

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：34417

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15739

研究課題名(和文)角膜細胞外マトリックスの改造による角膜厚調節

研究課題名(英文)Alteration of cornea thickness by modifying component of corneal extracellular matrix

研究代表者

赤間 智也 (AKAMA, Tomoya)

関西医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10548788

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：角膜細胞外マトリックスの構造を変化させることで角膜厚を調節可能かどうか、遺伝子改変マウスおよび糖分解酵素を用いて基礎的研究を行った。角膜ケラタン硫酸糖鎖合成の律速となる糖転移酵素遺伝子B3gnt7のノックアウトマウスは角膜が薄くなった。B3gnt7を成体マウス角膜で発現抑制するためにタモキシフェン誘導型CreリコンビナーゼとRosa26-mTmGマウスを用いて条件検討を行い、活性型タモキシフェンを眼科用ワセリンに懸濁し角膜に塗布することで遺伝子発現を変化させられることを確認した。またケラタン硫酸分解酵素として組み換え体ケラターゼIIを作成しその特徴を解析した。

研究成果の概要(英文)：To alter corneal thickness by modifying component of corneal extracellular matrix, we investigated effect of gene suppression, which is important for corneal keratan sulfate glycosaminoglycan production, on the corneal tissue in mice. We analyzed corneal phenotype of systemic B3gnt7-knockout mice, which lack expression of the rate-limiting enzyme for corneal keratan sulfate production, and found that the homozygous mutant mice have thinner cornea. For establishing of stage-specific gene suppression of B3gnt7 in adult mouse cornea, we produced B3gnt7-flox mice. For induction of Cre-recombinase activity at adult stage, we optimized OHT treatment procedure on live mouse cornea. We also cloned keratanase-II, which is a bacterial glycosidase that hydrolyzes keratan sulfate, and determined its minimum active domain of the enzyme.

研究分野：糖鎖生物学

キーワード：細胞外マトリックス ケラタン硫酸 ノックアウトマウス 糖転移酵素 硫酸転移酵素 糖分解酵素

1. 研究開始当初の背景

光が外界から網膜に到達して像を結ぶ際に最初に通過する組織が角膜である。角膜は眼球組織の最前面に位置して外界からの細菌の侵入を防ぐとともに情報となる光を通過させるという役割がある。ヒトの角膜では実質層は全角膜厚のおよそ90%を占める透明な組織であり、主にコラーゲン線維、糖タンパク質およびプロテオグリカンからなる細胞外マトリックスにより構成されている。このマトリックスは高度に秩序立った構造を形成しており、この秩序立った構造が角膜実質の高透明度に必要であると考えられている。また角膜組織は視覚系の中で最も高い屈折率を持つ組織で、そのため角膜厚の変化は網膜への結像に影響を与え、これを利用してLASIKなどの視覚矯正が行われている。

ケラタン硫酸プロテオグリカンは角膜実質細胞により産生される、角膜に多く見られる糖タンパク質の一つでありコアとなるタンパク質部分とそれに結合している直鎖状の糖質成分であるケラタン硫酸グリコサミノグリカン(GAG)の二成分から構成される。ロイシンリッチリピート構造を有するコアタンパク質はコラーゲン線維に結合してその線維径を規定すると考えられており、またケラタン硫酸GAGはその線維から放射状に広がることによってコラーゲン線維間の距離を決定する機能が示唆されている。

報告者らはケラタン硫酸GAGの角膜実質細胞外マトリックスの構築への寄与を調べるためにケラタン硫酸GAGの生合成経路の酵素を欠損させた遺伝子改変マウス3種を作成しその角膜における表現型を解析したところ、ケラタン硫酸GAGの鎖長が短くなった場合に限り角膜厚が減少し、ケラタン硫酸GAGの鎖長に変化がなかった場合は角膜厚も不変であった。この結果は角膜厚と角膜実質ケラタン硫酸GAG糖鎖長には強い相関があることを示していた。

2. 研究の目的

報告者らは成体の眼球においてケラタン硫酸GAG鎖を短くできれば角膜の厚さを薄くすることができ、近視の矯正を行うことができるのではないかと考えた。この仮説を検証するために遺伝子改変マウスによる成体でのケラタン硫酸GAG伸長酵素の発現停止実験とケラタン硫酸GAGの分解酵素の投与実験を行い、それぞれについて角膜厚の変化を解析する。本研究は成体において角膜細胞外マトリックスの構造を人為的に変化させることができるかを検証する基礎的実験であると同時に臨床応用につながる可能性を秘めた研究でもある。

3. 研究の方法

(1) 薬物誘導型 *B3gnt7* ノックアウトマウスの作成と角膜の表現型の解析

始めに *B3gnt7* flox/-//*Rosa26*-CreERT2/

pA-lacZマウスの作成を行う。このマウスは全身でCreERT2を発現しており、タモキシフェンの存在下でCreERT2が核内に移行してCreリコンビナーゼとしてfloxの遺伝子を組換える。対象となる遺伝子はケラタン硫酸GAG伸長を行う糖転移酵素β3GnT7をコードする遺伝子である*B3gnt7*とpA-lacZミニジーンである。pA-lacZミニジーンはマーカー遺伝子として*Rosa26R*座位に存在しており、Creリコンビナーゼが活性化された時のみlacZが発現することから、lacZ染色で陽性の細胞で*B3gnt7*の遺伝子発現も欠失していると考えることができる。このマウスを作成して若年期(5週齢以前)、成体(8-12週齢)、老年期(50週齢以降)にて4-ヒドロキシタモキシフェン(OHT, 活性型タモキシフェン)の投与を行う。薬物投与はワセリンに懸濁したOHTを麻酔下のマウス眼球への塗布にて行い、5日間連続投与する。投与後一定期間の飼育の後眼球を摘出して角膜厚を測定すると共にその角膜実質における細胞外マトリックス、特にコラーゲン線維の走行の変化を多光子顕微鏡にて調べる。Creリコンビナーゼによる組換えはX-galあるいは蛍光lacZ試薬にて確認する。

(2) ケラタン硫酸GAG分解酵素のクローニングと酵素の調製

ケラタン硫酸分解酵素としてエンドβガラクトシダーゼとケラタナーゼを使用する。エンドβガラクトシダーゼは既にクローニングと精製方法の確立が終了している。ケラタナーゼは産生微生物株を理研バイオリソースセンターから入手している。この微生物はゲノム配列が決定されていないので次世代シーケンサー(共同利用施設に設置済み)にてゲノム解析を行なうと共に酵素の精製を行い、精製タンパク質のN末端アミノ酸配列分析(外注を予定)かトリプシン分解物のMALDI-TOF-MS解析(MALDI-TOFは共同利用施設に設置済み)にてcDNA配列の決定を行なう。クローニングした酵素cDNAは大腸菌の発現ベクターに組み込んで組換え体の大量調製を行う。得られた精製酵素は溶液あるいは低融点アガロースで粘度を上昇させてから麻酔下のマウス眼球に塗布する。単回投与および数日間の連続投与を行い、その後眼球を摘出して酵素に対する抗体とケラタン硫酸GAGに対する抗体で免疫染色を行い酵素の浸透率と糖鎖の分解効率を調べる。

4. 研究成果

(1) 薬物誘導型 *B3gnt7* ノックアウトマウスの作成と角膜の表現型の解析

β3GnT7はマウス角膜においてケラタン硫酸糖鎖の伸長に律速となる糖転移酵素である。この遺伝子ノックアウトマウスは野生型と比較して発生および成長に大きな変化はなく、交配も可能であった。しかし角膜の構造を詳細に解析したところ角膜実質の厚さが野生型に比べノックアウトマウスでは薄くなっている

た。生化学的な解析の結果ノックアウトマウスの角膜実質ではケラタン硫酸プロテオグリカンのコアタンパク質の産生には変化がなかったものの、ケラタン硫酸グリコサミノグリカンの長さが短くなっていたことからケラタン硫酸糖鎖の長さが短くなったことが角膜実質の厚さが薄くなっている原因であると結論した。この研究結果は IOVS に論文として報告された。そこで薬物誘導型 *B3gnt7* ノックアウトマウスの作成を試みた。*B3gnt7* のエクソン 2 の上流と下流に *loxP* 配列を挿入したコンディショナルノックアウトマウス (*B3gnt7* flox) を作成し、*Rosa26-CreERT2* ノックインマウスと掛け合わせることで OHT を角膜に投与した際に *B3gnt7* が発現抑制される系の作製を試みた。この時、OHT により CreERT2 が活性化された角膜実質細胞を特定するために *Rosa26-pA-lacZ* を使い、CreERT2 が活性化されると lacZ 発現が誘導される系にて OHT の角膜投与による効果を確認した。OHT を眼科用ワセリンに懸濁したものを麻酔下でマウスの角膜に塗布し、1 時間後に麻酔を解除する処置を 5 日間連続で行い、1 週間後に眼球を摘出して X-gal で染色したところマウス角膜の上皮細胞と実質細胞に陽性染色が見られ lacZ 活性が確認された。このことから角膜への OHT 投与は適当であることが確認されたが、X-gal による検出は角膜を薬品にて固定を行う必要があることから角膜実質のコラーゲン線維の変化を観察するのに適当でないものと考えられた。そこで眼球を固定せずに lacZ 活性を検出する方法として、lacZ 活性により蛍光を発する lacZ 基質を入手してその効果を調べたが、バックグラウンドが非常に高く lacZ 活性を有する細胞を蛍光顕微鏡下で確認することはできなかった。これらの結果から、lacZ 活性で CreERT2 活性を確認する方法から CreERT2 活性により蛍光タンパク質の発現が変化する系に変更し、その効果を確認した。*Rosa-mTmG* マウスは何もしない場合は tdTomato による赤色蛍光を全身に有し、Creリコンビナーゼの活性化により tdTomato の発現から EGFP の発現に変化する。このマウスを用いて OHT の角膜塗布による CreERT2 の活性化の効率を調べたところ、2 日間の投与により既に角膜上皮細胞、実質細胞、内皮細胞での蛍光の変化が確認され、5 日間の連続投与では蛍光が変化した細胞の割合が大幅に増加した。角膜実質細胞のみならず内皮細胞も蛍光の変化が見られたことから本実験で行った OHT 投与方法は角膜組織にて CreERT2 を発現させるには非常に効果的であることがわかった。しかしながら 5 日間の投与でも蛍光の変化が全ての細胞に起こらなかった。この点については CreERT2 の活性化が完全でないということも考えられるが、蛍光タンパク質のターンオーバーが長く、遺伝子の発現は変化したもののタンパク質の寿命が長いせいで発現が残存していることも考えられるため、OHT 投与後長期のインターバルを置いた後の観察

が必要である。またこの蛍光タンパク質の発現の確認はマウスから眼球を摘出してそのまま確認することができたことから、*Rosa-mTmG* を用いたマウスを用いる方が角膜組織への影響を与えずにコラーゲン繊維の解析を行うことができるものと考えられた。この結果を踏まえ、現在 *B3gnt7* flox/-//*Rosa26-CreERT2* /mTmG を作成しており、このマウスに OHT 塗布を行う予定である。

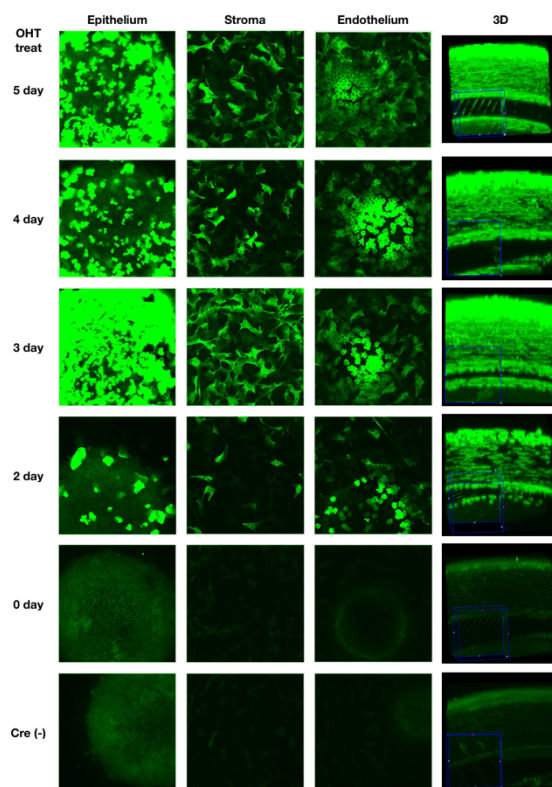


Fig. 1 OHT による CreERT2 活性化効果の確認
Rosa26-CreERT2/mTmG マウスの角膜に OHT-ワセリン塗布を 1 時間/1 日で 2 日から 5 日間連続で行い、1 週間後に CreERT2 活性化による EGFP の発現を多光子顕微鏡にて観察した。角膜の全層の細胞にて EGFP の発現が見られる。

(2) ケラタン硫酸 GAG 分解酵素のクローニングと酵素の調製

ケラターナーゼ II (KII) はケラタン硫酸グリコサミノグリカン (KS-GAG) を分解する酵素の一つで、硫酸化 GlcNAc を認識して糖鎖を切断する endo-*N*-acetylglucosaminidase である。現在、二種類のバクテリア (*Bacillus* sp. Ks36 株と *Bacillus circulans* KsT202 株) から酵素が同定されており、*Bacillus circulans* KsT202 株の酵素は約 200 kDa の膜タンパク質として cDNA が同定されている。先行論文により膜結合ドメインを除去した約 165 kDa の組み換え体 truncated KII が KII 活性を有することが報告されている。

我々は KII の最小酵素活性ドメインを決定するべくいくつかの deletion mutant を作成して KS 分解活性を測定し、約 110 kDa のドメイン KII-F7R4 を最小酵素活性ドメインとして同定した。同定した KII-F7R4 を大腸菌内で

発現させて精製し、組み換え体 KII-F7R4 の特性を 165kDa の酵素(組み換え体 truncated KII)と比較した。その結果、*Bacillus circulans* KsT202 KII の最小酵素活性ドメインは約 110 kDa の F7R4 部分であることが明らかとなった。truncated KII と比較すると N 末端側は 50 kDa 程の領域を除去しても活性が維持されたのに対し、C 末端側は数 kDa 除去しただけで酵素活性を失ったことからこの領域は酵素活性維持に重要な構造を含んでいると考えられた。truncated KII と KII-F7R4 の酵素の性質を比較すると、至適 pH の領域が F7R4 では大きく狭まっており、また至適反応温度の領域も低くなっていたことから、F7R4 で除かれた N 末端側領域は酵素の安定性に関わっているのではないかと考えられた。一方で、この領域は糖結合領域に相同性のあるドメイン(CBM 4.9)を含んでいるが、その有無は糖鎖認識の特異性や酵素活性に関与しないものと考えられた。

角膜への投与には酵素の分子量ができるだけ小さい方が有利であると考えて最小酵素活性ドメインの決定を行い、既に報告されている組換え体 KII よりも分子量の小さい酵素を作成することに成功したが、酵素の至適 pH が狭まってしまい、角膜組織の pH である中性領域では活性が発揮できなくなってしまったため、本酵素を角膜に投与することは効果的でないと判断した。現在はエンドβガラクトシダーゼの至適 pH の改変を行っており、中性領域で効果的に働くケラタン硫酸分解酵素の作製を試みている。

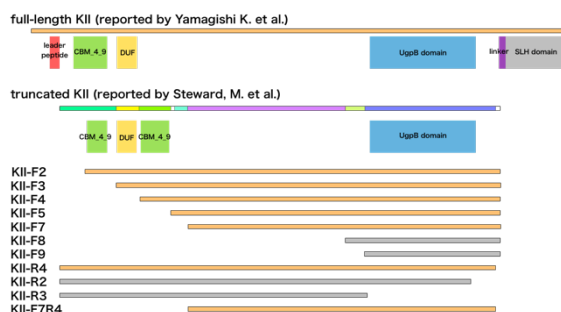


Fig. 2 KII のドメイン構造と構築した deletion mutants

これまでに報告されている活性 KII のアミノ酸配列上の特徴と、本研究で作成した deletion mutant KII の構造を示す。黄色は本研究で明らかとなったケラタン硫酸 GAG 分解活性のある KII で、灰色は不活性 KII を表す。

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 1 件)

- ① **Keratan Sulfate Phenotype in the β -1,3-N-Acetylglucosaminyltransferase-7-Null Mouse Cornea.** Littlechild Stacy L., Young Robert D., Caterson Bruce, Yoshida Hideyuki, Yamazaki

Maya, Sakimura Kenji, Quantock Andrew J., Akama Tomoya O., Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 59(3), pp1641-51, 2018, DOI:10.1167/iovs.17-22716 (査読有り)

[学会発表] (計 3 件)

- ① Determination for the minimum enzymatic domain of keratanase II (ポスター発表) Tomoya O. Akama, Toshisuke Kawasaki, Tomoyuki Nakamura, Society for Glycobiology 2017 Annual Meeting (2017年11月5日-8日・米国オレゴン州ポートランド)
- ② Keratanase II の最小酵素活性ドメインの同定 (ポスター発表) 赤間智也, 川寄敏祐, 中邨智之 第36回日本糖質学会年会 (2017年7月19日-21日・旭川)
- ③ *B. fragilis* endo-beta-galactosidase のクローニングとその酵素活性解析 (ポスター発表) 赤間智也, 安形清彦, 久保田智巳, 中邨智之, 福田道子 第89回生化学会大会 (2016年9月25-27日、仙台国際センター)

[図書] 該当なし

[産業財産権] 該当なし

[その他] 該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

赤間 智也 (AKAMA, Tomoya)
関西医科大学・医学部・准教授
研究者番号：10548788

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 研究協力者

該当なし