

2023 年度年次報告書

加齢による生体変容の基盤的な理解

2023 年度採択研究代表者

辰川 英樹

名古屋大学 大学院創薬科学研究科

助教

細胞外基質の架橋変容から生じる組織硬化の分子基盤の解明

研究成果の概要

本研究では、加齢により誘導される ECM の質の変化が加齢性の疾患(特に臓器が硬化する線維化)の増悪に関わる仮説を検証する。架橋酵素 TG2 や LOX の発現や活性が加齢により増加することから、これらの酵素による ECM の修飾に着目し、ECM の架橋修飾される基質や程度が変動することが、更なる線維化の増悪に繋がる新規分子機構を見出す。

2023 年度(第一年次)には、TG2 により架橋修飾される基質や修飾残基の解析法の最適化を目指した。これまでに申請者は、TG2 の修飾残基を網羅的に調べる解析系として、線維化組織の未固定組織切片を用いた手法を開発してきた。線維化した肺組織を回収し、未固定凍結切片を用いて、架橋酵素 TG2 の基質を調べるための Lys 側残基のアミンを模倣したビオチン化ペンチルアミン(BPA)を組織切片上で反応させ、内在性の TG2 の活性により BPA 修飾される Gln 残基の周辺配列やこれに帰属される基質を解析してきた。

しかしながら、組織切片にプローブを添加する上記手法では、遊離の TG2 の局在性は失われる(①)。さらに、これまで用いていた 8 M Urea による組織の抽出条件では ECM が完全に可溶化されない可能性がある(②)。4%SDS を含む抽出液では、ほとんどの ECM が可溶化される知見から、これまで用いていた解析手法を見直した。

① 当初の計画通り、生きたマウスで TG2 により架橋修飾される基質や残基を捉えるため、ブレオマイシン投与による線維化モデルにおいて臓器回収前に気管からプローブを投与し、プローブが修飾された基質や残基の網羅的同定解析を行った。ブレオマイシンで増加する 47 個のタンパク質の特定の修飾残基を同定し、このうち、34 個の特定の架橋修飾残基の増加は TG2 依存的であった。同定された架橋修飾残基は、組織切片を用いた実験結果とも一致が見られ、2 種の実験間で ECM の架橋修飾残基に共通性があった。このことは、組織切片を用いた解析であっても生体内の架橋反応を一部模倣できることを意味し、組織切片を用いた解析の有用性が確かめられた。

② 4%SDS を用いて組織抽出液を作製したところ、沈殿がほとんど見られない可溶化された抽出液が作製できた。4%SDS では、質量分析に用いる前処理としてのトリプシン消化ができないため、試薬調整手法も同様に検討し、Single-Pot Solid-Phase-enhanced Sample Preparation (SP3) 法を用いてタンパク質の抽出、トリプシン消化、アルキル化、分画を迅速に行う手法を確立した。同手法により、総タンパク質や修飾残基の同定数は 3 倍程度向上し、ブレオマイシン処理で有意に増加する架橋修飾残基として 663 個所が同定された。

今後は同手法を用いて、加齢マウスの線維化組織での TG2 の標的となる架橋修飾タンパク質および修飾残基について解析していく予定である。