LIFE2013　2013 年 9 月 2 日－4 日 山梨 (山梨大学)

機能性エラスチンペプチドの細胞応答に関する研究

Research of cell response by functional elastin peptide

○ 長谷川まりな（三重大）　傍嶋達也（三重大）　影山聡志（三重大）
堀江俊貴（三重大）　堀内孝（三重大）　宮本啓一（三重大）

Marina HASEGAWA, Mie University, Tatsuya SOBAJIMA, Mie University, Satoshi KAGEYAMA, Mie University, Toshiki HORIE, Mie University, Takashi HORIUCHI, Mie, University, Keiichi MIYAMOTO, Mie University

Abstract: Elastin is a protein that gives the elastic properties to biological tissues. So elastin exists in the tissues which need elastic force, for example blood vessel, lung, ligament and skin. When the blood vessel was damaged, elastin was degraded by enzyme and fractionate to elastin peptides. Generated elastin peptides at this time, influence surrounding cells and extracellular matrix and so on. However, elastin peptides are not very well known yet. Therefore, the present study aimed to clarify types by chromatography and function of elastin peptide by cell response. As a result, we were able to get the basic knowledge that will lead to the elucidation of the elastin peptides.

Key Words: Elastin, Elastin peptides, Chromatography

1. 緒言

エラスチンは、血管、肺、靭帯および皮膚などに多く含まれているタンパク質であり、デスモシンと呼ばれる特有の架橋構造により伸縮性を持ち、生体組織に弾性を与える重要な役割を担っている。

組織に存在するエラスチンは動脈硬化を始めとする血管傷害時において、酵素等によって分解され、断片化(ペプチド化)してしまう。この時生じるエラスチンのペプチド(以下エラスチンペプチド)が組織周辺に存在する細胞の遊走あるいは増殖に関与し、また、産生する酵素活性を増大させ、更に組織の分解を促進させると考えられている。[1][2] しかし、その種類や機能など、エラスチンペプチドに関する詳細は未だ不明である。

そこで、本研究では、傷害時に生体内で生じるエラスチンペプチドの種類と機能を解明することを目的とし、エラスチンペプチドの作製、クロマトグラフィーによるペプチドの分画・分取を行い、異なる種類のエラスチンペプチドによる細胞応答を調査した。

2. 方法

2-1 エラスチンペプチドの作製

ブタの血管から得られるエラスチンをクエン酸溶液に浸し、100~120 ℃で 1 時間弱加熱し、アルカリによる中和と遠心分離を繰り返すことによって得られた溶液を透析する(分画分子量 12000 以下)と高分子エラスチンが得られる。その過程で得られる外液を更に透析し(分画分子量 500~12000)、凍結乾燥を行うことでエラスチンペプチドを得た。

2-2 アミノ酸分析

方法 2-1 で作製したエラスチンペプチドのアミノ酸分析を行った。

2-3 クロマトグラフィー

方法 2-1 で得られたエラスチンペプチドの混合物を分画・精製するため、含有するアミノ酸の違いにより分画可能である疎水クロマトグラフィーを行った。使用したカラムは TSK-GEL ODA-100V で検出は吸光度 280nm により行った。

2-4 エラスチンペプチドによる細胞応答

方法 2 で分画・分取したエラスチンペプチドを血管平滑筋細胞に添加し、遊走と増殖に与える影響を評価した。

3. 結果

3-1 アミノ酸分析

方法 2-1 で作製したエラスチンペプチドのアミノ酸分析の結果を図 1 に示した。エラスチンペプチドは既報のエラスチンのアミノ酸組成[3]と比較すると、ほぼ同様の値をとることが分かった。

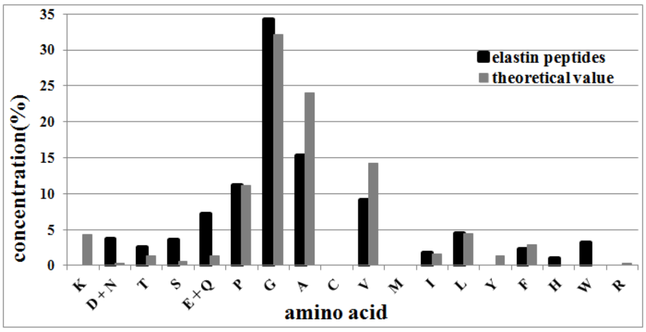

Fig.1　amino acid analysis

3-2 クロマトグラフィー

疎水クロマトグラフィーの結果を図 2 に示した。分画ピークが 4 つ見られた。これらのエラスチンペプチドを各々分取して平滑筋細胞に添加し、遊走や増殖に与える影響を見た。

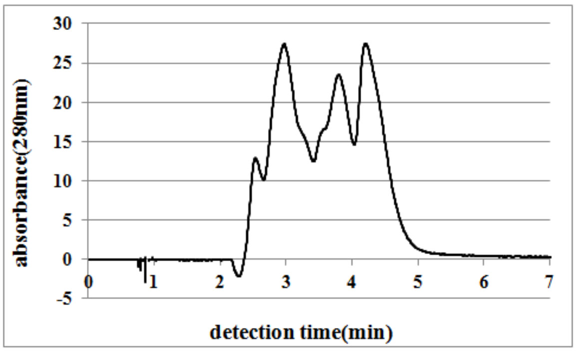

Fig.2　hydrophobic chromatography

4. 考察

4-1 ピーク数の妥当性

生体内では分子量約 67kDa のエラスチン同士が架橋構造を有している。今回作製したエラスチンペプチドは酸によ

る分解のため、切断部位は分かってはいないが、疎水性による相違による分画ピークは 4 つと想定していたより少なかった。既報のアミノ酸の配列より、全体の約 8 割を疎水性アミノ酸であるグリシン、アラニン、バリン、プロリン、ロイシンが占めている。そのため、これらのアミノ酸による疎水クロマトグラフィーのピークの変化は大きくないと考えられる。そこで考えられるのは、親水性アミノ酸であるグルタミン、グルタミン酸、セリン、アスパラギン酸の数による影響である。作製したエラスチンペプチド中のこられのアミノ酸の含有量が、本来のエラスチンの配列中のアミノ酸の理論値より多いことが図 1 の Q、E、S、D からも分かることから、僅かに含まれる親水性のアミノ酸の違いによる違いがピークとして現れたと思われる。

なお、これらのエラスチンペプチドの細胞応答に関しては現在研究中である。

5. 結論

本研究を通して、疎水性の違いによるエラスチンペプチドの種類が少なくとも 4 種類存在することが確認された。

今後、これらのペプチドを用いて細胞に与える影響を調査することにより、エラスチンペプチドの持つ機能の解明貢献できると考えている。

6. 参考文献

(1) Brooke, B. S., Karnik, S. K., Extracellular matrix in vascular morphogenesis and disease: structure versus signal, Trends Cell Biol, vol. 13, no. 1, pp. 51-56, 2003

(2) Ooyama, T., Fukuda, K., Substratum-bound elastin peptide inhibits aortic smooth muscle cell migration in vitro, Arteriosclerosis, vol. 7, no. 6, pp. 593-598, 1987

(3) Indik, Z., Yeh, H., Alternative splicing of human elastin mRNA indicated by sequence analysis of cloned genomic and complementary DNA, Proc Natl Acad Sci USA, vol. 84, no.16 , pp. 5680-5684, 1987