

Novel Spectrofluorometric Assays of Human Collagenase Activity and Their Application to Biological Specimen

(ヒトコラゲナーゼ活性の新規蛍光測定法と生体試料への応用)

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科生命薬科学専攻 Valon Ejupi

[目的]

コラーゲンは、皮膚、腱、骨、軟骨、基底膜などの結合組織における細胞外マトリックスの重要な成分である。間質性コラーゲン I, II, III および IV は、最も豊富に存在しており、組織の形成や細胞の移動、増殖、分化に重要な役割をしている。これらコラーゲンの分解は、コラゲナーゼによって行われ、生理的過程の他に、がんや関節リウマチなどの病的過程においても観察される。そのため、選択的で高感度なコラゲナーゼの活性測定法が求められている。

これまでに当研究室では、発蛍光試薬を用いたペプチドに特異的な蛍光誘導体化反応を開発している。これらの発蛍光試薬は、未修飾の N 末端アミノ酸及びペプチド結合と高選択的に反応し、ペプチドを蛍光体へと誘導化する。そこで今回、この蛍光誘導体化反応を基に、コラゲナーゼ活性の新規蛍光測定法を開発し、さらに、本測定法を用いて、UV 照射刺激した培養細胞から分泌されるコラゲナーゼ活性を調べた。

[結果および考察]

1,2-Dihydroxybenzene とアセチル化ペプチドを用いたコラゲナーゼ活性測定法

モデルコラゲナーゼとして matrix metalloproteinase-13 (MMP-13; ヒトコラゲナーゼ-III) を、基質として N 末端をアセチル化した合成ペプチド (Ac-GPQGIAGQ) を使用した。本測定法の原理を Fig. 1 (a) に示す。基質の配列には、コラゲナーゼによるコラーゲンの切断部位 (Gly-Ile) が含まれており、コラゲナーゼによって切断されると N 末端未修飾ペプチド (IAGQ) が生成する。酵素反応後、生成した IAGQ を 1,2-dihydroxybenzene (DHB) によって選択的に蛍光誘導体化し、蛍光強度を測定することでコラゲナーゼ活性を測定した。

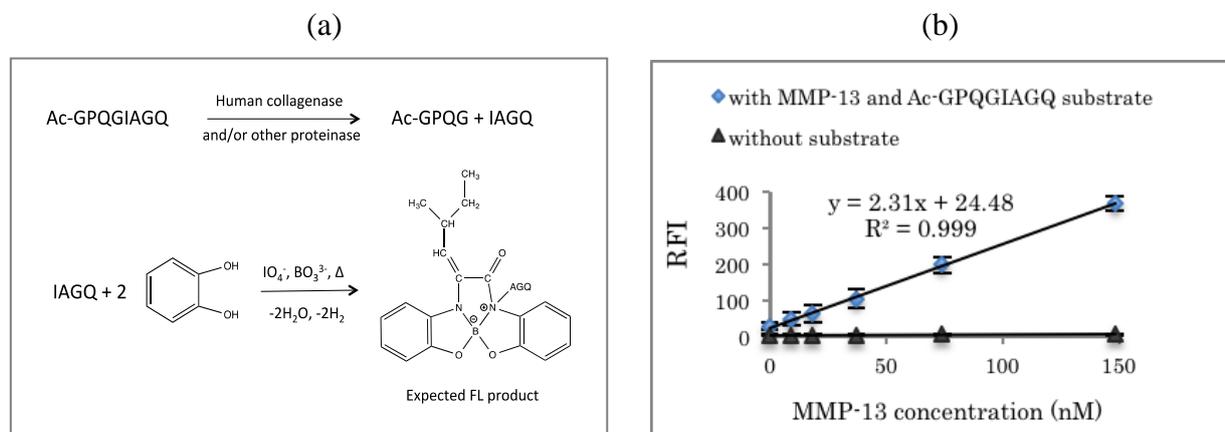


Fig. 1. (a) Protocol for human collagenase assay using an acetyl-peptide substrate and DHB fluorescence (FL)-reagent; (b) Calibration curve of MMP-13 with acetyl-peptide substrate.

様々な濃度の MMP-13 と 1.5 mM Ac-GPQGIAGQ を 10 mM CaCl₂ を含む 125 mM borate buffer (pH 7.5) 中、37°C、3 時間反応させたのち (total 40 μL)、250 mM borate buffer (pH 7.5) 20 μL、2.5 mM DHB 20 μL、2.5 mM NaIO₄ 20 μL を加え 100°C、5 分間加熱した。氷冷後、蛍光強度 (Ex=385 nm, Em = 500 nm) を測定したところ、Fig. 1 (b) に示すように、MMP-13 濃度と蛍光強度の間に良好な比例関係が得られた。このとき、基質を加えない場合では、蛍光は観察されなかった。これらの結果は、本法によって、MMP-13 が測定できることを示しており、MMP-13 の検出限界は 25 nM (S/N=3) であった。

3,4-Dihydroxyphenylacetic acid とコラーゲンをを用いたコラゲナーゼ活性測定法

MMP の 1 つであるコラゲナーゼは、コラーゲン中の Gly-Ile/Leu の Gly の C 末側を切断し、3/4 と 1/4 のコラーゲン断片を生成する。そこで、コラゲナーゼとコラーゲンを反応させたのち、分解したコラーゲン断片と未消化のコラーゲンをエタノール抽出によって分離し、コラーゲン断片を定量することでコラゲナーゼ活性が測定できるか調べた。本測定法の原理を Fig. 2 (a) に示す。酵素反応後のコラーゲン断片を、微生物由来コラゲナーゼによって、多数の N 末端 Gly 含有ペプチドにさらに分解した。この測定において、N 末端 Gly を含むペプチドと特異的に反応して蛍光を発する 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DHPAA) を用い、コラゲナーゼの活性を測定するものである。

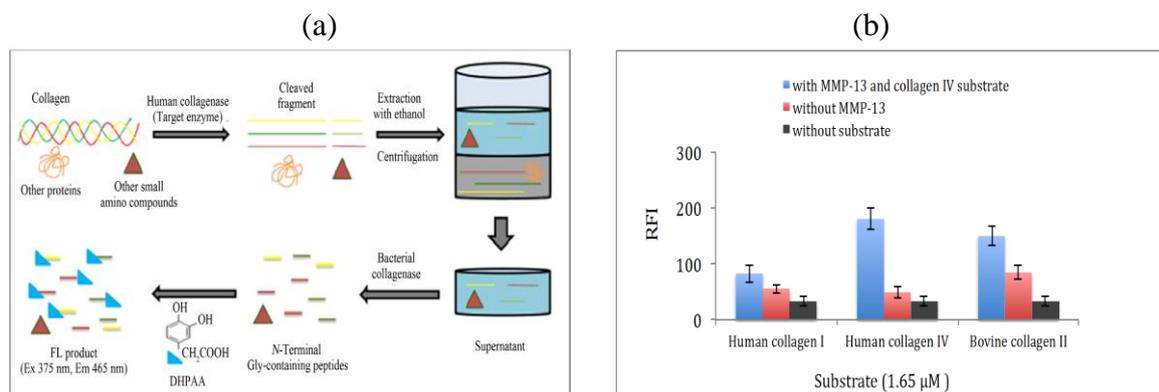


Fig. 2. (a) Protocol for a spectrofluorometric assay of human collagenase activity using collagen substrate; (b) degradation of different collagen substrate during the enzymatic reaction with human collagenase.

ヒトコラーゲン-I、-IV およびウシコラーゲン-II を基質として、MMP-13(ヒトコラゲナーゼ-III)と酵素反応させたところ、MMP-13 はヒトコラーゲン-IV を最も選択的に分解した(Fig. 2 (b))。最適化した反応条件下、ヒトコラーゲン-IV は、MMP-13 によって時間とともに分解され(Fig. 3 (a))、さらに、33-185 nM の濃度範囲において、MMP-13 の濃度と蛍光強度の間に良好な比例関係が得られた。このときの MMP-13 の検出限界は 85 nM (S/N=3) であった。

以上の結果は、DHB や DHPAA を用いる本法は、合成基質だけでなく天然の基質であるコラーゲンも使用できるコラゲナーゼ活性測定法であることを示している。

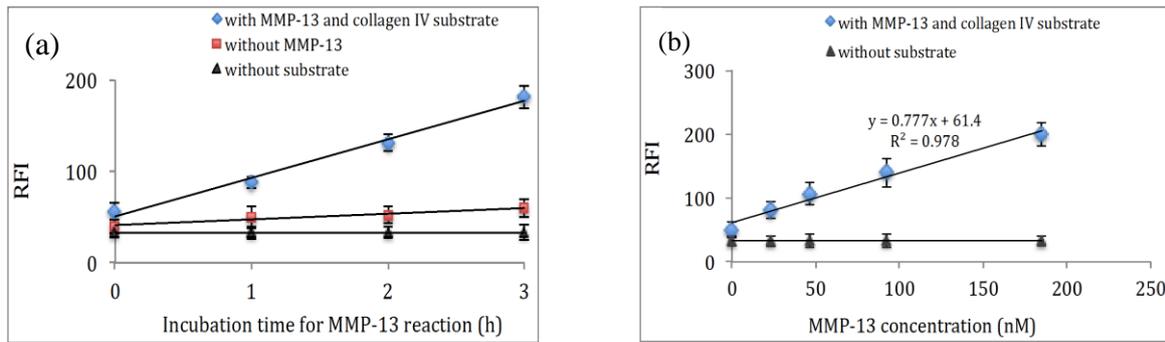


Fig. 3. (a) Kinetics of the enzymatic degradation of 1.65 μM collagen IV by 92.5 nM MMP-13; (b) Calibration curve of 0 - 185 nM MMP-13 using 1.65 μM collagen IV.

UV 照射によって刺激した培養細胞中のコラゲナーゼ活性

MMP は、不活性な酵素前駆体として生合成され、プロドメインの酵素的分解により活性化される。また、繊維芽細胞に UV を照射すると、MMP mRNA の発現および活性型コラゲナーゼの分泌が上昇することが報告されている。そこで、本測定法が、UV を照射した繊維芽細胞より培地中に分泌されるコラゲナーゼ活性の上昇を検出できるか調べた。また同様に、HeLa 細胞についても検討した。

繊維芽細胞および HeLa 細胞に 60 分間 UV を照射したのち培養を継続し、24 時間後の培地中に含まれるコラゲナーゼの活性を測定した。その結果、UV 照射した繊維芽細胞の培地中のコラゲナーゼ活性が上昇していることを確認できた。また、HeLa 細胞においても同様の結果が得られた(Fig. 4)。この結果は、本測定法が生体試料中のコラゲナーゼ活性を測定できることを示しており、本測定法は、がんや関節リウマチなどにおけるコラゲナーゼ研究に有用であると考えられる。

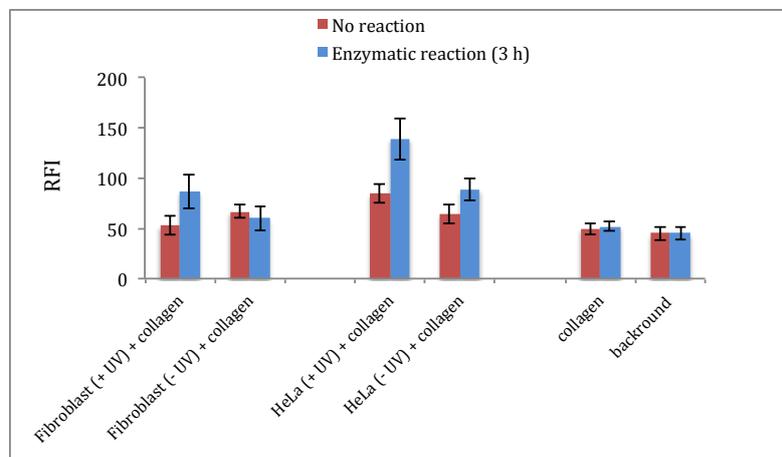


Fig. 4. Collagenase activity from biological specimen.

[基礎となった学術論文]

1. Ejupi V, Dragusha S, Kabashima T, Zhu Q, El-Mahdy AF, Yin S, Shibata T, Kai M. *Advances in Enzyme Research*, **3**, 19-29 (2015).

[参考論文]

1. Zhu Q, Yu Z, Kabashima T, Yin S, Dragusha S, El-Mahdy AF, Ejupi V, Shibata T, Kai M. *Sci. Rep.*, **5**, 10323 (2015).
2. El-Mahdy AF, Ejupi V, Shibata T, Kabashima T, Lu J, Kai M. *Microchim Acta*, **182**, 495-503 (2015).
3. Yin S, Dragusha S, Ejupi V, Shibata T, Kabashima T, Kai M. *J. Fluoresc.*, (2015) (in press).