

論文の内容の要旨

論文題目 **Interactions of Fibrillar Collagen Molecules**
(線維性コラーゲンの分子間相互作用)

氏名 水野 一 乗

コラーゲン3本鎖らせん構造は、配向したコラーゲン線維のX線回折パターンで見られる0.29 nmのピッチを説明し、らせん軸にほぼ直交する水素結合を説明できるような分子模型の作成、および(Pro-Hyp-Gly)₁₀などのペプチドの結晶のX線解析から、その基本構造は、ポリプロリンII型様の二次構造をとったポリペプチド鎖(α鎖)が3本会合した構造であると推測されている(Hypは4-ヒドロキシプロリン)。アミノ酸一次構造に3残基ごとにグリシン残基が存在するが、それ以外はコラーゲンらせん構造の熱安定性にプロリン、ヒドロキシプロリンは重要であるが、半数以上は(ヒドロキシ)プロリン以外の側鎖が占めている。コラーゲン3本鎖らせん構造を形成することにより、グリシン以外のすべての残基は分子の表面に露出する。分子のコラーゲンらせん領域では、正の荷電をしたアミノ酸残基が負に荷電したアミノ酸残基より多い。また、疎水性のアミノ酸の全アミノ酸に対する割合は低いものの、すべての疎水性の側鎖が分子の表面に露出して存在する。このようなコラーゲタンパク質としての特徴の研究対象になったものは、脊椎動物のI型コラーゲンと呼ばれるタンパク質である。I型コラーゲン分子はグリシンが3残基ごとにあらわれる一次配列が約1000残基以上途切れなく続く。このようなコラーゲン分子には、II型、III型、V型、

XI型があり、線維性コラーゲンファミリーを構成している。線維性コラーゲンは、組織における局在や存在量が、型によって異なる。分子を構成する α 鎖のアミノ酸配列の違いが、どのようなコラーゲタンパク質としての性状に違いを生じるのか、また多様な線維性コラーゲンの存在する生物学的意味は何かについて、コラーゲンらせん部位に着目して比較した研究は少ない。本研究では、線維性コラーゲンに関して、そのコラーゲンらせん領域が有する性状を硫酸化グリコサミノグリカンであるヘパリンとの相互作用、および自己会合能に着目して解析した。以下に、概要を示す。

ヘパリンとコラーゲンの相互作用をヘパリンカラムクロマトグラフィーにて解析した。I型とヘパリンとの相互作用は、コラーゲン3本鎖らせん構造が保たれているにもかかわらず、溶媒に含まれる尿素濃度に依存して低下した。尿素を含まない溶媒ではほとんどが結合するのに対し、4M尿素を含む溶媒で20℃においては、3本鎖らせん構造を保っているにもかかわらず、ほとんど結合しなかった。I型とヘパリンとの親和性に関しての先行研究では、結合するとする報告と結合しないという報告があったが、これらの報告で用いた条件を比較したところ、結合するとした報告では尿素を添加せず、一方、結合しないと結論した報告では尿素を添加していた。本研究から明らかになったように、尿素濃度に依存してI型コラーゲンとヘパリンとの相互作用が低下することから、先行研究における矛盾が説明できるようになった。熱変性により、3本鎖をばらばらにしたI型コラーゲン由来の α 鎖のヘパリン親和性は著しく低い。3本鎖らせん構造をとっているI型コラーゲン分子がヘパリン結合と結合する際には、複数の α 鎖由来の正電荷を有する残基がヘパリン中の硫酸基と結合できるようになると考えられる。一方、尿素は非イオン性物質であり、直接正の荷電とヘパリンの硫酸とのイオニックな相互作用を弱めることは考えにくい。それではどのように説明できるであろうか。通常、尿素はある濃度以上で急激にタンパク質のコンフォメーションに影響を与えるが、2M程度の低濃度では3本鎖らせん構造中のペプチド結合全体のコンフォメーションに、ほとんど影響を与えないと考えられている。実際に、4Mまでの濃度ではI型の円偏光二色性スペクトルに変化はなかった。そのようなことから、各鎖は全体としてポリプロリンII型様のらせん構造をとっているものの、3本鎖らせん構造表面上の2カ所以上の正電荷の相対的關係が変化し、ヘパリンの硫酸に適合できない立体構造をとってしまうからであると想定される。尿素分子が、ポリペプチド鎖に直接、あるいはコラーゲンらせん近傍に存在する水分子を介して、分子内 α 鎖間の水素結合、ペプチド結合の平面性、プロリンのピロリジン環の立体配座に直接および間接的に作用し、3本鎖らせん構造表面にあらわれる複数の正電荷の立体化学的な相対的な位置關係が変化していると推測された。

V型コラーゲンには鎖組成の異なる分子種、 $[\alpha 1(V)]_2\alpha 2(V)$ および $\alpha 1(V)\alpha 2(V)\alpha 3(V)$ 、が存在する。これらの分子種にヘパリン結合能の差があることを見出し、ヘパリンカラムクロマトグラフィーによって再現性よく分離できることを明らかにした。単独の α 鎖の中では最もヘパリン親和性の高い $\alpha 1(V)$ 鎖を2本持つ分子の結合能が高かった

のは、単に $\alpha 1(V)$ 鎖が2本あるためにヘパリンとの結合する機会が2倍多いということでは説明できない。 $\alpha 1(V)\alpha 2(V)\alpha 3(V)$ は、 $\alpha 1(V)$ 鎖単独よりもヘパリン結合能が低い。これはコラーゲンらせん構造をとることにより、コンフォメーションが制限されていることを示唆する。一方、 $[\alpha 1(V)]_2\alpha 2(V)$ 分子は $\alpha 1(V)$ 鎖単独より結合能が大である。コラーゲンポリペプチド鎖が3本鎖らせん構造をとったとき、異なるポリペプチド鎖に由来する正電荷がらせん表面に一定の間隔で方位角の狭い範囲に存在することにより、ヘパリン中の離れた硫酸基と2カ所以上で結合することが可能になるためと解釈できる。

これまで、ヘパリンとタンパク質との相互作用は、他の球状タンパク質と同様に一本のポリペプチド鎖に由来する塩基性側鎖によって説明されてきた。しかし、コラーゲンらせん構造は、異なる3本の鎖によって形成されている。そして、一次構造上の位置が同じ残基は、方位角が大きく異なっている。3本鎖構造形成によりコラーゲンとヘパリンとの相互作用が増すことは、異なる α 鎖に存在する塩基性アミノ酸側鎖が、3本鎖に会合することによって、ヘパリンとの結合部位を形成することを考えざるをえない。結合部位は両分子の長軸方向に沿ったものであると考えられた。コラーゲンおよびヘパリン(pdb:1HPN model 1等)の分子モデルを検討したところ、結合部位は両分子の長軸方向に沿ったものであると考えられた。複数の α 鎖に由来するアルギニンのグアニジノ基あるいはリジンのアミノ基が、狭い方位角方向に集中して露出する部位が形成される。これらの正電荷からなる部位が3本鎖らせんの表面に適切な間隔で分布していることが、ヘパリンに存在する複数の硫酸基との相互作用を可能にし、ヘパリン結合能が増す原因であると推測された。

コラーゲンらせん領域がラテラルな相互作用をすること、さらに紐状のらせんが一定の間隔でずれて会合するために、線維状の会合体を形成する。コラーゲン分子間のラテラルな相互作用はコラーゲン3本鎖らせん表面上に側鎖がどのように配置しているかに依存すると想定される。生理的条件下で、I型コラーゲンは線維を再構成し、約65nm周期(D周期)の縞模様が電子顕微鏡で観察される。これは、多数の分子が規則的な分子間相互作用によって会合した結果であると考えられる。一方、V型については、コラーゲンらせん領域を生理的条件下で再会合させると、縞模様を有する線維が観察される報告(Adachi and Hayashi, *Coll. Rel. Res.*, 5, 225-232, 1985)があるが、その詳細は明らかになっていない。分子種によるらせん領域のアミノ酸配列や翻訳後修飾の違いは、分子間相互作用の違いを生じうる。それによって、再構成される会合体の形状にも何らかの違いをもたらすことが期待された。そこで、V型分子種、 $[\alpha 1(V)]_2\alpha 2(V)$ の3本鎖らせん領域から、条件をふって再会合体を形成させて、電顕観察した。その結果、D周期の縞模様をもつ線維を再構成しうる条件(塩濃度、時間、タンパク質濃度)では、再構成された線維は枝分かれが少なく、太さが40nm程度となった。一方、I型では、平均の径も大きく、枝分かれや融合の多い、太さのバラツキの多い線維が再構成された。この結果は、V型の3本鎖らせん領域に存在する側鎖

の立体的配置に、再構成線維が一定の太さ以上にならないように制限される情報が含まれていることを示している。I型分子とV型分子は、どちらも主3本鎖らせん領域に規則的なアミノ酸配列の繰り返しに乱れはない。I型と比較して、V型のアミノ酸組成の主な特徴は、比較的大きい疎水性の側鎖が多いこと、および、リジン残基に糖が付加した α -D-グルコシル-(1 \rightarrow 2)- β -D-ガラクトシルヒドロキシリジン残基が多く存在することの2点である。同じく線維性コラーゲンであるII型の糖付加ヒドロキシリジン含量は、I型とV型の中間の値であるが、II型の再構成線維の平均径は、I型とV型の間となった。糖付加ヒドロキシリジンのサイズは、他の側鎖と比して著しく大きい。このことから、らせん領域が会合体をつくる際に、分子のパッキングに伴い、徐々に歪みを生じ、ラテラルに会合した分子数が一定の閾値を超えると分子が会合体上に安定に結合できなくなるために、線維径が一定以上にならないと解釈した。コラーゲンらせん領域に存在する翻訳後修飾である糖付加ヒドロキシリジンに関しては、生理的機能が明らかになっていない。らせん領域間の相互作用の制御をその一つとすることを提案したい。

コラーゲン3本鎖らせん構造と他分子(別のコラーゲン分子も含む)との分子間相互作用は、コラーゲンらせん構造、さらにその揺らぎにより、異なるポリペプチド鎖由来の側鎖が特徴的な立体配置をするという考えによって解釈できる。コラーゲンの他分子との結合部位は、複数の残基に由来するならば、コラーゲンらせんの分子構造から、必然的にらせん軸方向に分布していると考えられる。コラーゲンもヘパリンも紐状の形状をした分子である。したがってコラーゲンの結合部位は、ある方位角の範囲でらせん軸方向に沿って形成されると考えるのが妥当であろう。コラーゲンらせん軸においては、3本の異なる α 鎖に由来する一次配列上の異なる位置の側鎖が順番に方位角が揃う。尿素は、変性剤として作用する濃度より低濃度で、線維性コラーゲンのヘパリンとの相互作用だけでなく、コラーゲン分子間のラテラルな相互作用をも抑制する。この作用についての解釈の一つは、比較的離れた荷電側鎖の相対的な位置が紐状分子の相互作用に効いているという考えである。温度や尿素によって3本鎖らせんの角度、ピッチが変化し、荷電基の相対的關係(特に方位角)がずれる。これにより、ラテラルな相互作用が影響をうけると想定される。

本研究の結果は、3本鎖らせん構造を有するコラーゲタンパク質の性質(分子間相互作用)においては、プロリンの4位水酸化などによるコンフォメーションの安定性、リジンの水酸化や糖の付加など翻訳後修飾反応による分子表面の凹凸を含めた化学構造、ポリペプチド鎖の組み合わせ(鎖組成)、比較的離れた側鎖の相対的關係に影響する因子(尿素など)の存在など、タンパク質の一次構造の情報(ゲノム)だけでは制御され得ない高次の生物学的機能が付与されていることを示唆している。このことは、コラーゲタンパク質の生物学的機能を考える上で、新しい観点である。