

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K10215

研究課題名(和文) ヒトhemicentinの性状と機能解析

研究課題名(英文) Structural and functional analysis of human hemicentins

研究代表者

佐々木 隆子 (Sasaki, Takako)

大分大学・医学部・客員研究員

研究者番号：30133193

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：Hemicentinは線虫においてはじめて同定された分子量60万の細胞外マトリックスタンパク質であり、その機能解析のほとんどは線虫で行われてきた。線虫では1種類であるが、脊椎動物では2種類のアイソフォームが存在する。本研究では、ヒトhemicentin-1と-2をリコンビナントタンパク質として発現・精製し、それらの性状ならびに機能解析を遂行した。精製したリコンビナントhemicentinはどちらも凝集体を作りやすく、不溶性であった。また、どちらのhemicentinも基底膜の成分であるnidogen-1と-2に結合した。さらに、それぞれに対する抗体を作製し、マウス組織での局在の解析も行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

線虫で最初に同定されたhemicentinは、線虫においては基底膜と基底膜の接着複合体の成分で、細胞間接着、細胞と細胞外マトリックスの接着などに関与していることが報告されている。一方、hemicentin-1または-2のノックアウトマウスならびにダブルノックアウトマウスでは何の欠陥も観察されていない。しかし、hemicentin-1の変異が加齢黄斑変性の発症に関わっているということや心筋梗塞後の再構築において、hemicentin-1が心臓線維芽細胞の遊走能に寄与していることを報告され、本研究で得られた基礎知見はhemicentinの変異・異常による疾患の病態の理解にも寄与すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Hemicentin is a large extracellular matrix protein first identified in *C. elegans* and two isoforms are found in vertebrates. In this study, recombinant human hemicentin-1 and hemicentin-2 were expressed, purified and characterized. Both showed low solubility and to form aggregates. Both proteins bound to two isoforms of nidogen, which are basement membrane components and these bindings were comparable to laminin. The expression of hemicentin-1 was detected along the basement membrane of hair and whisker follicles, in the sclera of the eyes, and in the lumen of some lymphoid conduits. By contrast, hemicentin-2 was detected only in limited tissues and its expression was observed in the submucosa of the small intestine.

研究分野：細胞外マトリックス

キーワード：細胞外マトリックス タンパク質 基底膜 hemicentin

作製した。得られた抗血清からそれぞれの抗原を結合したカラムを用い、アフィニティ精製した抗体をマウスでの発現解析に用いた。8週齢のマウスから種々の臓器を取り出し、O.C.T.コンパウンドに包埋・凍結した。凍結切片作製後、冷アセトン固定し、免疫染色を行った。

(4) hemicentin の機能解析

他の細胞外マトリックスタンパク質に対する結合能

ELISA プレートに hemicentin-1 または hemicentin-2 を固相化し、種々の細胞外マトリックスタンパク質を soluble ligand として用い、それぞれのタンパク質に対する特異抗体を用い、結合したタンパク質を定量した。

hemicentin の細胞接着能

hemicentin-1 または hemicentin-2 を固相化した 96 well plate への種々の細胞の接着を測定した。

4. 研究成果

(1) リコンビナントタンパク質の発現と精製

それぞれのリコンビナントタンパク質の発現は his tag により検出した。それぞれの発現量は異なっていたが、精製可能な発現量であった。しかし、his tag は精製には使えなかったため、通常のクロマトグラフィーにより精製した。Full length ならびに vWA + IG ドメインは特に精製後の溶解度が低かった。Hemicentin-2 の G2F ドメインの発現量は極めて高かったが、精製過程で凝集・沈殿し、精製は困難であった。抗体作製のためのフラグメントを精製でき、免疫に用いた。

Hemicentin-1 の EG + FC のフラグメントは EG4 と EG5 で切断されていて、C 末側のフラグメントの N 末端のアミノ酸配列から、フリンがこの切断に関わっていることと、組織では C 末部位は切断され残っていない可能性が示唆された。

(2) マウス組織での局在解析

Hemicentin-1 のマウス組織での局在解析は Dr. Miner (Washington University, USA) と共同研究として行い、Hemicentin-1 ノックアウトマウスを用いて作製した抗体の特異性を確認した。マウス腎臓では、種々の血管に発現が認められたが、以前発現が報告された糸球体基底膜での発現は確認できず、メサンギウムに一過性の発現が認められた。ひげ毛包/毛包の外側の毛根鞘並びに結合組織鞘の基底膜に、眼では、胸膜、角膜、脈絡膜ならびにブルッフ膜で発現が確認された。さらに、脾臓の T 細胞ゾーンに、リンパ節では B 細胞濾胞に存在する導管内に検出され、導管内腔に存在する I 型コラーゲン線維と絡み合うかまたは並行して観察された。

一方、ヒト hemicentin-2 に対する抗体ではマウス組織における発現局在を検出することができなかったため、マウス hemicentin-2 の N 末にある vWA ドメインに対する抗体を作製した。Hemicentin-2 の発現は hemicentin-1 に比べると微量であるが、この抗体を用いた染色では、一部の血管、毛包基底膜、小腸の粘膜下組織に発現が観察された。

(3) Hemicentins と他の細胞外マトリックスタンパク質との結合性

これまでに nidogen, fibulin-1, perlecan と collagen (I, III, IV と V 型)などのタンパク質との結合を調べたが、これまでのところ、顕著な結合が認められたのはどちらの hemicentin についても基底膜の成分である nidogen-1 と nidogen-2 だけであり、さらに検索中である。それぞれの hemicentin の nidogen-1 ならびに nidogen-2 への結合はラミニンの γ 鎖への親和性に近かった。また、nidogen-1 のフラグメントを用い、結合部位の検索を行ったが、nidogen-1 の結合部位はラミニンの γ 鎖と同様に C 末の G3 ドメインであった。一方、抗体作製のために精製した hemicentin-1 のフラグメントを用いどの部位に nidogen-1 が結合するか調べた結果、分子の C 末部位 (TSPI, G2, EGF-like と FC ドメイン)に結合することが分かった。

< 引用文献 >

Vogel BE and Hedgecock EM, Hemicentin, a conserved extracellular member of the immunoglobulin superfamily, organizes epithelial and other cell attachments into oriented line-shaped junction. *Development*, 128 (2001), 883-894.

Carney et al., Genetic analysis of fin development in zebrafish identifies furin and hemicentin1 as potential novel fraser syndrome disease genes, *Plos Genet.* 15 (2010), 6, e1000907.

Schlutz et al., Analysis of the ARMD1 locus: evidence that a mutation in HEMICENTIN-1 is associated with age-related macular degeneration in a large family. *Hum. Mol. Genet.*, 15 (2003) 12, 3315-3323.

Chowdhury et al., Expression of fibulin-6 in falling hearts and its role for cardiac fibroblast migration. *Cardiovasc. Res.* (2014), 103, 509-520.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Lin MH, Pope BD 3rd, Sasaki T, Keeley DP, Sherwood DR, Miner JH	4. 巻 -
2. 論文標題 Mammalian hemocentin 1 is assembled into tracks in the extracellular matrix of multiple tissues	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Dev Dyn	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/dvdy.159.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------