

平成21年 6月 10日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007~2008

課題番号：19580336

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構造を基盤としたペプチド創薬

研究課題名（英文） Characterization of follistatin family proteins and development of pharmaceutical peptides based on the structure of the follistatin family.

研究代表者

新井 浩司 (ARAI KOJI)

東京農工大学・農学部・助教

研究者番号：70293016

研究成果の概要：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 TGF- β スーパーファミリー阻害薬として利用するために、まずフォリスタチンファミリーの様々な部位の部分蛋白質を作製し、TGF- β スーパーファミリー結合部位を同定した。さらにその結合部位の TGF- β スーパーファミリー阻害作用を検討したが、結合部位単独では阻害効果を示さず、TGF- β スーパーファミリーの作用阻害には TGF- β スーパーファミリーへの結合活性以外の要因が重要であることが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：畜産学・獣医学

科研費の分科・細目：基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：フォリスタチンファミリー、TGF- β スーパーファミリー、フォリスタチンドメイン

1. 研究開始当初の背景

フォリスタチンファミリー (FS 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。FS 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、FS 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。FS 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、FLRG では二番目の FS ドメイン (FS2 ドメイン) がアクチビン結合部位である。一方フォリスタチンに関しては、FS1 と FS2 ドメインを含む領域がアクチビンの生物活性を抑制しうることを、海外のグループが 2006 年に明らかにしていた。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ものと考えられたが、アクチビン以外のリガンドも同じ部位と結合しているかは不明であった。また、FS ファミリーのリガンドは広範囲にわたり、特定のリガンドの作用を阻害する組み換え体蛋白質を作製するにはさらなる工夫が必要であると考えられた。また、フォリスタチンの生物活性は多くの場合 TGF- β スーパーファミリーとの結合能で説明可能であるが、それだけでは説明の難しい現象も存在し、それはフォリスタチン分子内の塩基性領域と細胞表面のヘパラン硫酸プロテオグリカンとの相互作用で説明されているため、塩基性ペプチドによる修飾も有用な TGF- β スーパーファミリーアンタゴニスト開発に有効な手段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 あるいは 150 アミノ酸残基からなる比較的扱いやすいサイズのペプチドであり、この部位の組み換え体蛋白質を作製すれば TGF- β スーパーファミリーアンタゴニストとして働くものと期待された。しかしフォリスタチンファミリーのリガンド特異性は低いため、リガンド結合部位にランダムアミノ酸変異を施し、スクリーニングによりリガンド特異性の高い変異体を探し出すことも試みた。また、塩基性ペプチドによる修飾なども行い、高い組織局在性を持つなど、より利用価値の高い TGF- β 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) ラットフォリスタチンおよび FLRG の組換え型部分蛋白質の作製

フォリスタチンの各ドメイン単位での TGF- β スーパーファミリー結合活性を明らかにするため、①FS1 ドメイン単体(FST FS1)、②FS2 ドメイン単体(FST FS2)、③FS3 ドメイン単体(FST FS3)、④FS1 ドメインと FS2 ドメインを含むもの(FST FS1+2)、⑤FS2 ドメインと FS3 ドメインを含むもの

(FST FS2+3)、⑥FS1 ドメインから FS3 ドメインまでを含むもの(FST FS1+2+3)、⑦フォリスタチン 288 の全アミノ酸配列を含むもの(FST288)の計 7 種類の cDNA を RT-PCR により調整した。

FLRG についても各ドメイン単位の TGF- β スーパーファミリー結合活性を確認するため、①FS1 ドメイン単体(FLRG FS1)、②FS2 ドメインと C 末端側の酸性領域を含むもの(FLRG FS2 (AR+))、③前述の部分蛋白質から酸性領域を取り除いたもの (FLRG FS2 AR(-))、④FS1 ドメイン、FS2 ドメインと C 末端側酸性領域を含むもの (FLRG FS1+2 AR(+))、⑤前述の部分蛋白質から酸性領域を取り除いたもの(FLRG FS1+2 AR(-))の計 6 種類の cDNA を作製した。また、塩基性ペプチドによる修飾が FLRG の FS2 ドメインの性状に与える影響を解析するため、⑥FLRG FS2 (AR+)の N 末端側に 6 個のアルギニン残基を付加したもの (FLRG FS2 6xR AR(+))、⑦FLRG FS2 (AR-)の N 末端側に 6 個のアルギニン残基を付加したもの (FLRG FS2 6xR AR(-))、⑧FLRG FS2 (AR+)の N 末端側に 8 個のアルギニン残基を付加したもの (FLRG FS2 8xR AR(+))、⑨FLRG FS2 (AR-)の N 末端側に 8 個のアルギニン残基を付加したもの (FLRG FS2 8xR AR(-)) を作製した。

PCR によって調整した cDNA は、pGEM-T easy ベクターを用いた TA クローニングによりクローニングし、DNA シークエンサーを用いて塩基配列を確認した。塩基配列の確認後、これらの cDNA は EcoRI を用いて pGEM-T easy ベクターから切り出し、蛋白質の読み枠が合うよう、大腸菌用ヒストジンタグ融合蛋白質発現ベクターである pRSET A (インビトロジェン)あるいは pRSET C (インビトロジェン)の EcoRI 切断部位に挿入し、挿入方向をシークエンサーで確認した。

作製した大腸菌用発現プラスミドを大腸菌 BL21 DE3 株の化学的コンピテントセルに導入し、ニッケルアフィニティーカラムを用いて組み換え型蛋白質を精製した。培養に用いた組み換え型蛋白質はさらにイオン交換カラムを用いて精製した。

精製した蛋白質の濃度はウシ血清アルブミン(BSA)を標準蛋白質としてブラッドフォード法を用い測定した。

(2) ビオチン化リガンドの作製

アクチビン A は、アクチビン β A サブユニット遺伝子を導入した Chinese hamster ovary cell(CHO 細胞)の培養上清から精製したものの、組み換え型ヒトマイオスタチンと組み換え型ヒト BMP7 は Peprotech 社から購入したのを用い、N-ヒドロキシスクリン

ンイミジルビオチンエステルと反応させてビオチン標識した。

(3) リガンドブロッティング

精製したフォリスタチンあるいは FLRG の組み換え型蛋白質を PVDF 膜に対してスポットし、ビオチン化リガンドと反応させて洗浄後、西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 標識ストレプトアビジンと反応させ、洗浄した。シグナルはエンハンスドケミルミネッセンスと X 線フィルムを用いて検出した。陰性コントロールには pRSET A の空ベクターを用いて発現させた蛋白質を用いた

(4) ランダム変異を導入した発現ライブラリーの作製

フォリスタチンおよび FLRG の cDNA へのランダム変異導入はデオキシイノシトール 3 リン酸と PCR を用いた方法で行った。フォリスタチンについては FS1 と FS2 を含む部位の cDNA を、FLRG については FS2 ドメインと C 末端側を含む部位の cDNA を増幅し、ランダム変異を導入した。フォリスタチンについては前項でクローニングしたフォリスタチン 288 の cDNA 断片 (FST288) を EcoRI でプラスミドから切り出したものを、FLRG についてはラット FLRG 蛋白質の翻訳領域全長を含む cDNA 断片を EcoRI でプラスミドから切り出したものを鋳型にして PCR を行った。増幅に使用したプライマーの配列を表 2 に示す。上流プライマーには BamHI 切断部位を、下流プライマーには EcoRI 切断部位を付加した。PCR は GoTaq Flexi DNA Polymerase (プロメガ) と 0.2ml の PCR チューブを用い、50 μ l の液量で行った。フォリスタチン、FLRG いずれも 4 種類の反応を行い、それぞれ dATP、dCTP、dGTP、dTTP のいずれかを 14 μ M にし、他の dNTP を 200 μ M の濃度で加え、さらに各反応液には dITP 200 μ M を加えた。プライマー濃度は各々 0.5 μ M、MgCl₂ 濃度は 5 mM、Taq DNA ポリメラーゼ濃度は 0.05 unit/ μ l の条件で、最初の 1 サイクルは 95°C 1 分、55°C 30 秒、72°C 30 秒、その後のサイクルは 95°C 30 秒、60°C 30 秒、72°C 30 秒で 40 サイクルの PCR を行った。得られた PCR 産物は 1% アガロースゲルで分離後、DE81 濾紙 (Whatman) に吸着して回収した。回収した濾紙を洗浄バッファー (10 mM Tris-HCl, pH 8.0、1 mM EDTA、0.1 M NaCl) で 2 回洗浄した後、溶出バッファー (10 mM Tris-HCl, pH 8.0、1 mM EDTA、1 M NaCl) で溶出した。溶出液は中性フェノールクロロフォルムで一回除蛋白した後、等量のイソプロピルアルコールを加え、DNA を沈殿させた。回収した

DNA は BamHI と EcoRI で両端を切断し、フェノールクロロフォルム処理をした後エタノールで沈殿させた。さらにこの DNA 断片は読み枠が合うように pRSETA あるいは pRSETC の BamHI/EcoRI 切断部位に Ligation High (タカラ) を用いて挿入し、ランダム変異導入発現ライブラリーとした。

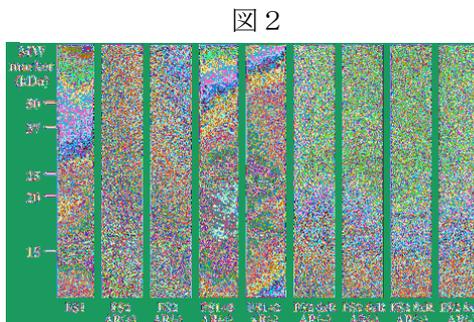
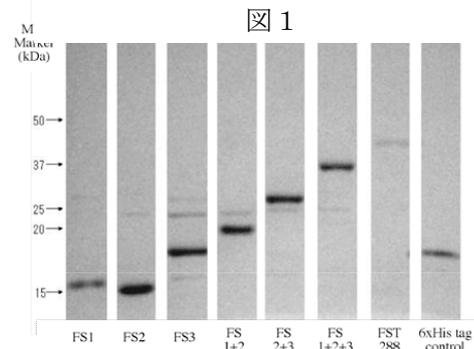
(5) ルシフェラーゼアッセイによる FLRG のリガンド結合部位の生物活性の検討

CHO 細胞にリン酸カルシウム法でアクチビン反応性のレポータープラスミドである p3TP-lux を導入し、アクチビン (10ng/ml) で刺激した。そのとき同時に FLRG のリガンド結合部位である FS2 ドメインを含む組み換え型部分蛋白質 (FLRG FS2 AR(+), FLRG FS2 AR(-), FLRG FS2 6xR AR(+), FLRG FS2 6xR AR(-)) を添加し、アクチビンの作用阻害効果を検討した。

4. 研究成果

(1) ラットフォリスタチンおよび FLRG の組換え型部分蛋白質の作製

大腸菌で発現させた組換え型蛋白質を、ニッケルアフィニティーカラムを用いて精製し、SDS-PAGE で解析した結果を図 1 と 2 に示す。フォリスタチン由来の組み換え



型蛋白質を図 1 に、FLRG 由来の組み換え型蛋白質を図 2 に示した。いずれのサンプルでも大腸菌体蛋白質に由来すると思われる蛋白質の混入が若干認められるものの、主要なバンドは一本のみであり、ニッケルアフィニティーカラムの一回精製で比較的高

純度の蛋白質を得ることが出来た。泳動距離から計算した主要なバンドの分子量は各組換え型蛋白質の予想されるアミノ酸配列から計算した分子量とほぼ一致した。

(2) 作製した各組換え型蛋白質と TGF- β スーパーファミリーとの結合

①フォリスタチンの各 FS ドメインの組換え型蛋白質と TGF- β スーパーファミリーとの結合

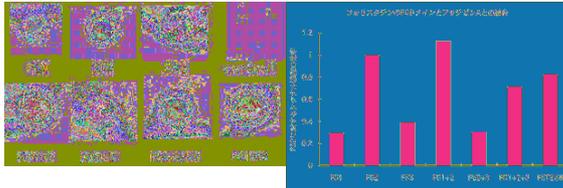


図 3

アクチビン A との結合では、FS ドメイン 1 から 3 のいずれにおいても陰性コントロールと比較して強いシグナルを示し、特に FS2 ドメインで全長のフォリスタチン分子よりも強いシグナルが観察された (図 3)。また、FS1 ドメインと FS2 ドメインの組み合わせでもっとも強いシグナルが観察された。一方、FS3 ドメインを含む組換え型蛋白質は、FS3 ドメインを含まないものに比較してアクチビンとの結合が弱くなる傾向が認めら

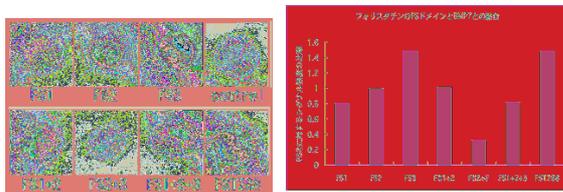


図 4

れた。BMP7 との結合を検討したところ、FS1、FS2、FS3 ドメインいずれにおいても BMP7 との結合が認められ、特に FS3 ドメインで全長の FST 分子と同程度の結合を示した (図 4)。次いで FS2 ドメインが BMP7 と強い結合を示したが、両者を含む FS2+3 では非常に弱いシグナルしか認められなかった。

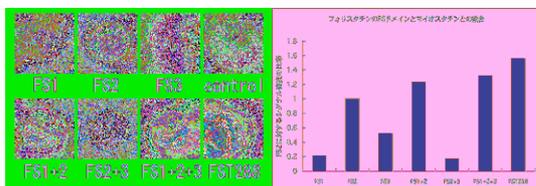


図 5

一方マイオスタチンとの結合に関しては、FS1 および FS3 ドメインはほとんど結合せず、FS2 ドメインを含むもののみで強いシグナルが認められた (図 5)。しかしながら、マイオスタチンの場合も前二者と同様 FS2+3 との結合は非常に弱く、ほとんどシ

グナルは認められなかった。

②FLRG の各 FS ドメインの組換え型蛋白質とアクチビンとの結合性

アクチビン A との結合 (図 6) では、酸性領域を欠く FS2 ドメイン(FS2 AR(-))でもっとも高いシグナルを示したが、FS ドメインに酸性領域が付加されたもの(FS2 AR(+))ではアクチビンとの親和性は著しく低下し

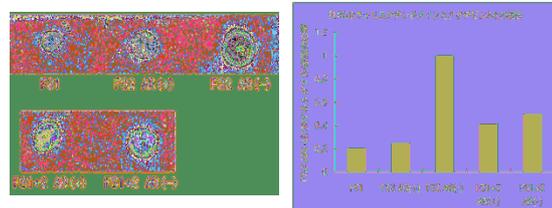


図 6

た。FS1 ドメインと FS2 ドメイン両者を持つものは、両者の中間のシグナルを示した。FS1 ドメイン単体は、検討した FLRG の FS ドメインの中でもっとも弱いシグナルを示した。BMP7 との結合を検討したところ (図 7)、FS2 ドメインを含み、酸性領域を含まない分子(FS2 AR(-), FS1+2 AR(-))で強いシグナルが観察された。これらの分子に酸性領域が付加されると BMP7 との結合シグナ

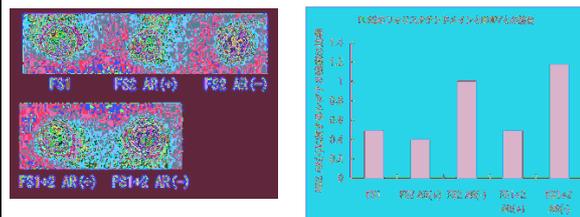


図 7

ルは著しく低下し、FS1 と同程度あるいはそれ以下までシグナルが低下した。マイオスタチンとの結合 (図 8) に関しては、FS1 ドメインと酸性領域を含まない FS2 ドメインで比較的強い結合が認められた。しかし、酸性領域を含むもの、また、FS1 ドメインと FS2 ドメイン両者を含むものは結合性が低下した。

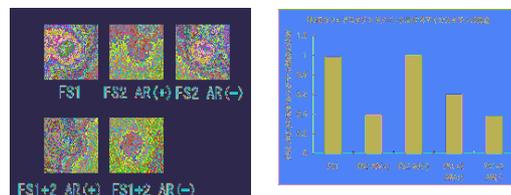


図 8

③塩基性ペプチドで修飾した組換え型ラット FLRG FS2 ドメインとアクチビンとの結合

ポリアルギニンによる修飾が組換え型ラット FLRG FS2 ドメインのアクチビン結合性に与える影響をリガンドブロッティング法で検討した結果を図 9 に示す。いずれの

組換え型蛋白質でも陰性コントロールと比較して強いシグナルが認められた。しかし、C末端側の酸性領域を含む組換え型蛋白質よりも、酸性領域を除去したもの、また、N末端側に 6 個のアルギニン残基を付加したものでより強いシグナルが認められた。8 個のアルギニン残基を付加したものでは 6 個のアルギニン残基を付加したものよりもシグナルが低下する傾向が見られた。

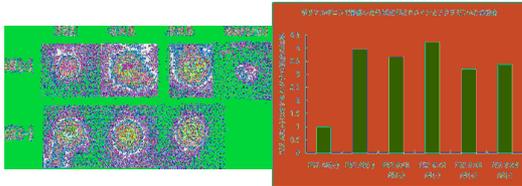


図 9

(3) ランダム変異を導入したフォリスタチンと FLRG の発現ライブラリーの作製

ランダム塩基置換を導入するための PCR を行い、フォリスタチンについては FS1 ドメインと FS2 ドメインを含む部分を、FLRG については FS2 ドメインと酸性領域を含む部分を増幅し、各々十分量の PCR 産物を得ることが出来た。これを発現ベクターに組み込み通常形質転換用大腸菌 (*Inv α*、インビトロジェン) に導入したところ、直径 10 cm の寒天培地上で数百個の形質転換体のコロニーを得ることが出来た。しかしながら、蛋白質発現用の大腸菌株である BL21(DE3) で作製したコンピテントセルでは形質転換体を得ることが出来なかった。これは、BL21 株が一般の形質転換用大腸菌株に比較して非常に形質転換効率が低いためと考えられる。そこで、作製した発現ライブラリーを一度通常形質転換用大腸菌株に導入して増幅し、その後増幅したライブラリーを用いて BL21 株を形質転換したところ、十分な数の形質転換体のコロニーを得ることが出来た。現在この方法を用いてライブラリーのスクリーニングを試みている。

(4) ルシフェラーゼアッセイによる FLRG のリガンド結合部位の生物活性の検討

方法の項で示した FLRG の FS2 を含む 4 種類の蛋白質ではアクチビンの作用を阻害することが出来ず、フォリスタチンファミリーによる TGF- β スーパーファミリーの活性阻害にはリガンド結合能以外の要因も重要であることが示唆された。

以上本研究の成果をまとめると以下の通りである。1) 大腸菌の発現系を用いることによりフォリスタチンファミリーの部分蛋白質が比較的簡便に精製できることが明らかとなった。2) これまで明らかにされていなかったアクチビン以外の TGF- β スーパーファミリーに対するフォリスタチン

ファミリーの結合部位が明らかとなった。3) 塩基性ペプチドによるフォリスタチンファミリーのリガンド結合部位の修飾は、リガンド結合能を増強する可能性が示唆された。

4) フォリスタチンファミリーによる TGF- β スーパーファミリー阻害作用には TGF- β スーパーファミリー結合能以外の要因が重要であることが示唆された。

今後 TGF- β スーパーファミリー阻害作用に必要な要因を明らかにし、さらにランダム変異の導入によりリガンド特異的な蛋白質が得られれば、非常に利用価値の高い TGF- β スーパーファミリー阻害剤が開発できるものと考えられる。

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 3 件)

- (1) Chaturvedi G, Arai K, Terranova PF, Roby KF. The Src tyrosine kinase pathway regulates thecal CYP17 expression and androstenedione secretion. *Molecular and Cellular Biochemistry* 318:191-200, 2008. 査読あり
- (2) Kon H, Kishi H, Arai KY, Shinoda M, Watanabe G, Taya K. The effects of prolactin and gonadotropin on luteal function and morphology in the cyclic golden hamster. *Journal of Reproduction and Development* 54:418-423, 2008. 査読あり
- (3) Arai KY, Nishiyama T. Developmental changes in extracellular matrix messenger RNAs in the mouse placenta during the second half of pregnancy: possible factors involved in the regulation of placental extracellular matrix expression. *Biology of Reproduction* 77:923-933, 2007. 査読あり

[学会発表] (計 3 件)

- (1) 工藤千香子、新井浩司、西山敏夫. マウス皮膚における細胞外マトリックス遺伝子発現の成長に伴う変化. 第 40 回日本結合組織学会学術大会、第 55 回マトリックス研究会大会合同学術集会、2008 年 5 月 29 日、東京
- (2) 新井浩司、工藤千香子、土屋博之、佐藤安訓、近藤嘉高、野村義宏、石神昭人、西山敏夫. ビタミン C 欠乏は皮膚のコラーゲン含量を減少させる. 第 40 回日本結合組織学会学術大会、第 55 回マトリックス研究会大会合同学術集会、2008 年 5 月 29 日、東京

〔図書〕(計 1件)

- (3)西山敏夫、新井浩司. 老化・老年病研究のための動物実験ガイドブック. pp247-253. アドスリー, 2008年5月

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・助教

研究者番号: 70293016

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし