

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26461661

研究課題名(和文)マトリックス会合におけるfibulin-4の機能解明

研究課題名(英文)Functional analyses of fibulin-4 on matrix assembly

研究代表者

佐々木 隆子 (Sasaki, Takako)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：30133193

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：細胞外マトリックスタンパク質あるfibulin-4は、弾性線維形成に必須であることが知られている。これまでに血管異常ならびに皮膚弛緩症を呈する患者で、fibulin-4ミスセンス変異が数例報告されている。本研究では、これら変異を導入したリコンビナントfibulin-4を精製し、それらの構造・機能に対する影響を解析した。3種の変異fibulin-4について解析を行った結果、どの変異タンパクも分泌量の低下、タンパク質分解酵素感受性の昂進等が観察されたが、その程度・特異性は変異により異なっていた。

研究成果の概要(英文)：Fibulin-4 is a 60kDa calcium binding glycoprotein that has an important role in development and integrity of extracellular matrices. Several mutations in the fibulin-4 gene are known in patients whose major symptoms are vascular abnormalities and cutis laxa. In order to elucidate the pathogenetic mechanisms, we expressed fibulin-4 mutants recombinantly in HEK293 cells, purified the proteins in native forms and analyzed alterations in secretion, matrix assembly, and interaction with other proteins. Our studies show that different mutations affect these properties in multiple ways, resulting in fibulin-4 deficiency and/or impaired ability to form elastic fibers. The substitution C267Y impaired secretion of the protein. The A397T mutation introduced an extra O-glycosylation site and deleted binding to LTBP1s. The binding of fibulin-4 to the LOX propeptide was strongly reduced by the mutation E57K. These findings show that different mutations result in different molecular defects.

研究分野：タンパク質化学

キーワード：細胞外マトリックス fibulin-4 変異 弾性線維 アセンブリー

## 1. 研究開始当初の背景

先天性皮膚弛緩症の原因遺伝子として弾性線維の構成成分であるエラスチン以外に ATP6V0A2(vacuolar ATPase を構成するサブユニットのひとつ)、ATP7A(copper-transporting ATPase 1)、PYCR1(pyrrroline-5-carboxylate reductase 1)、FBLN4 (fibulin-4)、FBLN5 (fibulin-5)、LTBP4 (latent TGF $\beta$ -binding protein 4) がこれまでに同定されている。その中で fibulin-4、fibulin-5とLTBP4の変異によるものは、常染色体劣性皮膚弛緩症1型に分類され、肺気腫・心血管異常または胃腸疾患を含む全身性の重篤な疾患とされている。

Fibulin-4とfibulin-5は、細胞外マトリックスタンパク質のfibulinファミリーに属し、fibulin-1-7 の7種が同定されている。これらタンパク質は弾性線維のマイクロフィブリルの成分であり、申請者は長年このfibulinファミリーについて、特にタンパク質化学的解析を行ってきた (Timpl, Sasaki et al., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2003; Kobayashi et al., *J. Biol. Chem.*, 2007)。さらにfibulin-4 欠損マウスの筋骨格系の解析をし、fibulin-4 が弾性線維だけでなく、コラーゲン線維の架橋形成に重要な役割をしていることを見出した。一方、fibulin-4 欠損マウスとfibulin-5欠損マウスを比較すると、同じ組織において程度に差はあるが同様の異常が観察されるもののこれらタンパク質間では補償作用が認められないことから、両タンパク質の機能、特に弾性線維形成における機能は異なっていると考えられる。弾性線維はfibrillin-1を主成分とするマイクロフィブリルにエラスチンの凝集体が会合して形成されると考えられているが、この線維形成過程におけるfibulin-5 の役割はエラスチンの初期のアセンブリーの促進・調節並びにマイクロフィブリルへの結合促進であり、一方、fibulin-4 はエラスチン架橋部位へのlysyl oxidase (LOX)の局在に必須であるとされている。しかし、申請者らのこれまでの解析結果

は、fibulin-4 はLOX の局在化のみならず、LOX 前駆体からの活性化にも関与していることを示唆している。LOXはエラスチンだけでなくコラーゲンの架橋にも関与する酵素であり、fibulin-4 欠損マウスの弾性線維とコラーゲン線維のどちらも共存する皮膚組織の病態の詳細な解析結果は、fibulin-4 変異による皮膚弛緩症の発症機序の解明だけでなく fibulin-4 の機能解明に重要な寄与をするものであると考えた。

## 2. 研究の目的

常染色体劣性皮膚弛緩症1A 型は細胞外マトリックス蛋白質であるfibulin-4 の変異に起因し、動脈瘤・肺気腫等、弾性線維に富む組織での異常も認められる。一方、fibulin-4 欠損マウスは、大動脈または横隔膜破裂により生後1日目に死亡することから、fibulin-4 は弾性線維形成に必須であると考えられている。これまでfibulin-4欠損マウスの血管系の異常に焦点を置き研究されてきたが、まだその機能解明には至っていない。

本研究では、これまでに皮膚弛緩症ならびに血管異常を伴う症例で報告されたfibulin-4 の変異を導入したタンパク質を発現・精製し、それらの性状を正常タンパク質と比較解析し、fibulin-4 変異による遺伝子疾患の発症機序の解明にむけて、分子レベルでの解析を行うことを目的とした。また、fibulin-4欠損マウスと野生型マウスの皮膚組織の比較解析を行い、皮膚弛緩症の詳細な病態変化を知ることにも目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) ヒト fibulin-4 cDNA へ変異を導入した発現ベクターの調整と細胞へのトランスフェクション

正常ヒトfibulin-4 cDNAへfusion PCR 法により変異を導入し、DNAシーケンスにより確認した。発現ベクターはpCEP-Pu ベクターやpcDNA3.1 を用いた。リポフェクタミン法により、HEK293 EBNA、線維芽細胞等へト

ランスフェクションした。ベクター由来の薬剤耐性細胞を選択し、その培養上清への fibulin-4 の分泌を SDS-PAGE ならびにウェスタン法で解析した。変異によるタンパク質構造の変化が重篤な場合は細胞内で分解され、分泌されない。

#### (2) リコンビナントタンパク質の精製

培養上清中に分泌が確認された変異タンパク質は正常タンパク質と同様に精製した。タンパク質精製には HEK293 EBNA 細胞を用いる。牛胎児血清を含まない培地で細胞を培養した培養上清を集め、DEAE セルロースと Superose 12、さらに精製が必要な場合は MonoQ を用い精製した。精製標品の純度は SDS-PAGE で確認した。

#### (3) 精製した fibulin-4 の性状の比較解析

Fibulin-4 はエラスチン、lysyl oxidase、LTBPs、フィブリリン等と結合することが知られているが、これらのタンパク質への結合が変異により影響を受けているかどうかを解析した。また、タンパク質分解酵素に対する感受性についても比較解析した。

#### (4) 野生型と fibulin-4 欠損マウスの皮膚解析

Fibulin-4 欠損マウスは、生後1日目に死亡するので、新生マウスの皮膚組織を用いて解析した。まず、種々の細胞外マトリックスタンパク質に対する抗体を用い、それらの局在に変化があるかを調べた。さらに、電子顕微鏡で、弾性線維ならびにコラーゲン線維の形態を観察した。

### 4. 研究成果

#### (1) 変異を導入したリコンビナント fibulin-4 の発現と精製

これまでに報告された5種の変異を導入した発現ベクターを作製し、HEK293 細胞へトランスフェクションした。5種のうち、E57K と E126K は、Ca<sup>2+</sup>結合に関与するアミノ酸残基の変異で、C267Y と R279C では、タンパク質構造上重要なシステ

イン残基の変異で、特に C267Y では fibulin-4 の構成モジュールである EGF 様モジュールの構造に必須であるシステイン残基を欠損している。トランスフェクションした細胞の fibulin-4 の分泌をウェスタンブロット法で解析すると、野生型 fibulin-4 に比べて、変異 fibulin-4 の分泌量は低下し、C267Y では培養上清中への fibulin-4 の分泌は検出できなかった。このことは、fibulin-4 構造に重要なシステイン残基の欠損により正しく折りたたまれないために、タンパク質の合成過程で分解されていると考えられた。培養上清中への分泌が確認された3種の変異 fibulin-4 を精製した。

#### (2) 精製した fibulin-4 の性状解析

E57K、E126K または A397T の変異を持つ fibulin-4 を精製した。A397T の変異は C 末端のフィブリン様モジュールに位置するが、トレオニン残基への変異により、Oグリカンの付加だけでなく、その近傍にあるアスパラギン残基への糖付加も確認された。

種々の細胞外マトリックスタンパク質との結合を野生型 fibulin-4 と比較解析した結果、どの変異タンパク質も程度に差は認められたが、どれも結合性は弱くなっていた。特に顕著な差が認められたのは、E57K fibulin-4 の LOX (このプロペプチドの部分に fibulin-4 は結合)への結合で、変異アミノ酸残基または変異アミノ酸の近傍が lysyl oxidase の結合部位である可能性が示唆された。

また、細胞外マトリックスへの取り込みへの影響を fibulin-4 欠損マウスから分離した線維芽細胞ならびに TALEN 法により作製した fibulin-4 を発現しない網状色素上皮細胞を用い解析した。トランスフェクションでは発現量に差があるので、精製した fibulin-4 を培地に加え数日培養後、免疫染色により細胞外マトリックスに取り込まれた fibulin-4 を観察した。変異特異的な変化は認められなかったが、変異タンパク質のマトリックスへの取り込

みは野生型と比べると低下していた。

### (3) プロテアーゼに対する感受性への影響

プロテアーゼは、組織での fibulin-4 の分解に関与が考えられるプラスミン、エラスターゼ、MMP2、MMP9 と MMP13 を用いた。E57K ではプラスミンに、E126K では白血球由来のエラスターゼ、MMP2 と MMP9 に、A397T では白血球由来のエラスターゼに対する感受性が昂進していた。

### (4) fibulin-4 欠損マウスの皮膚組織解析

種々の抗体を用いて解析を行ったが、その局在が欠損マウスで変化しているものは本研究では認められなかった。また、電子顕微鏡での解析でも顕著な差は認められなかった。一方、マウス皮膚から酸抽出した I 型コラーゲンを SDS-PAGE で分析すると、fibulin-4 欠損マウスではコラーゲン架橋の顕著な低下が観察された。

## 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 5 件)

① Hanada K, Sasaki T, Expression and purification of recombinant fibulins in mammalian cells. *Methods Cell Biol.* 143:247-259 (2018). 査読有  
doi: 10.1016/bs.mcb.2017.08.014

② Schiavinato A, Keene DR, Imhof T, Doliana R, Sasaki T, Sengle G. Fibulin-4 deposition requires EMILIN-1 in the extracellular matrix of osteoblasts. *Sci Rep.* 7(1):5526 (2017). 査読有  
doi: 10.1038/s41598-017-05835-7.

③ Sasaki T, Hanisch FG, Deutzmann R, Sakai LY, Sakuma T, Miyamoto T, Yamamoto T, Hannappel E, Chu ML, Lanig H, von der Mark K. Functional consequence of fibulin-4 missense mutations associated with vascular and skeletal abnormalities and cutis laxa. *Matrix Biol.* 56:132-149 (2016) 査読有

doi: 10.1016/j.matbio.2016.06.003.

④ Markova DZ, Pan TC, Zhang RZ, Zhang G, Sasaki T, Arita M, Birk DE, Chu ML. Forelimb contractures and abnormal tendon collagen fibrillogenesis in fibulin-4 null mice. *Cell Tissue Res.* 364(3):637-46 (2016) 査読有  
doi: 10.1007/s00441-015-2346-x.

⑤ Sasaki T, Stoop R, Sakai T, Hess A, Deutzmann R, Schlötzer-Schrehardt U, Chu ML, von der Mark K. Loss of fibulin-4 results in abnormal collagen fibril assembly in bone, caused by impaired lysyl oxidase processing and collagen cross-linking. *Matrix Biol.* 50:53-66 (2016).

査読有

doi: 10.1016/j.matbio.2015.12.002

[学会発表](計 3 件)

① Sasaki, T. et al., Loss of fibulin-4 results in abnormal collagen fibril assembly in bone, caused by impaired lysyl oxidase processing and collagen cross-linking., Gordon Research Conference on collagen, 2017.

② 佐々木隆子 他 7 名、Fibulin-4 欠損による骨コラーゲン線維形成異常、第 48 回日本結合組織学会学術大会、平成 28 年

③ 佐々木隆子 他 7 名、血管異常ならびに皮膚脆弱症を呈する患者で同定された fibulin-4 ミスセンス変異の及ぼす構造と機能への影響、第 47 回日本結合組織学会学術大会、平成 27 年

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

佐々木 隆子 (SASAKI, Takako)  
大分大学・医学部・助教  
研究者番号：30133193

### (2) 連携研究者

藤原作平 (FUJIWARA, Sakuhei)  
大分大学・医学部・教授  
研究者番号：90181411

宇谷 厚志 (UTANI, Atsushi)  
長崎大学・医学部・教授  
研究者番号：10292707