|  |
| --- |
| **(Sample)** |
| **リシルオキシダーゼの活性化におけるFibulin-4の必須の役割** | **An essential role for Fibulin-4 in lysyl oxidase activation** |
| 野田和男1,2、北川香織1、三木貴雄1、赤間智也1、寺嶋雅彦3、山内三男3、中邨智之1 | Noda K1,2, Kitagawa K1, Miki T1, Akama TO1, Terashima M3, Yamauchi M3, Nakamura T1 |
| 1関西医科大学薬理学講座、2倉敷中央病院形成外科、3University of North Carolina | 1Department of Pharmacology, Kansai Medical University; 2Department of Plastic Surgery, Kurashiki Chuo Hospital; 3University of North Carolina |
| 【目的】分泌タンパク質Fibulin-4のノックアウトマウスは弾性線維とコラーゲン線維の形成不全を来たし、生下時に大動脈や横隔膜の破裂により死亡する。これはエラスチン、コラーゲンの架橋酵素リシルオキシダーゼ（LOX）のノックアウトマウスと同じ表現型であることから、Fibulin-4がLOX活性にどのような影響を与えるのかを調べた。  【方法】マウス新生仔大動脈のエラスチン・コラーゲン架橋アミノ酸（デスモシン、ピリジノリン）はHPLCで測定した。Fbln4 KO MEF培養上清からLOXを精製し、3Hラベルしたトロポエラスチンを基質にLOX活性を測定した。LOX分子内架橋Lysine Tyrosyl Quinone (LTQ)はオービトラップ質量分析、LOXに結合する銅イオンはICP質量分析にて定量した。  【結果】Fbln4 KO MEF由来のLOXは活性が著しく低く、Fbln4 KOマウス組織はLox KOマウス組織と同じくエラスチン・コラーゲン架橋アミノ酸が大きく減少していた。LOXの活性中心はLTQとよばれる分子内架橋であるが、Fbln4 KO MEF由来のLOXにはLTQがほとんど検出されず、Fibulin-4がLTQ形成に必須であることがわかった。LTQ形成にはゴルジ体において銅イオントランスポーターATP7AからLOX前駆体への銅イオンの受け渡しが必要であるが、Fbln4 KO MEF由来のLOXの銅イオン含有率は著しく低かった。Fibulin-4はN末でLOX前駆体のプロドメインと、中央部からC末でATP7Aとそれぞれ結合することから、両者の橋渡しをしていることが考えられた。さらに、細胞外からエンドサイトーシスで取り込まれたFibulin-4もゴルジ体でLOXを活性化できることも見出した。  【結論】Fibulin-4はゴルジ体においてLOX前駆体とATP7Aに結合し、LOX前駆体への銅イオン受け渡しおよびその後のLTQ形成に必須の役割を果たす。 | [Objective] Mice deficient in Fibulin-4 (*Fbln4-/-*) have disrupted collagen fibers and elastic fibers and die shortly after birth from aortic and diaphragmatic rupture. These phenotypes closely overlap with those of mice deficient in a ECM cross-linking enzyme, lysyl oxidase (LOX). We studied whether and how Fibulin-4 plays a role in LOX enzyme activity.  [Methods] Cross-linked amino acids in elastin (Desmosine) and collagen (Pyridinoline) in mouse neonatal aortae were measured by HPLC. LOX enzyme activity was measured using tritiated tropoelastin as a substrate. Lysine Tyrosyl Quinone (LTQ) that is an intramolecular cross-link required for LOX activity and copper in purified LOX were measured by Orbitrap MS and ICP-MS, respectively.  [Results] The enzyme activity of LOX purified from *Fbln4* KO MEF was largely reduced. Accordingly, cross-linked amino acids from *Fbln4* KO mouse tissues and *Lox* KO mouse tissues were significantly decreased. LOX cofactor LTQ, an intramolecular cross-link, was almost absent in LOX produced from *Fbln4* KO MEF, indicating Fibulin-4 is necessary for LTQ formation. Copper ion that is transferred from ATP7A to proLOX in the Golgi is known to catalyze LTQ formation. LOX from *Fbln4* KO MEF contained much less copper than that from WT MEF. Fibulin-4 binds proLOX and ATP7A at its N-terminal domain and M and C-terminal domains, respectively, suggesting a bridging role of Fibulin-4 in copper transfer. Unexpectedly, extracellular Fibulin-4 was incorporated by endocytosis and activated LOX in the Golgi.  [Conclusion] Fibulin-4 binds proLOX and ATP7A in the Golgi, and thus play an essential role in copper ion transfer and subsequent LTQ formation in LOX. |
| キーワード：LOX, Fibulin-4, 架橋 | Key words: LOX, Fibulin-4, Cross-link |