

## 論文審査の結果の要旨

論文提出者氏名 高橋 誠一郎

コラーゲタンパク質はポリペプチド三本が会合し、コラーゲン三重らせんを形成してはじめて細胞外へ分泌される。三本鎖らせん構造を有しているコラーゲン分子だけが、生体内で機能を果たしているものであるとされている。細胞により合成されるコラーゲタンパク質の品質管理機構として、コラーゲンらせん構造の形成についての研究が進んでいる。このようなコラーゲタンパク質の現状の中で、論文提出者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) (コラーゲタンパク質分子を構成する一本のポリペプチド鎖を $\alpha$ 鎖と呼び、その後を示すローマン数字でコラーゲンの型を表す) 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、鎖間にジスルフィド結合のない、また、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。

得られた研究の成果の概要は次の通りである。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の時間経過と細胞上清中の量との関係を検討する過程で、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 $\alpha$ (IV)鎖は三本で、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)が染色されるのに対し、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、培養の開始後ま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では、再現性よく分泌されていることを見いだした。このポリペプチド鎖を抗体を用いたアフィニティークロマトにより、IV型コラーゲンから分離・精製し、構造を解析した結果、鎖間でジスルフィド結合を持たず、らせん構造を持たない $\alpha$ 1(IV)鎖であることを見いだした。さらに、三本鎖らせん構造を有し、鎖間にジスルフィド結合をもったIV型コラーゲンを構成するもう一つの $\alpha$ 鎖である、 $\alpha$ 2(IV)についても検討した結果、NR180K(NR $\alpha$ 1(IV))と連動して、NR180K-II(NR $\alpha$ 2(IV))鎖が出減することが判明した。

細胞を長期間培養していると、三重らせん構造を有するIV型コラーゲンだけが産生され、らせんを持たない $\alpha$ (IV)鎖は分泌されなくなる。しかし、長期培養し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、らせん構造を持たない $\alpha$  (IV)鎖を産生するようになった。ジスルフィド結合したIV型コラーゲン中の $\alpha 1$ (IV)鎖と $\alpha 2$ (IV)鎖の量比は、らせんを持たない $\alpha 1$ (IV)鎖と $\alpha 2$ (IV)鎖の量比と変わらなかった。すなわち、翻訳された $\alpha 1$ (IV)鎖と $\alpha 2$ (IV)鎖の比はらせん構造形成の有無、したがって、鎖間のジスルフィド結合の有無に無関係に一定であった。また、培養が長期にわたり、らせんを持たない $\alpha$  (IV)鎖 ( $\alpha 1$ (IV)鎖と $\alpha 2$ (IV)鎖)の産生量が落ちると、その分だけ、還元後に生じる $\alpha 1$ (IV)鎖 (R180)の量が増加していた。全 $\alpha$ 鎖の翻訳量はらせん形成する、しないを決める要因に依らず一定であった。このような事実を最も単純に説明できるモデルを提唱した。すなわち、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)の産生・分泌は、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まないことによる。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こと、また、NR180とNR180-IIとが会合していないことから、IV型コラーゲン $\alpha$ 鎖のC末端領域での三本鎖の会合が細胞外の血清中に存在する因子により抑制されるとの解釈が示された。

本研究により、IV型コラーゲンポリペプチド鎖がらせん構造をとるか、とらないかが細胞外環境によって決定され、細胞外環境を変えることにより可逆的にらせん構造形成の有無を操作できることが示唆された。これはIV型コラーゲンの生合成機構についての新知見であるが、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。また、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ような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が、コラーゲンの生合成機構にさらなる複雑なステップを考慮せざるをえないことを意味する。一方、らせん構造を持たないコラーゲンポリペプチド鎖に何らかの生理的な機能がありうるのか、これまで、誰も想像もしなかった課題が生まれた。腫瘍細胞の転移や腫瘍組織の拡張を抑えると報告されている、マトリックスメタロプロテアーゼの阻害作用物質あるいは血管新生の阻害物質の一つとして、らせん構造を持たない $\alpha$  (IV)鎖が関与することも想定される。本論文の研究成果は全く新しい観点からの発見であり、IV型コラーゲンだけでなく、コラーゲタンパク質ファミリーの構造と機能およびその制御について、新たな分野を展開するための糸口となると思われる。

以上の論文の内容の一部は共同研究として公表されているが、申請者の貢献度が最も高い。これらの内容について審査委員会で評価した結果、審査委員全員一致して、申請者論文は博士(学術)の学位にふさわしいと結論した。