

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 6日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580359

研究課題名（和文） フォリスタチンファミリーの性状解析とその利用に関する研究

研究課題名（英文） Characterization and utilization of follistatin family proteins.

研究代表者

新井 浩司 (ARAI KOJI)

東京農工大学・農学部・准教授

研究者番号：70293016

研究成果の概要（和文）：TGF- β スーパーファミリーに属する成長因子に結合し、その作用を阻害するフォリスタチンファミリー蛋白質を医療等に利用するため、組換え型フォリスタチンファミリー蛋白質を大腸菌で発現させたところ、大腸菌で発現させた蛋白質は生物活性を示さなかった。そこで哺乳類細胞での発現を試み、生物活性を持つフォリスタチンファミリー部分蛋白質を得ることが出来た。しかし哺乳類細胞で発現させた蛋白質は発現量、純度に問題があり、今後さらなる発現系および精製法の改善が求められた。

研究成果の概要（英文）：To investigate pharmaceutical utilization of follistatin family proteins as TGF-beta superfamily antagonists, recombinant follistatin family proteins were expressed in *E. coli*. However, the proteins produced in *E. coli* did not show biological activities. Therefore, we examined mammalian cell-expression system. We could obtain biologically active proteins by the mammalian cell system but quantity and purity of the proteins remain to be improved.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：蛋白質、生理活性

1. 研究開始当初の背景

フォリスタチンファミリーに属する蛋白質は、トランスフォーミング増殖因子 β (TGF- β) スーパーファミリーに結合し、その作用を抑制的に調節することが知られている。フォリスタチンファミリーのリガンドとして同定されている TGF- β スーパーファミリーのメンバーは、脊椎動物の器官形成や生殖機能、肝再生、造血、骨格筋増殖などの

調節に中心的な役割を果たしており、フォリスタチンファミリーは TGF- β スーパーファミリー阻害薬としての利用が広い分野で期待できるものと考えられた。フォリスタチンファミリーに属する蛋白質としてフォリスタチンと follistatin-related gene (FLRG) が知られており、申請者らは FLRG が TGF- β スーパーファミリーに属するアクチビンおよび骨形成因子 (BMP) の結合蛋白質である

ことを明らかにし、そのアクチビンへの結合部位を 2000 年に同定した。FLRG とフォリスタチンはそれぞれ二つあるいは三つのフォリスタチンドメイン (FS ドメイン) と呼ばれる構造を持ち、申請者らのこれまでの研究によりいずれも二番目の FS ドメイン (FS2 ドメイン) 単独でアクチビンに結合しうることを明らかにした。FLRG とフォリスタチンのリガンド結合部位の組み換え体蛋白質は TGF- β スーパーファミリーアンタゴニストとしての利用が期待できると考えられたが、FS2 ドメイン単独ではアクチビン結合活性を示すもののアクチビン阻害活性は示さず、アクチビン阻害活性にはリガンド結合部位以外のドメインも必要であると考えられた。また、フォリスタチンファミリーのリガンドは様々な組織で発現しているため、FS ファミリーを TGF- β スーパーファミリー阻害薬として利用して期待する効果を得るには、組織に局在してリガンドの作用を阻害することが可能になるよう修飾を施す等の工夫が必要であると考えられた。

2. 研究の目的

本研究は、フォリスタチンファミリーの構造を基に利用性の高い TGF- β スーパーファミリーアンタゴニストを開発することを目的とした。フォリスタチンファミリーのアクチビン結合部位は約 70 アミノ酸残基からなるドメインあるが、この部位単独では生物活性を示さず、TGF- β スーパーファミリーアンタゴニストとして使用することはできない。天然型のフォリスタチンであれば生物活性を示すが、TGF- β スーパーファミリーアンタゴニストとして使用するには分子量は小さい方が扱いやすく、余分な構造をできるだけ含まないことが望ましい。そのような TGF- β スーパーファミリーアンタゴニストを作製するにはフォリスタチンが生物活性を示すために最低限必要の構造を明らかにすることが重要である。また、フォリスタチンファミリーのリガンドは多くの組織で発現しており、単純に投与した場合多くの組織で無差別に TGF- β スーパーファミリーの活性を阻害する可能性があるため、作用させたい組織に長時間局在する性質を持つことが望ましい。そこで本研究ではフォリスタチンファミリー蛋白質にヒトマトリックスプロテアーゼ - 2 (MMP-2) 由来のコラーゲン結合ドメイン (collagen-binding domain, CBD) を付加することを検討し、より利用価値の高い TGF- β スーパーファミリーアンタゴニストの開発も試みた。

3. 研究の方法

(1) フオリスタチンタンパク質発現ベクターの構築

フォリスタチンは N 末端ドメイン、FS ドメイン 1-3、酸性ドメインからなり、そのうち FS2 ドメインはアクチビン結合ドメインとして同定されている。そのため、FS2 ドメインを含む様々なフォリスタチンの部分蛋白質発現ベクターを構築した (図 1)。



図 1. 作製した組換え型フォリスタチンタンパク質のドメイン構造

① 大腸菌用発現ベクターの構築

N 末端にポリヒスチジンタグを付加する大腸菌用発現ベクター pRSETA および B を用い、フォリスタチンのリガンド結合ドメインである FS2 ドメインを中心とした様々なフォリスタチン部分蛋白質を発現するベクターを作製した。発現ベクターに用いたフォリスタチンの cDNA は RT-PCR により調整し、シークエンス解析により変異の無いことを確認した。また、フォリスタチンの部分蛋白質に組織局在性を付与するため、これらの発現ベクターにさらにヒト MMP-2 の CBD を N 末端側に挿入し、コラーゲン結合能を持つフォリスタチン蛋白質の構築を試みた。

② 哺乳類細胞用発現ベクターの構築

大腸菌用に作製したコンストラクトからフォリスタチンとヒト MMP-2 CBD の cDNA 部分を制限酵素で切り出し、N 末端にポリヒスチジンタグを付加する哺乳類用発現ベクター pcDNA3.1 His にサブクローニングした。

(2) 組換え型フォリスタチン蛋白質の精製

大腸菌および哺乳類細胞で発現させた組換え型蛋白質は GE ヘルスケア社のニッケルアフィニティーカラムを用いて精製した。

(3) 簡便なフォリスタチンの生物活性評価系の確立

これまで CHO 細胞にアクチビン反応性レポーターコンストラクトである p3TP-lux をトランスフェクションし、アクチビンによるルシフェラーゼ活性の誘導をどれだけ阻害するかでフォリスタチンの活性を評価してきたが、毎回のトランスフェクションの労力を省くため、ゲノム DNA にこのレポーターコンストラクトと内部標準用 β ガラクトシダーゼ

発現コンストラクトを挿入した細胞株を樹立した。

(4) 卵巣刺激ホルモン (FSH) β 鎖 mRNA の 3' 末端非翻訳領域 (3' UTR) を利用した生物活性評価系

フォリスタチンは FSH β 鎖 mRNA の 3' UTR に作用してその安定性を低下させることで FSH β 鎖 mRNA の発現を抑制することが示唆されている。そこで、ルシフェラーゼレポーターコンストラクトである pGL3 basic に CMV プロモーターを組み込み、恒常的にルシフェラーゼを発現するコンストラクトを作製した。さらにこのプラスミドのルシフェラーゼ蛋白質コード領域下流にマウス FSH β 鎖の 3' UTR を挿入したコンストラクトを作製した。このレポーターコンストラクトを細胞に導入した後、アクチビンとフォリスタチンを添加してルシフェラーゼ活性の変化を測定した。

(5) 組換え型フォリスタチンタンパク質のアクチビン阻害およびコラーゲン結合活性評価
前述の p3TP-lux を導入したレポーターアッセイ用細胞株を 10ng/ml の濃度のアクチビン A で刺激し、同時に作製した組換え型フォリスタチンを添加してそのアクチビン阻害作用をルシフェラーゼ活性により測定した。また、コラーゲン結合活性は I 型コラーゲンをコーティングした 96 穴プラスチックプレートに作製した組換え型蛋白質を含む溶液を添加し、プレート洗浄後に抗フォリスタチンウサギ抗体、西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗ウサギ抗体および ECL 試薬を用いてプレートに結合した組換え型フォリスタチン蛋白質を検出することにより測定した。

(6) 組換え型フォリスタチン蛋白質の生体への応用に役立てるための皮膚におけるアクチビンの発現解析

組換え型フォリスタチンを医薬品として生体に投与するにはその生理的な役割を把握しておかなければならない。本研究では皮膚創傷治癒への適用を想定し、皮膚創傷治癒時におけるアクチビンの役割を解明するため、創傷治癒時におけるアクチビンおよびフォリスタチンの発現パターン、皮膚線維芽細胞および三次元培養皮膚モデルにおけるアクチビンとフォリスタチン発現の調節因子などについて生化学的手法により検討した。

① 皮膚創傷治癒時のアクチビンおよびフォリスタチンの発現変化

8~10 週齢の雄マウス背部を剃毛し、直径 6mm の生検トレパンを用いてエーテル麻酔下で背部皮膚に全層欠損層を作製した。創傷作製後経時的に皮膚を採取し、TGF- β スーパーファミリーおよびフォリスタチンファミリ

一 mRNA の発現変化をリアルタイム PCR 法により解析した。

② ヒト皮膚細胞におけるアクチビンおよびフォリスタチン発現調節機構

ヒト皮膚線維芽細胞において炎症性サイトカインがアクチビンとフォリスタチンの発現に与える影響を調べるため、単層培養した線維芽細胞を 1ng/ml 濃度の IL-1 β で刺激し、その後のアクチビンとフォリスタチン mRNA の発現量をリアルタイム PCR 法で解析した。また、表皮角化細胞と真皮線維芽細胞の相互作用が皮膚のアクチビンとフォリスタチンの発現に与える影響を調べるため、真皮線維芽細胞と表皮角化細胞を三次元培養系で共培養し、各々の細胞における遺伝子発現の変化をリアルタイム PCR 法により解析した。

4. 研究成果

(1) 大腸菌で発現した組換え型フォリスタチン部分蛋白質

大腸菌で各種フォリスタチン部分蛋白質を発現させることに成功し、ニッケルカラムを用いて精製した組換え型蛋白質の純度と量も比較的良好であった。

(2) 大腸菌で発現した組換え型フォリスタチンの性状解析

① コラーゲン結合活性

図 1 に示したフォリスタチン部分蛋白質にヒト MMP2 CBD を付加した組換え型蛋白質のコラーゲン結合性を調べたところ、CBD を持ついくつかの蛋白質にコラーゲン結合性が認められ、コラーゲン結合性を持つフォリスタチン蛋白質の作製が可能であることが示された。

② アクチビン阻害活性

大腸菌で発現させたフォリスタチン蛋白質のアクチビン阻害活性を前述の CHO 細胞を用いたアッセイ系で検討したところ、いずれの蛋白質でもアクチビンに対する阻害活性は認められず、大腸菌で発現させた蛋白質は TGF- β 阻害剤としての使用には適さないことが示された。大腸菌内で発現した組換え型蛋白質はフォリスタチンの全長を発現させたものでもアクチビン阻害活性は示さなかったことから、大腸菌内ではフォールディング等に問題が生じ、アクチビン阻害活性を示さなかった可能性が強い。

(3) 哺乳類細胞で発現した組換え型フォリスタチン部分蛋白質

大腸菌用発現ベクターに組み込んだ cDNA を哺乳類用発現ベクターにサブクローニングし、CHO 細胞に遺伝子導入してその細胞内蛋白質からヒスチジンタグを利用したニッケルカラムによるアフィニティークロマトグラフィーで組換え型蛋白質の精製を試みた。そ

の結果、様々な蛋白質が夾雑したサンプルしか得ることはできなかった。しかし抗フォリスタチン抗体を用いてウエスタンブロットを行ったところ、これらのサンプルには目的のフォリスタチン蛋白質が含まれていることが確認された。

(4) 哺乳類細胞で発現した組換え型フォリスタチンの性状解析

ニッケルカラムで溶出したサンプルを用いてアクチビン阻害活性を調べたところ、いくつかのサンプルで有意にアクチビン活性を阻害することが確認できたことから、哺乳類細胞の発現系で作製したフォリスタチンの部分蛋白質は生物活性を有していることが示唆された。しかし、細胞内での発現系ではニッケルカラムによる精製法では高純度のサンプルが得られないことが明らかとなったため、現在はそれぞれの発現ベクターにフォリスタチンの細胞外分泌シグナルペプチドを付加し、組換え型蛋白質が分泌蛋白質として細胞外に分泌されるように発現コンストラクトを改変中である。これらの分泌型発現ベクターを CHO 細胞にトランスフェクションし、無血清の低蛋白質培地で培養することにより、より高純度のサンプルが大量に得られるものと期待できる。

(5) FSH β 鎖 mRNA 3' UTR を利用したフォリスタチン生物活性評価系

FSH β 鎖 mRNA 3' UTR を下流に付加した CMV-ルシフェラーゼコンストラクトではそうでないものに比較してルシフェラーゼ活性が著しく低下しており、FSH β 鎖 mRNA 3' UTR が mRNA の不安定化に関与するというこれまでの仮説を支持する結果となった。また、アクチビンの添加により FSH β 鎖 mRNA 3' UTR を付加したコンストラクトでのルシフェラーゼ活性が有意に増加する結果が得られ、本アッセイ系がアクチビンの活性評価に適用できる可能性が示された。しかし、フォリスタチンの単独添加では有意なルシフェラーゼ活性の変化は観察されず、本アッセイ系はフォリスタチンの生物活性評価系には適していないことが明らかとなった。

(6) 皮膚におけるアクチビンの発現解析

創傷治癒時のアクチビンの発現変化を調べたところ、アクチビンの発現は受傷後に著しく増加することが明らかとなった。また、培養系でのヒト皮膚細胞を使用した実験から、創傷治癒時のアクチビンの発現は創傷部位で増加する IL-1 により引き起こされることが示唆された。これらの結果からアクチビンは皮膚創傷治癒時に重要な役割をはたしていることが示唆され、皮膚創傷部でアクチビンの作用をコントロールすることにより皮

膚創傷治癒を改善することが可能であると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者および連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Arai KY, Ono M, Kudo C, Fujioka A, Okamura R, Nomura Y, Nishiyama T. IL-1 β stimulates activin β A mRNA expression in human skin fibroblasts through the MAPK pathways, the NF- κ B pathway, and prostaglandin E2. *Endocrinology* 152: 3779-3790, 2011. 査読あり
DOI: 10.1210/en.2011-0255
- ② Arai KY, Sato Y, Kondo Y, Kudo C, Tsuchiya H, Nomura Y, Ishigami A, Nishiyama T. Effects of vitamin C deficiency on the skin of the senescence marker protein-30 (SMP30) knockout mouse. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 385: 478-483, 2009. 査読あり
DOI: 10.1016/j.bbrc.2009.05.104

[学会発表] (計 8 件)

- ① 原 卓也、工藤千香子、野村義宏、西山敏夫、新井浩司. マウス皮膚におけるコラーゲン発現の性差. 第 43 回 日本結合組織学会学術大会、第 58 回 マトリックス研究会大会 合同学術集会、大分、2011 年 6 月 10-11 日
- ② 藤岡温子、小野真梨子、工藤千香子、岡村良子、野村義宏、西山敏夫、新井浩司. 皮膚線維芽細胞におけるアクチビンおよびフォリスタチン mRNA 発現調節機構. 第 43 回 日本結合組織学会学術大会、第 58 回 マトリックス研究会大会 合同学術集会、大分、2011 年 6 月 10-11 日
- ③ 藤岡温子、小野真梨子、工藤千香子、野村義宏、西山敏夫、新井浩司. IL-1 β によるヒト皮膚線維芽細胞のフォリスタチン発現調節. 第 42 回 日本結合組織学会学術大会、第 57 回 マトリックス研究会大会 合同学術集会、秋田、2010 年 8 月 19 日~20 日
- ④ 重水洋平、八谷有宇子、新井浩司、佐々木 翼、村口太一、安達栄治郎、林 利彦、西山敏夫. 再構成 IV 型コラーゲン会合体は培養人工皮膚の表皮基底細胞増殖を促進する. 第 42 回 日本結合組織学会学術大会、第 57 回 マトリックス研究会大会 合同学術集会、秋田、2010 年 8 月 19 日~20 日
- ⑤ Arai KY, Ono M, Kudo C, Nomura Y,

Nishiyama T. IL-1 beta stimulates activin βA mRNA expression in human skin fibroblasts through MAPkinase pathways, NF- κ B pathway and prostaglandin E2. Yokosuka science festa 2009, june 4-7 Shonan Village Center, Yokosuka, 2009

- ⑥ 中村陽平、八谷有宇子、新井浩司、秋本龍二、市川秀之、神谷章平、西山敏夫. パルス電気刺激が培養ヒト皮膚細胞に及ぼす影響. 第82回日本生化学会大会、神戸、2009年10月21日～24日
- ⑦ 八谷有宇子、伊藤嘉奈子、新井浩司、佐々木翼、安達栄治郎、林利彦、西山敏夫. 再構成 IV 型コラーゲン会合体が三次元培養皮膚モデルの構造と機能に及ぼす影響. 第82回日本生化学会大会、神戸、2009年10月21日～24日
- ⑧ Hachiya Y, Ito K, Arai KY, Sasaki T, Adachi E, Hayashi T, Nishiyama T. Effects of reconstituted type IV collagen aggregates on epidermal structure and function in human skin equivalents. 34th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, Fukuoka, Dec. 4-6, 2009

[その他]

ホームページ等

www.collagen-institute.jp/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新井 浩司 (ARAI KOJI)

東京農工大学・農学部・准教授

研究者番号：70293016

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

西山 敏夫 (NISHIYAMA TOSHIO)

東京農工大学・農学部・教授

研究者番号：60372455