

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：新学術領域研究（研究課題）

研究期間：2008～2010

課題番号：20200072

研究課題名（和文）

生命に内在する蛋白質接着反応の多面的活用

研究課題名（英文）

Characterization and applications of enzymatic cross-linking reactions

研究代表者

人見 清隆（KIYOTAKA HITOMI）

名古屋大学・生命農学研究科・准教授

研究者番号：00202276

研究成果の概要（和文）：

私たちの体内では、必要に応じ、機能を持ったタンパク質が接着される反応がある。例えば血液凝固や皮膚表皮の形成である。これはトランスグルタミナーゼと言う酵素により為され、高等動物では8種類のアイソザイム（同一反応をするが役割や存在場所が異なる）がある。本研究ではこれらの酵素反応の生理機能の解明を高反応な基質ペプチドを探索して進め、このペプチド（配列）を用いた様々な技術への応用を試みた。

研究成果の概要（英文）：

Enzymatic cross-linking is essential reaction for several biological events: blood coagulation, skin formation. Transglutaminase, which is responsible for the reaction, is a family of enzyme consisting of 8 isozymes. In this project, I have carried out the identification of highly reactive substrate peptide which is useful tool for resolving of physiological significance. Furthermore, application of the peptide has been attempted.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	9,000,000	2,700,000	11,700,000
2009年度	8,500,000	2,550,000	11,050,000
2010年度	8,500,000	2,550,000	11,050,000
総計	26,000,000	7,800,000	33,800,000

研究分野：農芸化学

科研費の分科・細目：応用生物化学

キーワード：酵素、基質、カルシウム

## 1. 研究開始当初の背景

生体内にはタンパク質どうしを不可逆に架橋接着する酵素反応（トランスグルタミナーゼという酵素による）が存在し、多彩な生理機能に関わっている。動物のみでなく、植物から微生物まで幅広く存在し、ヒトでは8種類のアイソザイムが存在している。産業上の利用も含めて疾患の要因となる場合も多く、多くの研究者の成果によりその生理機能が研究され、血液凝固や皮膚表皮形成、転写因子の不活性化などの事実が明らかにされ

てきたが、まだ全てについてこの生理的意義、架橋接着される基質分子の全容解明にはほど遠い状況であった。

研究代表者は当時、高等動物のトランスグルタミナーゼの主要なアイソザイムについて、ファージ提示型のペプチドライブラリーを用いて高反応性な基質ペプチドを探索するシステムを確立していた。

そこで、この基質となるペプチド（配列）を活用して、活性測定系の開発や基質探索系の確立、有用な機能分子の固相化、と様々な

方向への応用生物化学的な展開をしたいとの着想に至った。

## 2. 研究の目的

トランスグルタミナーゼ（架橋接着酵素）の基質ペプチド探索を基本として以下のような4点に分けて目的を設定した。

(1) 接着反応酵素はあらゆる組織に存在するにも関わらず、その生理的意義が明らかなものは一部である。接着配列ペプチドをプローブにして、生体内で接着反応される蛋白質群を網羅的に検索・同定する。得られた蛋白質が、実際に生じる接着反応産物であるかどうかを、接着部位認識抗体を作製して明らかにして、生体内「接着蛋白質データベース」を構築する。

(2) これらのペプチドを活用し、プレート（ELISA方式）法によって、接着酵素活性を高感度な測定系の確立をめざした。蛍光標識した配列（ペプチド）を用いて、細胞・組織に内在する高感度に *in situ* で活性を検出する反応系を構築することも目的とした。

(3) 生体接着反応を原因とした種々の疾患予測のために、環境変化や病態時に、血中や組織の接着反応産物、接着酵素活性が変化するかどうかを検討する。正常および接着反応が異常なマウスを用いて、「血中・組織・細胞の蛋白質接着活性」に変動があるか、の予備的な調査実験を繰り返したのち、ヒトも含め疾患、年齢や環境による変動なども明らかにする。

(4) また、接着ペプチド配列を導入して、配向性を保って機能性蛋白質を接着させた新素材の開発をめざし、配列情報の検討による効率化を行うことを検討する。

## 3. 研究の方法

### (1) 生体内接着反応産物の網羅的解析

これまで得られていたアイソザイム、および新規に得られた高反応性基質ペプチドをプローブとして用いることで、「生体内で接着反応される蛋白質はどこにどのくらいあるか」を明らかにする。接着酵素の活性の多かった組織抽出液を調製して、「接着される側」の蛋白質を、「接着配列ペプチド」をビオチンなどで標識して親和性クロマトグラフィーによって精製し、質量分析によって分子群を同定することを試みた。

### (2) 架橋接着反応の高感度・迅速な活性測定系の開発

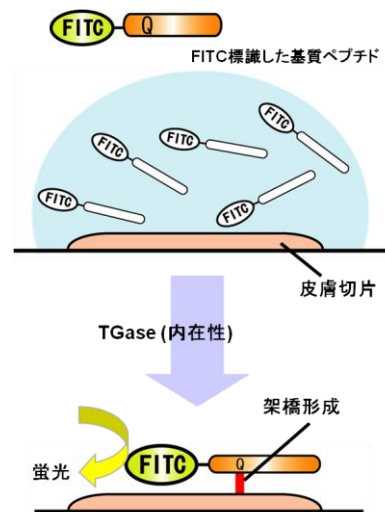
マイクロタイタープレートに、高反応性基質ペプチドを受け入れる基質である、カゼインもしくは一級アミンをコートし、ここに測定すべき酵素試料とビオチン標識した基質ペプチドを添加する。反応後、アビジン付加過酸化酵素と発色基質を加えて、ビオチン化ペプチドの量を測定する。

### (3) 生体内架橋接着反応の可視化

高反応性基質ペプチドを蛍光標識したものを得て、これを組織切片に直接添加して、内在性の酵素活性を検出した。

従来、皮膚表皮に置いて、TGase 1 に特異的なペプチドで蛍光標識したものについて、活性の可視化に成功していたため、本研究において、皮膚と毛胞において発現が報告されている、ヒト TGase 3 の高反応性基質配列（E51）について行った。

さらに、マウスの全組織切片についても同様の試みで、活性の組織分布を相対的に比較ができるかどうかを試みた。全組織切片の作製は、鶴見大学医学部川本忠文氏の開発した全マウス組織凍結切片、および通常の凍結切片を用いて行った。



### (4) 機能性蛋白質の固相化

機能性蛋白質の例として、微生物由来アルカリフォスファターゼを用いて、これに得ている高反応性基質ペプチド配列を、遺伝子工学的に融合させた蛋白質を作製した。

これを一級アミンをコートした材質に酵素の存在下で反応させる。本期間では、96穴マイクロプレートを試験的に行った。

### (5) 新規トランスグルタミナーゼの高反応性基質の探索と同定

未だ、生理学的意義の不明な、蛋白質架橋接着酵素の TGase 6 についても、従来のフェージ提示型ペプチドライブラリーを用いてスクリーニングを行い、これまで得ていたものと異なる、新規なトランスグルタミナーゼ基質ペプチドを同定することを試みた。

## 4. 研究成果

蛋白質接着反応を司る架橋化酵素トランスグルタミナーゼの生理的意義と活用について、当初の計画をほぼ予定通り進めること

ができたと考えている。これは研究の成果は内容に基づいて、次の5つに分けて記述する。

#### (1) 生体内接着反応産物の網羅的解析

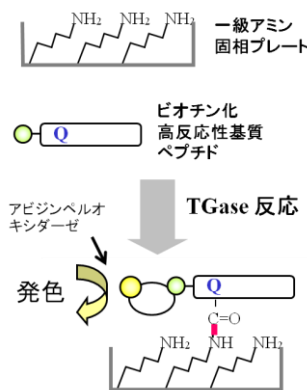
骨芽細胞を解析対象として、主要な2つのアイソザイム (TGase 2, Factor XIII) を選び、これらの基質となる分子の探索を行った。この細胞を選んだ理由は、両方のアイソザイムが高く発現し、それぞれが異なった基質を架橋接着していることが予測されたため、2つの酵素の基質を区別して同定する系を確立するための最適なモデル系と考えたからである。

方法に記した探索の結果、複数種の異なる基質と共通する基質を明らかにできた。この成果は、Amino Acids (印刷中; on line公表中)において発表している。

#### (2) 架橋接着反応の高感度・迅速な活性測定系の開発

広汎な発現をするアイソザイム TGase 2 を対象にして、ビオチン標識した高反応性基質ペプチドを用いて、高感度なアッセイ系を確立した (フランス企業 CovalAb との協同)。反応は既存の方法に比して、極め早く完了し、かつ高感度なものであった。

この成果は論文 (Perez-Alea et al. Anal. Biochem 2009) として発表している。また、アイソザイムを区別して測定する系も確立し、論文公表している (Hitomi et al. Anal. Biochem 2009)。



#### (3) 生体内架橋接着反応の可視化

蛍光標識した高反応性基質ペプチドを組織切片に加えると、内在性の接着酵素活性のある領域では、蛍光ペプチドが中の蛋白質に取り込まれて蛍光を発する。

このことにより、組織内の活性をもった状態の酵素を的確に捉えることができるようになった。これは、皮膚表皮で TGase 1 並びに TGase 3 で両者を区別して検出できることを示した (Yamane et al. FEBS J. 2010)。また、この方法はマウスのみならずヒトの皮膚や毛胞においても、病態における活性の変動を高感度な検出によって判定

することが可能であった (Akiyama et al. Am. J. Pathol. 2010)。

さらに、全マウス切片を用いての活性検出にも成功した。主要な酵素 TGase 1 (皮膚) および TGase 2 (幅広く分布) について解析した。その結果、TGase 1 は皮膚表皮のみならず、上皮組織、歯、爪、前胃にも明確な活性を認めた。また、TGase 2 は従来言われていた全組織における活性の発現はなく、特定の広い組織に分布し、小腸上皮や骨・軟骨組織にもその存在を認めた。また、胎児の発生段階における変動についても明らかにできた。これらの知見は、従来の免疫学的手法 (抗体) による解析よりも、より正確に活性を発現する部位を明らかにできた事を示すものである。

これによって、新たな接着反応が生じる部位の特定と、今後詳細な解析を加えれば、全酵素の全組織パターンを得られる可能性が示された (Itoh. et al. J. Cytochem. Histochem. 2011)

#### (4) 機能性蛋白質の固相化

アルカリフォスファターゼを対象蛋白質として、高反応性基質配列を融合した、蛋白質を作製し、酵素活性が影響されない分子を作製した。固相化については、配列を機能蛋白質に融合することに時間がかかり、具体的な固相の試みはプラスチックプレートのみ成功した。

なお、今回の研究で得られた知見を基に、挑戦的萌芽研究 (平成 23 年度~24 年度: 研究代表者) において、他の材料への固相化効率の検討を続けて実施している。

#### (5) 新規トランスグルタミナーゼの高反応性基質の探索と同定

機能が未知な新規なアイソザイムである、TGase 6 について、これまで行った研究方法をあてはめて、基質として好まれ易い配列の解明を行うとともに、この中でもっとも反応性が高かった配列に基づいた、高反応性な基質ペプチドの作製を行ってその取得に成功した。

なお並行して、本酵素に対するモノクローナル抗体産生ハイブリドーマの取得にも成功しており、発現している組織・細胞株の選択が行える状況になった。

得られた基質ペプチドを用いて、神経細胞、および皮膚表皮において基質探索を行った。特異的な発現が報告されていた神経細胞には TGase 6 は認められず、皮膚表皮において顕著な活性、および可能性のある基質蛋白質を同定することに成功した。

これらの成果はすでにくつかの学会に発表をしており、現在論文作成中である。

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 11 件)

1. Nakagawa N, Yamamoto M., Hitomi K. (他 10 名) Yamanishi K., Knocking-in the R142C mutation in transglutaminase 1 disrupts the stratum corneum barrier and postnatal survival of mice. 査読あり 65, 192-206 (2012) **J. Dermatol. Sci.**
2. Henry J, Hitomi K. Simon M. (他 8 名) Hornerin is a component of the epidermal cornified cell envelopes. 査読あり **FASEB J.** 25 (5), 1567-1576 (2011) 5 月
3. Sugimura, Y. Yamashita H. Hitomi K. Screening of substrate peptide sequences for tissue-type transglutaminase (TGase 2) Using T7 Phage cDNA Library. 査読あり **Cytotechnology**, 63(2), 111-118 (2011)
4. Itoh M., Kawamoto T., Tatsukawa H., Kojima S., Yamanishi, K., Hitomi, K. In situ detection of active transglutaminases for keratinocyte-type (TGase 1) and tissue-type (TGase 2) using fluorescence-labeled highly reactive substrate peptides. 査読あり **J. Histochem. Cytochem.** 59, 180-187. (2011)
5. Yamane, A., Fukui, M., Sugimura, Y., Itoh, M., Alea, M. P, Said, El Alaoui, Akiyama, M., Hitomi, K. Identification of a preferred substrate peptide for transglutaminase 3 and detection of in situ activity in skin and hair follicles. 査読あり **FEBS J.** 277, 3564-3574. (2010)
6. Zeeuwen PM., van Vlijmen-Willems I., Rodijk-Olthuis I, D., Hitomi K., Schalkwijk J. (他 5 名) The cystatin M/E-cathepsin L balance is essential for tissue homeostasis in epidermis, hair follicles, and cornea. 査読あり **FASEB J.** 24, 3744-3755. (2010)
7. Akiyama M., Hitomi K., and Shimizu, H. (他 4 名) Transglutaminase 1 Preferred Substrate Peptide K5 Is an Efficient Tool in Diagnosis of Lamellar Ichthyosis. 査読あり **Am. J. Pathol.** 129, 2306-2309. (2010)
8. Hitomi, K., Kitamura, M., Alea, M. P., Ismail, C., Thomas, V., Alaoui, S El. A Specific Colorimetric assay for measuring of transglutaminase 1 and factor XIII activities. 査読あり **Anal. Biochem.** 394, 281-283. (2009)
9. Cheng, T., Hitomi K., Schalkwijk, J. Zeeuwen, P.L.J.M. (他 3 名) A biochemical pathway that controls skin barrier formation: expression of its key components in inflammatory skin diseases and in reconstructed skin. 査読あり **Br J. Dermatol.** 161, 253-264. (2009)
10. 人見清隆 タンパク質架橋化酵素の高反応性基質配列の探索と活用 査読なし **生化学** vol 81. No.8., 708-711. (2009)
11. Alea, M. P., Kitamura, M., Martin, G., Thomas, V., Hitomi, K., Alaoui, S El., Development of an isozyme-specific colorimetric assay for tissue transglutaminase 2 cross-linking assay. 査読あり **Anal. Biochem.** 389, 150-156. (2009)

[学会発表] (計 21 件)

1. 齊藤麻衣、樋口幾、伊藤みほ、人見清隆 Characterization of medaka transglutaminases, a protein cross-linking enzyme family. Medaka Strategic Research 岡崎 (愛知県) 平成 23 年 11 月
2. 人見清隆 タンパク質架橋化酵素トランスグルタミナーゼの高反応性基質配列の探索と多面的活用 酵素工学会招待講演 東京 (東京大学山上会館) 平成 23 年 9 月
3. 人見清隆 Identification of the preferred substrate sequences for transglutaminase and utility for detection of activity in an isozyme-specific manner 日本生化学会大会シンポジウム 京都国際会議場 平成 23 年 9 月
4. タンパク質架橋化酵素の高反応性基質配列の探索と活用 伊藤みほ、福井美奈、鞍本克真、清水由隆、人見清隆 日本動物細胞工学会 東京 (東京大学山上会館) 平成 23 年 7 月
5. 福井美奈、山根亜沙佳、伊藤みほ、人見清隆 機能未知なタンパク質架橋化酵素 (TG 6) の高反応性基質配列の探索 生化学会大会分子生物学会年会 神戸国際会議場 平成 22 年 12 月
6. 山根亜沙佳、福井美奈、伊藤みほ、人見清隆 表皮特異的タンパク質架橋化酵素 (TG 3) の高反応性基質配列の解析 生化学会大会分子生物学会年会 神戸国際会議場 平成 22 年 12 月
7. 渡邊一哉、人見清隆 分化段階の骨芽細胞株におけるタンパク質架橋化酵素トランスグルタミナーゼの基質解析 生化学会大会分子生物学会年会 神戸国際会議場 平成 22 年 12 月

8. 伊藤みほ、川本忠文、人見清隆 タンパク質架橋化酵素の高反応性基質ペプチドを活用したマウス全組織内酵素活性の可視化 農芸化学会中部支部例会 名古屋 (名古屋大学) 平成 22 年 10 月 中部支部企業奨励賞受賞
9. 山根亜沙佳、福井美奈、伊藤みほ、人見清隆 Screeninig and identification of the preferred substrate sequences for transglutaminase 3 using phage-display peptide library. (ポスター) ゴードン国際会議 (米国) 平成 22 年 7 月
10. 伊藤みほ、川本忠文、人見清隆 Detection of in situ activities of transglutaminases using highly reactive substrate peptides (ポスター) ゴードン国際会議 (米国) 平成 22 年 7 月
11. 人見清隆 Identification of highly reactive substrate peptides for transglutaminases from random peptide library and its application. 招待講演 ゴードン国際会議 (米国) 平成 22 年 7 月
12. 人見清隆 タンパク質架橋化酵素トランスグルタミナーゼの高反応性基質配列の解明と活用 天野エンザイム応用酵素シンポジウム 名古屋 平成 22 年 6 月
13. 人見清隆 Establishment of a novel assay system for transglutaminase using highly reactive substrate peptide 国際ポリアミン学会 静岡 (御殿場) 平成 22 年 6 月
14. 福井美奈、山根亜沙佳、伊藤みほ、人見清隆他 ヒト表皮型タンパク質架橋化酵素 (TGase 3) の高反応性基質配列の探索と解析 生化学会中部支部例会 名古屋 (名古屋大学) 平成 22 年 5 月
15. 福井美奈、山根亜沙佳、柴田秀樹、牧正敏、人見清隆 ヒト表皮型トランスグルタミナーゼに対する高反応性基質配列の探索と解析 日本農芸化学会大会 東京・東京大学 平成 22 年 3 月
16. 伊藤みほ、柴田秀樹、牧正敏、人見清隆 トランスグルタミナーゼに対する高反応性基質ペプチドを活用した活性検出法の確立 日本農芸化学会大会 東京・東京大学
17. 人見清隆 高等動物トランスグルタミナーゼの高反応性基質配列の探索と活用 日本農芸化学会大会シンポジウム 東京・東京大学 平成 22 年 3 月
18. 渡辺一哉、角田佳奈子、柴田秀樹、牧正敏、人見清隆 トランスグルタミナーゼの骨芽細胞株における発現と架橋化酵素活性の解析 第 82 回日本生化学会大会 神戸国際展示場 平成 21 年 10 月
19. 人見清隆 タンパク質架橋化酵素の高反応性基質ペプチドの探索とその有効活用 第 82 回日本生化学会大会シンポジウム 神戸

- 国際会議場 平成 21 年 10 月
20. 人見清隆 生体内タンパク質接着反応における高反応性基質と多面的活用 慈恵会医科大学分子生物セミナー 東京・慈恵会医科大学 平成 21 年 9 月
21. Kiyotaka HITOMI (人見清隆) ゴードン国際会議「ポリアミン」アメリカ ニューハンプシャー州 平成 21 年 6 月 招待講演

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

人見清隆 (KIYOTAKA HITOMI)

研究者番号: 00262276

### (2) 研究分担者

なし  
( )

研究者番号:

### (3) 連携研究者

神谷典穂 (NORIHO KAMIYA)

(九州大学大学院工学系研究科・教授)

研究者番号: 50302766

松藤千弥 (SENYA MTSUFUJI)

(東京慈恵会医科大学医学部・教授)

研究者番号: 50192753