

審査の結果の要旨

論文提出者氏名 吉川 究

I型プロコラーゲン分子は細胞内で遺伝子情報から翻訳されたポリペプチド鎖三本が会合し、コラーゲンらせん構造を形成した後、細胞外へ分泌される。しかし、何らかの原因で安定な三本鎖らせん構造が形成されないプロコラーゲンは細胞から分泌されないような品質管理機構が行われているとされている。これに対し、高橋誠一郎ら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 $\alpha 1$ (IV)鎖および $\alpha 2$ (IV)鎖(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 α 鎖と呼び、その後に示すローマン数字でコラーゲンの型を表す)が分泌過程が抑制されるわけでもなく、また、分解されることなく、分泌されることを示した。正常ヒト胎児肺由来線維芽細胞(TIG-1)の培養において、血清が存在することにより、らせん構造を持たないIV型コラーゲンポリペプチド鎖の産生・分泌が顕著となり、血清の非存在下では殆ど検出されない。これらの結果に関して、論文提出者は特に次の2点に注目した。1) 3本鎖らせん構造をとらないIV型コラーゲン α 鎖の分泌は正常細胞で見られ、細胞外の環境にのみ依存し、可逆的に観察される現象である。すなわち、生理的にもありうる現象である。2) $\alpha 1$ (IV)鎖および $\alpha 2$ (IV)鎖の産生量は培養液中の血清の有無に関係なく一定であり、立体構造の違いのみが血清の有無に依存する。すなわち、IV型コラーゲンポリペプチド鎖が翻訳されてから分泌へ至るまでの過程が細胞外因子によって制御されている。これらはコラーゲン生合成についての従来からの研究では全く想定されなかった現象である。さらなる解析のために、血清中のどのような因子によってIV型コラーゲンポリペプチド鎖の立体構造が影響を受けるのかに焦点をあてて検討した。その結果、細胞外に存在するアスコルビン酸濃度がその因子であることを見出した。以下に論文の内容の概要を記す。

第一に、ヒトメサンジウム細胞から分泌されるIV型コラーゲンポリペプチド鎖の量は血清の添加、アスコルビン酸の濃度によって殆ど変化しないが、らせん構造を有するIV型コラーゲン分子の産生量を減少は血清濃度が高いほど大であり、アスコルビン酸の有効濃度が減少していることに対応していることが分かった。ヒト腎臓メサンジウム細胞を無血清中、アスコルビン酸2リン酸(以下 asc2-p と略記する)を添加して培養すると、500 k サイズのIV型コラーゲンポリペプチド鎖のみが産生された。500 k は還元後 α 鎖サイズ(180k)になることから、3本鎖らせん構造をとっている $[\alpha 1(IV)]_2\alpha 2(IV)$ 分子由来である。一方、無血清で、asc2-p 無添加で培養した培養上清には、還元前から180 k サイズの $\alpha 1(IV)$ 鎖および $\alpha 2(IV)$ 鎖がウェスタンブロッティングにより同程度の濃さで検出

された。これは高橋らがヒト胎児肺線維芽細胞の血清存在下の培養で見出した、らせん構造を持たない $\alpha 1(\text{IV})$ 鎖および $\alpha 2(\text{IV})$ 鎖と同一のものである。血清が存在することにより、asc2-p 濃度が下がったために、らせん構造を持たない IV 型コラーゲン α 鎖が分泌されたと推察し検討した。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、培地の血清濃度が高いほど、より高濃度の asc2-p を添加する必要があった。さらに細かく asc2-p の濃度を変えて検討し、asc2-p の濃度がらせん構造を持ったIV型分子の産生量と直接相関することを見いだした。リン酸エステルでない、アスコルビン酸ナトリウムを毎日1回、培地に添加すると、長期培養においても、3本鎖らせん構造を持たない $\alpha 1(\text{IV})$ 鎖および $\alpha 2(\text{IV})$ 鎖は産生されず、3本鎖らせん構造を持つ $[\alpha 1(\text{IV})]_2\alpha 2(\text{IV})$ 分子のみが産生された。

第二に、3本鎖らせん構造をしたIV型コラーゲタンパク質分子の分泌過程のどの段階にアスコルビン酸が関わっているかを検討した。3本鎖らせん構造を持たない $\alpha 1(\text{IV})$ 鎖の産生量はらせん構造を持たない $\alpha 2(\text{IV})$ 鎖の産生量と常に互いに連動しており、らせん構造をとっているときのポリペプチド鎖の割合である2対1を保っていた。培養上清中に分泌された $\alpha 1(\text{IV})$ 鎖の総量を、3本鎖らせん構造を持たない $\alpha 1(\text{IV})$ 鎖の量、および3本鎖らせん構造を持つ $[\alpha 1(\text{IV})]_2\alpha 2(\text{IV})$ 分子中の $\alpha 1(\text{IV})$ 鎖の量を合計は、3本鎖らせん構造を持たない $\alpha 1(\text{IV})$ 鎖の分泌量に関わらずほぼ一定であった。 $\alpha 2(\text{IV})$ 鎖についても同様であった。すなわち、アスコルビン酸はポリペプチド鎖の翻訳量に影響しなかった。すなわち、アスコルビン酸は IV 型コラーゲンポリペプチド鎖が翻訳された後、3本鎖らせん構造の形成するまでの過程に関与するものと考えられる。これらの現象はヒト胎児肺線維芽細胞、ヒト大動脈平滑筋細胞、ヒト臍帯血管内皮細胞、ヒト線維肉腫細胞 HT-1080、ヒト胎児骨格筋肉腫細胞 RD など、IV型コラーゲン遺伝子を発現している種々のヒト細胞の培養において、普遍的に見られた。

血清存在下、0.2 mM の asc2-p の添加により、I型プロコラーゲン生合成・分泌され、線維への形成が促進される。コラーゲタンパク質生合成過程に重大な役割を果たしているプロリルヒドロキシラーゼ（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 asc2-p が作用すること、すなわち、プロリルヒドロキシラーゼ活性の安定化にアスコルビン酸は寄与する。asc2-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 $\alpha 1(\text{IV})$ 鎖の方のヒドロキシプロリン含量は asc2-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(約 60%)よりも少なかった(14%)。ヒドロキシプロリン含量が少ないために3本らせん構造が不安定であることが、らせん構造をとっていないIV型コラーゲンポリペプチド鎖の分泌をもたらしたと考えられる。一方、IV型コラーゲン分子が3本鎖らせん構造を形成する前提条件として三本のポリペプチド鎖がカルボキシ末端のNC1ドメインで三量体を形成する必要がある。そこで、培養上清中の非らせん構造のIV型コラーゲン α 鎖同士がNC1ドメインで非共有結合性の相互作用により会合しているかどうか検討し

た。asc2-p 無添加で培養した上清を $\alpha 1(IV)$ 鎖に対するモノクローナル抗体を結合したアフィニティーカラムに展開した。らせん構造を持たない $\alpha 2(IV)$ 鎖は、素通り画分に回収され、らせん構造をとらない $\alpha 1(IV)$ 鎖は結合画分に回収された。asc2-p 無添加で産生された、非らせん構造の $\alpha 1(IV)$ 鎖と $\alpha 2(IV)$ 鎖は非共有結合性の相互作用によっても互いに結合していないことが判明した。これはアスコルビン酸が欠けていると、3本の $\alpha 1(IV)$ 鎖と $\alpha 2(IV)$ 鎖が会合できないこと、すなわち、アスコルビン酸は3本の $\alpha(IV)$ 鎖の会合に必要な因子であることを示唆している。

本論文により、IV型コラーゲンポリペプチド鎖が生合成され、分泌に至るまでには2つの経路があることがはじめて示唆された。3本の α 鎖が会合し、らせん構造を形成する経路、コラーゲントタンパク質に共通する経路の他に、ポリペプチド鎖が会合せず、らせん構造も形成しないで細胞外へ分泌される経路である。3本鎖の会合の形成および安定化にアスコルビン酸が関与していることが示唆された。ポリペプチド鎖が会合せず、らせん構造を形成しないまま分泌される経路は従来は全く考えられておらず、本論文ではじめて明らかにされた。この機構が他のコラーゲントタンパク質にも当てはまるのか、という、新たな課題をもたらしたことも重要な成果である。さらに、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としてIV型コラーゲンNC1ドメインが提唱されている。実際に組織の中でNC1ドメインがこのような機能を発揮する機構として、らせん構造を持たない $\alpha(IV)$ 鎖の産生・分泌があげられる。本論文で得られた研究成果はIV型コラーゲン生合成機構に新しい観点を提供する画期的な発見である。異なるポリペプチド鎖が複数以上集まって機能しているコラーゲントタンパク質ファミリーをはじめ種々の高分子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糸口としてとらえるならば、ポストゲノムの中の一つの柱にもなりうると思われる。

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、論文提出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、投票した結果、審査委員全員一致して、本論文は博士(学術)の学位にふさわしい内容を有すると結論した。