

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 17 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23380200

研究課題名(和文)細胞機能を司る蛋白質架橋形成の分子基盤

研究課題名(英文)Molecular basis of protein cross-linking reactions for cellular functions

研究代表者

人見 清隆 (Hitomi, Kiyotaka)

名古屋大学・創薬科学研究科・教授

研究者番号：00202276

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,300,000円、(間接経費) 4,590,000円

研究成果の概要(和文)：高等動物細胞の蛋白質どうしを架橋形成させる酵素、トランスグルタミナーゼを対象に、高反応性の基質ペプチドを用い、その機能を分子のレベルで明らかにすることを目的とした。RNA、抗体、活性レベルで、マウスを用いて主要なアイソザイムについての発現パターンを解析した。細胞内で架橋形成を検出する解析系の確立をめざして、FRET(共鳴エネルギー波長移行現象)による架橋反応の検討を行った。新規なアイソザイムの高反応性基質を取得したほか、どのようなタンパク質群を架橋形成するのかを探索する系を確立した。また、モデル生物としてのメダカを対象に、該当酵素の解析と変異個体の作製を行った。

研究成果の概要(英文)：Transglutaminases are the enzymes that catalyze protein cross-linking or modification via peptide-bound glutamine residues. These reactions are essential for the multiple biological processes such as blood coagulation, skin epidermis formation and apoptosis. In order to elucidate the physiological roles and expression sites on mammals, using highly reactive substrate peptides (obtained by us for these years), we analyzed expression pattern and established identification system of possible substrates. In the studies, expressions for RNA, protein (using antibody), in situ enzymatic activity were investigated. Furthermore, establishment of FRET system to detect intracellular activity was attempted. As a result, in vitro system was successful. In addition, Medaka (*Oryzias latipes*) as a model animal, was analyzed for the orthologues of transglutaminases: biochemical data and establishment of a couple of genetic loss fish was produced.

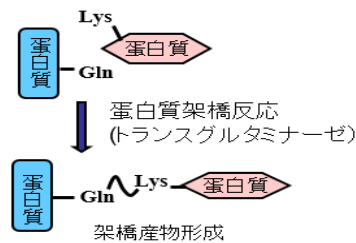
研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・応用分子細胞生物学

キーワード：酵素 蛋白質架橋 細胞機能

### 1. 研究開始当初の背景

高等動物の細胞内外では、タンパク質のグルタミン残基とリジン残基の間に、カルシウムイオン依存的に共有結合（イソペプチド結合）の形成が酵素的に行われて、多彩な生命現象に関わっている(図)。例えばその機能が明らかな主要なものとしては、血液凝固の最終段階（フィブリン）、皮膚表皮の硬度形成（ケラチンなどの構成蛋白質）、細胞外マトリクスや細胞骨格などがあげられる。これら以外にも「蛋白質分子間の架橋接着」は様々な場所や環境応答において、細胞・組織の機能発現に重要な役割を果たしていると考えられている。これを担う酵素はトランスグルタミナーゼ(Transglutaminase)と呼ばれる酵素ファミリーで、動物から植物・微生物まで広く存在するが、ヒト等の哺乳類では8種類が組織によって異なって存在し、それぞれが独自の機能を発揮している。



そのため本酵素群の異常は様々な疾患要因となる。また、未解明な架橋反応の生理的意義の解明が課題であると共に、特異的な阻害剤の開発を始めとした疾患対策も研究が急がれるとなっている。

しかしながら、本酵素群が生体内のどのような細胞・組織に発現するのか、などについては、その発現パターンは完全には解明されていない。また、発現がされている場合でも、活性がどのように細胞内で発揮されるのか、その制御機構についても不明である。併せて、本酵素が何を（基質として）架橋するのか、有効な探索系が必要である。このことが上に記した生理的意義の解明や疾患対策への貢献につながる。

採択に至るまでの段階で研究代表者は、本酵素の基質特異性について研究を進め、天然の基質を上回る高反応性でアイソザイム特異的な12残基のペプチド配列を同定していた。これを用いて特異的で有用な活性検出系を確立しており、本課題ではこのペプチド（配列）をさらに有効活用した研究展開を目指せる段階にあった。そのため、分子細胞レベルでの蛋白質架橋の生理機能・発現制御・検出システムを研究解析したいとの着想に至った。

### 2. 研究の目的

上述のように高反応性基質配列をより活用して、細胞レベルでの蛋白質架橋の分子基盤を明らかにする必要がある。従って、本研究課題では、まず高反応性基質配列ペプチ

ドを用いて、活性がどのように変動しながら個体形成が行われ、主要なアイソザイムが個体内でどのような分布をするのか、を明らかにすることをめざした。分子細胞レベルでの酵素の存在については、網羅的な内容がまだ全てのアイソザイムについて明らかになっておらず、こうしたアプローチは必須である。

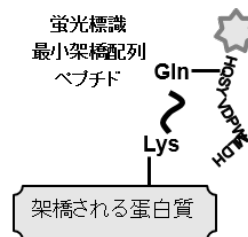
また、架橋をされる基質はどのような分子が優先されて、どのような産物として架橋接着を受けるか、を明らかにする必要がある。高反応性基質配列に相当するペプチドを用いれば、架橋されやすい蛋白質（基質）を探索が可能で、そのための方法論を確立する必要があった。この系の確立も目的として、組織・細胞抽出液中の基質探索を行うことを試みた。

一方、細胞レベルでの架橋接着を検出するうえで、FRET（蛍光波長エネルギー移行現象）を利用した検出系を考案している。本課題において、高反応性基質を利用した系が実際に可能か、その確立を目的とした。

一連の研究に並行し、これまであまり解析のされていなかった新規なアイソザイム（TG6,TG7）の高反応性基質配列の解明を行うことも目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 胎生時期に伴う蛋白質架橋形成の解析  
これまでに蛍光標識した高反応性基質配列ペプチドを用いて、マウス全組織切片の活性を可視化する実験系を確立している。本課題では、マウスの胎生時期（発生段階）によって、全組織の凍結切片を作製した。それぞれについて活性を可視化した。



また、併せて抗体を用いて蛋白質としての存在量も解析して、別の蛍光色素で重ね合わせる(merge)ことで、架橋酵素の「存在量」と架橋反応「活性」の比較検

討も同時行えるかどうかを調べた。

(2) RNA レベルでの蛋白質架橋酵素発現の全組織的解析

マウスを用いて全組織切片の作製方法を確立しているため、従来可視化に用いていたこれらの凍結切片を用いて、in situ hybridization（ジゴキシゲニン標識RNAプローブによる検出）を実施した。主要な各アイソザイム（FXIII, TG1, TG2, TG3）について、相互に相同性の少ない塩基配列領域を選んで、hybridizationのためのプローブとして用いた。

また RT-PCR(逆転写酵素 - PCR)によって、

全組織について、7種のアイソザイム全てに関して、mRNAレベルでの発現パターンを明らかにした。

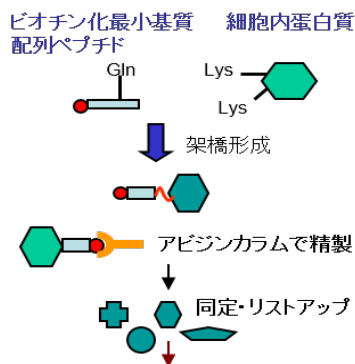
(3) 高反応性基質配列を活用した FRET アッセイの確立

異なる波長を有する蛍光蛋白質である、GFP および BFP を用いて、それぞれにグルタミン側提供基質、リジン側提供基質としてのペプチド配列を融合させたものを大腸菌の発現系で作製した。両者を酵素反応として反応させ、波長の変化を検出した。蛍光波長の移動がより明確になるような条件(濃度、反応時間)を検討したほか、組換え蛋白質としての作製条件も検討した。

なおこの他、Cerulean, Venus という改変された蛍光波長を有する蛋白質も用いて、融合タンパク質を得て解析した。

(4) 高反応性基質ペプチドを活用した架橋される(基質)蛋白質の探索系の確立: 腎臓および肝臓の基質解析

ビオチン標識した高反応性基質ペプチドを、腎臓や肝臓の組織抽出液と混合し、組織に内在する酵素活性に依存する状態で反応させた。反応産物をアビジン固定化ゲルを用いた親和性クロマトグラフィーを行ってビオチン結合物を精製し、質量分析装置によってこれらを解析した。



(5) モデル動物としてのメダカにおける蛋白質架橋酵素の解析

ニホンメダカ (*Oryzias latipes*) は、近年創薬・医学分野においてモデル生物として、その世代交代の速さやゲノムサイズの小ささ等で、有用性から活用が増えている。

本架橋反応の分子基盤を明らかにするうえで、メダカにおいて相当する遺伝子を欠失・変異させて、その表現型から生理的機能を推測できる。

本課題では、これによってオルソログの一つである OITGK2(動物の皮膚表皮型酵素 TG1 に相当すると考えられる遺伝子)を対象とした。化学物質で変異させた DNA を持つメダカライブラリから、該当する遺伝子に変異が入った個体を選別する方法 (Tilling 法) が確立されており、それをを用いて育成した(基礎生物学研究所での個別共同利用)。

その一方でヒトの各アイソザイムに相当する、メダカのトランスグルタミナーゼ遺伝

子オルソログを得て、それらの組換え蛋白質の発現精製を行った(大腸菌)。精製を終えたものについては、速度論的解析を始め、温度における安定性を解析した。測定はビオチン標識カダベリンの、マイクロタイタープレートを用いたカゼインへの取込みアッセイで行った。

このほか並行して行った、新規なアイソザイム (TG6, TG7) の高反応性基質の獲得方法については、詳細はこれまでの発表論文・報告と同様であり、詳細は割愛する (JBC20006, FEBS J 2008)。同定はペプチド提示型ファージディスプレイ法による。組換え型 TG6, TG7 を用いてスクリーニングを行い、候補配列を得た。これらを融合蛋白質として発現させ、反応性と特異性に基づいてそれぞれから選抜した。配列に相当する合成ペプチドは委託して得て、上記のプレートアッセイ法によって検討した。

#### 4. 研究成果

(1) 胎生時期に伴う蛋白質架橋形成の解析 (論文発表)

FITC 標識した合成基質ペプチド (TG1 に対して K5: YEQHKLPSSWPF, TG2 に対しての T26: HQSYVDPWMLDH) を用いた可視化検討の結果、いずれも胎生時期に応じて、生体のマウスで発現している組織において活性が上昇した。ただし、組織毎にその上昇時期についてはばらつきがあった。

またこの可視化実験を行う試料切片に対して、抗体による免疫染色を行い、酵素蛋白質の「存在量」の検出を同じ切片で行うことにも成功した。その結果「活性」と「存在量」を同時に異なる蛍光色素で観察することができ、いくつかの組織において、活性を失いつつも存在している酵素があることが判明した。これらの結果により、蛋白質として発現(検出)されていれば必ずしも活性を持った形で存在しないこと、および単なる抗体染色では、正確な架橋反応形成が評価できないことを示し、蛍光標識ペプチドの有用性を示すことができた。

得られた胎児期の架橋酵素発現分布のパターンの詳細については、発表論文 および、研究室に公開したホームページ内データベースに掲載している。

(2) RNA レベルでの蛋白質架橋酵素発現の全組織的解析

本酵素の組織における発現分布に関する研究はこれまで数多く発表されているものの、網羅的にアイソザイムを発現解析して比較した報告はない。

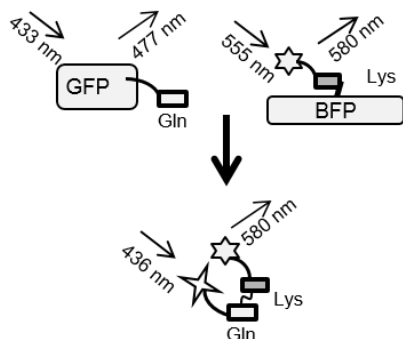
*In situ* hybridization および RT-PCR によって、各組織の発現パターンを解析した。各組織より RNA を調製、cDNA 合成を行いこれを鋳型として、7種のアイソザイムに特異的なプライマーにより PCR を行って、mRNA 発現レベルの比較、発現組織の特定を行った。

これまでの蛋白質レベルや酵素活性レベ



ルでのパターンともほぼ矛盾しない発現結果を得た。

### (3) 高反応性基質配列を活用した FRET アッセイの確立



GFP とグルタミン残基供与ペプチド融合、BFP とリジン残基供与基質ペプチド融合を施した組換え蛋白質を大腸菌内で発現するよう、ベクタープラスミドを構築した。また、これらに替わる蛍光蛋白質である、Cerulean, Venus についても行った。大腸菌で発現させたものはいずれも可溶性で大量の発現が認められ、精製も容易に単一の産物を得ることに成功した。

これらを架橋酵素反応系に供して、反応前後の蛍光波長の変化を測定したところ、有意な変化を認めたが、その差は少なかった。そのため、蛋白質濃度、反応時間等の条件を検討した。発現させる大腸菌の培養温度を調整したところ、有意な FRET 現象がより生じることを見出した。

### (4) 高反応性基質ペプチドを活用した架橋される(基質)蛋白質の探索系の確立：腎臓および肝臓の基質解析

高反応性基質ペプチドを用いた基質探索はペプチド濃度 (0.1 mM)、組織抽出液の反応時間 (30 分) を検討し、括弧内の値を適切な数値として評価した結果を得ている。しかしながら、アイソザイム特異性を考慮するとやや高く、これより下げると精製できる基質量が少なくなることから今後の改良が必要と考えている(参考となる論文発表)

得られた腎臓抽出物からはいくつかの新たな基質候補蛋白質を得ることができた。ただし、多く検出できた分子の中には細胞骨格蛋白質を始め、量的に多いものが混在していたので、*in vitro* のみで反応する基質を効率よく排除する必要がある。肝臓でもほぼ同様の結果を得ている。

今課題で得られたものについては、*in vivo* での反応性を検討していく。

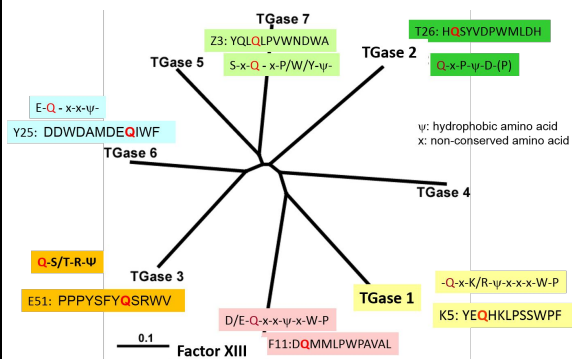
### (5) モデル動物としてのメダカにおける蛋白質架橋酵素の解析

蛋白質架橋の分子基盤をより詳細に探るため、当初予定に加えてメダカによる生理学的意義の解析を行った。メダカにも遺伝子検

索の結果、ヒト酵素に相当する分子が7種類存在することが予想され、そのうち主要なものについては、遺伝子を得て組換え蛋白質を作製した。酵素反応様式などの生化学的解析を行った結果、作製した分子(オルソログ)はいずれも、ヒトの酵素と同様にカルシウム依存的な架橋化活性を示すことがわかった。特にこれらの中で、皮膚および組織のヒト酵素(TG1, TG2)に相当する遺伝子については、欠損個体の作製を行い、発現の抑制された変異体を得ることに成功しているため今後表現型を詳細に検討する。

またメダカ組織内での発現パターンも得ており、変異体表現型の知見と併せて、架橋反応の分子基盤情報に活かしていく。

なお一連の研究の中で、これまで不明であった、新規アイソザイム(TG6, TG7)の高反応性基質配列を、ファージ提示型ペプチドライブラリーより探索した。TG6 については、Y25 配列(DDWDAMDEQIWF)、TG7 については Z3S(YSLQLPVWNDWA)という配列を得た(論文発表 および )。それぞれ、アイソザイムに特異性を示した(Z3S については若干 TG2 と反応をした)。Y25 配列を用いて、初めて皮膚表皮にこの酵素活性が存在することを示した。



本研究課題研究の成果としても含めた、得られてきた高反応性基質配列を上を示す。

## 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10件)

平成25年度

Kurmaoto K, Yamasaki R, Hitomi K (他2名) Phage-displayed peptide library screening for preferred human substrate peptide sequences for transglutaminase 7. Arch. Biophys. Biochem. 査読有 537, 138-143. 2013 doi: 10.1016/j.abb.2013.07.010

Itoh M, Tatsukawa H, Kojima S, Hitomi K, (他2名) Variations in both TG1 and TG2 isozyme-specific *in situ* activities and protein expressions during mouse

embryonic development. J. Histochem. Cytochem. 査読有、61, 793-801 2013 doi: 10.1369/0022155413501676

Cui C, Wang S, Myneni VD, Hitomi K, Kaartinen M Transglutaminase activity arising from Factor XIIIa is required for stabilization and conversion of plasma fibronectin into matrix in osteoblast cultures. Bone 査読有 59:127-38. doi: 201310.1016/j.bone.2013.11.006.

平成 24 年度

Watanabe K, Tsunoda, K, Itoh M, Fukui M, Mori H, Hitomi K Transglutaminase and Factor XIII catalyze distinct substrates in differentiating osteoblastic cell line. Amino Acids 査読有 2013 10. 1007/s00726-011-1131-8

Fukui M, Kuramoto K, Hitomi K (他 4 名) Identification of a highly reactive peptide for TG6: Detection of its transglutaminase activity in the skin epidermis using the peptide. FEBS J. 査読有 280, 1420-1429 2013 doi 10.1111/febs.12133

Sugitani K, Hitomi K, Kato S (他 7 名) A distinct effect of transient and sustained upregulation of cellular factor XIII in the goldfish and optic nerve on optic nerve regeneration Neurochem. Intl. 査読有 61, 423-432 2012 doi: 10.1016/j.neuint.2012.06.004.

Johnson B, Hitomi K, Watts SW Vena cava and aortic smooth muscle cells express transglutaminases 1 and 4 in addition to transglutaminase 2. Am J. Physiol Heart and Circ. Physiol. 査読有 302, H1355-1366 2012 doi 10.1152/ajpheart.00918.2011

人見清隆 タンパク質架橋化酵素の高反応性基質の探索と活用 バイオテクノロジーとバイオインダストリー 査読無 70, 442-447 2012

平成 23 年度

Nakazawa N, Yamamoto M, Hitomi K, Yamamishi K, (他 10 名) Knocking-in the R142C mutation in transglutaminase 1 disrupts the stratum corneum barrier and postnatal survival of mice J. Dermatol Sci, 査読有 65, 196-206 2012 doi 10.1016/j.jdermsci.2011.12.011

Henry, J, Hitomi, K, Simon M (他 10

名) Hornerin is a component of the epidermal cornified cell envelopes FASEB Journal 査読有 25 1567-1576 2011 doi. 10.1096/fj.10-168658

〔学会発表〕(計 25 件)

平成 25 年度

人見清隆、Applications of the highly reactive substrate peptides for transglutaminases: Diagnostic visualization. 第 86 回日本生化学会大会 2013 年 9 月 パシフィコ横浜

人見清隆、辰川英樹 Highly reactive substrate peptides for transglutaminase family. 第 36 回日本分子生物学会 2013/12/ 神戸ポートアイランド

小河亮太、辰川英樹、人見清隆 (他 3 名) モデル生物としてのメダカにおけるタンパク質架橋化酵素ファミリーに関する解析 モデル生物としてのメダカにおけるタンパク質架橋化酵素ファミリーに関する解析 第 86 回日本生化学会大会 (鈴木紘一メモリアル賞受賞)

2013/9/1 パシフィコ横浜

古川健太郎、人見清隆(他 3 名) 高反応性基質ペプチドを用いた腎臓におけるタンパク質架橋化酵素の活性検出 第 36 回日本分子生物学会 2013/12/ 神戸ポートアイランド

平成 24 年度

Hitomi K., Identification and application of highly reactive peptide substrate for mammalian transglutaminase, a protein cross-linking enzyme. Japan-China-korea Joint symposium on Enzyme Engineering 2012 年 5 月 29 日 金沢  
Hitomi K., Identification and applications of the highly reactive substrate peptides for transglutaminases. Gordon Research Conference 2012 年 7 月 21 日 Davidson College (USA)

斎藤麻衣、人見清隆 (他 4 名) モデル生物としてのメダカにおけるタンパク質架橋化酵素の欠損変異体の取得と解析 日本生化学会大会 2012 年 12 月 福岡国際会議場

菅沼名津季、人見清隆(他 4 名) モデル生物としてのメダカにおけるタンパク質架橋化酵素ファミリーの生化学的解析 日本生化学会大会 2012 年 12 月

山崎梨沙、人見清隆(他 4 名) 皮膚表皮に存在する新規タンパク質架橋化酵素 TG6 の高反応性基質配列の解析 日本生化学会大会 2012 年 12 月 (鈴木紘一メモリアル賞受賞)

平成 23 年度

人見清隆 トランスグルタミナーゼが触媒するタンパク質のポリアミン修飾による生理機能の調節 日本農芸化学会大会

2012年3月25日 京都女子大学

②1 樋口幾、人見清隆（他2名） ヒト前立腺型タンパク質架橋化酵素の発現と前立腺由来タンパク質の基質配列解析 日本農芸化学会大会 2012年3月24日 京都女子大学

②2 斉藤麻衣、人見清隆（他3名）モデル生物としてのメダカ(*Oryzias latipes*)におけるタンパク質架橋化酵素の解析 日本農芸化学会大会 2012年3月24日 京都女子大学

②3 斉藤麻衣、伊藤みほ、人見清隆  
Characterization of medaka transglutaminases, a protein cross-linking enzyme family. Medaka Strategic Research 2011年11月 Okazaki Conference Center, Aichi (岡崎市)

②4 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 酵素工学研究会 2011年9月29日 山上会館(東京)

②5 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 2011年9月21日 京都国際会議場

〔その他〕

ホームページ等

自らの研究室において公表の基質・発現データベースのホームページを作成している。

[http://www.ps.nagoya-u.ac.jp/lab\\_pages/biochemistry/transglutaminases\\_database.html](http://www.ps.nagoya-u.ac.jp/lab_pages/biochemistry/transglutaminases_database.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

人見清隆

名古屋大学大学院創薬科学研究科・教授

研究者番号：00202276

### (2) 研究分担者 なし

### (3) 連携研究者

小嶋聡一

独立行政法人理化学研究所 ライフサイエンス技術基盤研究センター

研究者番号：10202061

秋山真志

名古屋大学大学院医学系研究科

研究者番号：60222551