

エラスチン結合タンパクの探索

Investigation of elastin binding protein

○ 中村雅広 (三重大) 原吉彦(三重大) 境淳志 (三重大)

神谷歩 (三重大) 水谷直紀 (三重大) 影山聡志 (三重大)

堀内孝 (三重大) 宮本啓一 (三重大)

Masahiro NAKAMURA, Mie University, Yoshihiko HARA Mie University, Atsushi SAKAI Mie University
Ayumu KAMIYA, Mie University, Naoki MIZUTANI, Mie University, Soushi KAGEYAMA, Mie University
Takashi Horiuti, Mie, University, Keiichi MIYAMOTO, Mie University

Abstract: Elastin is a protein that gives the elastic properties of biological tissues. Which is a good candidate for biomaterials such as artificial blood vessel and artificial ligament used in tissue engineering. However, the interaction of elastin and cells are not very well known yet. Therefore, this study aimed to explore the elastin binding protein. By using insoluble elastin affinity chromatography. As a result, We were able to get the basic knowledge that will lead to the elucidation of the interaction of cells and elastin.

Key Words: Elastin, Elastin Binding Protein, Affinity Chromatography

1. 緒言

エラスチンは、生体組織に伸縮性および弾性を与える重要なタンパク質である。エラスチンの足場材料としての性質は、損傷した血管や靭帯などの弾性繊維を修復し、再生する材料として有効と考えられている。また、材料化に伴い、エラスチンと細胞の相互作用において細胞遊走、増殖、基質産生などに影響を与える事が報告されている。⁽¹⁾ これらの相互作用は、細胞表面上に存在するエラスチンレセプターと呼ばれるタンパク質がエラスチン内の結合配列を認識し、結合する事で起こるとされている。現在、エラスチンレセプターとして考えられているタンパク質は数種類存在する。しかし、これらエラスチンレセプターや、細胞機能を及ぼすメカニズムに関して未だ不明な点が多く、これらの解明が求められている。そこで、本研究では、エラスチン結合タンパクの探索を行い、エラスチンレセプター解明に繋げる事を目的に行った。本実験では、より生体内のエラスチン模倣を可能とする不溶性エラスチンとエラスチン存在下に存在する黄色靭帯細胞から抽出液を作製し、アフィニティクロマトグラフィなどを行う事で、エラスチン結合タンパクの探索を行った為、報告する。

2. 方法

2-1 細胞抽出液の作製

黄色靭帯細胞(Passage4~7)を使用し、サブコンフルエントまで培養させた後、細胞抽出液を作製した。

2-2 不溶性エラスチンアフィニティクロマトグラフィ

ブタ大動脈血管組織から抽出した不溶性エラスチンを Tris-HCl を含むバッファーで膨潤させ、その後 NaCl, Urea 溶液でそれぞれ洗浄し、最後に NaOH による洗浄を行ったものと行わなかったものを2種類用意した。これらの処理を行った不溶性エラスチンに細胞抽出液を添加し、エラスチンに対し非結合性のタンパク質を除去した。次に、Lactose, NaCl, Urea を含む溶液でそれぞれ溶出し、溶出したタンパク質をエラスチン結合タンパクとした。溶出確認は、吸光度測定(280nm)により評価した。

2-3 SDS-PAGE

サンプルは限外濾過により濃縮後、10%ポリアクリルア

ミドゲルで分析した。ゲルの染色は、銀染色および Flamingo ゲルスチンを使用した。

3. 結果

3-1 不溶性エラスチンアフィニティクロマトグラフィ

Urea 溶出により最大 19 個のエラスチン結合タンパクを確認出来た。この結果を受けて次に、Lactose と NaCl による溶出を行った結果、それぞれ最大 10 個、6 個のエラスチン結合タンパク質を確認する事が出来た。また、NaOH 処理を行わなかった不溶性エラスチンでは、より多くのエラスチン結合タンパクが確認出来た。

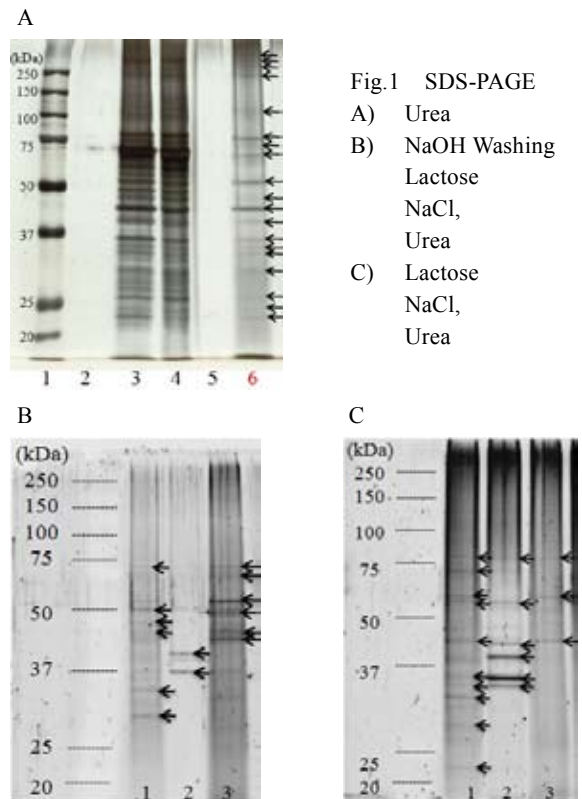


Fig.1 SDS-PAGE
A) Urea
B) NaOH Washing
Lactose
NaCl,
Urea
C) Lactose
NaCl,
Urea

4. 考察

4-1 既知タンパク質との分子量比較

本実験で各溶出液において特に発現が顕著に確認されたタンパクバンドを既知タンパク質⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾⁽⁴⁾と分子量比較を行った。その結果、Table 1 の通りとなった。NaCl 溶出では、約 41kDa, 34kDa, Urea 溶出では、約 55kDa, 48kDa, 45kDa において該当するタンパクが見られなかった。これらのタンパク質は、エラスチンと新たな相互作用を持つ可能性が考えられる為、今後、質量分析により同定する必要がある。

Table.1 Elastin binding protein molecular weight comparing

Elution	Elution protein	Known protein
Lactose	Araound 72kDa Araound 55kDa Araound 33kDa Araound 29kDa	EBP(67kDa), Galectin-3 dimer (62kDa)
NaCl	Araound 41kDa Araound 36kDa Araound 34kDa	Unkown Galectin-3(30kDa), L-ficorin(37kDa), MAGP-1(31kDa)
Urea	Araound 81kDa Araound 61kDa Araound 55kDa Araound 48kDa Araound 45kDa	Unkown Unkown or GPCR(40~70kDa) Unkown or GPCR

4-2 NaOH 処理によるエラスチン結合タンパクの違い

不溶性エラスチンは、エラスチンの前駆体である約 72kDa トロポエラスチンが酵素により架橋された巨大な構造を持つ。その為、分子内に架橋が十分にされていない部位や、露出した部位が断片化エラスチンとして存在し、酸や塩基の影響を受けやすい状態にある。そこで、NaOH 処理を行う事で、不溶性エラスチン内の断片化部位を洗浄し、断片による影響を抑える事が可能となる。この処理を行った結果、確認されたタンパク質に違いが見られた。また、これらタンパク質の内、Lactose 溶出において約 72kDa 発現の有無が見られた。このタンパク質は、エラスチンレセプターとして知られる 67kDaEBP の発現部位に相当し、このタンパク質が 67kDaEBP であると仮定すれば、67kDaEBP は断片化エラスチンとのみ結合特性をもち、不溶性エラスチンとは結合特性を持たない事が示唆出来る。これは、エラスチンが断片化する事で初めて 67kDaEBP の結合配列である VGVAPG が露出し、結合する為であると考えられる。

今後は、この約 72kDa タンパク質が 67kDaEBP である事を同定する必要がある。

5. 結論

本実験を通して、エラスチン結合タンパクを確認する事が出来た。その内訳は、Lactose 溶出で最大 10 個、NaCl 溶出で最大 6 個、Urea 溶出で最大 6 個確認された。また不溶性エラスチンを NaOH 処理する事で得られるタンパクに違いが確認された。

今後、質量分析により各タンパク質を調査する事により、未解明なエラスチン結合タンパクおよびエラスチンレセプターの解明に繋がり、エラスチンと細胞間の相互作用の更なる解明に貢献出来るものと考えている。

6. 参考文献

- (1) Brooke, B. S., Karnik, K. S., Li, D. Y., Extracellular matrix in vascular morphogenesis and disease: structure versus signal, *TRENDS in Cell Biology*, vol.13, no.1, pp.51-56, 2003.
- (2) Bax, D.V., Rodgers, U. R., Bilek, M. M., Weiss, A. S., Cell Adhesion to Tropoelastin Is Mediated via the

C-terminal GRKRK Motif and Integrin avb3, vol.284, no.42, pp.28616-28623, 2009.

- (3) Mecham, R. P., Hinek, A, Griffin, G. L., Senior, R. M., Liotta, L. A., The Elastin Receptor Shows Structural and Functional Similarities to the 67-kDa Tumor Cell Laminin Receptor, *BIOLOGICAL CHEMISTRY*, vol. 206, no.28, pp.16652-16657, 1989.
- (4) Toshihiko Y, Eichi T, Kazuharu I, Elastic System Fibers in the Periodontal Tissues, *shisyunisshi*, vol.46(3), pp175-184, 2004