

## 論文の内容の要旨

### らせん構造を持たないIV型コラーゲン $\alpha$ 鎖の培養細胞による産生

高橋 誠一郎

コラーゲタンパク質の生合成・分泌機構についてはI型コラーゲンに関する研究の成果から、生体内で機能を果たしている三本鎖らせん構造を有しているコラーゲン分子だけが産生されるように細胞内の生合成・分泌調節機構により保証されていると一般に受け入れられている。すなわち、コラーゲン分子は三本のポリペプチド鎖(各ポリペプチドをコラーゲタンパク質では $\alpha$ 鎖と呼ぶ)が三本鎖らせんを形成され完成されたものだけが細胞外へ分泌され、らせん構造を持たないコラーゲン $\alpha$ 鎖は分泌されず、生合成過程で除去される機構(品質管理機構)が働いて、細胞内で分解を受ける。

一方、らせんを持たないIV型コラーゲンの $\alpha$ 鎖[IV型コラーゲンの $\alpha$ 鎖を $\alpha$ (IV)鎖と書く]が培養細胞によって産生されたとの先行研究がある。ところが、これらの先行研究で用いた細胞は腫瘍由来のもの、あるいは $\alpha$ (IV)鎖を強制発現させたものであることから、非生理的な条件での現象と考察している。すなわち、らせん構造を持たない $\alpha$ (IV)鎖の産生・分泌の原因は、IV型コラーゲン分子の構成成分(IV型コラーゲン分子は異なる $\alpha$ 鎖から構成されている)である、どちらかの $\alpha$ (IV)鎖が翻訳されていない、または不足しているため、余剰の $\alpha$ 鎖が分解されずに、たまたま細胞外に検出されたとの考察、あるいは、コラーゲン分子の生合成過程における品質管理機構が働いていないためであろうと考察され、生理的意義についてはふれていない。

私ははらせん構造を持たない一本のポリペプチド鎖からなるIV型コラーゲン遺伝子産物 $\alpha$ (IV)が生理的な条件下でも分泌される可能性に着目して研究を展開し、その結果、培養正常ヒト胎児肺由来線維芽細胞(TIG-1)は生理的に変動しうる範囲の細胞外の環境に依存して、らせん構造を持たないIV型コラーゲン $\alpha$ 鎖を産生するとの結論を得た。これらの研究過程から、らせん構造を持たないIV型コラーゲン $\alpha$ 鎖の産生が生理的な意義があるとの考えを持つに至った。

得られた研究の成果の概要は次の通りである。ヒト胎児肺由来線維芽細胞 TIG-1 細胞は長期培養す

ると、I型コラーゲンだけでなく、IV型コラーゲンを産生・分泌し、細胞層へ蓄積していく。IV型コラーゲンの細胞層への蓄積と細胞上清中の量との関係を培養時間経過とともに検討する過程で、培養上清中に時折IV型コラーゲン $\alpha 1$ 鎖に特異的なアミノ酸配列を認識する単クローン抗体と反応する、サイズ180Kのポリペプチドが存在することを見いだした。IV型コラーゲン分子中の $\alpha 1$ (IV)鎖は三本鎖らせん構造を形成しているだけでなく、鎖間にジスルフィド結合を有するので、非還元条件でウェスタンブロットすると $\alpha$ 鎖の3倍のサイズ、500kDa(これを $\gamma$ 鎖と呼ぶ)になるのに対し、サイズ180Kポリペプチド鎖は非還元条件で見られる(NR180K)。このポリペプチド鎖(NR180K)がどのような培養条件で産生されるのかを試行錯誤した結果、血清を添加した培養液の場合で、しかも、培養の開始後、未だ細胞外マトリックス成分等が十分蓄積されていない培養期間中で、再現性よく分泌されることを見いだした。

培養上清中のNR180の量は、らせんを喪失したIV型コラーゲン $\alpha 1$ (IV)のアミノ酸配列を認識する抗 $\alpha 1$ (IV)鎖抗体JK132を用いたELISAの値と相関する実験結果が得られた。そこで、NR180の構造を解明するために、NR180含量の高い培養上清から、JK132抗体アフィニティーカラムを用いてNR180を単離することを試みた。その結果、NR180のみが結合画分に回収された。単離したNR180をバクテリア・コラゲナーゼにより処理すると、IV型コラーゲン鎖のNC1領域(NCはnon-collagenousの略)のサイズに相当する約30kDaのポリペプチド鎖が得られた。精製したNR180のV8 proteaseの消化断片のアミノ酸配列を一部(17残基)決定した結果、ヒト $\alpha 1$ (IV)鎖だけに存在する配列を得た。また、培養上清中のNR180はIV型コラーゲン分子中で鎖間でジスルフィド結合した $\alpha 1$ (IV)鎖に比べて、トリプシンにより容易に(約1/100の濃度で)消化された。すなわち、NR180はらせんを持つIV型コラーゲン分子が示すプロテアーゼ耐性を示さなかった。以上のことから、NR180は鎖間S-S結合をしていない、らせん構造を持たないIV型コラーゲン $\alpha 1$ 鎖であると結論した。

らせん構造を持たず会合もしていない $\alpha 1$ (IV)鎖と、らせん構造を持ち鎖間にジスルフィド結合を有する $\alpha 1$ (IV)鎖との、産生・分泌における関連を明らかにすべく、IV型コラーゲン分子を構成するもう一つの $\alpha$ 鎖である $\alpha 2$ (IV)鎖についての挙動を検討した。血清添加の培養上清で、かつ、NR180が存在する培養上清中だけに非還元で約180kDaの位置に移動するペプチド鎖(NR180-II)が抗 $\alpha 2$ (IV)鎖抗体で検出された。IV型コラーゲン分子中の $\alpha 2$ (IV)鎖は還元後に180kDaに移動することから、NR180-IIは鎖間S-S結合のない $\alpha 2$ (IV)鎖であると結論した。また、抗体JK132アフィニティーカラムを利用して精製したNR180の濃縮画分にはNR180-IIは存在しなかった。これはNR180とNR180-IIとは非共有結合性の相互作用による会合もしていないことを示す。IV型コラーゲン $\alpha 1$ 鎖と $\alpha 2$ 鎖がらせん構造を持つか、持たないかということと、会合しているか、いないかが連動している可能性が示唆された。らせんを持たない $\alpha$ (IV)鎖とらせん構造を持ち、還元後に $\alpha$ (IV)鎖になるポリペプチド鎖は尿素中でのSDS電気泳動で異なる移動度を示すことから、翻訳後修飾に差があることが推論される。翻訳後修飾反

応と $\alpha$ 鎖の会合，らせん構造の形成が関係する可能性が想定されたので，らせん構造の形成の有無等に影響する細胞培養の条件が全 $\alpha$ (IV)鎖の発現量および $\alpha$ 1(IV)鎖と $\alpha$ 2(IV)鎖の量比にどのように関係するかを検討した。

長期培養により培養上清中にらせんを持たない $\alpha$ (IV)鎖が検出できなくなった細胞層をトリプシンで分散し細胞を継代培養すると，再びらせんを持たない $\alpha$ (IV)鎖を産生するようになった。らせんを持たない $\alpha$ (IV)鎖の産生は細胞外の因子による影響は可逆的であると結論づけられる。血清の添加の有無により $\alpha$ (IV)鎖間のジスルフィド結合の形成およびらせん構造の形成は影響を受けるが， $\alpha$ 1(IV)鎖に対する $\alpha$ 2(IV)鎖の量比はらせん構造形成の有無に無関係に一定であった。すなわち，IV型コラーゲン分子の構成成分である $\alpha$ 鎖の翻訳量のアンバランスが本現象を引き起こす原因とは考えられない。TGF- $\beta$ の添加により，らせんを持たない $\alpha$ (IV)鎖( $\alpha$ 1(IV)鎖と $\alpha$ 2(IV)鎖)とらせんを持つ $\alpha$ (IV)鎖を合わせたトータルの $\alpha$ (IV)鎖の産生量は増加するが，この場合も， $\alpha$ 1(IV)鎖に対する $\alpha$ 2(IV)鎖の量比は変化しない。つまり，翻訳される $\alpha$ 1(IV)鎖と $\alpha$ 2(IV)鎖の量比は全翻訳量と関係ないと想定される。これらの結果を総合的に考慮すると，らせん構造を持たないIV型コラーゲン $\alpha$ 鎖(NR180およびNR180-II)が産生・分泌されたのは翻訳された $\alpha$ (IV)鎖が三量体として会合する段階，あるいは，その後の三本鎖らせん構造の形成段階が進行しなかった結果であることを示唆する。さらに，NR180のアミノ酸配列にヒドロキシプロリンが含まれているが，NR180とNR180-IIとは会合していないことから，培養液に血清を添加した培養細胞内ではIV型コラーゲン $\alpha$ 鎖がC末端領域で三本鎖に会合することが進行しないと解釈すると本研究で得られた現象が説明できる。

本研究により，細胞外の環境を変えることにより可逆的にIV型コラーゲンのらせん構造形成の有無が左右されること(らせん構造をとるか，とらないかが細胞外の環境によって決定される)が示唆された。この現象がどのようなコラーゲタンパク質にも当てはまるのか，それともIV型コラーゲンに特有のことか，という新たな課題をもたらした。仮に，本研究で見いだされた新事実がIV型コラーゲンに特有のことであるとすると，IV型コラーゲンに特異的なこととして何が考えられるかということが問題になる。らせん構造を持たないIV型コラーゲン $\alpha$ 鎖がらせん構造を持ち，鎖間にジスルフィド結合したIV型コラーゲン $\alpha$ 鎖とは翻訳後の化学修飾が異なることはコラーゲン生合成・分泌機構において，細胞外から制御あるいは影響を受ける，新たなステップが存在することを示唆する。