

F-7 人工プロテオグリカンの酵素的合成

高垣啓一、石戸圭之輔、柿崎育子、岩船美都、遠藤正彦
(弘前・医・一生化)

【目的】プロテオグリカン (PG) は、動物細胞の外側を取り巻いている結合組織の主要な構成成分の一つであり、細胞の増殖、分化、形態形成など多くの生物学的機能に深く関与している。この PG の基本的な構造は、コアタンパク質とグリコサミノグリカン (GAG) 鎖 (コンドロイチン硫酸、デルマトン硫酸、ヘパラン硫酸、ヘパリン等) から成っており、これらは共通の橋渡し部分 (グルクロン酸-ガラクトース-ガラクトース-キシロース) を介してコアタンパク質のセリンに結合している。このような PG を酵素的に人工合成することを目的とした。具体的には次の三つの項目に分けて行った。1) 生物活性を有する GAG 糖鎖の組み換えによる合成、2) 組み換え糖鎖をタンパク質へ導入するための橋渡し部分を含むキャリアーの調製、3) 組み換え糖鎖のタンパク質への導入。

【方法及び結果】1) GAG 糖鎖自身の組み換えのためには、精巢性ヒアルロニダーゼの糖転移活性を利用した。その結果、22 糖までの糖鎖長を有するコンドロイチン硫酸系糖鎖の組み換えが可能となった。また、反応条件 (pH 7.0、Ba、Ca の添加等) を変えることにより、反応収率を上げることも可能であった。2) 橋渡し部分を含む糖鎖の合成は、培養細胞系を利用した。即ち、キシロシル-4-メチルウンベリフェロン (Xyl-MU) 存在下で培養細胞を培養し、橋渡し部分 (グルクロン酸-ガラクトース-ガラクトース-キシロース) を有する GAG 糖鎖を合成し、これをキャリアー糖鎖の土台とすることができた。3) 糖鎖のタンパク質への導入のためには、GAG 糖鎖とコアタンパク質間の結合部位であるキシロース-セリン結合を加水分解するエンド- β -キシロシダーゼを発見し、その糖転移活性を調べた。その結果、高分子の GAG 糖鎖をそのまま糖転移する活性があることが知られた。

【考察】現在の遺伝子工学的手法を用いても、PG を合成することは困難である。そこで、エンド型グリコシダーゼを用いて酵素的に PG を合成する方法の開発を試みた。その結果、生物活性の無い糖鎖から、生物活性を有する組み換え糖鎖を構築し、これをタンパク質へ導入することも可能であり、医薬品開発などの応用が期待される。

Enzymatic Synthesis of Artificial Proteoglycan

Keiichi Takagaki, Keinosuke Ishido, Ikuko Kakizaki, Mito Iwafune, Masahiko Endo

Dept. of Biochem., Hirosaki Univ. Sch. of Med

F-8

フィブロネクチン自己会合ドメインを利用したマトリックス組込型増殖因子の作成

関口 清俊^{1,2}、真鍋 理一郎²

(阪大・蛋白研¹、ERATO・関口細胞外環境プロジェクト²)

【目的】細胞外マトリックスは、コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニンなどの自己会合能をもつ蛋白質を中心に構築された超分子会合体であり、細胞はこのマトリックスにレセプターを介して接着することにより、生体内での空間的配置や増殖・分化・細胞死を制御する情報を受け取っている。我々は、フィブロネクチンが細胞表面で自己会合により線維状構造体を形成すること、この自己会合には分子の N 末端側 70kD ドメインと C 末端側 37kD ドメインの両方が必要であることに着目し、種々の機能蛋白質をこの 2 つの自己会合ドメインの間に挟み込むことにより、新規生理活性を組み込んだ人工マトリックスを構築する方法を開発した。本研究の目的は、この方法を細胞増殖因子に応用して、増殖因子活性をビルトインした人工マトリックスを構築し、それによって生体外での細胞の増殖・分化・遊走を制御する新しい細胞外環境を創成することにある。

【結果および考察】フィブロネクチンの N 末端側 70kD 領域と C 末端側 37kD 領域を連結した“ミニフィブロネクチン (miniFN)”の発現ベクター pMTX1 に細胞増殖因子 TGF α をコードする cDNA を挿入し、TGF α とミニフィブロネクチンのキメラ蛋白質 (miniFN-TGF α) を培養細胞に発現させ、キメラ蛋白質を培養上清より精製した。このキメラ蛋白質を含む培地で線維芽細胞を培養すると、キメラ蛋白質が細胞外マトリックスに不溶化され、キメラ蛋白質がマトリックス組織化能を保持していることが確認された。また、キメラ蛋白質を含む無血清培地で細胞を培養すると、細胞の増殖がおけると同時に、TGF α に特有なフォーカス形成が誘導された。この結果は、キメラ蛋白質が TGF α の生理活性も保持していることを示している。

TGF α は細胞の増殖と遊走の促進を通じて皮膚や角膜での創傷治癒を促進することが報告されている。角膜創傷治癒モデルを用い、キメラ蛋白質とインタクトな TGF α の創傷治癒促進活性を比較した結果、キメラ蛋白質は TGF α に比べて有意に高い治癒促進活性を持つこと、また、拡散性のインタクト TGF α と比べ、活性が長時間持続することが判明した。現在、増殖因子を含む種々のサイトカインが創傷治療薬として検討されているが、これらの因子は拡散性であるため、活性がすぐに失われる欠点がある。マトリックス組み込み型増殖因子は、この問題点を克服した活性持続型の創傷治療薬として今後の臨床応用が期待される。

A novel growth factor with matrix assembly activity.

Kiyotoshi Sekiguchi^{1,2}, Ri-ichiroh Manabe² (Inst. Protein Res., Osaka Univ.¹, ERATO, Biomatrix Signaling Project²)