

研究題目 質量分析法による lysyl oxidase の酵素活性部位の検出と活性化機構の解明

研究組織

研究代表者：中邨智之（関西医科大学薬理学講座）

共同研究者：谷口寿章（徳島大学疾患酵素学研究センター）

研究分担者：赤間智也（関西医科大学薬理学講座）

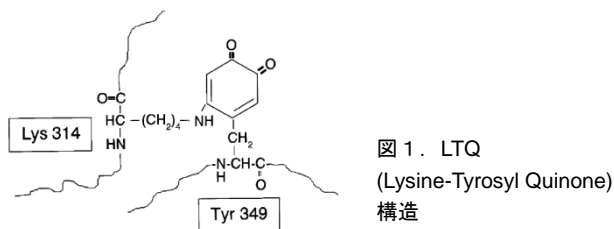
北川香織（関西医科大学薬理学講座）

【1】研究の概要

[1-1] 本研究の目的・概要

生体組織の強度はコラーゲン線維、伸縮性は弾性線維という細胞外マトリックスによってそれぞれ担われている。コラーゲン線維はコラーゲン分子どうし、弾性線維はエラスチン分子どうしが架橋されてはじめてその機能を発揮するが、どちらもシロキナーゼ（LOX）という酵素によって架橋される。

LOX は翻訳後修飾としてその活性中心に Lysyl-Tyrosyl-Quinone (LTQ) という分子内架橋構造ができることが知られているが（図1）、これは銅イオン依存的に勝手に形成されるものと考えられてきた。銅イオンを LOX に受け渡すのは ATP7a という銅イオントランスポーターであるが、この銅イオン受け渡しを効率よく行うためには別の因子が必要であるという状況証拠を得た。これは現時点ではまだ仮説に過ぎないが、本研究では、LOX の LTQ を含むフラグメントを質量分析により解析し、上記仮説を直接証明することを目的とする。



[1-2] 研究の方法・経過

前年度、ブタ大動脈と皮膚より精製した LOX をフェニルヒドラジン処理することにより、LTQ を含むフラグメントを検出することが可能となった。

今年度は、野生型マウスおよび上記因子ノック

アウトマウスから線維芽細胞 (MEF) の不死化細胞株を樹立し、それら培養 MEF 細胞株由来の LOX を精製して LTQ の有無を MS/MS により検討した。野生型 MEF 細胞株の培養上清からは十分な量の LOX タンパク質が精製できたが、ノックアウト MEF 細胞株から精製できる LOX は少なかったため、レンチウイルスを用いてマウス LOX 過剰発現させ、その培養上清から精製を行った。

これらのタンパク質を酵素によって部分分解し、MS/MS によって解析したところ、野生型 MEF 細胞株由来の LOX には LTQ を含むペプチドが多く検出されたがノックアウト MEF 細胞株由来 LOX からは非常に低いレベルしか検出されなかった。逆に LTQ ができていないペプチドはノックアウト MEF 細胞株由来 LOX の方に多く含まれていた。

また、新生仔大動脈に含まれるコラーゲン架橋ペプチドとエラスチン架橋ペプチドを定量したところ、ノックアウトマウス由来組織ではこれらが大幅に減少していることがわかった。

以上より、当初の仮説は正しいことがほぼ証明された。

【2】研究成果

[2-1] 本共同研究で明らかになった研究成果

LOX の酵素活性中心は LTQ であることが知られているが、どのような条件下で LTQ が形成されるのかはわかっていなかった。本共同研究では LOX の精製方法開発、LOX 高発現細胞株の樹立などの基礎的な準備から始めて、ついにこれまで細胞外マトリックスタンパク質としか考えられていなかった分子が LTQ 形成に必須であることを明らかにするに至った。

[2-2] 本共同研究による波及効果及び 今後の発展性

LOX は細胞外マトリックスの架橋に必須の酵素であるが、リジン残基を酸化してしまう危険な酵素であるためにその酵素活性と作用部位は厳密なコントロールがされているはずである。これまで LOX がリジン側鎖どうしの架橋を触媒する仕組みについては研究されてきたが、LOX の酵素活性を調節する仕組みについてはほとんど知られていない。本研究は、LOX の酵素活性に必須の分泌タンパク質の発見を足がかりに、その酵素活性調節の分子機構を初めて明らかにしようというものである。その成果は細胞外マトリックスの再生医学、生体組織工学などへの応用が期待される。

【3】 主な発表論文等 論文発表、学会発表、成果資料等

なし

【4】 今後の課題等 今後の課題、その他等

今回比較した LOX は、ノックアウト細胞由来のものだけ LOX 過剰発現させたものである。内在性の LOX どうしの比較の方がフェアであるため、野生型 LOX 高発現細胞株に CRISPR/Cas9 を用いて当該遺伝子のノックアウトを行った。今後、この細胞を用いて内在性の LOX どうしでの比較を行う予定である。

また、なぜ LOX の LTQ 形成に当該因子が必要であるのか、そのメカニズムは不明である。pro LOX への銅イオン受け渡し、あるいは pro LOX のコンフォメーション変化などに影響する可能性を考え、今後解明していく。