

1. 課程博士
2. 若林朋子（わかばやし ともこ）
3. 博士（薬学）
4. 博薬 第 1097 号
5. 平成 16 年 3 月 25 日
6. 新規膜貫通型コラーゲン CLAC-P/type XXV collagen の発現、代謝ならびに相互作用分子に関する研究
8. 若林朋子論文要旨.pdf Adobe Acrobat

論文の内容の要旨

論文題目 新規膜貫通型コラーゲン CLAC-P/type XXV collagen の発現、代謝ならびに相互作用分子に関する研究

氏名 若林 朋子

アルツハイマー病 (AD) 脳に特徴的な老人斑アミロイドには、主要構成成分であるアミロイドβペプチド (Aβ) 以外にもいくつかの蛋白質性成分の存在が知られており、Aβの線維化や細胞毒性への関与が想定されている。我々は AD 老人斑アミロイドを精製、生化学的に解析し、新規構成成分 CLAC (collagen-like Alzheimer amyloid plaque component) ならびにその前駆体である CLAC-P (CLAC precursor) を同定した。CLAC-P は II 型膜貫通蛋白質であり、細胞外領域に 3 ヶ所のコラーゲン様 Gly-X-Y 繰り返し配列領域 (COL1~3) を持つことから、type XXV collagen (Col XXV) の名称も与えられた。CLAC-P の一部は furin convertase による切断を受けてその細胞外領域 (sCLAC) が分泌されること、AD 脳では Aβの凝集・線維化に伴って CLAC の蓄積が増加することが示されている。

コラーゲンファミリーに属する分子は、その構造にもとづいてサブファミリーに分類されている。近年、膜貫通領域を有するコラーゲンが複数報告され、膜貫通型コラーゲンと総称されている。このうち Col XIII、XXIII は CLAC-P/Col XXV と類似性の高い分子構造を持つことから、共通した機能を担う分子群であると考えられるが、その生理的役割や、AD との関連については未解明の点が多い (Fig.1A)。本研究において私は、新規コラーゲン CLAC-P/Col XXV の発現、代謝について解析するとともに、特にその相互作用分子につい

て、他の膜貫通型コラーゲンと対比しつつ検討を行った。

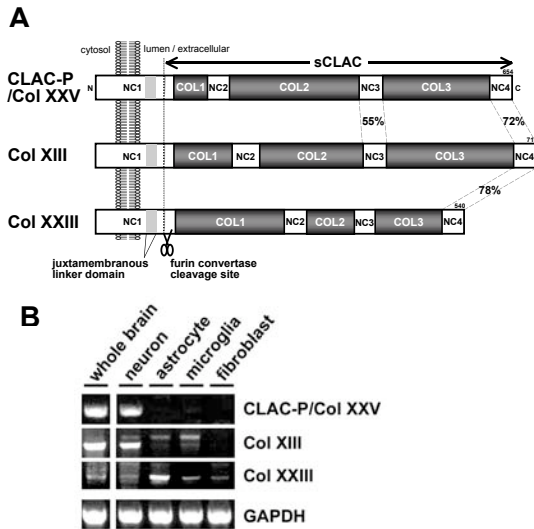


Fig.1 CLAC-P/Col XXV と膜貫通型コラーゲン
A: 分子構造.
B: 膜貫通型コラーゲンの脳における mRNA 発現解析 (RT-PCR 法) .

1. 各種膜貫通型コラーゲンの脳における発現とAD脳における変化

膜貫通型コラーゲンの脳における mRNA 発現を、マウス初代培養神経細胞、アストロサイト、ミクログリアおよび髄膜由来線維芽細胞において RT-PCR 法により検討した。CLAC-P/Col XXV は神経細胞に特異的に発現するのに対し、Col XIII は神経細胞に加えてグリア細胞にも発現し、Col XXIII は全ての細胞種で発現していることが分かった (Fig.1B)。

いずれの膜貫通型コラーゲンも脳に発現が見られ、細胞外領域が切断・分泌を受けることから、CLAC-P/Col XXV と同様に AD 脳老

人斑アミロイドに蓄積する可能性が考えられた。しかし、AD 脳の免疫組織化学ならびにアミロイド画分のウェスタンブロットングにより、βアミロイドとの共存が認められたのは CLAC のみであった。

2. CLAC-P/Col XXV の代謝に関する検討

CLAC-P/Col XXV の代謝を検討するため、CLAC-P/Col XXV を恒常的に発現する HEK293 細胞株を取得し、メタボリックラベリング法を用いて CLAC-P/Col XXV の全長型および分泌型 (sCLAC) 蛋白質の消長を経時的に観察した (Fig.2A)。その結果、全長型が 6 時間程度で消失するのに伴い、分泌型の増加が観察された。その後全長、分泌型ともに一定量が長時間安定に残り、その半減期は約 60 時間であった。

コラーゲン蛋白質はトリプルヘリックス構造を形成して安定化し、熱やプロテアーゼに対する抵抗性を獲得することがその基本的性質として知られている。α,α'-dipyridyl によりプロリン、リジンのヒドロキシル化を阻害した細胞では、

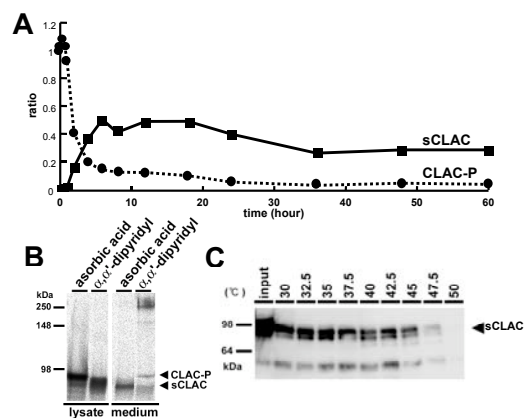


Fig.2 CLAC-P/Col XXV の代謝
A: メタボリックラベリングによる CLAC-P/Col XXV と sCLAC の定量。
B: ヒドロキシル化阻害による分泌への影響。
C: 熱安定性およびトリプシンへの抵抗性の検討。

CLAC-P/Col XXV は電気泳動上の移動度が促進し、正常な sCLAC の分泌も抑制されたことから、プロリン、リジンのヒドロキシル化は CLAC-P/Col XXV のトリプルヘリックス形成の安定と、sCLAC の生成に必要であることが示された (Fig.2B)。また、sCLAC を様々な温度で熱処理した後トリプシン消化を行ったところ、45°Cまではトリプシン耐性を示し、熱安定性、プロテアーゼ耐性などのコラーゲンに共通な性質を保っていることが示された (Fig.2C)。

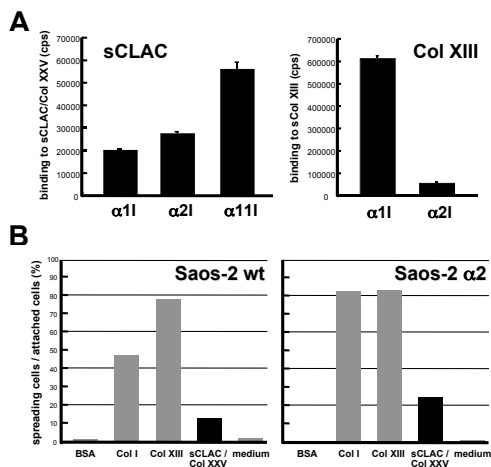


Fig.3 CLAC-P/Col XXV とインテグリンの相互作用
A: GST- α と基質との *in vitro* 結合アッセイ.
B: Saos-2 細胞を用いた spreading アッセイの結果. 各基質上に spreading した細胞の比率.

3. CLAC-P/Col XXV と相互作用するコラーゲン受容体インテグリンの検討

コラーゲンは通常インテグリンなどの受容体を介して生理機能を発揮する。コラーゲン受容体インテグリンとして α 1 β 1、 α 2 β 1、 α 10 β 1、 α 11 β 1などが知られており、その α subunit はいずれも分子のN末端側にI domain (inserted domain) と呼ばれる約200アミノ酸からなる基質認識部位を持つのが特徴である。これら4種のコラーゲン受容体インテグリンはいずれも脳においてmRNA発現が見られることを確認した。

CLAC-P/Col XXV とこれらのインテグリンとの相互作用を検討するため、CLAC-P/Col XXV もしくは Col XIII を恒常発現する HEK293 細胞株の培養上清から、ヘパリンカラム、ハイドロキシアパタイトカラム、ゲル濾過を用いてリコンビナント分泌型蛋白質を精製する方法を確立し、これを基質として検討に用いた。*in vitro* 結合アッセイでは、GST 融合リコンビナント I domain (GST- α I) と固相に敷いた各種コラーゲンとの Mg^{2+} 存在下における結合を、Eu (ユーロピウム) ラベル抗 GST 抗体の蛍光により測定した (Fig.3A)。その結果、sCLAC は α 1 β 1< α 2 β 1< α 11 β 1 の順に親和性を示したが、Col XIII は逆に α 1 β 1 と強い結合を示した。

次にインテグリンを介する細胞の基質への接着 (attachment)、伸展 (spreading) を cell spreading アッセイにより評価した。内因性に α 1、 α 10、 α 11 および β 1 インテグリンを発現する Saos-2 細胞 (ヒト骨肉腫由来細胞) の野生株 (Saos-2 wt 細胞) と、恒常的に α 2 インテグリンを発現させた Saos-2 α 2 細胞を用いた。固相化した各種コラーゲン上にシクロヘキシミド処理した Saos-2 細胞を加え、2 時間後の基質に対する attachment と spreading の比率を計測した (Fig.3B)。その結果、sCLAC 上において Saos-2 wt 細胞の spreading

が観察され、さらにその比率は Saos-2 $\alpha 2$ 細胞で上昇したことから、sCLAC が $\alpha 2\beta 1$ インテグリンの基質となることが確認された。

4. グリコサミノグリカンと CLAC-P/Col XXV の相互作用

我々は sCLAC の精製過程において sCLAC がヘパリンカラムに強く結合することを見出した。そこで CLAC-P/Col XXV と各種グリコサミノグリカン (GAG) との結合を *in vitro* 結合アッセイにより検討した (Fig.4A)。その結果、sCLAC はヘパラン硫酸に強い結合を示した。コンドロイチン硫酸にも結合が見られたが、ヒアルロン酸にはほとんど結合しなかった。

次にこれらの GAG が CLAC-P/Col XXV の代謝に与える影響を検討した。メタボリックラベリングした CLAC-P/Col XXV 発現細胞の培養液中に各種の GAG を加え、培養液中の sCLAC と RIPA バッファーで可溶化した細胞画分中の CLAC-P/Col XXV の量を定量した (Fig.4B,C)。その結果、ヘパリン、ヘパラン硫酸やコンドロイチン硫酸を添加した細胞では分泌量の増加が認められた。ヒアルロン酸は分泌上昇効果を示さなかった。また、ヘパリン添加による分泌の増加は Col XIII についても観察されたが、その効果は CLAC-P/Col XXV に比して弱かった (Fig.4C)。細胞外領域の分泌に対する GAG の効果の強さは、*in vitro* の結合アッセイで見られた GAG とコラーゲンの結合能に相関していた。

CLAC-P/Col XXV への結合および分泌促進効果を示した GAG はいずれも硫酸基の修飾を持つアニオン性 GAG であった。CLAC-P/Col XXV の COL 領域には正電荷アミノ酸が多く存在しており、GAG との相互作用を媒介するものと考えられる。

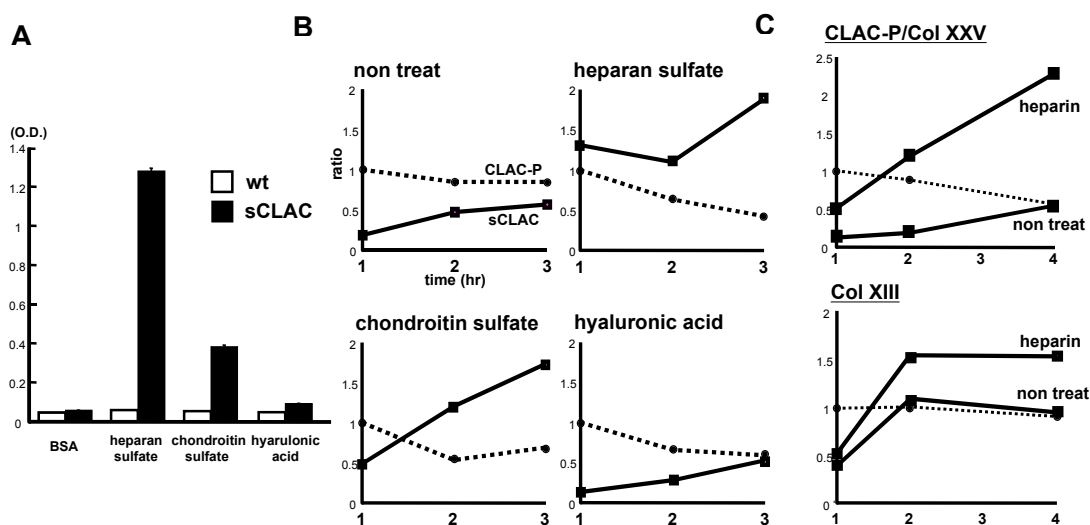


Fig.4 GAG と CLAC-P/Col XXV の相互作用

A: GAG と CLAC-P との *in vitro* 結合アッセイ. HEK293 細胞野生株 (wt) および CLAC-P 恒常発現株 (sCLAC) の培養上清を用いた。

B: GAG 添加による CLAC-P/Col XXV 量、sCLAC 分泌量の経時的変化。

C: ヘパリン添加による sCLAC および Col XIII 細胞外領域の分泌に対する影響。

また、アニオン性 GAG による sCLAC の分泌量増加のメカニズムを考えるにあたり、細胞に保持されている sCLAC の存在を見出し、細胞に保持される sCLAC が GAG の競合的添加や、GAG 合成阻害により減少することを示した。このことは、細胞表面におけるアニオン性 GAG 修飾を持つ分子と sCLAC との相互作用を示唆している。

【まとめ】

本研究において私は CLAC-P/Col XXV がコラーゲンとしての基本的性質を有し、脳に発現するコラーゲン受容体インテグリンを介して生理機能を発揮する可能性を示した。また、アニオン性 GAG との結合と分泌量の相関が見られることから、CLAC-P/Col XXV の機能はヘパラン硫酸、コンドロイチン硫酸プロテオグリカン等の糖蛋白質との相互作用により調節を受ける可能性を示唆し、Fig.5 に示すモデルを提示した。膜貫通型コラーゲンファミリー分子のうち、AD 脳老人斑アミロイドに蓄積するのは CLAC のみであった。今後 CLAC-P/Col XXV がアミロイド蓄積に果たす役割、その生理的機能ならびに他の膜貫通型コラーゲンとの機能的異同を解明してゆきたい。

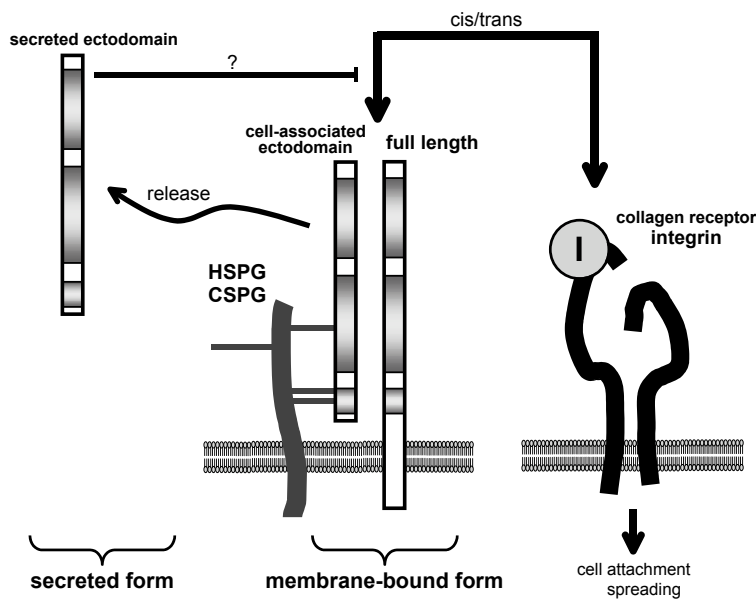


Fig.5 膜結合型コラーゲンと受容体の結合とその制御に関するモデル