

審査の結果の要旨

論文提出者氏名：水野 一乗

コラーゲタンパク質は3本のポリペプチド鎖からなる3本鎖らせん構造を分子内に持つ。コラーゲン3本鎖らせん構造をとるためにはアミノ酸一次構造上、3残基ごとにグリシン残基の存在が必須である。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している。このため、球状タンパク質とは大きく異なるユニークな性状を有する。コラーゲタンパク質中、疎水性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ので、分子状のコラーゲタンパク質は疎水性の表面を有する。低温ではコラーゲタンパク質は比較的溶解度が高く、中性溶液中で、20℃以上など比較的高い温度においては溶解度が低く会合しやすい。3本鎖らせん構造を失ったコラーゲンポリペプチド鎖は水に対する溶解度は高く、低温ではゲル状になる。本論文は単離したコラーゲタンパク質を用いて分子間の相互作用を検討することにより、コラーゲン3本鎖らせん構造の有する特徴的な性状をその化学構造から理解することを追求した成果をまとめたものである。

I型コラーゲンコラーゲンではグリシンが3残基毎に存在する一次配列が約1000残基以上途切れなく続いている。これはII型、III型、V型、XI型コラーゲンにも当てはまる。これらのタンパク質を線維性コラーゲンファミリーと呼ぶ。これらの線維性コラーゲンは、型によって、組織における局在や存在量が異なる。コラーゲン分子を構成するポリペプチド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差別化を生じるのであろうかという問題提起を基に本学位論文の研究は展開された。以下に本論文で得られた成果を要約する。

一般的にタンパク質のヘパリンとの結合は、溶媒のNaCl濃度によって低下することから、イオンの相互作用によると考えられる。この意味ではコラーゲタンパク質も例外ではない。しかし、I型コラーゲンのヘパリンへの結合をヘパリンセファロスクロマトグラフィーにより検討したところ、生理的イオン強度のリン酸緩衝液中では、すべてのタンパク質が吸着するのに対し、溶媒に4M尿素を添加すると、コラーゲン3本鎖らせん構造を保っているにもかかわらず、ほとんど結合しなくなった。4M以下の濃度では、コラーゲンの結合量は尿素濃度に依存して低下した。尿素の存在により、3本鎖らせん構造を保っているにもかかわらず、ヘパリンとの結合に関与する複数のポリペプチド鎖に由来する側鎖の立体配座が変化した分子が存在することが示唆された。クロマトグラフィーを行う時間程度では構造変化が行き来しないということから、異なる立体配座の行き来に長い時間を要する(ヒドロキシ)プロリンのコンホメーション(シストランス)が一つの候補と思われる。

線維性コラーゲンのヘパリンとの相互作用は、単独の α 鎖と3本鎖らせん構造をとったものとは異なる。V型コラーゲンの分子亜種 $\alpha 1(V)$ $\alpha 2(V)$ $\alpha 3(V)$ は $\alpha 1(V)$ 鎖単独よりヘパリン結合能が低い。これは単独の変性ポリペプチド鎖では種々のコンホメーションが取れるのに対し、コラーゲンらせん構

造中ではコンホメーションが制限され、硫酸基と結合するような立体構造がとりにくくなったためと考えられる。一方、 $[\alpha 1(V)]_2\alpha 2(V)$ 分子あるいは $[\alpha 1(I)]_2\alpha 2(I)$ 分子は $\alpha 1(V)$ 鎖単独あるいは $\alpha 1(I)$ 鎖単独より結合能が大である。すなわち、同一のポリペプチド鎖 2 本からなるコラーゲン 3 本鎖らせんでは、変性した単鎖のコラーゲンポリペプチド鎖に比べ、ヘパリン親和性が大となる。3 本鎖に会合することによって、新たなヘパリン結合能が生まれることを分子モデルを用いて検討した。その結果、異なる α 鎖に存在する塩基性アミノ酸側鎖がヘパリン中の硫酸と相互作用する部位が両分子の長軸方向に沿って複数以上分布しているという全く新たな観点を導入することでデータの解釈が可能となった。このように 3 本鎖らせん構造をもつことにより、ヘパリン結合能が増す機構についての仮説が得られた。

I 型コラーゲンは、生理的条件下で線維を再構成し、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 I 型コラーゲンらせん領域が縦軸方向に一定の間隔でずれて、ラテラルに相互作用する結果であるという機構が提唱されている。このような規則的な、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強く依存すると想定される。V 型コラーゲン分子種 $[\alpha 1(V)]_2\alpha 2(V)$ の 3 本鎖らせん領域を用い、塩濃度、インキュベーション時間、タンパク質濃度の変化などの異なる条件下で D 周期を有する線維が観察された。これらの V 型コラーゲン再構成線維は異なる条件下でも電顕的には殆ど区別がつかないが、I 型コラーゲン再構成線維とは異なる特徴を示した。すなわち、線維の枝分かれが殆どない、線維の太さが 40nm 程度の会合体が得られた。I 型コラーゲンから再構成した線維では、枝分かれや融合の多く、太さが平均で 80nm と大きいだけでなく、バラツキが大きかった。3 本鎖らせん領域に存在する側鎖の化学構造が異なることが会合体線維構造の違いと関係している可能性を考察した。V 型コラーゲンのアミノ酸側鎖には比較的の髙の大きい疎水性側鎖が多いこと、および、I 型コラーゲンには殆どない、リジン残基に糖が付加したヒドロキシリジン残基が数十個存在する。糖付加ヒドロキシリジンのサイズは他のアミノ酸側鎖と比して著しく大きく、その存在は棒状のコラーゲンらせん表面に凹凸をつくる。V 型コラーゲンからの再構成線維の径が小さいことが棒状の表面に凹凸のあるため、ラテラルなパッキングに制限が生じるためと考察した。コラーゲン分子の化学構造と線維会合体の関係、さらには、コラーゲン分子の他の成分との相互作用を考える上で、表面の形状を考慮するという新しい視点を導入した。V 型コラーゲン分子種 $\alpha 1(V)\alpha 2(V)\alpha 3(V)$ も D 周期を持つ縞模様を再構成する能力があるが、温度が高い条件で周期性を持たない線維に変換されることが分かった。D 周期線維構造を安定にする力がヘパリンへ結合能と関係あると考えることもできる。

本研究の結果は、3 本鎖らせん構造を有するコラーゲントタンパク質の性質(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ホ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化学構造がコラーゲントタンパク質分子の特徴あるいは新たな機能を付与することを示している。本論文はコラーゲン 3 本鎖らせん構造と機能について、新規の観点からの独創的な研究成果である。以上の論文の内容の一部は申請者がファーストオーサーの論文として公表されているが、いずれも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。