化が LOX の酵素活性に与える影響を調べた。野生型 MEF と Fbln4 KO MEF の培養上清から LOX を精製し、 $^3\text{H}$  ラベルしたトロポエラスチンを基質として活性を測定したところ、Fbln4 KO MEF 由来 LOX の活性は著しく低いことがわかった。また野生型マウス、Fbln4 KO マウス、LOX KO マウスの大動脈中のエラスチン架橋産物、コラーゲン架橋産物を測定したところ、Fbln4 KO マウスでは LOX KO マウス同様、いずれの架橋産物も著しく低下していた。すなわち、Fibulin-4 は LOX の酵素活性そのものに必要であることがわかった。

LOX 前駆体 (proLOX) はゴルジ体において銅イオンを取り込み、分子内架橋 Lysine Tyrosyl Quinone (LTQ) を形成する。この LTQ が補酵素としてはたらき、LOX の酵素活性中心となることが知られている。野生型 MEF と Fbln4 KO MEF 由来 LOX を精製して LTQ の有無を LC-MS/MS で調べたところ、Fbln4 KO MEF 由来 LOX には LTQ がほとんど検出されなかった。また結合している銅イオンを ICP-MS で定量したところ、Fbln4 KO MEF 由来 LOX に結合している銅イオンは著しく少なかった。従って、Fibulin-4 は proLOX が銅イオンを取り込んで LTQ を形成するのに必須であることが明らかとなった。

意外なことに、Fbln4 KO MEF の外からリコンビナント Fibulin-4 を加えると活性型 LOX が産生されることを見出した。Fibulin-4 はエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれたあとゴルジ体まで逆輸送され、ゴルジ体内で proLOX への銅イオン取り込みと LTQ 形成に寄与するという証拠を得た。

細胞外マトリックスにはエラスチンやコラーゲンのようにそれ自体が構造体を形成する分子の他に、トロンボスポンジン、デコリン、SPARC、LTBP、Fibulin のように「細胞外マトリックス

中に存在するがそれ自体は構造を担わない」分子が数多く存在しており「マトリセルラータンパク質」と総称されることもあるが、多くは機能がよく分かっていない。今回の発見は Fibulin-4 が分泌タンパク質であるにもかかわらずゴルジ体で主な作用を担っていることがユニークであるだけでなく、一旦分泌された Fibulin-4 が細胞内に取り込まれてゴルジ体に逆輸送されて働くというのはこれまでにない全く新しい酵素活性化の機序である。他の銅イオン含有酵素(チロシナーゼなど)の活性化の機序にも新たな視点をもたらすものであると同時に、マトリセルラータンパク質がただの足場(スキャフォールド)としての働きを超えて思ってもみない機能を持つ可能性を示すものであると言える。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Makino T, Kagoyama K, Murabe C, Nakamura T, Shimizu T	4. 巻 101
2. 論文標題 Association of Development of Solar Elastosis with Increased Expression of Fibrillin-1, LTBP-2 and Fibulin-4 in Combination with Decreased Expression of LTBP-4	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Acta Dermato Venereologica	6. 最初と最後の頁 adv00372
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2340/00015555-3738	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Noda Kazuo, Kitagawa Kaori, Miki Takao, Horiguchi Masahito, Akama Tomoya O., Taniguchi Takako, Taniguchi Hisaaki, Takahashi Kazuaki, Ogra Yasumitsu, Mecham Robert P., Terajima Masahiko, Yamauchi Mitsuo, Nakamura Tomoyuki	4. 巻 6
2. 論文標題 A matricellular protein fibulin-4 is essential for the activation of lysyl oxidase	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eabc1404
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.abc1404	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 該当する
1. 著者名 Kinoshita Yoshiaki, Ikeda Takato, Kushima Hisako, Fujita Masaki, Nakamura Tomoyuki, Nabeshima Kazuki, Ishii Hiroshi	4. 巻 171
2. 論文標題 Serum latent transforming growth factor- binding protein 4 as a novel biomarker for idiopathic pleuroparenchymal fibroelastosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Respiratory Medicine	6. 最初と最後の頁 106077 ~ 106077
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.rmed.2020.106077	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 1.Mori H, Yamada H, Toyama K, Takahashi K, Akama T, Inoue T, Nakamura T	4. 巻 257
2. 論文標題 Developmental and age-related changes to the elastic lamina of Bruch's membrane in mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol	6. 最初と最後の頁 289-301
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00417-018-4184-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 oyama S, Horie T, Nishino T, Baba O, Sowa N, Miyasaka Y, Kuwabara Y, Nakao T, Nishiga M, Nishi H, Nakashima Y, Nakazeki F, Ide Y, Kimura M, Tsuji S, Ruiz Rodriguez R, Xu S, Yamasaki T, Otani C, Watanabe T, Nakamura T, Hasegawa K, Kimura T, Ono K	4. 巻 8
2. 論文標題 Identification of Differential Roles of MicroRNA 33a and 33b During Atherosclerosis Progression With Genetically Modified Mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of the American Heart Association	6. 最初と最後の頁 e012609
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/JAHA.119.012609	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 Nakamura Tomoyuki, Bornstein Paul	4. 巻 1
2. 論文標題 Matricellular Proteins	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Reference Module in Biomedical Sciences	6. 最初と最後の頁 137 ~ 151
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/B978-0-08-102723-3.00009-3	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 中邨智之
2. 発表標題 循環器病学基礎研究の歴史をたどる ~ 生理学から分子生物学へ ~
3. 学会等名 第84回日本循環器学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tomoyuki Nakamura
2. 発表標題 Essential function of Fibulin-4 in lysyl oxidase activation.
3. 学会等名 Gordon Research Conference on Elastin and Elastic Fiber (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中邨智之
2. 発表標題 弾性線維形成のしくみ ~ 弾性線維形成タンパク質と日光弾性線維症の発症メカニズム
3. 学会等名 第41回日本光医学・光生物学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究協力者	赤間 智也  (AKAMA Tomoya)		
研究協力者	野田 和男  (NODA Kazuo)		

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		
米国	University of North Carolina	Washington University School of Medicine	