

論文の内容の要旨

IV型コラーゲン生合成に対するアスコルビン酸の効果

吉川 究

コラーゲタンパク質は、一般に、3本鎖らせん構造をとったもののみが細胞外に分泌されると考えられている。しかし、IV型コラーゲタンパク質は、3本鎖らせん構造をとらないものも細胞外に分泌されることが報告されている。ただし、腫瘍細胞、およびIV型コラーゲン遺伝子を強制発現させた細胞培養系についての研究であることから、品質管理機構が適切にはたらかず、アーティファクティックに、3本鎖らせん構造をとらないIV型コラーゲン α 鎖が産生された可能性が考えられていた。コラーゲタンパク質分子を構成する各ポリペプチド鎖を「 α 鎖」と呼ぶ。IV型コラーゲンの $\alpha 1$ 鎖を「 $\alpha 1(\text{IV})$ 鎖」と表記する。 $\alpha 1(\text{IV})$ 鎖2本、 $\alpha 2(\text{IV})$ 鎖1本からなる3本鎖らせん構造をとった分子を、「 $[\alpha 1(\text{IV})]_2 \alpha 2(\text{IV})$ 分子」と表記する。

ところが、高橋らは、3本鎖らせん構造をとらないIV型コラーゲン $\alpha 1(\text{IV})$ 鎖および $\alpha 2(\text{IV})$ 鎖が、正常ヒト肺線維芽細胞 TIG-1 によって産生されることを報告した。通常、 $\alpha 1(\text{IV})$ 鎖は、 $\alpha 2(\text{IV})$ 鎖とともに、 $[\alpha 1(\text{IV})]_2 \alpha 2(\text{IV})$ 分子を構成する。3本鎖らせん構造をとらない $\alpha 1(\text{IV})$ 鎖だけでなく $\alpha 2(\text{IV})$ 鎖も産生されたことは、どちらかの $\alpha(\text{IV})$ 鎖が過剰に翻訳され、3本鎖らせん構造を形成する相手が不足したことが原因ではないと考えられた。ポリペプチド鎖に翻訳された後に、3本鎖らせん構造形成がなされなかったことが原因であると考えられた(Takahashi, Yoshikawa, et al., *Connective Tissue* 31, 161-168, 1999)。この現象の重要な点は、正常細胞で見られる現象であることだけでなく、3本鎖らせん構造をとらない $\alpha 1(\text{IV})$ 鎖および $\alpha 2(\text{IV})$ 鎖の産生が、培養条件に依

存したことである。3本鎖らせん構造をとらない $\alpha 1(\text{IV})$ 鎖および $\alpha 2(\text{IV})$ 鎖の産生は、培地中の血清の有無に相関した。無血清で培養すると、3本鎖らせん構造をとった $[\alpha 1(\text{IV})]_2\alpha 2(\text{IV})$ 分子のみが産生された。一方、血清を添加して培養すると、3本鎖らせん構造をとった $[\alpha 1(\text{IV})]_2\alpha 2(\text{IV})$ 分子と、3本鎖らせん構造をとらない $\alpha 1(\text{IV})$ 鎖および $\alpha 2(\text{IV})$ 鎖が産生された。

3本鎖らせん構造をとらない α 鎖が培養条件に依存的して産生されることは、コラーゲン生合成においてはじめて明らかにされたことである。そこで、私は、3本鎖らせん構造をとらない $\alpha 1(\text{IV})$ 鎖および $\alpha 2(\text{IV})$ 鎖の産生についての現象を詳細に検討することにした。それにより、IV型コラーゲンに特徴的な生合成・分泌機構を解明するための糸口をとらえることが可能であると考えた。血清中の生化学的な因子を同定できれば、3本鎖らせん構造をとらない $\alpha 1(\text{IV})$ 鎖および $\alpha 2(\text{IV})$ 鎖の産生という観点から、IV型コラーゲン生合成のメカニズムについて、分子レベルで検討することが可能になると考えた。

以下に、本研究で得られた主な結論と、その根拠となる結果および考察を要約するが、その前に、本研究で用いた方法論のユニークな特徴について記す。

培養上清中に分泌された、3本鎖らせん構造をとった $[\alpha 1(\text{IV})]_2\alpha 2(\text{IV})$ 分子は、3本の $\alpha(\text{IV})$ 鎖間にジスルフィド結合を有する。3本鎖らせん構造をとらずに分泌された $\alpha 1(\text{IV})$ 鎖および $\alpha 2(\text{IV})$ 鎖は、鎖間ジスルフィド結合を有していない。それ以外の状態、例えば、鎖間ジスルフィド結合を有するが3本鎖らせん構造をとらない状態の分子は検出されない。すなわち、3本鎖らせん構造の有無と鎖間ジスルフィド結合の有無が、現象論的に常に相関する。したがって、非還元条件でSDS-PAGEを行うことで、3本鎖らせん構造の有無を調べることができる。非還元のSDS-PAGEにおいて、 $[\alpha 1(\text{IV})]_2\alpha 2(\text{IV})$ 分子は $\alpha(\text{IV})$ 鎖3本分の移動度(約 500 kDa)を示す。3本鎖らせん構造をとらない $\alpha 1(\text{IV})$ および $\alpha 2(\text{IV})$ 鎖は $\alpha(\text{IV})$ 鎖1本分の移動度(約 180 kDa)を示す。本研究では、ヒトの細胞を数日間培養し、回収した細胞培養上清を非還元条件でSDS-PAGEを行い、 $\alpha(\text{IV})$ 鎖の移動度(500 kDa か 180 kDa か)を3本鎖らせん構造をとっているかどうかの指標とした。

①IV型コラーゲタンパク質の分泌フォームはアスコルビン酸により制御される。

ヒト腎臓メサングウム細胞を asc 2-p を添加して培養すると、3本鎖らせん構造をとった $[\alpha 1(\text{IV})]_2\alpha 2(\text{IV})$ 分子が産生された。一方、asc 2-p 無添加で培養すると、3本鎖らせん構造をとらない $\alpha 1(\text{IV})$ 鎖および $\alpha 2(\text{IV})$ 鎖が産生された。

asc 2-p は、生理的には生体内には存在しないが、細胞膜上でリン酸基が除かれアスコルビン酸となってから細胞に取り込まれるか、あるいは asc 2-p のまま細胞内に取り込まれた後、細胞内フォスファターゼによりリン酸基が除かれアスコルビン酸に転換されていると推定されている。アスコルビン酸は非常に酸化されやすく、37°Cの培地中では1日程度しか活性を持続しないが、asc 2-p は酸化されにくく、長期間にわたり活性を持続すると考えられている。このため、コラーゲン生合成の研究にたびたび用いられる。

3本鎖らせん構造をとらない $\alpha 1(\text{IV})$ 鎖および $\alpha 2(\text{IV})$ 鎖の産生を抑え、3本鎖らせん構造をとった $[\alpha 1(\text{IV})]_2\alpha 2(\text{IV})$ 分子のみを産生するには、培地に添加する血清濃度が高いほど、より高濃

度のasc 2-pを添加する必要があった。先に示した高橋らの研究では、培地交換のときのみならず、常にasc 2-pを比較的低濃度培地に添加して培養していた。このasc 2-p濃度では、無血清培地中においてはasc 2-pが十分働き、10%血清添加培地中においてはasc 2-pの効果が低下しているものと考えられた。すなわち、血清成分ではなく、asc 2-pがIV型コラーゲンタンパク質の産生フォームと直接関連すると考えられた。

以上は、asc 2-p の効果についての観察である。しかし、実際に生体内および細胞内ではたらくのはアスコルビン酸であるので、次に、アスコルビン酸がIV型コラーゲンの分泌フォームにおよぼす効果について検討した。アスコルビン酸を、培養開始時に培地に添加しただけでは、7日間培養した後の培養上清中には、 $[\alpha 1(IV)]_2\alpha 2(IV)$ 分子よりも、3本鎖らせん構造をとらない $\alpha 1(IV)$ 鎖および $\alpha 2(IV)$ 鎖の方が多く産生された。しかし、毎日、培地にアスコルビン酸を添加し続けると、3本鎖らせん構造をとらない $\alpha 1(IV)$ 鎖および $\alpha 2(IV)$ 鎖は産生されず、3本鎖らせん構造をとった $[\alpha 1(IV)]_2\alpha 2(IV)$ 分子のみが産生された。IV型コラーゲンの産生フォームにおよぼす効果については、アスコルビン酸と asc 2-p の間で本質的な差異は無いと考えられた。

②アスコルビン酸はIV型コラーゲンタンパク質の3本鎖らせん構造形成に関与する。

3本鎖らせん構造をとらない $\alpha 1(IV)$ 鎖と $\alpha 2(IV)$ 鎖の産生は常に相関していた。また、培養上清中に分泌された $\alpha 1(IV)$ 鎖の総量を、3本鎖らせん構造をとらない $\alpha 1(IV)$ 鎖の量、および3本鎖らせん構造をとった $[\alpha 1(IV)]_2\alpha 2(IV)$ 分子中の $\alpha 1(IV)$ 鎖の量を合計したものとみなすと、これは、3本鎖らせん構造をとらない $\alpha 1(IV)$ 鎖の分泌量に関わらずほぼ一定であった。 $\alpha 2(IV)$ 鎖についても同様であった。すなわち、3本鎖らせん構造をとった $[\alpha 1(IV)]_2\alpha 2(IV)$ 分子の産生が少ないときは、そのぶん、3本鎖らせん構造をとらない $\alpha 1(IV)$ 鎖および $\alpha 2(IV)$ 鎖の産生が多かった。

3本鎖らせん構造をとらない $\alpha 1(IV)$ 鎖および $\alpha 2(IV)$ 鎖の産生の原因は、IV型コラーゲン遺伝子の転写、ポリペプチド鎖への翻訳、あるいは分泌制御に対するものではないと考えられる。アスコルビン酸は、これらのステップには関与せず、3本鎖らせん構造の形成に関与するものと考えられる。その結果、分泌されるときに3本鎖らせん構造の有無を決定することになる。

③以上の現象・メカニズムはIV型コラーゲンタンパク質を産生している種々のヒト細胞に普遍的である。

胎児肺線維芽細胞、大動脈平滑筋細胞、臍帯血管内皮細胞、線維肉腫細胞 HT-1080、胎児骨格筋肉腫細胞 RD についても、①と同様の現象が観察された。

コラーゲンタンパク質分子の3本鎖らせん構造形成は、3本の α 鎖の会合と、会合後のらせん形成の、2つのステップに大きく分けて考えられる。この2つのステップに分けて、IV型コラーゲンタンパク質の3本鎖らせん構造形成に対するアスコルビン酸の効果を検討した。

④アスコルビン酸はIV型コラーゲンポリペプチド鎖のプロリン残基の水酸化を促進する。

小胞体内において、翻訳されたI型プロコラーゲンポリペプチド鎖中のプロリン残基が水酸化されると、らせん形成が促進されることが知られている。これに対するアスコルビン酸の作用として、プロリン水酸化酵素(コラーゲンポリペプチド鎖中のプロリン残基を水酸化する酵素)の活性中心に存在する Fe^{2+} が Fe^{3+} に酸化されないように作用し、酵素活性の安定化に寄与することが知

られている。アスコルビン酸は、プロリン残基の水酸化を促進し、会合後のらせん形成を促進すると考えられている。ヒドロキシプロリン含量を調べたところ、asc 2-p 無添加で培養した時に産生された3本鎖らせん構造をとらない $\alpha 1(\text{IV})$ 鎖の方が、asc 2-p を添加して培養した時に産生された3本鎖らせん構造をとった $[\alpha 1(\text{IV})]_2\alpha 2(\text{IV})$ 分子中の $\alpha 1(\text{IV})$ 鎖よりも少なかった。

⑤アスコルビン酸は3本の $\alpha(\text{IV})$ 鎖の会合に関与する。

$\alpha 1(\text{IV})$ 鎖に対するモノクローナル抗体を用いたアフィニティーカラムにおいて、asc 2-p 無添加で培養した時に産生された3本鎖らせん構造をとらない $\alpha 2(\text{IV})$ 鎖は、素通り画分に回収された(3本鎖らせん構造をとらない $\alpha 1(\text{IV})$ 鎖は結合画分に回収された)。asc 2-p 無添加で産生された、3本鎖らせん構造をとらない $\alpha 1(\text{IV})$ 鎖と $\alpha 2(\text{IV})$ 鎖は、互いに結合した状態ではないことが判明した。この結果は、アスコルビン酸が無いと、3本鎖らせん構造形成の過程で $\alpha 1(\text{IV})$ 鎖と $\alpha 2(\text{IV})$ 鎖が会合できない可能性を示唆している。つまり、アスコルビン酸は3本の $\alpha(\text{IV})$ 鎖(2本の $\alpha 1(\text{IV})$ 鎖と1本の $\alpha 2(\text{IV})$ 鎖)の会合に必要であることを示唆している。

上記2点以外に、3本鎖らせん構造の形成に関して興味深いことが見いだされた。

⑥ムチン型糖鎖の付加

asc 2-p 無添加で培養した時に産生された3本鎖らせん構造をとらない $\alpha 1(\text{IV})$ 鎖には、O-結合型糖鎖付加の一種であるムチン型糖鎖が付加していることが明らかとなった。asc 2-p を添加して培養した時に産生された3本鎖らせん構造をとった $[\alpha 1(\text{IV})]_2\alpha 2(\text{IV})$ 分子中の $\alpha 1(\text{IV})$ 鎖には、付加していなかった。3本鎖らせん構造形成とムチン型糖鎖の付加の間に何らかの相関がある可能性が示唆された。

以上で示したように、IV型コラーゲン生合成には、ポリペプチド鎖に翻訳された後、3本鎖らせん構造を形成する経路と、3本鎖らせん構造を形成しない経路の2種類存在する。そして、そのどちらの経路をとるかをアスコルビン酸が制御する。これは、従来考えられていたコラーゲン生合成のモデルでは全く考えられておらず、本研究において、IV型コラーゲンを研究することによりはじめて明らかにされたことである。IV型コラーゲタンパク質は、3本鎖らせん構造をとった分子として、あるいは、3本鎖らせん構造をとらない $\alpha(\text{IV})$ 鎖として、それぞれ別の生理活性を有することになるものと考えられる。