

皮膚の老化に伴うエラスチン遺伝子発現の動態

慶應義塾大学医学部

多島新吾

Tropoelastin (65kd) was found to be converted to a lower molecular weight fragment (45kd) in the cultured medium in chick smooth muscle cell culture. The conversion was found to be time-dependent by pulse-chase experiment using cell culture system. This was also confirmed by chase experiment in test tube. These results indicate that the processing of tropoelastin was mediated by a protease present in the cultured medium. In fact the conversion was specifically inhibited by 1mM EDTA and not by NEM and PMSF. The processing of tropoelastin is of vital importance for understanding tropoelastin metabolism.

1. 緒言

老化に伴う皮膚の変化のうち senile elastosis (老人性弾力線維症)は老人の日光曝露部の皮膚真皮表層にエラスチン線維が蓄積する状態で、長期の紫外線照射によりエラスチン線維に何らかの異常が生じるために発生すると考えられている。現在まで、senile elastosis 中のエラスチン架橋(デスマシン、イソデスマシン)量が増加していること、エラスチン発現量に変化がないことがすでに知られている。この事実は局所のエラスチン合成活性には異常は認められず、合成後のエラスチンタンパクの修飾、あるいは分解に異常が存在していることを示唆する。エラスチンの分解過程はいまだ不明の点が多く主に白血球由来のエラスターゼが知られているのみである。また分解を受けたエラスチンペプチドがさらにどのような代謝をうけるのか、不明である。我々はエラスチンの分解物が組織中に比較的安定に存在し、かつその後架橋形成にも関与し、より不安定なエラスチン線維を形成するという仮定に基づき、まずエラスチン分解物の同定、分解メカニズムについて検討

を行った。

2. 実験

受精後20日目の鶏胚動脈より酵素消化法(コラゲナーゼ、エラスターゼ)を用いて平滑筋細胞を単離した。以下の実験には初代培養細胞のみを用いた。細胞が confluent の状態になるまで10%牛胎児血清添加 Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)にて培養した。0.5%牛胎児血清添加 DMEM にて48時間培養し、その最終6時間をバリリン不含 DMEM 中に [^3H]バリリン (60Ci/mmol)でタンパクを標識した。pulse-chase の実験ではバリリンで標識後 cold バリリン (100 μM) をし加え chase した。バリリン以外では [^{35}S]メチオニン (1000Ci/mmol), [^3H]グルコサミン (50Ci/mmol), [^3H]マンノース (30Ci/mmol)で標識した。培地中のタンパクはプロテアーゼインヒビター (1mM EDTA, NEM, PMSF) 中で30%硫酸で沈澱させ、4~15% gradient SDS polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)を行い、オートラジオグラフィーを行った。必要の場合

Elastin gene expression in the aged skin

Shingo Tajima

合デンストメーターで各タンパクの相対量を比較した。

3. 結果

すでに我々は培養平滑筋細胞がフィブロネクチン、コラーゲンの他に分子量65kdのトロポエラスチン分子を活発に合成していることを報告した。今回の実験でトロポエラスチンより低分子のタンパク(45kd)を認め、このタンパクがトロポエラスチン由来のペプチドであることを各種標識RIおよびエラスチン抗体を用いて検討した。トロポエラスチンはすでに糖鎖を有さないこと、メチオニン残基を有さないこと、シスチン残基をC末端(Fig.1B, 矢印)に2残基有することがわかっている。65kd, 45kdいずれのタンパクも、グルコサミン、マンノース、メチオニンのとりこみが認められず(Fig.1A; lane 1, 2, 3)またシスチンのとりこみが認められた(Fig.1A; lane 4)。このことは45kdペプチドはC末端が切断されたものでなくN末端から約20kdのフラグメントが切断されて

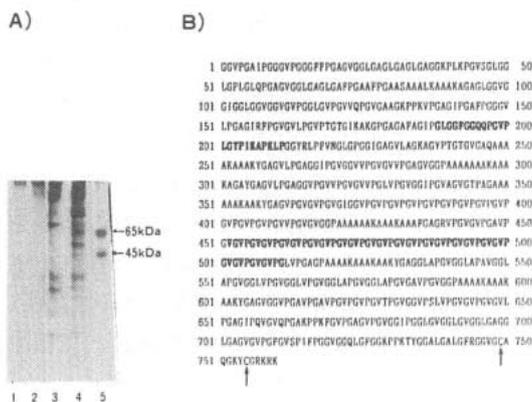


Fig.1A 各種 RI にて標識した培地中のタンパクのSDSPAGE 後オートラジオグラフィー。^[3H]グルコサミン (lane 1), ^[3H]マンノース (lane 2), ^[35S]メチオニン (lane 3), ^[35S]シスチン (lane 4) により標識した。非標識培地をトロポエラスチンモノクローナル抗体にて染色 (lane 5)。

1B cDNA より推定されるニトロエラスチンの全アミノ酸配列 (太線は alternate splicing をうける配列。矢印は C 末端に存在するシスチン残基)

生じる可能性が考えられた。タンパクをプロットしエラスチン抗体で染色した結果65kd, 45kdいずれのタンパクも特異的に検出された。以上の結果より45kdタンパクは65kdタンパクに由来する可能性が示唆された。一方エラスチン mRNA は multiple alternate splicing を認めることがすでに報告されている。アミノ酸配列では2カ所の配列が splice out される (Fig.1B 太文字) ことが報告されているが、いずれの配列の鎖長もたかだか62残基であり (約6.2kd) 65kd から45kd への変換は alternate splicing の産物による可能性は低いと思われた。したがって45kdペプチドは65kdトロポエラスチンが合成されてから分解をうけて生じた産物であると考えられた。

45kdタンパクが65kdトロポエラスチンの分解産物であることを検討するために pulse-chase

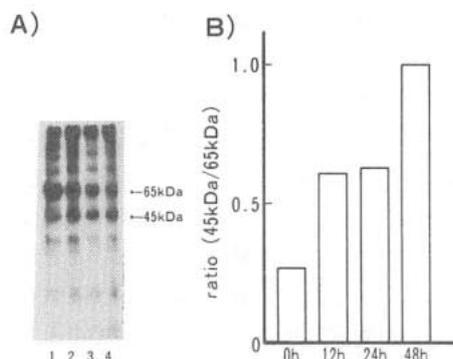


Fig. 2 pulse-chase 実験。培養平滑筋細胞を^[3H]バリンで6時間標識し0 (lane 1), 12 (lane 2), 24 (lane 3), 48 (lane 4) 時間 chase した。B は A の結果をデンストメーターで定量した。

の実験を行った (Fig.2)。この結果 chase の時間経過とともに45kdの65kdタンパクに対する割合が増加していくことが示され45kdが65kdの分解により生じる可能性が考えられた。以上の結果をさらに証明するために65kdタンパクをDEAEセルロースカラムを用いて partially に精製し、同様の実験を行った。その結果 chase の時間とともに45kdの65kdに対する割合が増加していくことが判明した (Fig.3)。45kdが分解過程で生じるのに培地中に存在するプロテアーゼが関与している

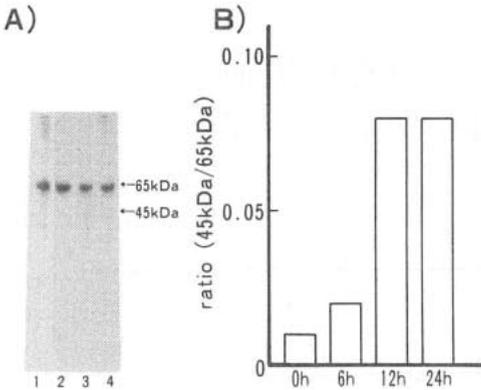


Fig. 3 partially purified tropoelastin を平滑筋細胞培地に加え、0(lane 1), 6(lane 2), 12(lane 3), 24(lane 4)時間 chase した。B は A の結果をデンストメータで定量した。

可能性を検討するために培地を試験管内で各種プロテアーゼインヒビター存在下で incubate して 65kd と 45kd の割合を検討した (Fig.4)。

その結果 NEM, APMSF では分解は抑制されず、EDTA 1mM 存在下においてのみ抑制された。このことは分解に関与する酵素は金属プロテ

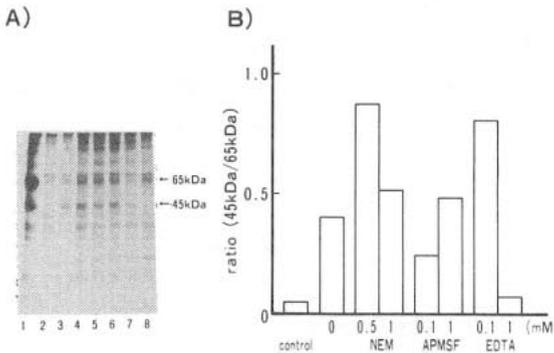


Fig.4A $[^3\text{H}]$ バリンで標識した培地を各種プロテアーゼ存在下で試験管内で反応させた結果のオートラジオグラフィー, lane 1; 培地中のタンパク. lane 2; 無添加で反応。lane 3,4; NEM 各々 0.5, 1mM 存在下で反応。lane 5,6; APMSF 各々 0.1, 1mM 存在下。lane 7,8; EDTA 各々 0.1, 1mM 存在下。B は A の結果をデンストメータで定量した。

アーゼによると考えられた。

4. 考察

今回の実験結果よりエラスチン分子は 65kd から 45kd へと低分子化をおこし、この分解は①比較的すみやかに培地中で生じる。②分解は at random に生じるのではなく、おそらく N 末端から約 20kd のフラグメントが切断される。③45 kd の分解物は比較的安定に存在している。④この分解はおそらく培地中に存在する金属プロテアーゼにより生じることが示唆された。現在エラスチンを分解する酵素としてエラスターゼがよく知られている。この酵素は数種類のプロテアーゼの集合体であり、脾臓由来、多形核 (PMN) 白血球由来、マクロファージ由来のものが知られている。代表的な PMN エラスターゼはセリンプロテアーゼに属しエラスチン以外にⅢ型コラーゲンを分解するなどの点より本実験で示唆されたプロテアーゼとは性状が異なると考えられる。マクロファージエラスターゼは分泌型の金属プロテアーゼであるが¹⁾、本実験にマクロファージが混入している可能性は低い。したがって本実験の金属プロテアーゼは平滑筋細胞により分泌されるものと考えられた。

本実験で最も興味深い点は 45kd タンパクが安定であり、intact なエラスチンが形成されるに当たり 45kd 同士あるいは 65kd と 45kd タンパク同士が架橋を形成する可能性がある点である。今後不溶性エラスチンが沈着する細胞画分について 45kd タンパクの代謝という点から検討する予定である。

文献

- 1) Banda, M. J. and Werb, Z.: Biochem. J. 193, 589-605(1981).