

糖鎖組み換えサイボーグ型デコリンの合成と線維化の治療

今 淳
青森県立保健大学

Key Words ①プロテオグリカン ②デコリン ③線維化

I. はじめに

デコリンはコアタンパク質に1本の糖鎖(グリコサミノグリカン糖鎖)が結合したプロテオグリカンである。その機能は、TGF- β 自身に結合してTGF- β の立体構造を変化させ、TGF- β により生じる線維化を阻害する抗線維化である。現時点で線維化を完治する方法は無く、従って、瘢痕やケロイド、強皮症などの膠原病や皮膚悪性腫瘍の治療(化学療法、放射線療法)の過程で生じる(肺などの)臓器線維症など、各種線維性皮膚疾患に対する医療応用がいま非常に期待されている。

線維化は、臨床的に致命的な予後に陥る場合が多々あるため、国内外では様々な治療研究が進められ、特にデコリン遺伝子を活用した遺伝子治療は期待が集っている。しかしデコリン遺伝子の導入や発現効率が低いなど、遺伝子治療に様々な問題があり、臨床適用には未だ至っていない。

申請者らはデコリンのコアタンパク質が抗線維化の発現には必須であるが、発現量の強度はグリコサミノグリカン糖鎖の構造に依存することに着目した。以上から、本研究では、糖鎖工学を用いてグリコサミノグリカン糖鎖の構造を人工的に組み換え、種々の強度の抗線維化能をもつ人工デコリン合成を目指す。そのため本年度は、グリコサミノグリカンを結合させるデコリンのコアタンパク質の精製を行った。

II. 目的

本年度は、遺伝子工学によりデコリン遺伝子を組み込んだタンパク発現ベクターを構築、これによって人工デコリンコアタンパク質の精製した。次年度以降は、これに様々なグリコサミノグリカン糖鎖を糖鎖工学的に結合させ、様々な抗線維化能を有する人工デコリンの合成を目指す。

III. 研究方法

デコリン cDNA を組み込んだタンパク発現ベクター(pBAD/Thio-TOPO, Invitrogen)を大腸菌に導入し、リコンビナントデコリンを発現させる。これをニッケル絡む、抗体カラム等で精製する。大腸菌で発現するリコンビナントデコリンはグリコサミノグリカン糖鎖が結合していない純粋なタンパク質である。

IV. 結果・考察

ヒトの RNA をテンプレートにして RT-PCR 反応によってデコリン cDNA を調製し、これをタンパク発現ベクター(pBAD/Thio-TOPO)にライゲーション反応によって組み込んだ。次いでこれを大腸菌に導入して形質転換させた。この大腸菌は LB 培地に添加し、リコンビナントデコリンを生成させるために、各種濃度のアラビノース存在下で培養した。培養後、SDS-PAGE 及びウェスタンブロットによってリコンビナントデコリンの生成の至適条件を検討した。その結果、アラビノース最終濃度 0.005%で最も発現が高かった。そこで、この条件下で大量精製を行った。LB 培地添加後、

リコンビナントデコリン誘導, 次いで, 超音波処理及び8M 尿素処理を行った。そして, 脱塩のため4M 尿素, 2M, 1M, 0.5M で段階的に透析を行い, 最終的にはリン酸緩衝液に置換し, 濃縮した。このウェスタンブロットでは, デコリンの抗体により単一なバンドが検出され, デコリンタンパクのサイズに一致した。また, LB 培地 1 リットル当たり 10.8 mg のリコンビナントデコリンが精製された。次年度以降はリコンビナントデコリンに糖鎖工学的手法により様々なグリコサミノグリカン糖鎖を結合させて抗線維化能の強度の異なる人工デコリンを調製する。

*連絡先：〒030-8505 青森市浜館間瀬 58-1 E-mail: a_kon@auhw.ac.jp