

厚生労働科学研究費補助金

長寿科学総合研究事業

弾性線維形成因子 DANCE を標的とした老化関連疾患の予防・治療法開発の研究

平成 17～18 年度 総合研究報告書

主任研究者 中邨 智之

平成 19 (2007) 年 4 月

## 目 次

### I. 総括研究報告

弾性線維形成因子 DANCE を標的とした老化関連疾患の予防・治療法開発  
の研究 \_\_\_\_\_ 1

中邨 智之

(資料) 日経新聞記事 平成17年7月4日朝刊

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 \_\_\_\_\_ 16

III. 研究成果の刊行物・別刷 \_\_\_\_\_ 17

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

総括研究報告書

弾性線維形成因子 DANCE を標的とした老化関連疾患の予防・治療法開発の研究

主任研究者 中邨 智之

京都大学医学研究科 先端領域融合医学研究機構 助教授

## 研究要旨

加齢による弾性線維の劣化は体中の組織の弾性低下を招き、皮膚のたるみ以外に肺気腫や動脈中膜の硬化・断裂の原因となっている。我々は弾性線維形成に必須の分泌タンパク DANCE（別名 fibulin-5）を見出した。本研究では、老化関連疾患の中でも特に弾性線維の断裂が病因とされる肺気腫・大動脈瘤について DANCE の関与を明らかにするとともに、DANCE がどのようにして弾性線維形成に寄与しているのかその分子メカニズムを調べることによって DANCE が疾患の予防もしくは治療のターゲットになりうるかを研究する。本研究では、リコンビナント DANCE が無血清でも弾性線維形成を促進することができることを証明し発表した。その分子機序として、DANCE がエラスチンタンパクを結合してそのコアセルベーションを促進する作用があること、DANCE によってクロスリンクされた成熟した弾性線維の形成が促進されること、DANCE はクロスリンク酵素をリクルートしてきて結合することによりこの作用を発揮しているらしいこと、などを明らかにした。また加齢によって弾性線維再生活性のない切断型 DANCE が増えてくることを見出し、DANCE を高感度測定する ELISA を開発した。この ELISA を用いて血清中に比較的高濃度で DANCE が循環していることがわかった。DANCE 切断部位特異的 ELISA も同時に開発し、動脈疾患患者および慢性閉塞性肺疾患患者の中に血清中切断型 DANCE 高値の一群がいることを明らかにした。

## 分担研究者

北 徹 京都大学・循環器内科学 教授  
古川 裕 京都大学・循環器内科学 助手  
室 繁郎 京都大学・呼吸器内科学 助手

主要疾患である肺気腫や動脈中膜の硬化・大動脈瘤、さらに最近では加齢黄斑変性症なども弾性線維の劣化・断裂が直接原因であると考えられてきているため、弾性線維の劣化予防と再生は高齢化社会における極めて重要な課題である。しかし弾性線維形成の機序が不明のため、弾性線維の劣化予防と再生についての研究はほとんどされていない。我々は弾性線維形成に必須の分泌タンパク、DANCE（別名 fibulin-5）を見出した。DANCE 遺伝子欠損マウスの表現

## A. 研究目的

加齢に伴って体中の組織の弾性は失われていく。これは、弾性線維という細胞外線維の劣化・断裂による。このことが引き起こすのは単に「体が硬くなる」とか皮膚がたるむといった問題だけではない。高齢者の

型はヒトの老化に非常に類似しており、皮膚は弾性が無くたるみ、肺気腫をきたし、動脈は蛇行して硬化していた。この結果は、DANCE 欠損による弾性線維形成不全だけで老化の症状の多くを引き起こせることを示しているが、老化の表現型や老化関連疾患に DANCE の変化・減少が関与しているかどうかという研究はまだない。本課題では、老化関連疾患の中でも特に弾性線維の断裂が病因とされる肺気腫・大動脈瘤について DANCE の関与を明らかにするとともに、DANCE がどのようにして弾性線維形成に寄与しているのかその分子メカニズムを調べることによって DANCE が疾患の予防もしくは治療のターゲットになりうるかを研究する。

## B. 研究方法

### 1. 細胞培養

293T 細胞と京都大学医学部附属病院形成外科より提供を受けたヒト皮膚線維芽細胞は DMEM, 10%FBS で 5%CO<sub>2</sub>, 37°C の環境で培養した。

### 2. プラスミド

pEF6/V5 (Invitrogen) の V5-His tag のかわりに FLAG tag または Myc tag をつけたプラスミド (pEF6/FLAG と pEF6/Myc) を作成し、DANCE (fibulin-5) 全長または ΔN1 (nt 247-399 欠損)、ΔN2 (nt 247-504 欠損)、ΔM (nt 505-1110 欠損)、ΔC (nt 1114-1512 欠損) DANCE を pEF6/FLAG にサブクローニングした。同様にヒト LOX、LOXL1, 2, 3, 4 の cDNA を pEF6/Myc にサブクローニングした。

### 3. タンパク精製

pEF6/V5 の V5-His tag のかわりに

FLAG-His tag をつけたプラスミドを作成し、その中にタグとフレームをあわせて全長 DANCE または変異 DANCE cDNA をサブクローニングした。これらを 293T 細胞にトランスフェクションし、Blasticidin で選択した安定発現株の中から高発現株を得た。この DANCE 高発現 293T 細胞株の無血清細胞上清から Ni-NTA アガロースビーズを用いて分泌されたリコンビナント DANCE を精製した。200mM イミダゾールで elute されたリコンビナントタンパクは脱塩カラムでイミダゾールを除去して培養に用いた。

ヒトトロポエラスチン cDNA はヒト皮膚線維芽細胞培養から RT-PCR を用いてクローニングし、シークエンスによって ELNc という最も長い splice variant であることを確認した。この cDNA を pTrcHis ベクター (Invitrogen) にサブクローニングし、大腸菌で発現させ、Ni-NTA カラムを用いて精製した。

### 4. 弾性線維形成アッセイ系

ヒト皮膚線維芽細胞はカバーガラスの上にコンフルエントになるようにまいて、2日後にリコンビナントタンパク入りの無血清培地 (DMEM/F12) にメディウム交換した。10日後に細胞を 100%エタノールで固定し、2%BSA でブロッキングした。1次抗体は抗 FLAG M2 モノクローナル抗体 (Sigma)、抗エラスチンポリクローナル抗体 (Elastin Products Company)、抗 DANCE モノクローナル抗体、抗ヒトフィブリリン 1 ポリクローナル抗体を用いた。2次抗体は Alexa 488, 546, 647 でラベルされた抗ウサギ IgG または抗マウス IgG を用いた。DAPI による核染色の後、コンフォーカル顕微鏡 (LSM510 META, Zeiss または FV-1000, Olympus) で鏡検、データ取得を

行った。抗 DANCE モノクローナル抗体は、DANCE 遺伝子欠損マウスをリコンビナント DANCE タンパクで免疫することにより作成した。

#### 5. コアセルベーションアッセイ

可溶性のリコンビナントトロポエラスチンタンパク溶液とリコンビナント DANCE タンパク溶液は氷上で混合し、8 チャンネルの石英キュベットに移して 440nm の光で光散乱（濁度）を測定した。実験は循環恒温槽からの水で温度を調節できる吸光度計（UV-1650、島津製作所）で行った。

#### 6. 免疫沈降実験

293T細胞に FLAG タグまたは Myc タグを付けたタンパク発現プラスミドをトランスフェクションし、培養上清を混合して抗 FLAG-M2 アフィニティゲルで免疫沈降した。沈降物は SDS-PAGE で展開し、PVDF 膜に転写して抗 Myc モノクローナル抗体、抗 FLAG M2 モノクローナル抗体でバンドを検出した。

#### 7. 組織中 DANCE の加齢による変化

4ヶ月齢と20ヶ月齢の C57BL/6J マウス、および C57BL/6J 系統にバッククロスした DANCE 遺伝子欠損マウスを屠殺後、胸部大動脈と背中 of 皮膚を取り出してその一部を凍結粉碎し、6M 尿素で組織ライゼートを作成した後、PBS で透析した。ウェスタンブロットには抗マウス DANCE ポリクローナル抗体を用いた。

#### 8. 細胞培養における DANCE 切断の検出と切断端のアミノ酸配列決定

シグナルペプチドの下流に FLAG タグを

付けた DANCE 発現ベクターを 293T 細胞にトランスフェクションし、無血清培地に替えて 48 時間後に培養上清を SDS-PAGE で展開し、抗 FLAG 抗体または抗 DANCE ポリクローナル抗体でウェスタンブロットを行った。

また、カルボキシル末端に 6xHis タグを付けたヒト DANCE 安定発現株細胞を作成し、その培養上清から Ni-NTA カラムで DANCE を精製し、SDS-PAGE で展開してクーマジー染色を行った。切断型 DANCE のバンドを切り出し、エドマン分解によって切断端のアミノ酸配列を決定した。

#### 9. DANCE 依存的弾性線維形成アッセイ系における切断型 DANCE の活性検定

DANCE 依存的弾性線維形成アッセイ系（未発表）において、リコンビナント DANCE は弾性線維再生能を持つ。プレプロトリプシンのシグナルペプチドと FLAG タグを付加した切断型 DANCE の安定発現株細胞を作成し、その培養上清から切断型 DANCE を精製して弾性線維形成アッセイを行った。抗エラスチン抗体で弾性線維の形成を、抗 FLAG 抗体で入れたリコンビナントタンパクの局在を、それぞれ蛍光免疫染色で確認した。

#### 10. 抗ヒト DANCE モノクローナル抗体の作成

精製したリコンビナントヒト DANCE タンパクを Balb/c 系統マウスもしくは Balb/c 系統に掛け合わせた DANCE 遺伝子欠損マウスに免疫し、脾細胞をミエローマ細胞と融合させてハイブリドーマを作成した。ハイブリドーマをスクリーニングして高力価抗 DANCE 抗体を産生するクローンを得た。

また、切断部配列ペプチドを抗原にして、同様に DANCE 切断部認識抗体産生クローンを得た。

### 1.1. DANCE タンパク測定 ELISA の作成と検定

DANCE ペプチドを 6 種類作成し、KLH コンジュゲートした後ウサギを免疫し、抗 DANCE ポリクローナル抗体を作成した。抗体は抗原ペプチドカラムを用いて精製した。抗 DANCE モノクローナル抗体は、293T 細胞で発現させたヒトリコンビナント DANCE タンパクを精製し、Balb/c 系統にバッククロスした DANCE 遺伝子欠損マウスに免疫して作成した。切断部位特異的 DANCE モノクローナル抗体に関しては、切断型 DANCE を精製してエドマン分解によって切断部位を決定し、切断部位アミノ酸配列を持ったペプチドをマウスに免疫することによって作成した。定法に従って脾細胞よりハイブリドーマを作成し、DANCE を特異的に認識する高力価モノクローナル抗体を得た。ハイブリドーマ細胞をヌードマウスに接種し、腹水をプロテイン A 精製して高濃度の抗体を得た。抗 DANCE ペプチドポリクローナル抗体の組み合わせ、または抗 DANCE モノクローナル抗体を組み合わせることで DANCE 測定サンドイッチ ELISA を作成した。1つの抗体をタンパク吸着プレート (Maxisorp) に固相化し、別の抗体をビオチン化して検出抗体とし、ストレプトアビジン-HRP を用いて検出を行った。スタンダード DANCE タンパクは、DANCE 安定発現 293T 細胞株より分泌されたものを精製し、段階希釈して用いた。

### 1.2. ヒト血清中 DANCE の検出

まず 30 歳から 42 歳の健康人血清を用いて血清中全 DANCE 濃度、切断型 DANCE

濃度を決定した。

次に京都大学医学部付属病院循環器内科にて採取した、抗血小板薬を服用している動脈疾患患者 400 名分の血清について DANCE 濃度を測定した。

### 1.3. 遺伝子解析のための血液採取

京都大学医学部付属病院呼吸器内科に通院中の COPD 患者のうち、書面で同意の得られた患者より採血を行った。この研究は、TIMP や MMP など複数の遺伝子多型と COPD の関連を調べる研究の一部として行った。

### 1.4. プライマーデザイン、PCR ダイレクトシーケンス

DANCE 遺伝子多型にどのようなものがあるかは知られておらず、また遺伝子変異を見つけることも目的としているため、全エクソンをシーケンスする方法を採用した。DANCE 遺伝子は 11 個のエクソンがあるが、これらをそれぞれ増幅できるような PCR プライマーセットをデザインした。患者血液よりゲノム DNA を精製し (QIAamp, QIAGEN)、各エクソンを PCR 増幅してゲル電気泳動し、ゲルから精製した PCR 産物をダイレクトシーケンスした。

(倫理面への配慮)

ヒト血中 DANCE 濃度の測定は、京都大学医学部の倫理委員会での承認を得た上で、インフォームドコンセントを書面で得た被験者のみを対象に行った。同研究では、被験者から静脈血約 10 ml を採取する以外に被験者に侵襲を与えない。また、サンプルのデータベース登録時には患者名は登録されず、データはグループ間での平均値・標準偏差など統計上の処理後のものだけが公表され、個人別のデータの公表は行わない

など、被験者の個人情報管理には十分注意した。

マウスを用いる実験は、苦痛負荷は含まず、手術・屠殺は麻酔下に施行した。動物実験計画はすべて京都大学医学部動物実験委員会の承認を得て行った。

## C. 研究結果

### 1. DANCE は弾性線維の形成を促進する

弾性線維形成における DANCE の寄与を明らかにするため、ヒト皮膚線維芽細胞を用いて *in vitro* アッセイ系を作成した。この細胞は 10% 血清存在下で 10 日以上培養すると、抗エラスチン抗体で染まる弾性線維が形成されるが、無血清で培養すると弾性線維が形成されない。細胞培養における弾性線維形成には血清が必須であることがこれまでに報告されているが、血清には多数の既知・未知因子が含まれているため何が弾性線維形成に重要なのかを知ることが困難であった。ところが驚いたことに、無血清培地にリコンビナント DANCE タンパクを添加しておく、豊富に弾性線維が形成されていた (図 1)。できる弾性線維の量は加える DANCE タンパク量に依存していた。加えた DANCE タンパクはエラスチンと共局在していた。DANCE タンパク添加によって弾性線維構成成分の発現量に変化があるかどうかをマイクロアレイや qPCR で検討したが、エラスチンやフィブリリン 1, 2 をはじめとする弾性線維構成成分の遺伝子発現に変化はなかった。つまり無血清培養においても弾性線維構成成分は十分量発現されているが、DANCE タンパクを加えるまでは弾性線維としてオーガナイズされないということが言える。すなわち DANCE は遺伝子発現を変えるシグナ

ル分子ではなく、弾性線維構成成分のアセンブルを促進するオーガナイザー分子であると考えられた。

### 2. DANCE はトロポエラスチンのコアセルベーションを促進する

エラスチンの単量体であるトロポエラスチンは、生理的溫度でコアセルベーションという相転移を起こして自己凝集することが知られている。トロポエラスチンのコアセルベーションはトロポエラスチンのクロスリンクの前におこる重要なステップであると位置づけられている。DANCE はトロポエラスチンと直接結合することが知られているため、我々は DANCE がトロポエラスチンのコアセルベーションに影響するかどうかを検討した。精製したリコンビナントトロポエラスチンタンパク溶液は、35-40°C でコアセルベーションをおこして濁ってくる。トロポエラスチンタンパク溶液に少量の DANCE タンパクを加えておくと、コアセルベーションのおこる溫度が低下した (図 2)。すなわち、DANCE はトロポエラスチンのコアセルベーションを促進すると考えられた。

### 3. 組織中 DANCE の加齢による変化

抗マウス DANCE 抗体を用いたウエスタンプロットにより、3ヶ月齢のマウス大動脈組織には多くの DANCE タンパクが検出された。22ヶ月齢のマウス大動脈組織からも DANCE タンパクが検出されたが、量は3ヶ月齢のものに比べて約半分であった。次に、皮膚組織内 DANCE を調べた。3ヶ月齢マウスの皮膚には約 55 kD の全長 DANCE が多く含まれていたが、22ヶ月齢マウスの皮膚では全長 DANCE が著明に

減少しており、約 45 kD のバンドが増強していた。ヒトの皮膚組織でも加齢によって DANCE タンパクの切断と減少がともにおこっていることを確認した。

#### 4. 細胞培養における DANCE 切断の検出と切断端のアミノ酸配列決定

シグナルペプチドの下流に FLAG タグを付けた DANCE コンストラクトを 293T 細胞に発現させ、培養上清を SDS-PAGE で展開し、抗 FLAG 抗体および抗 DANCE ポリクローナル抗体を用いてウエスタンブロットを行った。抗 DANCE 抗体では老化マウス皮膚と同様に 2 本のバンドが検出されたが、抗 FLAG 抗体では約 55 kD のバンドのみが検出された。これはアミノ末端ドメイン約 10 kD が切断・分解をうけていることが原因と考えられたため、プロテアーゼ阻害剤が DANCE の切断を阻害できるかどうかを検討した。システインプロテアーゼ阻害剤 E64 では切断が阻害されなかったが、セリンプロテアーゼ阻害剤であるアプロチニンではほぼ完全に DANCE 切断が阻害された。すなわち、DANCE はセリンプロテアーゼによってアミノ末端ドメインが切断されることが明らかになった。

次に、カルボキシル末端末端に 6xHis タグをつけたリコンビナント DANCE タンパクを精製し、SDS-PAGE で展開、クーマジーブルーで染色し、約 45 kD のバンドを切り出してエドマン分解により切断部位のアミノ酸配列を決定した。この情報に基づき、はじめからアミノ末端ドメインを欠く切断型 DANCE の発現コンストラクト、安定発現株細胞を作成して、リコンビナント切断型 DANCE タンパクを精製した。

#### 3. DANCE 依存的弾性線維形成アッセイ系における切断型 DANCE の活性検定

我々の開発した DANCE 依存的弾性線維形成アッセイ系では、リコンビナント DANCE タンパクを培地中に入れておくと 10 日後には抗エラスチン抗体で染色される弾性線維ができる。このとき加えたリコンビナント DANCE タンパクは弾性線維上に局在する。この系に全長 DANCE のかわりにリコンビナント切断型 DANCE タンパクを加えておくと、弾性線維は形成されず、加えたリコンビナントが線維状に並ぶこともなかった。すなわち、切断型 DANCE には弾性線維再生能がないと考えられた。

#### 4. DANCE によって形成誘導された弾性線維は成熟した弾性線維である

機能的な弾性線維形成のためには、トロポエラスチンの線維状の沈着とコアセルベーションだけではなく、分子間のクロスリンクが必要である。上記データは DANCE がマイクロフィブリルに沈着してトロポエラスチンの沈着・凝集を促進していることを示しているが、これらトロポエラスチンがクロスリンクして成熟した弾性線維となっているかどうかは不明である。これを調べるため、 $\beta$ -aminopropionitrile (BAPN) という LOX (リシルオキシダーゼ阻害薬) を培地中に加えてみた。LOX ファミリーはトロポエラスチンのクロスリンク酵素である。培地中に BAPN を加えて LOX 活性を阻害したところ、DANCE の線維状沈着は阻害されなかったが、エラスチンは沈着しなかった (図 3)。すなわち、DANCE タンパクによって線維状に沈着するエラスチンはクロスリンクされており、DANCE タンパクが形成を誘導する弾性線維は成熟した



弾性線維であると考えられた。

#### 5. LOXL1, 2, 4 は DANCE と結合する

成熟した弾性線維形成のためには、エラスチンは LOX ファミリー酵素によってクロスリンクされる必要がある。現在5つの LOX ファミリーが知られている：LOX, LOXL1, LOXL2, LOXL3, LOXL4。LOX 遺伝子欠損マウス、LOXL1 遺伝子欠損マウスは弾性線維の形成異常がおこることが最近報告された。DANCE がこれら LOX ファミリーと結合するかどうかを免疫沈降実験で調べた。LOXL1, 2, 4 は DANCE と結合し、C 末端を欠損させた DANCE では結合が非常に弱くなったので、DANCE の C 末端と特異的に結合しているものと考えられた (図 4)。

#### 6. 抗ヒト DANCE モノクローナル抗体の作成

ポリクローナル抗 DANCE 抗体を用いて DANCE 測定 ELISA 系の作成を試みたが、感度が十分上がらなかった。このため、抗 DANCE モノクローナル抗体を作成した。定法に従って Balb/c 系統のマウスにヒト DANCE タンパクを免疫する方法を行ったが力価が上昇しなかった。これは、DANCE はアミノ酸配列が種間で非常に保存された分泌タンパクであるので野生型マウスが DANCE タンパクに対して免疫寛容になっているためと考えられた。そこで Balb/c にバッククロスした DANCE 遺伝子欠損マウスに DANCE タンパクを免疫したところ、非常に高力価の血清が得られた。このマウス脾細胞からハイブリドーマを樹立し、数千クローンの高力価モノクローナル抗体を得た。これとは別に、DANCE 切断部ペプチ

ドを Balb/c 系統マウスに免疫して DANCE 切断部位を認識するモノクローナル抗体を数千クローン得た。

#### 7. DANCE 測定 ELISA、切断型 DANCE 測定 ELISA の作成

上記のモノクローナル抗体を組み合わせ、サンドイッチ ELISA を作成したところ、高感度 (検出限界 1ng/ml) に DANCE を検出することができた。さらに、抗体の組み合わせによって、全長と切断型 DANCE を両方含むようなタンパクは高感度に検出するが、全長 DANCE だけだと非常に低感度になる興味深い ELISA ができた。この ELISA は切断型 DANCE を特異的に検出することができると考えられた (検出限界約 1ng/ml)。

#### 8. ヒト血清中 DANCE の検出

30歳から42歳の健常人血清を用いて血清中 DANCE 濃度を測定したところ、全 DANCE 濃度は 100-200ng/ml であり、切断型 DANCE は検出限界以下であった。

次に京都大学医学部付属病院循環器内科にて採取した患者血清400名分について測定を行った。血中 DANCE 濃度は 100-300ng/ml で、切断型 DANCE は検出限界前後が多かったが、10名ほどは切断型 DANCE が異常高値 (10ng/ml 以上) を示した。

#### 9. COPD 患者における DANCE 遺伝子多型・変異の検索

京都大学医学部付属病院受診中の COPD 患者100名より同意を得て採血を行った。DANCE 遺伝子のエクソンすべてをシーケンシングしているが、現在までに DANCE 遺

伝子変異は見つかっていない。

#### D. 考察

我々は DANCE が弾性線維形成のオーガナイザー活性を持つことを初めて見いだした (図 5)。無血清細胞培養において弾性線維形成に成功したのは我々が初めてである。血清中にはサイトカインや増殖因子をはじめとする多数の既知・未知因子が含まれているため、これまで弾性線維形成の研究を細胞培養で行うことには大きな困難が伴った。我々の無血清弾性線維形成アッセイ系は、細胞が産生する因子と加えるリコンビナントタンパクだけで構成されており、今後このアッセイ系を用いて弾性線維研究が大きく進むことが期待される。血清中には DANCE もかなりの高濃度で含まれていることを最近見いだしたが、血清中 DANCE が弾性線維に寄与していた可能性もある。我々は DANCE 遺伝子欠損マウスが弾性線維形成異常を来すことから、DANCE が弾性線維形成に必須であることをすでに報告しているが、今回の知見は DANCE が単に弾性線維構成成分というだけではなく弾性線維形成をオーガナイズできる重要な分子であることを示唆している。弾性線維再生薬の開発を考えると、DANCE は標的分子として大きな可能性をもっているといえる。

加齢によって皮膚組織中 DANCE の大部分は 10 kD ほど小さな分子量のものになっていた。この低分子型 DANCE は細胞培養でも観察され、セリンプロテアーゼ阻害剤でなくなることから、切断型 DANCE であると考えられる。すなわち、DANCE は加齢によって切断を受ける。DANCE の切断が弾性線維形成において持つ意味は、今

回の研究で明らかとなった。全長 DANCE が弾性線維再生能を持つのに対して、切断型 DANCE は全く弾性線維再生能がなかったのである。したがって、DANCE の切断は DANCE の弾性線維再生活性の不活化であるということができる。

ヒトの加齢や老化関連疾患で DANCE の量、切断の有無を調べることは、弾性線維再生能を測定することに近いと考えられるため、非常に重要である。このために DANCE 測定系が待たれていたが、ようやく DANCE を高感度に測定できる ELISA ができた。さらに、切断型 DANCE を特異的に測定するという困難なテーマにも挑戦し、切断型 DANCE 特異的 ELISA を作ることに成功した。今回、ヒト血清中に比較的高濃度で DANCE タンパクが循環していることを見いだした意義は大きく、今後いろいろな疾患で血清 DANCE タンパクを測定することにより、血清 DANCE 濃度が疾患マーカーとなりうる可能性がある。循環器内科の患者血清における疾患と血清 DANCE 濃度の関連については現在解析中である。

特に興味深いのは、一部の患者で切断型 DANCE が非常に高値となったことである。組織のウエスタンブロットなどでは全長 DANCE の半分量ぐらい切断型 DANCE が検出されるので、1) 切断型 DANCE は循環血流には入りにくい、2) 切断部位が *in vivo* では細胞培養とは異なっている、3) 切断された後で少し削り込まれるために切断面特異的な抗体では認識されなくなる、などの可能性が考えられる。3) の場合は、血清中切断型 DANCE 異常高値の患者では切断されて間もない DANCE が多くあることになり、疾患の活動性を表している可能

性がある。今後、患者のフォローアップを通じて切断型 DANCE 高値の持つ意味を検討していきたい。また、血中の DANCE はどの組織から産生されたものに由来するのか、についても明らかにしていきたい。

#### E. 結論

DANCE/fibulin-5 は強力な弾性線維形成誘導因子であり、単に弾性線維構成成分というだけではなく弾性線維形成をオーガナイズできる重要な分子である。その分子メカニズムは、トロポエラスチンとの結合とコアセルベーションの促進、LOX ファミリー酵素との結合によるクロスリンクの促進であると考えられる。また、老化によって DANCE の切断、すなわち DANCE の弾性線維再生能の不活化がおこる。

全 DANCE 濃度及び切断型 DANCE 濃度を高感度で検出できる ELISA の作成に成功した。この ELISA を用い、ヒト血液中には比較的高濃度で DANCE が循環していることが明らかとなった。一部患者では切断型 DANCE 濃度が異常高値であり、疾患活動度との関係が注目される。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 論文発表

Hirai M, Ohbayashi T, Horiguchi M, Okawa K, Hagiwara A, Kita T, Chien KR, Nakamura T. Fibulin-5/DANCE has an elastogenic organizer activity that is abrogated by proteolytic cleavage *in vivo*. *J Cell Biol* 176:1061-1071, 2007.

Lotery AJ, Baas D, Ridley C, Jones RP, Klaver CC, Stone E, Nakamura T, Luff A, Griffiths H, Wang T, Bergen AA, Trump D: Reduced secretion of fibulin 5 in age-related macular degeneration and cutis laxa. *Hum Mutat* 27:568-74, 2006.

McLaughlin PJ, Chen Q, Horiguchi M, Starcher BC, Stanton JB, Broekelmann TJ, Marmorstein AD, McKay B, Mecham R, Nakamura T, Marmorstein LY: Targeted disruption of fibulin-4 abolishes elastogenesis and causes perinatal lethality in mice. *Mol Cell Biol* 26:1700-9, 2006.

##### 学会発表

Nakamura, T., Hirai, M., Ohbayashi, T., Horiguchi, M.: DANCE/fibulin-5 has an elastogenic activity which is inactivated by aging-associated proteolytic cleavage. Invited talk at The 4th European Meeting on Elastin (July 9 - 12, 2006, Lyon, France).

Nakamura, T., Hirai, M., Ohbayashi, T., Horiguchi, M.: Latent TGF- $\beta$  binding protein 2 is a DANCE/fibulin-5 binding protein that regulates elastic fiber assembly. The 4th European Meeting on Elastin (July 9 - 12, 2006, Lyon, France).

Hirai, M., Ohbayashi, T., Horiguchi, M., Kita, T., Nakamura, T.: DANCE promotes elastic fiber development, an implication for future aging therapies. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, and 11th FAOBMB Congress (June 18 - 23, 2006, Kyoto).

中邨智之：「弾性線維形成の分子機構」第35回かなえ医薬振興財団研究助成贈呈式記念講演（招待講演）（東京、2007年2月23日）

中邨智之：「弾性線維形成におけるDANCE/fibulin-5の役割」第4回エラスチン研究会学術集会（招待講演）（東京、2006年12月8-9日）

Nakamura, T.: Molecular mechanisms of elastic fiber organization by DANCE/fibulin-5. Invited talk at Gordon Conference on Elastin and Elastic Fiber (July 31, 2005, New Hampshire, U.S.A.).

中邨智之：「弾性線維の形成と再生の分子機構」第12回皮膚創傷治癒フォーラム（招待講演）（東京、2005年6月11日）

Hirai, M., Ohbayashi, T., Horiguchi, M., Kita, T., Nakamura, T.: Latent TGF- $\beta$  binding protein-2 (LTBP-2) interacts with DANCE, suggesting a novel mechanism of elastogenesis. 第58回日本細胞生物学会大会（大宮、2005年6月15-17日）

Hirai, M., Ohbayashi, T., Horiguchi, M., Kita, T., Nakamura, T.: DANCE promotes elastic fiber development. An implication for future aging therapies. 第70回日本循環器学会学術集会（名古屋、2006年3月24-26日）

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

特許出願

国内出願番号：特願 2005-030864 国内出願日：平成17年2月7日

国際出願番号：PCT/JP2006/301372 国際出願日：平成18年1月23日

名称：DANCE またはその発現を増強する因子による弾性線維再生の方法

発明者：中邨智之 平井希俊

出願人：京都大学

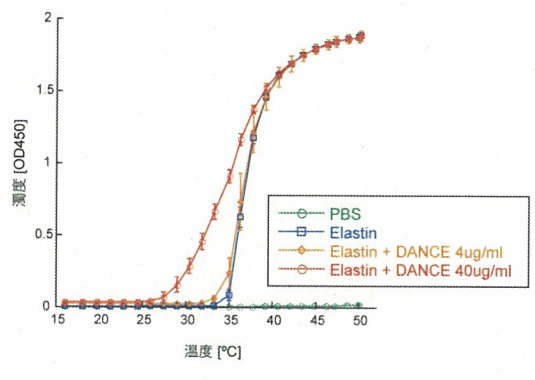
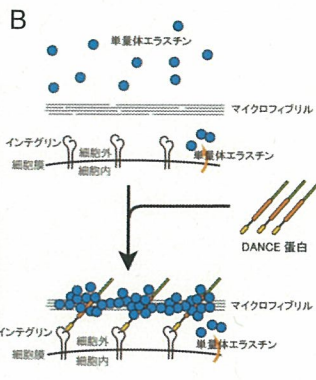
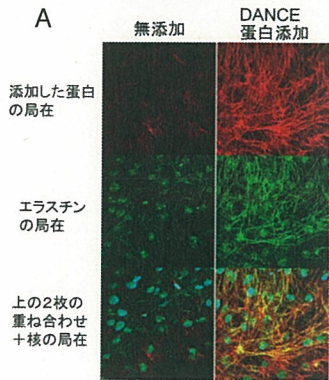


図1. A. 線維芽細胞培養にリコンビナント DANCE タンパク(赤)を加えると無血清でも弾性線維形成(緑)が誘導される。B. 無血清でもエラスチンやマイクロフィブリルは十分量発現しているが、DANCE を加えてはじめて弾性線維としてオーガナイズされる。

図2. コアセレーションアッセイ。リコンビナント単量体エラスチン溶液は温度を上げていくと36°C付近でコアセレーションをおこして濁る。これに DANCE 蛋白を混ぜておくとより低い温度でコアセレーションがおこる。

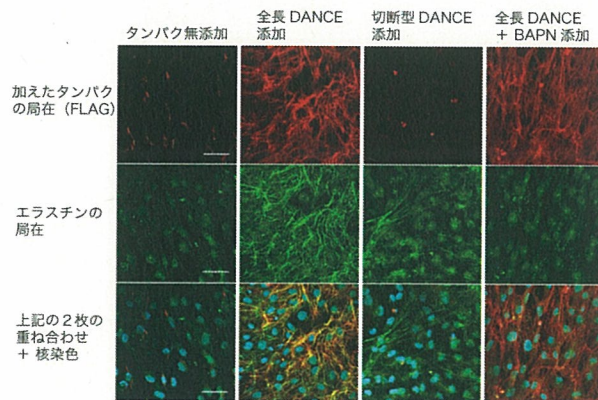
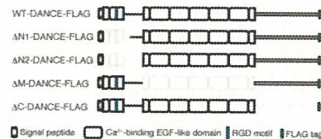


図3. 全長 DANCE と同時に BAPN を添加すると DANCE はマイクロフィブリル上に局在するがエラスチンはマイクロフィブリル上には沈着できない。また、切断型 DANCE には弾性線維形成誘導活性がない。全長 DANCE をヒト線維芽細胞無血清培養に加えると抗エラスチン抗体で染まる弾性線維ができるが、切断型 DANCE を加えても弾性線維はできない。

[免疫沈降実験]

FLAGタグをつけたDANCE (WT)とその deletion mutant ( $\Delta N1$ ,  $\Delta N2$ ,  $\Delta M$ ,  $\Delta C$ )、およびMycタグをつけたLysyl Oxidase酵素ファミリー蛋白 (LO, LOXL1 - 4)が結合するかどうかを免疫沈降実験で調べた。



[LOXL2の例]

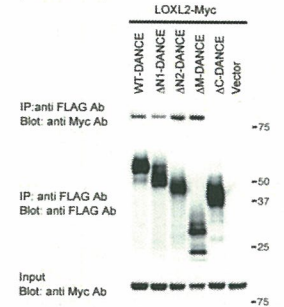


図4. DANCE は5つのクロスリンク酵素(Lysyl Oxidase 酵素ファミリー)のうち LOXL1, 2, 4 と結合する。Lysyl Oxidase 酵素ファミリーには Lysyl Oxidase (LO), Lysyl Oxidase-Like 1 (LOXL1), LOXL2, LOXL3, LOXL4 の5つが知られている。全長 DANCE および各ドメインを欠く deletion mutant と Lysyl Oxidase 酵素ファミリーをそれぞれ293T 細胞に発現させ、in vitro binding assay にて結合を調べた。ここでは LOXL2 と DANCE の結合が DANCE の C 末端欠損でなくなることを示す。

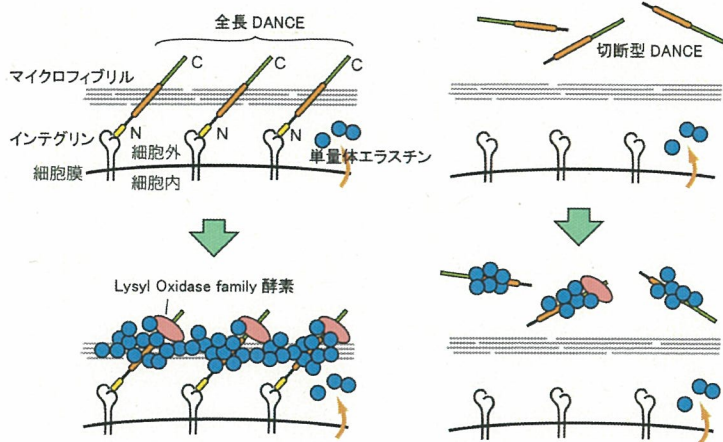


図5. DANCE が弾性線維形成を誘導するメカニズム(Line-DANCE モデル)。全長 DANCE はまずマイクロフィブリル上にならび、単量体エラスチンを結合してそのコアセルベーションを促進し、最後に C 末につけたクロスリンク酵素でそのクロスリンクが効率よく行われるようにする。これにより、線維の伸び縮みが可能になる。これに対して切断型 DANCE はマイクロフィブリル上にならぶことができず、従ってエラスチンの線維状沈着とクロスリンクに寄与することができない。

資料

日経新聞

平成17年7月4日朝刊

05-7-4④

# 肌の張り保つたんぱく

## 京大、弾性線維の再生に道

京都大学の中邨智之・助教授は肌の張りなど皮膚の弾力を保つのに欠か

せないたんぱく質を発見した。このたんぱく質がないネズミを人工的に作

ったところ、皮膚がたるんで、元に戻らなくなっ

た。肌の弾力を取り戻す働きを止めると、皮膚が

延びることを突き止めた。動脈も硬くなってい

た。このたんぱく質が体内で作られなくなると、

皮膚や血管などに弾力を与える弾性線維がうまく

「しわとり菜」などの開

発につながるそうだ。

京大チームはネズミに

ある「DANCE」というたんぱく質の遺伝子の

動きを止めると、皮膚が

延びることを突き止めた。動脈も硬くなってい

た。このたんぱく質が体内で作られなくなると、

皮膚や血管などに弾力を

与える弾性線維がうまく

できなくなる可能性があ

るといふ。

ケガの治療に移植用の

皮膚を再生する取り組み

が進んでいるが、現在は

弾性線維を作ることがで

きず、傷を覆うにとどま

っている。弾性線維を再

生することができれば、

張りのある皮膚を移植す

ることが可能になる。

中邨助教授は「老化に

よる皮膚のたるみにお

の遺伝子が関係してい

かもしれない」と話し

ている。今後、たんぱく

の詳しい役割を突き止

ると同時に、現在は難

いとされる弾性線維の

生にも乗り出す。

**ENGREYLL**  
biccama.com

研究成果の刊行に関する一覧表

Hirai M, Ohbayashi T, Horiguchi M, Okawa K, Hagiwara A, Kita T, Chien KR, Nakamura T. Fibulin-5/DANCE has an elastogenic organizer activity that is abrogated by proteolytic cleavage *in vivo*. **J Cell Biol** 176:1061-1071, 2007.

Lotery AJ, Baas D, Ridley C, Jones RP, Klaver CC, Stone E, Nakamura T, Luff A, Griffiths H, Wang T, Bergen AA, Trump D: Reduced secretion of fibulin 5 in age-related macular degeneration and cutis laxa. **Hum Mutat** 27:568-74, 2006.

McLaughlin PJ, Chen Q, Horiguchi M, Starcher BC, Stanton JB, Broekelmann TJ, Marmorstein AD, McKay B, Mecham R, Nakamura T, Marmorstein LY: Targeted disruption of fibulin-4 abolishes elastogenesis and causes perinatal lethality in mice. **Mol Cell Biol** 26:1700-9, 2006.



# Fibulin-5/DANCE has an elastogenic organizer activity that is abrogated by proteolytic cleavage in vivo

Maretoshi Hirai,<sup>1,2</sup> Tetsuya Ohbayashi,<sup>1</sup> Masahito Horiguchi,<sup>1,2</sup> Katsuya Okawa,<sup>1</sup> Akari Hagiwara,<sup>1</sup> Kenneth R. Chien,<sup>3</sup> Toru Kita,<sup>2</sup> and Tomoyuki Nakamura<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Horizontal Medical Research Organization and <sup>2</sup>Department of Cardiovascular Medicine, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Kyoto 606-8501, Japan  
<sup>3</sup>Cardiovascular Research Center, Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School, Charlestown, MA 02114

Elastic fibers are required for the elasticity and integrity of various organs. We and others previously showed that fibulin-5 (also called developing arteries and neural crest EGF-like [DANCE] or embryonic vascular EGF-like repeat-containing protein [EVEC]) is indispensable for elastogenesis by studying fibulin-5-deficient mice, which recapitulate human aging phenotypes caused by disorganized elastic fibers (Nakamura, T., P.R. Lozano, Y. Ikeda, Y. Iwanaga, A. Hinek, S. Minamisawa, C.F. Cheng, K. Kobuke, N. Dalton, Y. Takada, et al. 2002. *Nature*. 415:171–175; Yanagisawa, H., E.C. Davis, B.C. Starcher, T. Ouchi, M. Yanagisawa, J.A. Richardson, and E.N. Olson. 2002. *Nature*. 415:168–171). However, the molecular mechanism by which fibulin-5 contributes to elastogenesis remains unknown. We report

that fibulin-5 protein potently induces elastic fiber assembly and maturation by organizing tropoelastin and cross-linking enzymes onto microfibrils. Deposition of fibulin-5 on microfibrils promotes coacervation and alignment of tropoelastins on microfibrils, and also facilitates cross-linking of tropoelastin by tethering lysyl oxidase-like 1, 2, and 4 enzymes. Notably, recombinant fibulin-5 protein induced elastogenesis even in serum-free conditions, although elastogenesis in cell culture has been believed to be serum-dependent. Moreover, the amount of full-length fibulin-5 diminishes with age, while truncated fibulin-5, which cannot promote elastogenesis, increases. These data suggest that fibulin-5 could be a novel therapeutic target for elastic fiber regeneration.

## Introduction

Elastic fibers play a crucial role in the structural integrity and function of various organs (Rosenbloom et al., 1993). The loss of elasticity leads to many age-related phenotypes, such as wrinkled skin, emphysema, and arteriosclerosis (Pasquali-Ronchetti and Baccarani-Contri, 1997; Bailey, 2001). Therapeutic intervention for these age-related changes has not been realized because the mechanisms of the development and maintenance of elastic fibers remain unclear. Elastic fibers comprise two distinct components: an amorphous core of cross-linked elastin surrounded by a peripheral mantle of microfibrils. In the process of elastic fiber assembly, elastin precursors (tropoelastin) are deposited on microfibrils, aligned in an orderly way, and cross-linked by

lysyl oxidase (LOX) enzymes to form mature elastin, which confers the elastic properties to elastic fibers (Rosenbloom et al., 1993). However, the molecular mechanism of this multi-step process remains largely unknown (Kielty et al., 2002).

Tropoelastin, which is a major constituent of the elastic fiber, can interact with other tropoelastin molecules and self-aggregate at physiological temperatures. Thus, tropoelastins undergo a phase transition, which is termed coacervation, from soluble monomers to insoluble aggregates (Urry, 1988). In elastic fiber assembly, coacervation is considered to play a critical role through concentrating and aligning tropoelastin before cross-linking. However, coacervation of tropoelastins alone is not sufficient to explain the assembly process and the variable forms of elastic fibers in different tissues. For fibrillar deposition of tropoelastin, microfibrils, which are mainly composed of fibrillin-1 and -2, are assumed to act as scaffolds, and to direct the morphogenesis of elastic fibers. In fact, mice deficient in both fibrillin-1 and -2 were recently reported to exhibit impaired

Correspondence to Tomoyuki Nakamura: nakatomo@kuhp.kyoto-u.ac.jp

Abbreviations used in this paper: BAPN,  $\beta$ -aminopropionitrile; DANCE, developing arteries and neural crest EGF-like; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; HSF, human skin fibroblast; LOX, lysyl oxidase; LOXL, LOX-like.

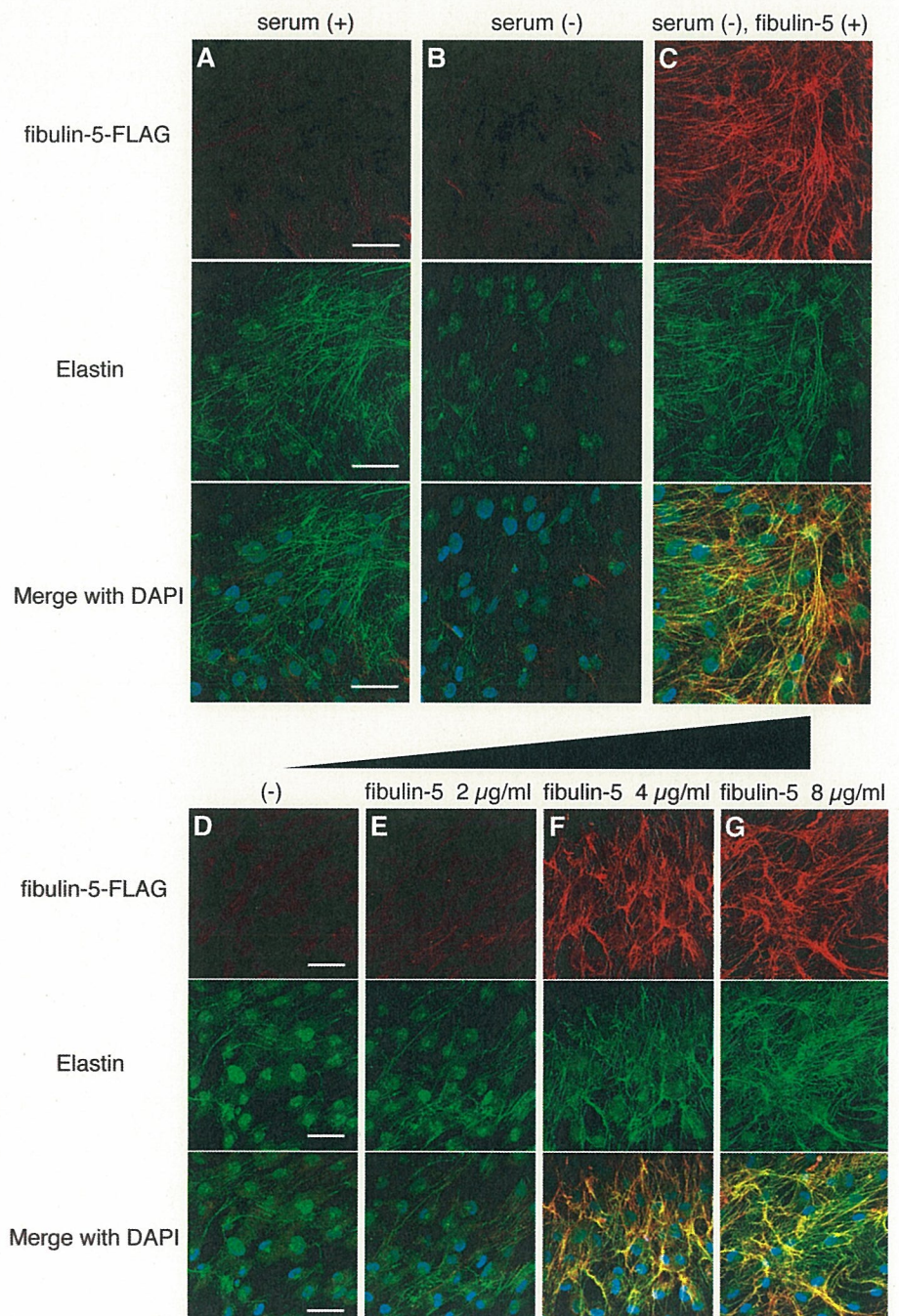
The online version of this article contains supplemental material.

elastogenesis (Carta et al., 2006), indicating that fibrillins are required for the initial assembly of elastic fibers.

The final cross-linking step is initiated by oxidative deamination of tropoelastins, which is catalyzed by LOXs (Kagan and Li, 2003). LOXs are copper-containing monoamine oxidases secreted by fibrogenic cells, such as fibroblasts and smooth muscle cells. Five LOX family members have been identified so far: LOX, LOX-like 1 (LOXL1), 2, 3, and 4 (Molnar et al., 2003). LOX-deficient mice were reported to die perinatally because of insufficient cross-linking of elastin and collagens (Maki et al., 2002; Hornstra et al., 2003). LOXL1-deficient mice were reported to live to adulthood, but to have degenerated elastic fibers, suggesting that LOXL1 is also important for the

development and/or maintenance of elastic fibers (Liu et al., 2004). Yet, little is known about how LOXs are recruited to catalyze tropoelastins on microfibrils.

Thus, the elastic fiber assembly involves recruitment and organized deposition of various molecules, and seems to be tightly regulated and finely tuned to achieve the appropriate elastic properties in each organ. However, whether there are any specific molecules organizing the assembly of elastic fiber components remains unknown. Recently, we and others showed that the elastic fiber assembly process requires fibulin-5 (also known as developing arteries and neural crest EGF-like [DANCE] or embryonic vascular EGF-like repeat-containing protein [EVEC]) by thoroughly investigating fibulin-5-deficient mice



**Figure 1. Fibulin-5 potently induces elastic fiber development and promotes tropoelastin coacervation.** (A–C) Human skin fibroblasts were cultured in 10% fetal bovine serum-containing medium (A), in serum-free medium (B), and in serum-free medium with 8  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of purified recombinant FLAG-tagged fibulin-5 protein (C). Cultures were stained with anti-FLAG (top) or anti-human elastin (middle) antibody. The bottom images were produced by superimposition of the top and middle images, together with DAPI nuclear staining. (D–G) Human skin fibroblasts were cultured in serum-free medium with 0, 2, 4, or 8  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of purified FLAG-tagged recombinant fibulin-5 protein, to examine the dose-dependency of fibulin-5 elastogenic activity. Cultures were stained as in A–C. Bars, 50  $\mu\text{m}$ .

(Nakamura et al., 2002; Yanagisawa et al., 2002). These mice recapitulate human aging phenotypes, such as loose skin, emphysematous lungs, and stiff arteries because of disorganized elastic fibers. Fibulin-5 has an Arg-Gly-Asp motif at the N-terminal domain and interacts with cell surface integrins, such as  $\alpha v\beta 5$ ,  $\alpha v\beta 3$ , and  $\alpha 9\beta 1$  (Nakamura et al., 1999, 2002). Fibulin-5 also has tandem arrays of calcium-binding EGF-like domains and a characteristic C-terminal fibulin domain, and these structures enable it to interact with several elastic fiber components, such as elastin (Yanagisawa et al., 2002; Freeman et al., 2005), EMILIN (Zanetti et al., 2004), and LOXL1 (Liu et al., 2004). Thus, fibulin-5 is a good candidate for an organizer of elastogenesis that scaffolds elastic fiber components in the vicinity of cell surfaces. However, the specific role of fibulin-5 in elastogenesis, whether fibulin-5 can promote elastogenesis, and whether there is a correlation of aging-associated alterations of fibulin-5 with aging phenotypes, remains unknown.

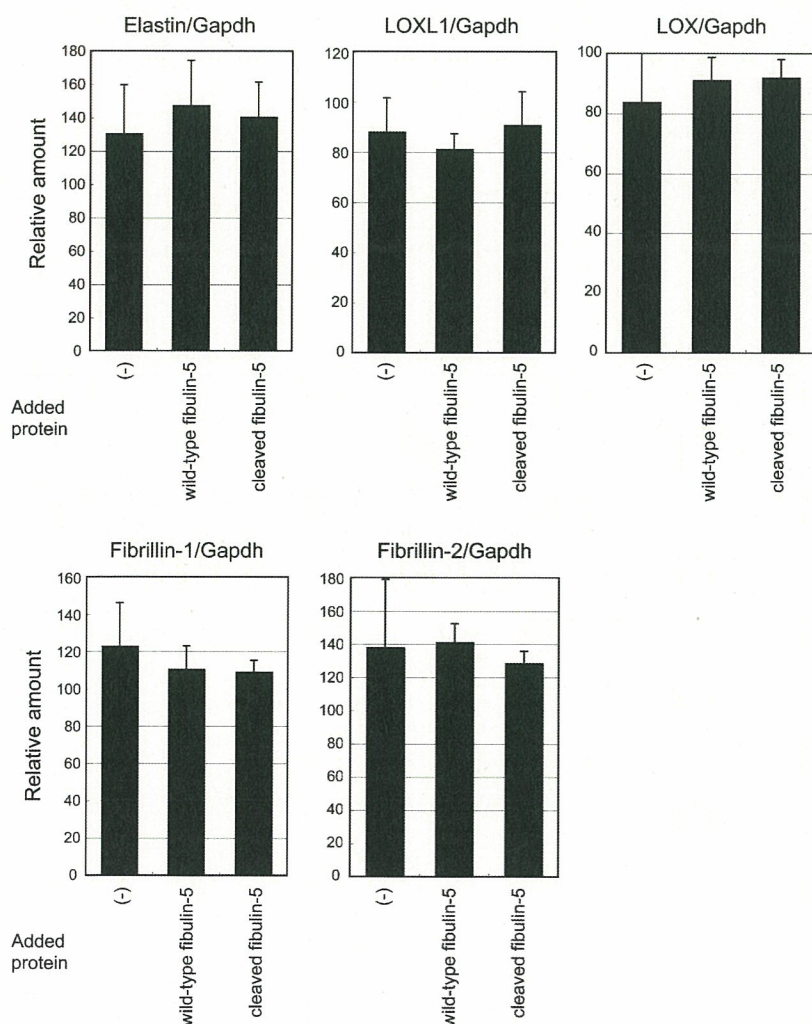
We report that recombinant fibulin-5 protein potently induces elastic fiber assembly, even in serum-free cell culture, without changing the expression of elastic fiber components, suggesting that fibulin-5 serves as an organizer molecule for elastogenesis. Fibulin-5 deposits on microfibrils, promotes aggregation of tropoelastin molecules through coacervation,

and also interacts with LOXL1, 2, and 4, which are enzymes that cross-link elastin. We propose a model in which fibulin-5 tethers LOXL enzymes to microfibrils, thus facilitating aggregation and cross-linking of elastin on microfibrils. Intriguingly, a much lower level of full-length fibulin-5, and a higher level of a truncated form of fibulin-5 were detected in aged mouse loose skin than in young mouse skin because of proteolytic cleavage of the N-terminal domain. The cleavage of fibulin-5 abrogates fibulin-5–microfibril interaction, leading to loss of the elastic fiber–organizing activity of fibulin-5.

## Results

### Fibulin-5 promotes assembly of elastic fiber components

To elucidate the molecular role of fibulin-5 in elastogenesis, we established an *in vitro* system to evaluate elastic fiber assembly, using human skin fibroblast cultures. In the presence of fetal bovine serum, skin fibroblasts developed an abundant meshwork of elastic fibers, which were stained with antielastin antibody (Fig. 1 A), as previously reported (Mecham, 1987). In the absence of serum, they did not develop elastic fibers (Fig. 1 B). Investigation of elastogenic factors has been hampered by the



**Figure 2. Quantitative PCR analysis in skin fibroblasts after addition of recombinant full-length fibulin-5 or truncated form of fibulin-5.** Total RNA from skin fibroblasts was extracted 2 d after addition of recombinant proteins in the serum-free culture media. cDNA was synthesized and was subjected to quantitative real-time PCR for the expression of elastin, LOXL1, LOX, fibrillin-1, -2, and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Gapdh) transcripts. A graphic presentation of results obtained by real-time PCR is shown. Levels of Gapdh transcript were used to normalize cDNA levels. The relative amount of PCR product amplified from control fibroblasts was set at 100. Data are presented as triplicates, and the means  $\pm$  the SD are shown. The primers used are shown in Table S1, available at <http://www.jcb.org/cgi/content/full/jcb.200611026/DC1>.

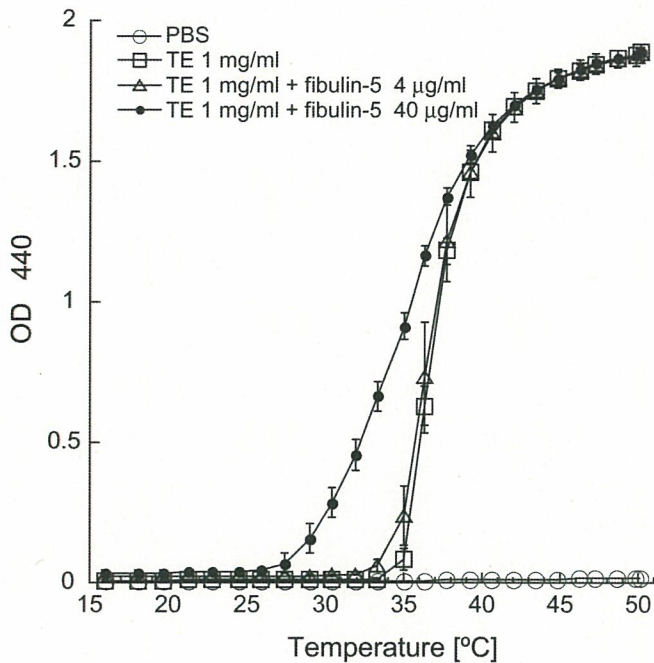


Figure 3. **Coacervation assay using purified recombinant tropoelastin and fibulin-5 proteins.** 1 mg/ml of soluble tropoelastin with 0, 4, or 40 µg/ml of fibulin-5 protein was induced to coacervate by increasing the temperature, and the turbidity of the solution was measured. Data were obtained in duplicate, and the mean  $\pm$  the SD values are shown.

serum dependency of elastogenesis in cell culture, as serum contains various proteins of known and unknown functions (Mecham, 1987). Surprisingly, we found that skin fibroblasts developed an abundant meshwork of elastic fibers, even in serum-free media, when they were cultured with purified recombinant fibulin-5 protein (Fig. 1 C). Staining with anti-FLAG antibody revealed that added fibulin-5 protein colocalized with elastin. Recombinant fibulin-5 protein induced elastic fiber assembly in a dose-dependent manner in serum-free medium (Fig. 1, D–G). We scarcely detected endogenous fibulin-5 in serum-free culture, whereas we detected abundant deposition of fibulin-5 in serum-containing culture (Fig. S1, available at <http://www.jcb.org/cgi/content/full/jcb.200611026/DC1>). Addition of fibulin-5 protein did not affect the mRNA expression of elastic fiber components (e.g., elastin and fibrillins; Fig. 2), indicating that a sufficient amount of elastic fiber components was produced even in serum-free culture, but that they could not be organized into elastic fibers without the addition of fibulin-5 protein. These data suggest that fibulin-5 is not a signaling molecule that changes gene expression, but an organizer molecule that promotes assembly of elastic fiber components.

#### Fibulin-5 promotes coacervation of tropoelastin

Tropoelastin, which is the precursor of elastin, can interact with other tropoelastin molecules and self-aggregate at physiological temperatures through a phase transition termed coacervation (Urry, 1988; Vrhovski et al., 1997). Coacervation is considered to be an important step before cross-linking of tropoelastin molecules for elastic fiber assembly (Urry, 1988; Vrhovski et al., 1997).

Because fibulin-5 can directly interact with tropoelastin (Yanagisawa et al., 2002), we examined whether fibulin-5 can affect the coacervation of tropoelastin. Purified recombinant tropoelastin protein coacervated at 35–40°C, causing the solution to become turbid (Fig. 3). In the presence of recombinant fibulin-5 protein, tropoelastin started to coacervate at lower temperatures (Fig. 3), suggesting that fibulin-5 promotes coacervation of tropoelastin.

#### The switching of fibulin-5 subtypes occurs with age, whereas elastic matrices are deteriorated

Fibulin-5-deficient mice exhibit aging-related characteristics, including loose skin, emphysema, and stiff arteries, because of disorganized elastic fiber development (Nakamura et al., 2002; Yanagisawa et al., 2002). Because tissue elastic properties are gradually reduced with aging (Pasquali-Ronchetti and Baccarani-Contri, 1997; Bailey, 2001), we examined the age-related changes of elastic matrices by observing skin tissues of young and old mice with transmission electron microscopy. As shown in Fig. 4 A, elastic fibers were disorganized and fragmented in old mice, whereas they were organized into thick fibrous structures in young mice (Fig. 4 A, middle and top). The deteriorated elastic fibers in old mice closely resemble the disorganized and fragmented elastic fibers found even in young fibulin-5-deficient mice (Fig. 4 A, middle and bottom). Next, we investigated whether the expression of fibulin-5 is altered during aging, as we inferred from the data in the previous sections that suggested fibulin-5 is not only necessary for elastogenesis but also able to promote elastic fiber organization. Using skin tissues of young and old mice, we performed Western blotting with anti-fibulin-5 antibody (BSYN2473). As shown in Fig. 4 B, we detected two specific bands in wild-type mice, while we did not detect any band in fibulin-5-deficient mice. Notably, the intensity of the upper bands was considerably decreased in the old mice compared with the young mice (Fig. 4 B, compare lanes 1–3 with lanes 4–6). On the other hand, the intensity of the bottom bands increased remarkably in the old mice (Fig. 4 B, compare lanes 1–3 with lanes 4–6). From these results, we hypothesized that the switching of fibulin-5 subtypes may affect the elastogenic activity of fibulin-5 and be correlated with the deterioration of elastic matrices during aging.

#### Fibulin-5 is partially cleaved in vitro

Because only one major transcript of fibulin-5 was detected by Northern blot analysis (Nakamura et al., 1999) and no mRNA or EST that would code for a protein  $\sim$ 10 kD smaller or larger than the major form of fibulin-5 protein was found in public databases, the two subtypes of fibulin-5 protein we observed were not thought to be splice variants, but were rather considered to be indicative of posttranslational modification. To investigate this modification, we transfected an expression vector containing fibulin-5 cDNA with a signal peptide and a FLAG tag at the N terminus into 293T cells. The culture medium of these cells was collected and subjected to Western blotting. As shown in Fig. 4 C, we detected 2 specific bands of 45 and 55 kD with an anti-fibulin-5 antibody (BSYN2473; Fig. 4 C, left) that recognizes amino