

平成 21 年 5 月 8 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19580103

研究課題名（和文）タンパク質架橋反応を担う酵素群の最小基質配列の解明と活用

研究課題名（英文）Characterization and application of minimum substrate sequences of transglutaminase, a protein cross-linking enzyme.

研究代表者

人見 清隆（KIYOTAKA HITOMI）

名古屋大学・大学院生命農学研究科・准教授

研究者番号：00202276

研究成果の概要：タンパク質架橋酵素であるトランスグルタミナーゼは、高等動物では 8 つのアイソザイムが多彩な生命現象に関わる。反応においては基質中の特定のグルタミン残基を酵素が認識する。こうしたグルタミン残基を含む最小基質としてのペプチド配列を、ファージ提示型ライブラリを用い、皮膚特異的酵素や産業利用されている放線菌由来酵素について解明した。最小基質配列に相当するペプチドを用い、高感度な酵素活性検出系の確立や有用な機能タンパク質の固相化などの応用的展開も行った。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000円	600,000円	2,600,000円
2008年度	1,600,000円	480,000円	2,080,000円
総計	3,600,000円	1,080,000円	4,680,000円

研究分野：動物生化学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：トランスグルタミナーゼ、タンパク質架橋反応、酵素、最小基質

1. 研究開始当初の背景

トランスグルタミナーゼは、タンパク質どうしの架橋（接着）反応を触媒する酵素ファミリーで、血液凝固の最終段階や皮膚表皮形成をはじめ、生体内で多彩な生命現象に必須である。この酵素は、動物ではカルシウムイオン依存的に、グルタミン残基とリジン残基の間において共有結合レベルでの架橋形成を行う。また、一級アミンのグルタミン残基への導入や、グルタミン酸への変換反応も触媒することができる。このような特異的な「接着反応」は、生体内の様々な場所で多彩な生命現象に関わっている。遺伝子レベルでは、ヒトでは 8 つのアイソザイムが存在することが知られている。

また、このような蛋白質修飾反応は、食品等産業利用分野でも利用されており、放線菌由来の酵素表品はすでに食品製造過程に導入されている。

これまで研究代表者は、トランスグルタミナーゼが好んで架橋重合をする（基質中の）グルタミン残基の周辺配列の一次構造配列を同定する方法を、主要なアイソザイムである、Factor XIII(血液凝固)と TGase 2 について確立していた。ヒトなど高等動物にはこれ以外にも重要なアイソザイム、たとえば皮膚表皮形成に必須な、TGase 1 および TGase 3 が存在するが、これらについては、未だそのような関連情報は不明なままであった。

2. 研究の目的

以上のような研究背景のもとで、これまで確立した最小基質配列の同定のためのスクリーニングを、皮膚表皮に存在するトランスグルタミナーゼ (TGase 1, TGase 3) や、食品製造等、産業分野で利用される放線菌由来のトランスグルタミナーゼについても適用し、架橋重合の生じる蛋白質群に必要な基質としての配列の同定を行うことを目的とした。このことにより、本酵素反応が進行する際の機構解明や、阻害剤の開発、酵素利用など幅広い応用展開に向けての基盤情報が得られることを期待した。特に、皮膚表皮の酵素については、両者 (TGase 1, TGase 3) が同じ反応機構でありながら、どのように表皮内の構造蛋白質が架橋重合し、硬度形成に役割分担をしているのか、という知見を明らかにできると考えたからである。

また、得られた最小基質配列は、ペプチドとしての配列を「接着のためののりづけ配列」として活用できると考えた。これらを機能性タンパク質に融合し、有効利用する目的で検討した。

3. 研究の方法

タンパク質架橋酵素の至適な配列の同定を皮膚特異的な酵素 (TGase 1) について行った。昆虫細胞系で発現精製した TGase 1 を得て、ファージディスプレイランダムペプチドライブラリを用いて、ペプチド配列候補を得た。その後、融合蛋白質としてこれらの配列を大腸菌で発現・精製し、その反応性を検討した。得られた反応性の良い配列をさらに特異性 (他のアイソザイムとの反応交差性) について検討した結果、一つの高反応性ペプチド配列を選択した。これを用いて、高感度に皮膚表皮での活性の視覚化を試みた。

微生物 (放線菌 *Streptomyces mobaraensis*) 由来の酵素も、カルシウム依存性はないものの、酵素の反応機構は同じであるので、同様のスクリーニングのアプローチが可能と考え、放線菌由来の酵素についても行った。得られた候補配列を検討して、酵素の反応機構について考察を加えるとともに、合成ペプチドレベルでの反応性、特異性を調べた。

また、最小基質配列を活用した応用展開として、マイクロタイターウェルを固相とし、標識した基質配列ペプチドを用いて迅速で高感度なアッセイ系の確立を試みた。

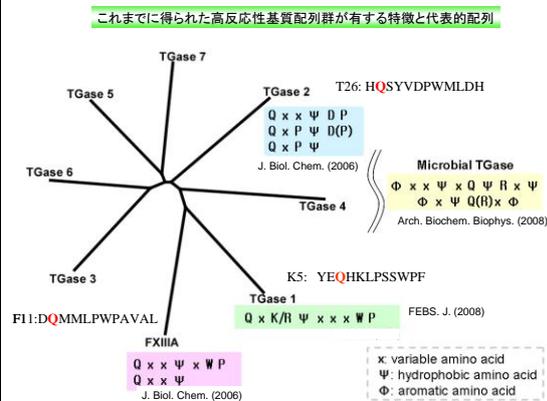
さらなる応用例としては、有用な機能性タンパク質の固相化を試みた。まず、機能を有するタンパク質 (一本鎖抗体、酵素) の N 末端あるいは C 末端に、TGase 2 の最小基質配列を遺伝子工学的に融合したものを大腸菌において発現、精製した。これらを、アミノ基を突出させるように化学的に操作したゲルを用いて、トランスグルタミナーゼの働

きによって方向を制御して、かつ効率上昇を目指して酵素反応による固相化を試みた。

4. 研究成果

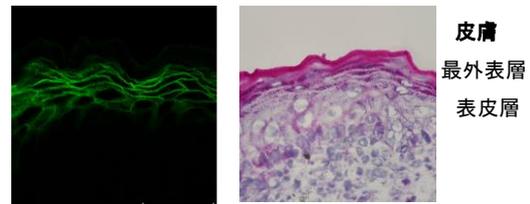
(1) 目的とした皮膚表皮形成に必要な蛋白質架橋酵素群 (TGase 1, TGase 3) について、最小基質配列を得べくスクリーニングを行った。その結果、TGase 1 については高い反応性を示す配列群を得た。これらの配列の特徴は従来得られている TGase 2 や Factor XIII での基質配列とは類似点は有するものの、異なる傾向であることを明らかにした。

トランスグルタミナーゼは一群のファミリーを形成しているが、基質として認識する蛋白質はそれぞれ異なり、その要因として認識されるグルタミン残基周辺の一次構造に違いがあることを示した (図)。



また、今回得られた、TGase 1 の最小基質配列は、大腸菌において発現させた融合タンパク質や合成ペプチドとして解析検討した場合においても、他アイソザイムとの交差性は低く、TGase 1 に対しての高い反応性と特異性を示した。得られた代表的な配列については、反応に重要なアミノ酸残基をアラニンス置換により解析して明らかにした。

さらにこの最小基質配列の応用方法として、蛍光標識したペプチドを皮膚組織に加えて反応させることによって、皮膚表皮内の内在性の活性を容易に検出するシステムの構築に成功した (図)。



蛍光観察 色素染色
 (蛍光標識した最小基質ペプチドを用い、初めて皮膚での架橋形成の視覚化に成功)

また、最小基質配列の応用的展開として、迅速で高感度な酵素活性測定方法を確立した。マイクロタイターウェルを用い、一級アミンを固相化したのちに、ビオチン標識した最小基質配列に相当するペプチド (TGase1, TGase2, Factor XIII にそれぞれ対応する合成ペプチド) を基質として反応させた。この方法により、従来よりも迅速なアッセイ系が確立できた。またこの方法は、従来市販されている固相系のアッセイシステムよりも、50-100 倍程度の高感度なものであることが明らかになった。また、このアッセイ系の特長として、各アイソザイムに特異的に活性検出を行えることを、マウスの組織抽出液を対象にして示すことができた。

もう一方の皮膚表皮特異的なトランスグルタミナーゼである TGase 3 についても、配列候補群をスクリーニングの結果多数得ることに成功した。得られた候補配列は、他の TGase の最小基質配列で得られているものとは類似傾向があるが、いくつかのアミノ酸配列分布において、特徴がみられた。現在、これらの配列はペプチド融合蛋白質として大腸菌で発現することに成功しているため、今後これらの反応性を詳細に解析し、性質を明らかにする予定である。

(発表等における雑誌論文、主として①、②、④)

(2) 食品成分の改変に用いられている、放線菌由来の TGase についてもスクリーニングを行い、数種の最小基質配列を得た。この微生物 TGase はその性質、構造共に、高等動物のものとは異なるが、同様に基質配列も全く異なる傾向を示した (前出図)。放線菌由来の酵素は、その立体構造がすでに明らかになっており、酵素の活性部位周辺と、得られた基質配列のアミノ酸配列の傾向分布 (立体構造) を検討して、反応機構について考察した。今後の産業利用上での活用をめざし、これらの最小基質配列の中から、最も反応性の高い配列を合成ペプチドのレベルで検討した結果、反応性および特異性について高いものであることがわかった。

(発表における雑誌論文としては主に⑤)

(3) すでに得ている、最小基質配列を用いて、有用な機能性タンパク質の固相化への応用展開を試みた。対象としたタンパク質としては、GST (グルタチオン S トランスフェラーゼ) および一本鎖抗体 (ウシ血清アルブミンに対する遺伝子組換え産物としての抗体) を用いて、それぞれ、N 末端、C 末端に、得られていた最小基質配列を遺伝子工学的に融合付加したところ、きわめてトランスグルタミナーゼに対する反応性が上昇した。このよ

うに修飾された蛋白質は、一級アミンに対して基質として効率よく反応できる。そこで、一級アミンをゲル表面に有するように化学的処理を施し、酵素の存在下で、上の 2 つのタンパク質を固相化した。その結果、どちらにおいても、単純な共有結合反応よりも、活性部位を効果的に保持するように方向制御した状況で、効率的な固相化が達成された。これを踏まえて今後、他の素材への有効な固相化方法を展開する可能性を示した。

(発表等における雑誌論文、主に②、⑨)

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 9 件)

①Alea, M., Kitamura M., Thomas V., Martin, G., Hitomi, K., Alaoui, S., Development of an isoenzyme-specific colorimetric assay for TGase 2 cross-linking activity. Anal. Biochem. 389, 150-156 (2009) 査読有

②Hitomi, K., Kitamura, M., Sugimura, Y. Characterization of the preferred substrate sequences for tissue-type transglutaminase. Amino Acids, 36, 619-624 (2009) 査読有

③Cheng T., Ivonne MJJ, van Vlijmen-Willems, Hitomi K., Pasch MC, PEJ van Erp, Schalkwijk, J., and Zeeuwen, P. Colocalization of cystatin M/E and its target proteases suggests a role in terminal differentiation of human nail and hair follicle. J Invest. Dermatol. 129, 1232-1242 (2009) 査読有

④Sugimura, Y., Hosono M., Yamanishi K., Tsuda T., Maki M., Hitomi K. Identification of preferred substrate sequences for transglutaminase 1: development of a novel peptide that can efficiently detect cross-linking enzyme activity in the skin. FEBS J. 278, 5667-5677 (2008) 査読有

⑤Sugimura, Y., Yokoyama, K., Nio, N., Maki M., Hitomi K. Identification of the preferred substrate sequences of microbial transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis* using a phage-displayed peptide library. Archives. Biophys. Biochem. 477, 379-383 (2008) 査読有

⑥Kawai Y., Wada, F., Sugimura Y., Maki, M., Hitomi, K. Transglutaminase 2 activity promotes membrane resealing upon mechanical damages in a lung cancer cell line A549. Cell Biology International. 32, 928-934

(2008) 査読有

⑦Yorikawa, C., Takaya E., Shibata, H., Shibata, H., Hitomi, K., Maki, M., Human calpain 7/PalBH associates with a subset of ESCRT-III-related proteins in its N-terminal region and partly localizes to endocytic membrane compartments. J. Biochem., 143, 731-735 (2007) 査読有

⑧ Wada, F., Hasegawa, H., Nakamura A., Sugimura, Y., Sasaki, N., Shibata, H., Maki, M., Hitomi, K. Identification of substrates for transglutaminase in Physarum polycephalum, an acellular slime mold, upon cellular mechanical damage. FEBS J., 274, 2766-2777 (2007) 査読有

⑨Sugimura, Y., Ueda, M., Maki, M. Hitomi, K., Novel site-specific immobilization of functional protein using a preferred substrate sequence for transglutaminase 2. J. Biotechnol. 131, 121-127 (2007) 査読有

[学会発表] (計 12件)

①角田佳奈子、眞海喬生、渡辺一哉、杉村禎昭、柴田秀樹、牧正敏、人見清隆 骨芽細胞におけるトランスグルタミナーゼの発現と基質解析 日本農芸化学会大会 2009年3月29日 福岡

②杉村禎昭、細野真代、北村三矢子、柴田秀樹、牧正敏、人見清隆 皮膚型トランスグルタミナーゼの高反応性基質ペプチドを用いた *in situ* 酵素活性の新規検出法 国際生化学会分子生物学会大会 2008年12月9日神戸

③人見清隆 タンパク質架橋酵素：トランスグルタミナーゼの反応機構と応用 日本農芸化学会大会 2008年3月29日 名古屋

④杉村禎昭、細野真代、横山慶一、丹尾希、柴田秀樹、牧正敏、人見清隆 放線菌由来トランスグルタミナーゼに対する高反応性基質配列の同定と解析 日本農芸化学会大会 2008年3月28日 名古屋

⑤人見清隆 Identification and characterization of the preferred substrate sequences for transglutaminases. 国際生化学会分子生物学会大会 2007年12月12日横浜

⑥細野真代、杉村禎昭、北村三矢子、山下博之、柴田秀樹、牧正敏、人見清隆 皮膚特異的トランスグルタミナーゼ(TGase 1)の高反応性基質配列の同定 国際生化学会分子生物学会大会 2007年12月11日 横浜

⑦杉村禎昭、細野真代、横山慶一、丹尾希、柴田秀樹、牧正敏、人見清隆 微生物型トランスグルタミナーゼに対する高反応性器質配列の探索と解析 国際生化学会分子生物学会大会 2007年12月11日横浜

⑧河合良樹、和田文孝、杉村禎昭、柴田秀樹、牧正敏、人見清隆 タンパク質架橋酵素反応は動物細胞での物理的傷害の修復に必要である 国際生化学会分子生物学会大会 2007年12月11日横浜

⑨細野真代、杉村禎昭、北村三矢子、柴田秀樹、牧正敏、人見清隆 皮膚特異的トランスグルタミナーゼ(TGase 1)の高反応性基質配列の同定 日本農芸化学会関西中部合同支部例会 2007年9月21日 愛知

⑩河合良樹、和田文孝、柴田秀樹、牧正敏、人見清隆 トランスグルタミナーゼは動物細胞での物理的傷害の修復に必要である日本農芸化学会関西中部合同支部例会 2007年9月21日 愛知

⑪ Identification of the preferred substrate sequences for transglutaminases using phage-displayed peptide library. Hitomi K., Sugimura, Y., Hosono M., Kitamura, M., Maki M., 9th International Conference on Transglutaminase and Protein cross-linking. 2007 Sep. 2nd Morocco

⑫ Analysis for the substrate preference of keratinocyte transglutaminase (TGase 1) using phage-displayed peptide library. Sugimura, Y., Hosono M., Kitamura, M., Maki M., Hitomi K., 9th International Conference on Transglutaminase and Protein cross-linking. 2007 Sep. 2nd Morocco

6. 研究組織

(1) 研究代表者

人見 清隆 (KIYOTAKA HITOMI)

名古屋大学大学院生命農学研究科・准教授

研究者番号：00202276

(3) 連携研究者

山西 清文 (KIYOFUMI YAMANISHI)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：10182586

(4) 研究協力者

杉村 禎昭 (YOSHIAKI SUGIMURA)

名古屋大学大学院生命農学研究科・博士後期

課程学生・学術振興会特別研究(DC1)