

コラーゲン3重らせん構造の熱安定性を確保する  
生合成機構に関する研究

Study on the Biosynthetic Mechanism That Ensures  
the Thermal Stability of the Collagen Triple Helix

2022年3月

藤井 一徳

Kazunori FUJII





コラーゲン 3 重らせん構造の熱安定性を確保する  
生合成機構に関する研究

Study on the Biosynthetic Mechanism That Ensures  
the Thermal Stability of the Collagen Triple Helix

2022 年 3 月

早稲田大学大学院 先進理工学研究科  
化学・生命化学専攻 生物分子化学研究

藤井 一徳

Kazunori FUJII



## 略語表

本論文におけるアミノ酸はすべてL体であり、標準的な3文字および1文字表記を使用した。その他のアミノ酸については以下に記載した。

Acm	: S-acetamidomethyl
Ahx	: 6-aminohexanoic acid
AP	: alkaline phosphatase
BiP	: binding immunoglobulin protein
BSA	: bovine serum albumin
bCMP	: branched CMP
CBB	: Coomassie Brilliant Blue R 250
CD	: circular dichroism
CHCA	: $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid
CMP	: collagen-mimetic peptide
cCMP	: cyclic CMP
DIC	: <i>N,N</i> -diisopropylcarbodiimide
DMEM	: Dulbecco's modified Eagle's medium
DTT	: 1,4-dithiothreitol
EDT	: 1,2-ethanedithiol
EDTA	: ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	: enzyme-linked immunosorbent assay
ER	: endoplasmic reticulum
ERAD	: ER-associated degradation
ERES	: ER exit site
ERGIC	: ER-Golgi intermediate compartment
ESI MS	: electrospray ionization mass spectrometry
FACIT	: fibril-associated collagens with interrupted triple helices
FAM	: carboxyfluorescein
FBS	: fetal bovine serum
FITC	: fluorescein isothiocyanate
FKBP65	: FK506-binding protein 65
Fmoc	: 9-fluorenylmethoxycarbonyl
GGHL	: glucosyl-galactosyl-hydroxylysine
GHL	: galactosyl-hydroxylysine

HEPES : 2-hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid  
HFDm : human fibroblasts defined medium  
HOBt : 1-hydroxybenzotriazole  
HRP : horseradish peroxidase  
HSP : heat-shock protein  
Hyp or O : hydroxyproline  
Hyl : hydroxylysine  
LC-MS : liquid chromatography-mass spectrometry  
MALDI-TOF MS : matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry  
MD : molecular dynamics  
MMP : matrix metalloproteinase  
Mtt : *N*- $\epsilon$ -4-methyltrityl  
multiplexin : multiple triple-helix domains and interruptions  
MRM : multiple reaction monitoring  
NEM : *N*-ethylmaleimide  
NP-40 : Nonidet P-40  
OI : osteogenesis imperfecta  
PBS : phosphate-buffered saline  
PMSF : phenylmethylsulfonyl fluoride  
PVDF : polyvinylidene fluoride  
RP-HPLC : reversed-phase high-performance liquid chromatography  
SDS : sodium dodecyl sulfate  
SDS-PAGE : SDS-polyacrylamide gel electrophoresis  
SERPIN : serine protease inhibitor  
SH3 : Src homology 3  
ssCMP : single-stranded CMP  
soCMP : strand-offset cCMP  
TANGO1 : transport and Golgi organization protein 1  
TFA : trifluoroacetic acid  
Tris : tris(hydroxymethyl)aminomethane  
TBS : tris-buffered saline



## 目次

### 第1章 序論

1.1. コラーゲンとは.....	1
1.2. コラーゲンの生合成.....	3
1.3. コラーゲン特異的分子シャペロン HSP47.....	5
1.4. 細胞外に分泌されるプロコラーゲンの品質管理.....	6

### 第2章 変性コラーゲンを高感度に検出できる分子ツールの開発

2.1. 緒言.....	8
2.2. 変性コラーゲンに結合する CMP の分子設計と合成.....	10
2.3. ELISA による CMP と変性コラーゲンの親和性評価.....	14
2.4. cCMP を用いた western blotting によるコラーゲンの検出.....	17
2.5. cCMP を用いた細胞外コラーゲンの蛍光染色.....	19
2.6. cCMP を用いた細胞内プロコラーゲンの蛍光染色.....	21
2.7. MD シミュレーション.....	23
2.8. 使用直前の加熱処理を必要としない cCMP の開発.....	24
2.9. ELISA による soCMP と変性コラーゲンの親和性評価.....	27
2.10. 考察.....	30
2.11. 第2章に関する実験.....	31

### 第3章 プロコラーゲンの3重らせん構造は HSP47 によって安定化される

3.1. 緒言.....	47
3.2. <i>Hsp47</i> <sup>+/+</sup> および <i>hsp47</i> <sup>-/-</sup> MEF が発現するタンパク質の western blotting 解析.....	49

3.3. 蛍光染色によるコラーゲンの局在解析.....	52
3.4. MEF から分泌された I 型コラーゲンにおける翻訳後修飾の定量.....	55
3.5. MEF から分泌された I 型コラーゲン $\alpha$ 鎖の定量.....	61
3.6. MEF から分泌された $[\alpha 1(I)]_2\alpha 2(I)$ の熱変性温度測定.....	64
3.7. 考察.....	66
3.8. 第 3 章に関する実験.....	72

#### 第 4 章 コラーゲン 3 重らせん構造の熱安定性は環境温度によって調節される

4.1. 緒言.....	83
4.2. 異なる温度で培養した ZF4 細胞が発現するタンパク質の解析.....	85
4.3. ZF4 細胞から分泌された I 型コラーゲンにおける翻訳後修飾の定量.....	88
4.4. ZF4 細胞から分泌された I 型コラーゲンにおける部位特異的な 3-Hyp の解析.....	90
4.5. ZF4 細胞から分泌された I 型コラーゲン $\alpha$ 鎖の定量.....	92
4.6. ZF4 細胞から分泌されたコラーゲンの構造熱安定性.....	95
4.7. 考察.....	99
4.8. 第 4 章に関する実験.....	105

第 5 章 総括.....	119
---------------	-----

参考文献.....	122
-----------	-----

謝辞

研究業績

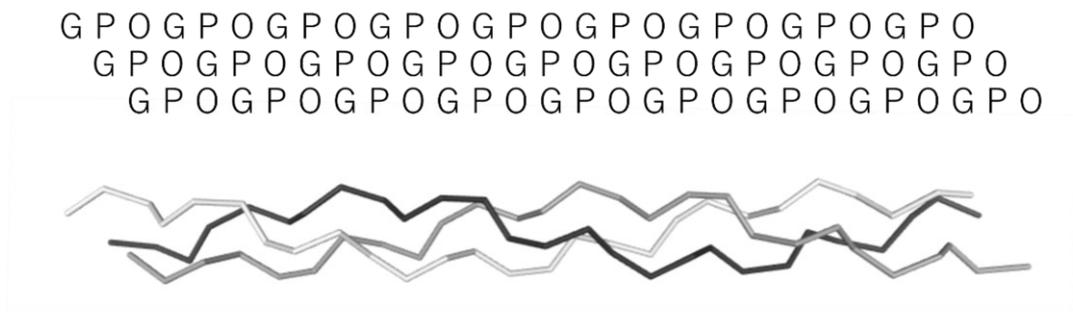


## 第1章 序論

### 1.1. コラーゲンとは

コラーゲンは多細胞動物に豊富に存在するタンパク質であり、ヒトでは総タンパク質重量の約3割を占める。コラーゲンは細胞外マトリックスの主要な構成成分として、組織構造に機械的な強度を与えるのみならず、細胞機能の制御といった役割も担っている。ヒトでは28の異なる型のコラーゲンが同定されており、高次構造の違いなどから線維性コラーゲン、基底膜コラーゲン、短鎖コラーゲン、fibril-associated collagens with interrupted triple helices (FACIT) コラーゲン、膜貫通型コラーゲン、multiple triple helix domains and interruptions (multiplexin) コラーゲンなどに分類されている。コラーゲン分子を構成するポリペプチド鎖は $\alpha$ 鎖と呼ばれており、全ての $\alpha$ 鎖には3残基ごとのGlyを特徴とするGly-X-Y (X、Yは任意のアミノ酸) 繰り返し配列が存在する。哺乳類の場合X位とY位の約3分の1は、それぞれProおよびProの翻訳後修飾によって生じる4-hydroxyproline (Hyp) 残基が占めている。この領域で3本の $\alpha$ 鎖が会合し、3重らせん構造を形成することでコラーゲン分子となる。このとき $\alpha$ 鎖はそれぞれ左巻きのらせん構造をとり、さらに互いにアミノ酸1残基ずつずれて緩く右巻きのらせんとなっている (Figure 1-1)。

a



b



Figure 1-1. コラーゲンの3重らせん構造

コラーゲンの典型的な配列である Gly-Pro-4-Hyp の9回繰り返し配列をもつペプチド3量体  $[(\text{Gly-Pro-4-Hyp})_9]_3$  の結晶構造を短軸方向 (a) および長軸方向 (b) から示した (Protein Data Bank ID: 3B0S)。O は4-Hypを示す。

## 1.2. コラーゲンの生合成

線維性コラーゲンである I、II、III 型コラーゲン、特に脊椎動物で最も豊富に存在する I 型コラーゲンは、構造や機能、生合成の観点からよく研究されている。これらのコラーゲンの  $\alpha$  鎖は Gly-X-Y 繰り返しからなる、アミノ酸約 1000 残基の 3 重らせん形成領域を持っている。

コラーゲン前駆体であるプロコラーゲンは、3 重らせん領域および両末端のプロペプチド領域をもっており、その翻訳後修飾および構造形成は小胞体 (endoplasmic reticulum: ER) 内腔で行われている (Figure 1-2)。リボソームで翻訳が開始されると、各 prepro $\alpha$  鎖はそれと同時に ER 内腔に挿入される。翻訳が完了し、N 末端の ER シグナル配列が切断された 3 本の pro $\alpha$  鎖は、C-プロペプチド部分で 3 量体を形成し、ジスルフィド結合により架橋されたのち C 末端から N 末端の方向にジッパーを閉じるように 3 重らせんを形成していく (Engel and Prockop 1991)。この際、1 本鎖のポリペプチド部分にはプロリン 4-水酸化酵素、プロリン 3-水酸化酵素、リシン水酸化酵素といった修飾酵素が結合し、それぞれ Pro の 4 位水酸化、Pro の 3 位水酸化、Lys の側鎖水酸化を触媒する (Myllyharju 2005)。Hydroxylysine (Hyl) にはさらに糖鎖が付加され galactosyl-hydroxylysine (GHL)、glucosyl-galactosyl-hydroxylysine (GGHL) となる。このうち、Y 位 Pro の 4-Hyp 化はコラーゲンのもっとも主要な翻訳後修飾であり、3 重らせん構造の熱安定性を大きく向上させている (Berg and Prockop 1973a)。X 位 Pro の 3-Hyp 化も 3 重らせん構造の熱安定性を高め (Mizuno et al. 2008)、Lys の水酸化および Hyl への糖鎖付加は 3 重らせん構造の熱安定性に影響を与える可能性が示されている (Nokelainen et al. 1998; Takuwa et al. 2016)。3 重らせんを形成した部分にはプロコラーゲン特異的な分子シャペロン heat-shock protein 47 (HSP47) が結合する (Koide et al. 2000; Tasab, et al. 2000)。3 重らせん構造が完成したプロコラーゲンは Golgi 体を経て細胞外に分泌される。細胞外でプロコラーゲンの C-および N-プロペプチドが特異的プロテアーゼによって切断さ

れることでコラーゲン3重らせん分子となり、それらが自己集合することで細線維となる。  
さらにそれらが会合することでコラーゲン線維が形成される。

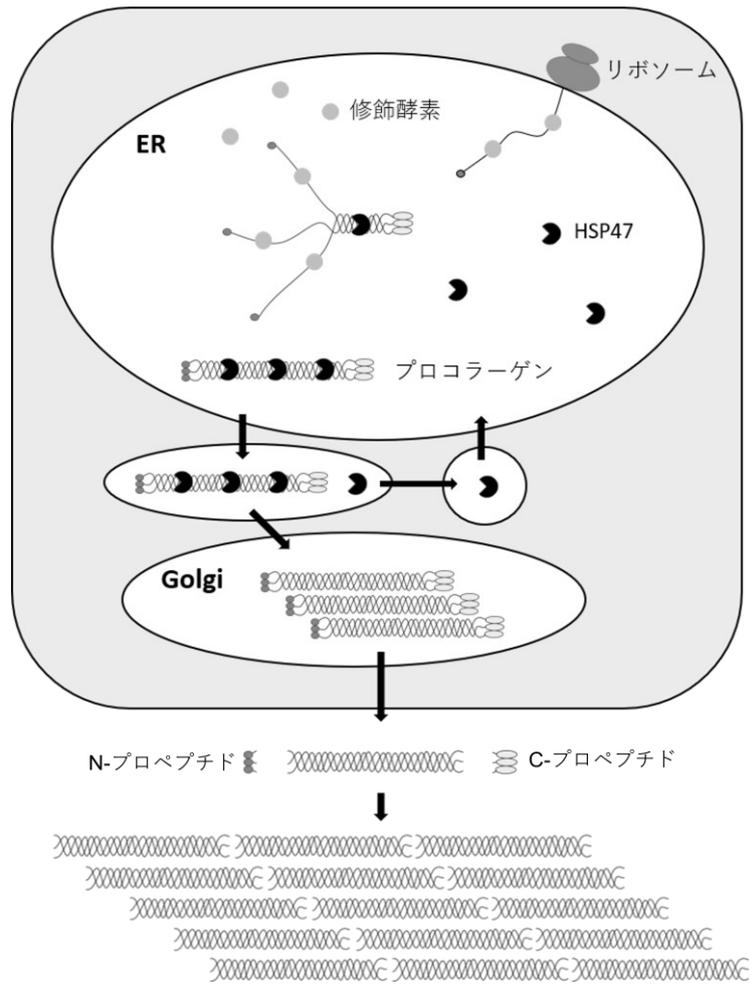


Figure 1-2. コラーゲンの生合成過程

プロコラーゲンの構造形成はER 内腔で行われる。1 本鎖部分には修飾酵素が結合し、3 重らせん部分には HSP47 が結合する。プロコラーゲンの C-および N-プロペプチドは細胞外で特異的プロテアーゼによって切断され、コラーゲン分子となる。コラーゲン分子は会合してコラーゲン細線維となる。

### 1.3. コラーゲン特異的分子シャペロン HSP47

プロコラーゲン特異的な分子シャペロン HSP47 は、*serpinh1* 遺伝子によってコードされており、serine protease inhibitor (SERPIN) ファミリーに属するがセリンプロテアーゼの阻害活性はもたない、糖鎖修飾を受けた約 47 kDa の HSP である。脊椎動物の ER に局在し、プロコラーゲン 3 重らせんの Gly-X-Arg 配列に結合する (Koide et al. 2006)。HSP47 が結合する可能性のある部位は、I 型コラーゲンの  $\alpha$  鎖 [ $\alpha$ (I)] では約 30 カ所と推定されている。少なくとも哺乳類ではコラーゲンの生合成に必須であり、HSP47 欠損マウスはコラーゲンの構造形成不全により胎生致死となる (Nagai et al. 2000)。

HSP47 は ER 内腔において、プロコラーゲンの 3 重らせん構造に結合することで、プロコラーゲン分子同士の側方的な会合による凝集体形成の抑制 (Ishida et al. 2006) や 3 重らせん構造の局所的な安定化 (Koide et al. 2000; Tasab et al. 2000) を行っていると考えられている。プロコラーゲンは 3 重らせん形成後に Golgi 体に運ばれ、その後細胞外に分泌されるが、HSP47 は *cis*-Golgi あるいは ER-Golgi intermediate compartment (ERGIC) で pH の低下に伴ってプロコラーゲンから解離し、C 末端の ER 局在シグナル (Arg-Asp-Glu-Leu: RDEL) の存在により再び ER に戻される (Nakai et al. 1992; Oecal et al. 2016; Saga et al. 1987; Satoh et al. 1996)。

タンパク質の分泌経路にある ER には HSP47 以外にも binding immunoglobulin protein (BiP) や glucose-regulated protein 94、ジスルフィド結合に関与する protein disulfide isomerase、糖修飾に関わるカルネキシンやカルレティキュリンといった分子シャペロンが存在するが、これらは ER ストレスにより発現が誘導され、正しくフォールディングできなかったタンパク質の蓄積に対処している。一方、HSP47 は分泌経路では、知られている中で唯一の熱ショックタンパク質であり、構成的にも発現しているが、熱ストレスによってその発現が亢進する。また、BiP や HSP70 といった他の分子シャペロンがアンフォールド状態のタンパク質に対

して広い基質特異性を示すのに対し、HSP47 は基質特異的なシャペロンとして、正しくフォールディングしたコラーゲン 3 重らせん構造に特異的に結合する。近年では、HSP47 が細胞外マトリックスを構成する decorin、fibromodulin、lumican と結合し、それらの分泌に関与することが報告されるなど (Ishikawa et al. 2018)、HSP47 がプロコラーゲン特異的な分子シャペロンとして以外にも、生体内で多様な役割を果たしている可能性が示唆されている。

#### 1.4. 細胞外に分泌されるプロコラーゲンの品質管理

フォールディングしたプロコラーゲン分子は、長さ約 300 nm の硬い棒状構造を形成しているため、直径 90 nm 以下の従来の COPII 被覆小胞に入ることができない。そのため、プロコラーゲンの ER から Golgi 体への輸送には transport and Golgi organization protein 1 (TANGO1) が重要な役割を果たしている。TANGO1 欠損マウスでは、コラーゲンの分泌が遅くなり、骨形成に異常が生じることが知られている (Wilson et al. 2011)。TANGO1 は ER 局在シグナル配列をもつ膜貫通型タンパク質であり、ER exit site (ERES) において、プロコラーゲンを積み込むことができる巨大な COPII 小胞の形成を促進している (Saito et al. 2009; Yuan et al. 2018)。さらに、ER 内腔で TANGO1 の Src homology 3 (SH3) ドメインが HSP47 と相互作用することで、正常に 3 重らせん構造を形成したプロコラーゲンを ERES 周辺に濃縮していることが示唆されている (Ishikawa et al. 2016; Yuan et al. 2018)。

オートファジーによる ER の分解は ER ファジーとして知られている。ER 内のミスフォールドタンパク質は、ER-associated degradation (ERAD) 経路または ER ファジー経路で分解される。ER 内のミスフォールドプロコラーゲンも、一部は ER ファジーによって分解されることが知られているが (Ishida et al. 2009)、HSP47 はプロコラーゲンを含むオートファジー小胞には取り込まれない (Cinque et al. 2015)。これは、正しくフォールディングできなかったプロコラーゲン分子が、オートファジーによって特異的に分解されることを示唆して

いる。また、ER におけるプロコラーゲンの分解には、カルネキシンと ER ファジー受容体である FAM134B の複合体が関与していることが報告されており、カルネキシンは C-プロペプチドにおけるアスパラギン結合型糖鎖と相互作用することで、凝集体を形成したプロコラーゲンの ER ファジーによる分解に寄与している (Forrester et al. 2019)。

一般に、タンパク質の立体構造はその一次構造によって一義的に規定されており、その熱安定性は体温に耐えうるものである。しかし、線維形成していないコラーゲンの 3 重らせん構造は、少なくとも哺乳類の場合、その体温に耐える十分な熱安定性をもっていないことが知られている (Leikina et al. 2002)。そのため、細胞内には 3 重らせん構造を安定化するためのなんらかのシステムが存在していると考えられる。また、コラーゲンの 3 重らせん構造は多数の翻訳後修飾により安定化されていることから、その熱安定性は、翻訳後修飾の調節によっても変化している可能性もある。

そこで本論文では、コラーゲンがいかにして 3 重らせん構造の熱安定性を確保し、構造形成を行っているのかを明らかにすることを目指した。コラーゲンが 3 重らせん構造の熱安定性を十分に獲得できない場合、その 3 重らせんは変性していると考えられるため、変性と非変性状態を区別することのできる化合物は本研究において有用なツールとなる。そこで第 2 章では、3 重らせん構造がほどけた変性コラーゲンを高感度に検出することができる分子ツールの開発を行い、以降の研究ではこれを活用した。第 3 章では、コラーゲン特異的分子シャペロン HSP47 がプロコラーゲン 3 重らせん構造を安定化しているのかを検証し、第 4 章では、コラーゲン 3 重らせん構造の熱安定性と環境温度の関係を解析することで、3 重らせん構造自体の熱安定性が環境温度に合わせて変化しているのかを調べた。

## 第2章 変性コラーゲンを高感度に検出できる分子ツールの開発

### 2.1. 緒言

コラーゲンの3重らせん構造は高温や機械的なストレスによって変性するが、コラーゲンの3重らせん構造の変性状態と非変性状態は、コラーゲンに対する抗体を用いても区別することができなかつたため、変性コラーゲンを検出することができる物質は、コラーゲンの分子構造を調べるためのツールとして有用である。さらに、コラーゲン3重らせんの変性は、がんや骨粗鬆症などの疾患において増加することが示唆されるため (Acerbo et al. 2014; Kessenbrock et al. 2010)、変性コラーゲンに特異的に結合する物質は、これら疾患の診断や *in vivo* イメージング、あるいは、組織への薬物送達といった目的でも使用することができると考えられる。

これまでに、コラーゲンの Gly-X-Y くり返し配列を模倣して化学合成したアミノ酸数十残基からなるコラーゲン様ペプチド (collagen-mimetic peptide: CMP) が、変性コラーゲンに対する親和性をもつと報告されている (Chattopadhyay et al. 2012, 2016; Li et al. 2012; Wang et al. 2005)。CMP はコラーゲンの3重らせん構造がほどけた部分を認識し、その部位とハイブリッド3重らせんを形成することで結合する。多くの固形がん細胞ではコラーゲン分解酵素である matrix metalloproteinase (MMP) が過剰発現しているため、がん腫瘍周辺には分解の過程で3重らせん構造が変性したコラーゲンが存在すると考えられる (Dong et al. 2011; Kessenbrock et al. 2010; Xie et al. 2016; Yamamura et al. 2002)。そこで、ヒト前立腺がん細胞 (PC-3) を移植したマウスを用いて、1本鎖 CMP (single-stranded CMP: ssCMP) である (Gly-Pro-4-Hyp)<sub>n</sub> によるがん腫瘍の *in vivo* イメージングが達成された (Li et al. 2012)。さらに、CMP と MMP 活性マーカーが共局在したことから、がん腫瘍の周辺では MMP によるコラーゲンの分解が亢進することで、変性コラーゲンが蓄積していることが示された。しかしな

がら、CMP は水溶液中で自己集合して 3 重らせんを形成する性質をもっており、3 重らせんを形成した CMP はコラーゲン結合能を失ってしまう。そのため、使用直前に CMP 溶液を加熱することで 3 重らせんをほどく必要があり、この性質は特に *in vivo* へ応用する場合の課題であった (Figure 2-1)。

そこで、2 本の平行な CMP の両末端を共有結合的に結束し、環状 CMP (cyclic CMP: cCMP) とすることで、変性コラーゲンに対する結合親和性を向上させ、自己集合による 3 重らせん形成も阻害できるのではないかと考えた。本章では、cCMP の変性コラーゲン結合能を評価し、*in vitro* における変性コラーゲン検出ツールとしての有用性を確かめた。

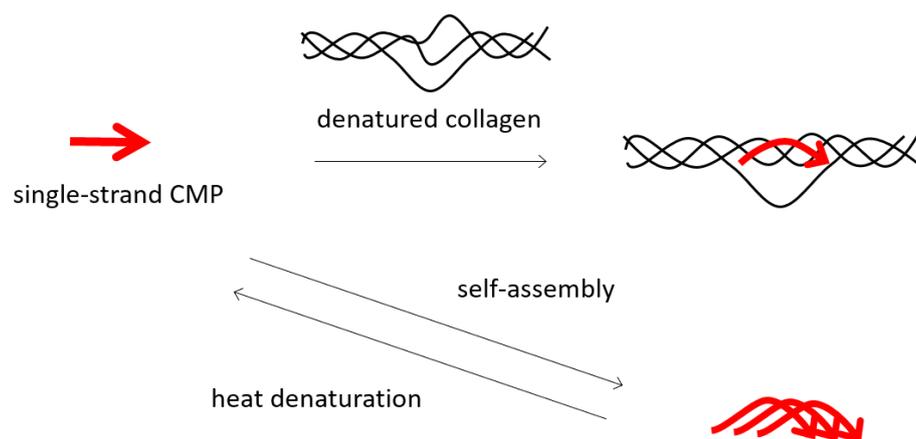


Figure 2-1. ssCMP の性質

ssCMP は溶液中で自己集合して 3 重らせん構造を形成し、変性コラーゲン結合能を失う。そのため、使用直前に ssCMP 溶液を熱処理することで 3 重らせんをほどく必要がある。

## 2.2. 変性コラーゲンに結合する CMP の分子設計と合成

3重らせんを形成するポリペプチド鎖間の共有結合による結束は、3重らせん構造を安定化することが知られており、2+1ハイブリッドは1+1+1ハイブリッドよりも形成しやすいと推測できる (Hentzen et al. 2017; Horng et al. 2006; Melacini et al. 1996; Tanrikulu and Raines 2014)。そこで、ssCMP は変性コラーゲンのポリペプチド鎖 2 本と、2 本鎖 CMP は変性コラーゲンのポリペプチド鎖 1 本と、3 重らせんを形成すると考えた (Figure 2-2)。実際、枝分かれ CMP (branched CMP: bCMP) は高い親和性と選択性で ssCMP と結合し、3 重らせん構造を形成することが報告されている (Delsuc et al. 2017)。

そこで、本研究では bCMP と cCMP の 2 種類の 2 本鎖 CMP を設計した (Table 2-1)。設計したペプチドには Pro-4-Hyp-Gly の 4 から 10 回繰り返し配列、スペーサーとして 6-aminohexanoic acid (Ahx)、側鎖アミノ基を用いてペプチド鎖を分岐させるための Lys 残基、ペプチド溶液の濃度を吸光度から求めるための Tyr 残基 (Pace et al. 1995)、蛍光色素やビオチンを結合するための C 末端 Lys 残基を共通モチーフとして組み込んだ。cCMP の N 末端には Cys 残基を導入し、ジスルフィド結合を介して架橋できるようにした。

ペプチド鎖は 9-fluorenylmethyloxycarbonyl (Fmoc) 固相法で構築した (Figure 2-3)。枝分かれ構造は Fmoc-Lys(Fmoc)-OH を導入することで達成した。N 末端を無水酢酸とピリジンを用いてアセチル化したのち、脱保護カクテル [trifluoroacetic acid (TFA):H<sub>2</sub>O:*m*-cresol:thioanisole:1,2-ethanedithiol (EDT) = 82.5:5:5:5:2.5, v/v] を用いて、ペプチド鎖を樹脂から切り出した。ヨウ素処理により *S*-acetamidomethyl (Acm) 基の脱保護と、N 末端 Cys 残基間のジスルフィド架橋を行うことで、cCMP を環化した。既報の変性コラーゲン結合ペプチドである ssCMP はコントロールとして合成した (Li et al. 2012; Wang et al. 2005)。これらの粗ペプチドを逆相高速液体クロマトグラフィー (reversed-phase high-performance liquid chromatography: RP-HPLC) により精製し、C 末端 Lys 残基のアミノ基にビオチンまたは蛍光

色素を標識した。

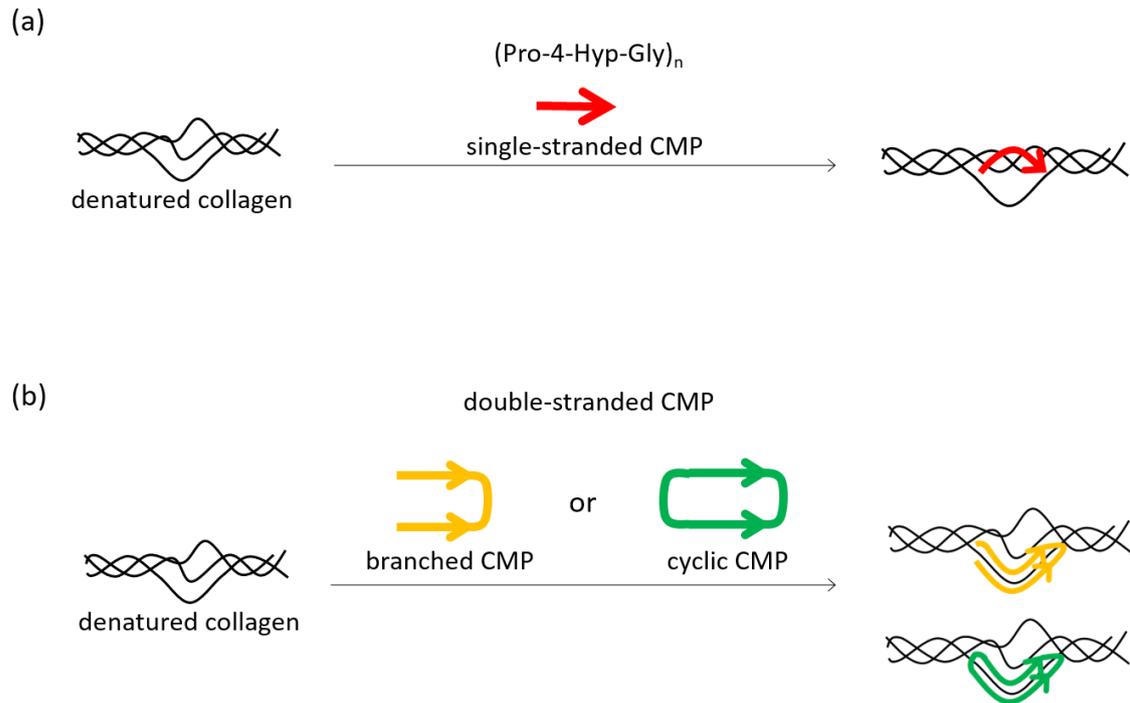


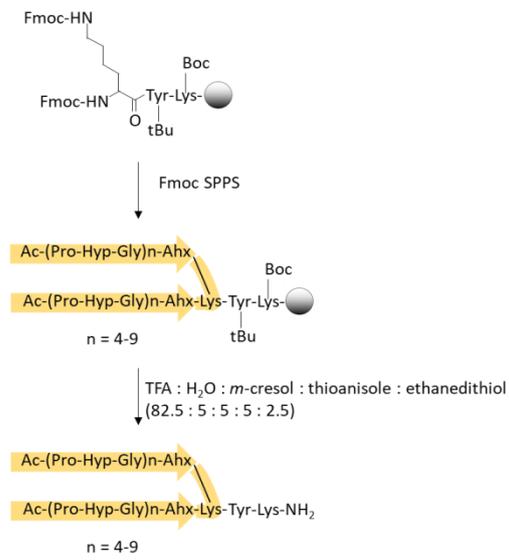
Figure 2-2. CMP と変性コラーゲンのハイブリッド3重らせん形成モデル

(a) ssCMP、(b) double-stranded CMP のそれぞれの色付き矢印は Pro-4-Hyp-Gly の繰り返し配列を示している。

Table 2-1. CMP の配列

Peptide	Sequence	n
<b>ssCMP6</b>		6
<b>ssCMP8</b>	Ac-(Pro-4Hyp-Gly) <sub>n</sub> -Ahx-Tyr-Lys-NH <sub>2</sub>	8
<b>ssCMP10</b>		10
<b>bCMP4</b>		4
<b>bCMP5</b>	Ac-(Pro-4-Hyp-Gly) <sub>n</sub> -Ahx	5
<b>bCMP6</b>	Ac-(Pro-4-Hyp-Gly) <sub>n</sub> -Ahx-Lys-Tyr-Lys- NH <sub>2</sub>	6
<b>bCMP7</b>		7
<b>bCMP8</b>		8
<b>bCMP9</b>		9
<b>cCMP4</b>		4
<b>cCMP5</b>	Ac-Cys-Ahx-(Pro-4-Hyp-Gly) <sub>n</sub> -Ahx	5
<b>cCMP6</b>	Ac-Cys-Ahx-(Pro-4-Hyp-Gly) <sub>n</sub> -Ahx-Lys-Tyr-Lys- NH <sub>2</sub>	6
<b>cCMP7</b>		7
<b>cCMP8</b>		8
<b>cCMP9</b>		9

(a) Synthesis of branched CMP



(b) Synthesis of cyclic CMP

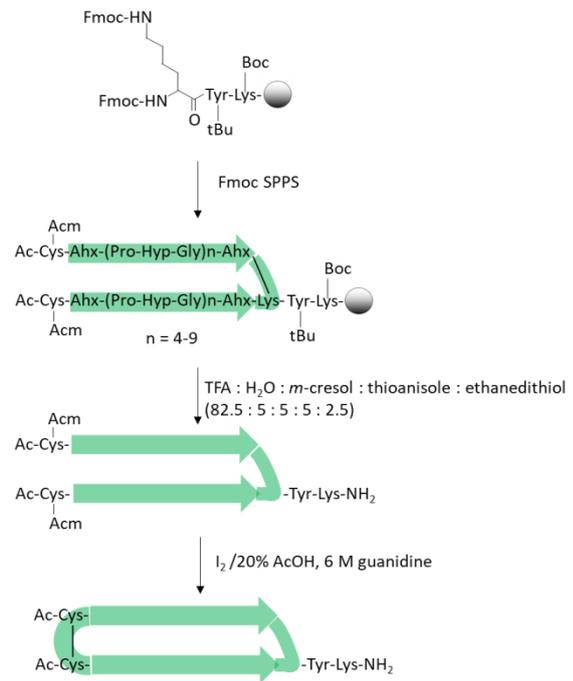


Figure 2-3. 2 本鎖 CMP の合成スキーム

(a) bCMP および (b) cCMP の合成スキームを示した。

### 2.3. ELISA による CMP と変性コラーゲンの親和性評価

合成した CMP の変性コラーゲンに対する親和性を比較するために、ビオチン標識 CMP の I 型コラーゲン (ウシ真皮由来) に対する結合能を enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) により評価した。水溶液中で 4°C 保存していたビオチン標識 CMP はすべて、ネイティブおよび変性コラーゲンのどちらにも 4°C でほとんど結合しなかった (Figure 2-4a)。そこで、ssCMP に関する先行研究を参考にして (Li et al. 2012; Wang et al. 2005)、使用直前に CMP を 95°C で 5 分間加熱したところ、4°C (Figure 2-4b) および 37°C (Figure 2-4c) において 2 本鎖 CMP の顕著な結合が観察された。特に、cCMP は他のデザインと比べてコラーゲン結合能が高いことが明らかになった。さらに、Pro-4-Hyp-Gly 繰り返し数が多いほど結合が強くなる傾向がみられた。bCMP と cCMP は、ネイティブコラーゲンよりも変性コラーゲンに強く結合した。この結果は、CMP がコラーゲン 3 重らせん構造のほどけた部分に結合していることを示唆している。さらに、CMP はネイティブコラーゲンにも結合したことから、本実験の条件ではネイティブコラーゲンの 3 重らせん構造が固定化のプロセスで部分的にほどけている可能性があることも示唆された。

ペプチドの circular dichroism (CD) スペクトル測定により、4°C における 2 本鎖 CMP と ssCMP の 2 次構造を分析したところ、225 nm に正のコットン効果が観察された (Figure 2-12) (Long et al. 1993)。この結果は、これらの CMP が 4°C で自己集合して 3 重らせんを形成していることを示唆している。Figure 2-4a と合わせて考えると、CMP が自己集合により 3 重らせんを形成するとコラーゲンの変性部分にほとんど結合しなくなると考えられるため、以降の実験では直前に加熱して自己集合を解消させた CMP を使用した。

ssCMP10 と cCMP7 を ssCMP および cCMP の代表的なデザインとして選択し、これらのコラーゲンおよび変性コラーゲンに対する濃度依存的な結合を測定することで (Figure 2-4d)、平衡解離定数 ( $K_D$ ) を算出した。4°C における cCMP7 の  $K_D$  値は変性コラーゲンに対

して  $6.6 \times 10^{-8}$  M、ネイティブコラーゲンに対しては  $1.1 \times 10^{-7}$  M と求められた。また、Figure 2-4d の ELISA の結果において、A405 (max) が ssCMP10 と cCMP7 で同じと仮定して ssCMP10 の  $K_D$  値を算出したところ、変性コラーゲンに対しては  $9.5 \times 10^{-6}$  M、ネイティブコラーゲンに対しては  $1.0 \times 10^{-6}$  M よりも大きいと推定された。これらの結果から、cCMP7 は ssCMP10 よりも変性コラーゲンに対して 100 倍以上強い親和性を持つことが示された。

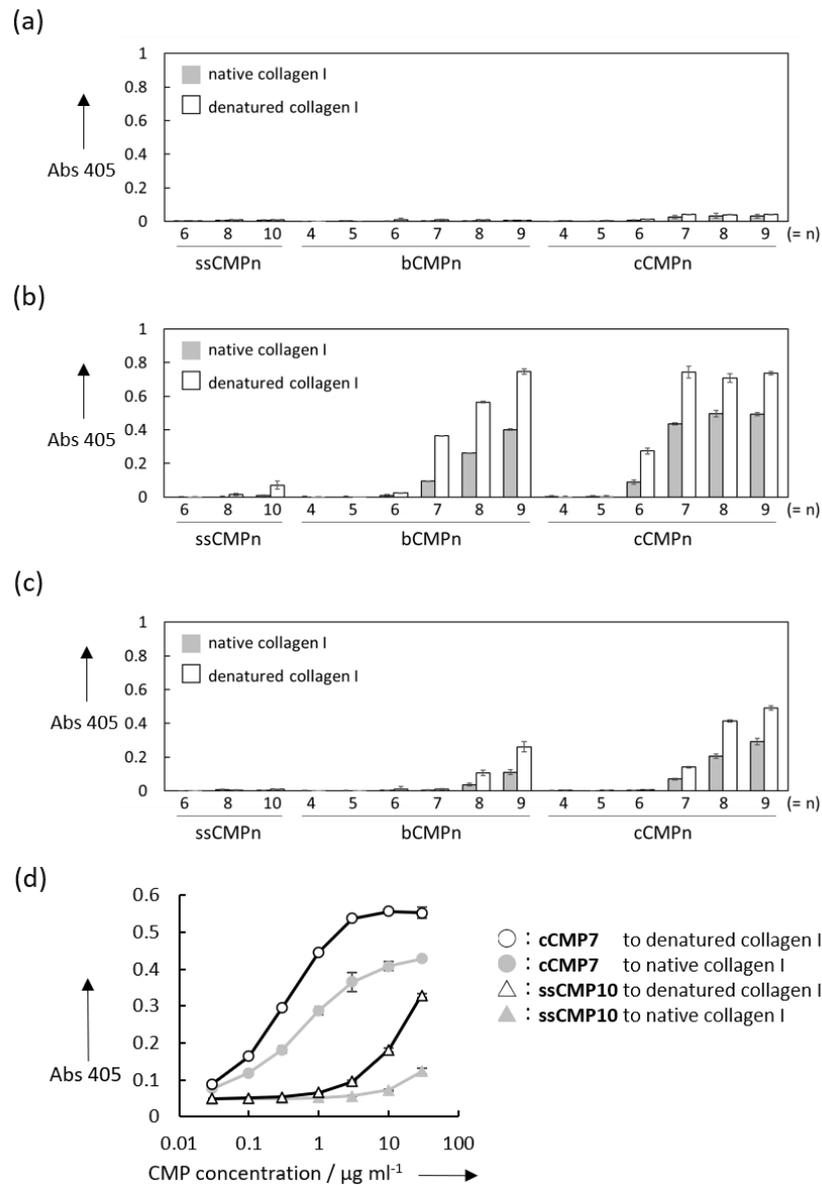


Figure 2-4. ELISA による CMP とコラーゲンの親和性評価

(a) 4°C における、2  $\mu\text{g/ml}$  CMP のネイティブおよび熱変性コラーゲンへの結合を評価した。

CMP は直前の熱処理を行わずに使用した。Means  $\pm$  SD (n = 3)。

(b) 4°C および (c) 37°C における、2  $\mu\text{g/ml}$  CMP のネイティブおよび熱変性コラーゲンへの結合を評価した。CMP は、使用直前に 95°C で 5 分間加熱し、氷上で 1 分間冷却したものを使用した。Means  $\pm$  SD (n = 3)。

(d) 4°C における、cCMP7 または ssCMP10 のネイティブおよび熱変性コラーゲンへの濃度依存的な結合を評価した。CMP は使用直前に熱処理を行った。Means  $\pm$  SD (n = 3)。

#### 2.4. cCMP を用いた western blotting によるコラーゲンの検出

Western blotting において抗体の代わりに cCMP を利用できるのかを調べるために、ビオチン標識した cCMP7 と ssCMP10、および抗 I 型コラーゲン抗体を用いて western blotting を行い、I 型コラーゲンの検出感度を比較した (Figure 2-5a)。cCMP7 を用いることで ssCMP10 よりも高感度に I 型コラーゲンを検出でき、10 ng/well で I 型コラーゲンを泳動した場合には  $\alpha 1$  と  $\alpha 2$  鎖のどちらとも、3 ng/well で I 型コラーゲンを泳動した場合でも  $\alpha 1$  鎖の検出が可能であった。また、抗 I 型コラーゲン抗体をメーカーの使用推奨濃度 (1:1000 dilution) で用いても 100 ng/well の I 型コラーゲンまでしか検出できず、cCMP7 の検出感度は高濃度 (1:200 dilution) で抗 I 型コラーゲン抗体を使用した場合と同程度であることが示された。さらに、cCMP7 を使用することで、複数のタンパク質の混合物から I から V 型コラーゲンを特異的に検出することができた (Figure 2-5b)。マウス胎児線維芽細胞 (MEF) のライセートサンプルから、細菌性コラーゲナーゼ処理により分解される pro $\alpha 1$ (I) 鎖、および C-プロペプチドが切断されていない  $\alpha 1$ (I) 鎖である pC $\alpha 1$ (I) 鎖に相当する 150 から 200 kDa のバンドを特異的に検出できることも示された (Figure 2-5c)。これらの結果は、cCMP7 がコラーゲンの共通配列である Gly-X-Y 繰り返しを認識して結合していることを示している。

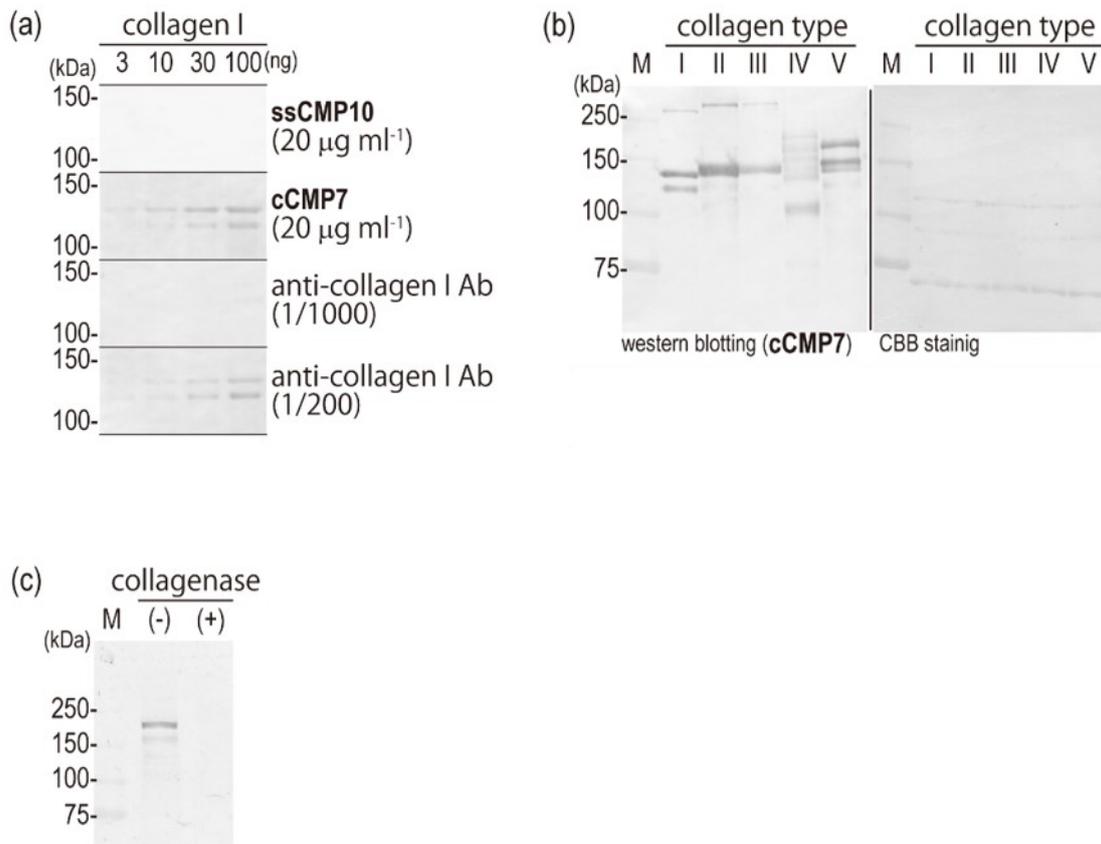


Figure 2-5. cCMP7 を用いた western blotting によるコラーゲンの検出

(a) cCMP7、ssCMP10 または抗 I 型コラーゲン抗体を用いて I 型コラーゲンを検出した。(b) cCMP7 を用いて 21 種類のタンパク質を含む分子量マーカー [myosin heavy chain (227 kDa),  $\beta$ -galactosidase (116 kDa), phosphorylase B (97.2 kDa), bovine serum albumin (66.4 kDa), glutamate dehydrogenase (55.6 kDa), ovalbumin (45.0 kDa), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (35.7 kDa), carbonic anhydrase II (29.0 kDa), soybean trypsin inhibitor A (20.1 kDa), lysozyme (14.3 kDa), aprotinin (6.5 kDa)] と混合した I-V 型コラーゲン (I, II, III, V 型コラーゲン: 100 ng, IV 型コラーゲン: 300 ng) を検出した。(c) cCMP7 を用いて、MEF ライセートおよび細菌性コラーゲナーゼ処理した MEF ライセート中のコラーゲンを検出した。

## 2.5. cCMP を用いた細胞外コラーゲンの蛍光染色

cCMP が変性コラーゲンの蛍光染色に利用できるかどうかを調べるために、5-carboxyfluorescein (FAM) 標識した cCMP7 または ssCMP10 を用いて、MEF から分泌されたコラーゲンの検出を試みた。分泌されたコラーゲンを熱変性させるために、細胞固定操作の直前に、95°C に加熱した phosphate-buffered saline (PBS) で処理したサンプルも作製した。変性コラーゲン検出能は CMP の濃度依存的に上昇した (Figure 2-6a)。cCMP7 (30 µg/mL) を用いるとネイティブなコラーゲン線維が検出されたものの、熱変性した場合のコラーゲン線維と比較するとそのシグナルは非常に弱かった。また、30 µg/mL ssCMP10 を用いることでも変性コラーゲンを検出することができたが、そのシグナルは 0.3 µg/mL cCMP7 と同程度であった (Figure 2-6b)。この結果は、cCMP7 が ssCMP10 に比べて、100 倍程度高い変性コラーゲン結合能をもっていることを示唆している。また、抗 I 型コラーゲン抗体を用いると、熱変性の有無にかかわらずコラーゲン線維が検出された (Figure 2-6c)。これらの結果により、cCMP7 を用いることで変性コラーゲンを高感度に検出できることが明らかになった。

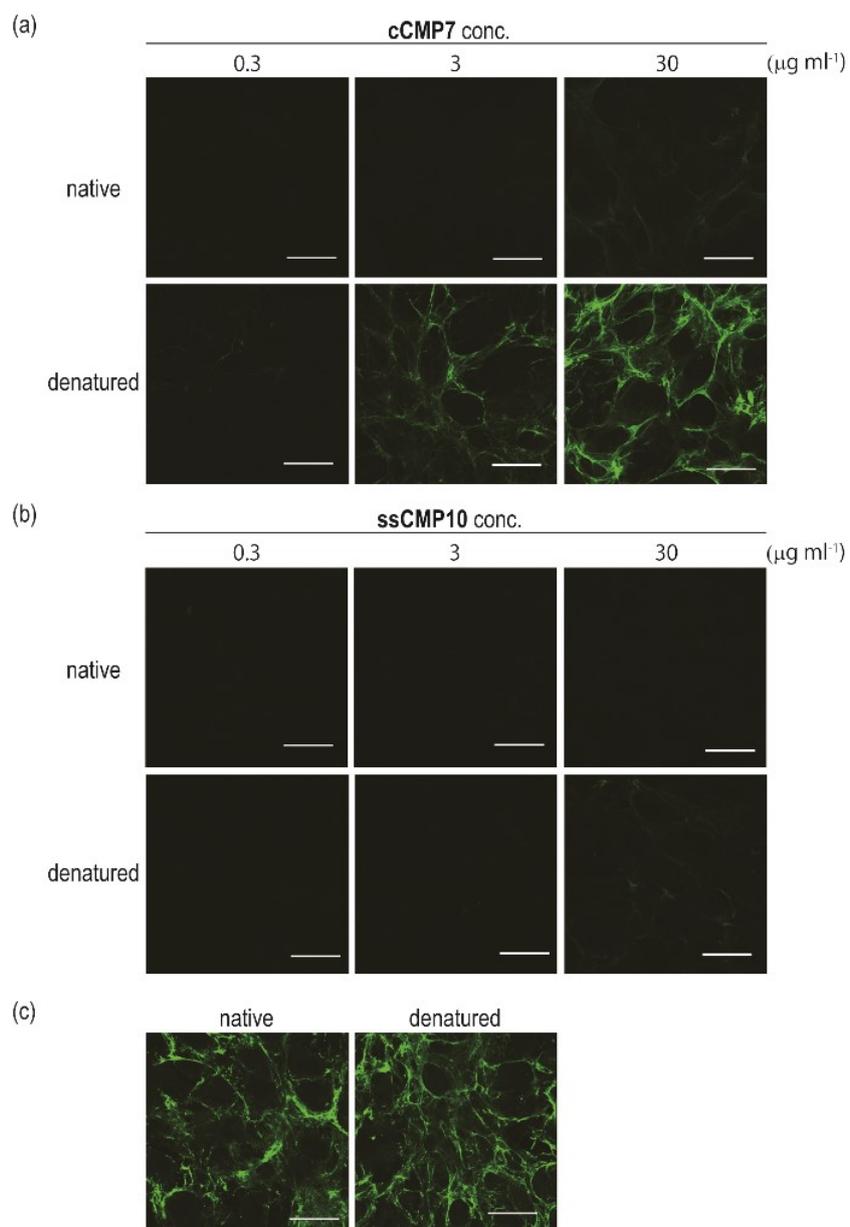


Figure 2-6. MEF から分泌されたコラーゲン線維の検出

(a) 蛍光標識 cCMP7、(b) 蛍光標識 ssCMP10、(c) 抗 I 型コラーゲン抗体を用いて、ネイティブなコラーゲンおよび熱処理によって変性させたコラーゲンを検出した。スケールバーは 50 μm。

## 2.6. cCMP を用いた細胞内プロコラーゲンの蛍光染色

cCMP を用いることで細胞内のプロコラーゲンの検出が可能なのかを調べるために、FAM 標識した cCMP7 または抗 I 型コラーゲン抗体を用いて、固定および膜透過処理した MEF 内部のプロコラーゲンを染色した。cCMP7 の蛍光は ER 染色のために用いた抗 KDEL 抗体の蛍光と重なっていた (Figure 2-7a)。一方で、抗 I 型コラーゲン抗体を用いるとその蛍光は Golgi 体染色に用いた抗 GM130 抗体のシグナルと重なった (Figure 2-7b)。

この結果は、cCMP7 と抗 I 型コラーゲン抗体によるプロコラーゲンの認識の仕方が異なっていることを示している。プロコラーゲンは ER 内腔で 3 重らせん構造を形成したのち、Golgi 体に輸送される。そのため、cCMP7 は抗コラーゲン抗体ではほとんど検出できない、ER 内腔におけるプロコラーゲンフォールディング中間体の 1 本鎖部分に特異的に結合したものと考えられる。

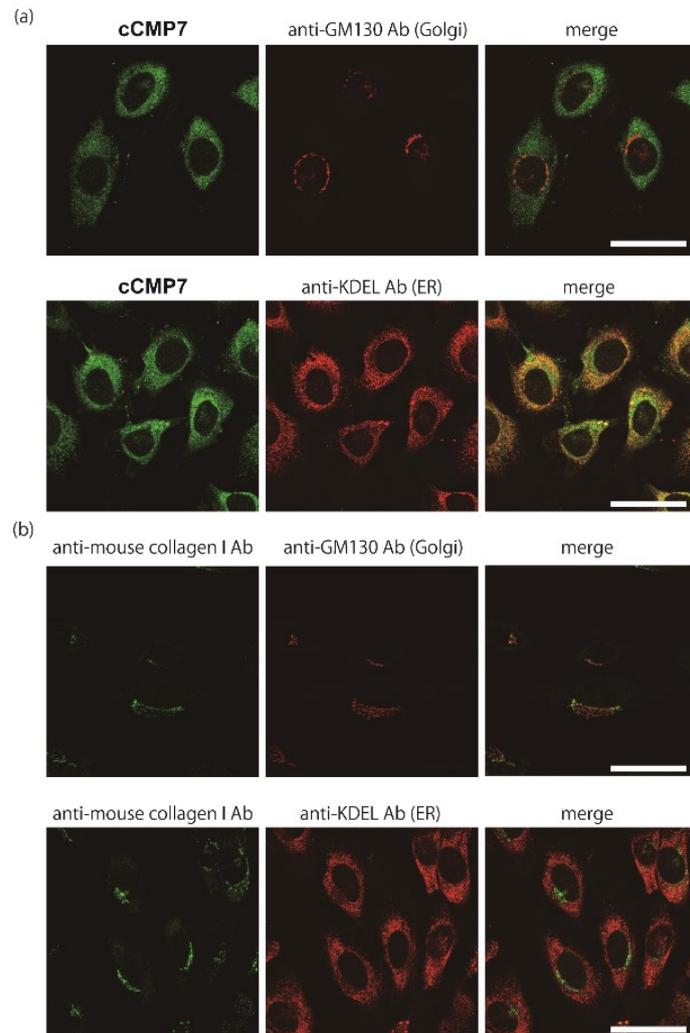


Figure 2-7. MEF 内部のプロコラーゲンの検出

(a) 蛍光標識 cCMP7 (30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; green) または (b) 抗 I 型コラーゲン抗体 (1:100 dilution; green) を抗 GM130 抗体 (Golgi 体マーカー; red) または抗 KDEL 抗体 (ER マーカー; red) と用いることで、透過処理した細胞内部のプロコラーゲンと ER または Golgi 体の二重染色を行った。スケールバーは 50  $\mu\text{m}$ 。

## 2.7. MD シミュレーション

cCMP の変性コラーゲンに対する親和性が、ssCMP のそれよりも高い理由を調べるため、Ac-(Pro-4-Hyp-Gly)<sub>7</sub>-NH<sub>2</sub> と cCMP7、bCMP7 または ssCMP7 のハイブリッド 3 重らせんをモデル化した。これらのモデルで、3 重らせんが形成されている場合とほどけている場合のエネルギー差 ( $\Delta G_{\text{bind}}$  score) を molecular dynamics (MD) 法により *in silico* で予測したところ、 $\Delta G_{\text{bind}}$  score は cCMP7 のハイブリッド 3 重らせんで最も小さかった [ $\Delta G_{\text{bind}}$ (ssCMP): -128.6 kcal/mol;  $\Delta G_{\text{bind}}$ (bCMP): -138.90 kcal/mol;  $\Delta G_{\text{bind}}$ (cCMP): -147.43 kcal/mol] (Table 2-2)。cCMP は、bCMP や ssCMP よりもコラーゲンの変性部分と安定なハイブリッド 3 重らせんを形成することが示唆された。

Table 2-2. 3 重らせん構造における ssCMP7 の結合自由エネルギーの予測値

Combination	Peptides	$\Delta G_{\text{bind}}$ score (kcal/mol)
1	<b>ssCMP7</b>	-128.66 ± 1.91
2	<b>bCMP7</b>	-138.90 ± 3.86
3	<b>cCMP7</b>	-147.43 ± 1.91

## 2.8. 使用直前の加熱処理を必要としない cCMP の開発

cCMP7 は ssCMP 同様、自己集合により変性コラーゲン結合能を失うため、使用直前の加熱処理が必要である (Figure 2-4)。そこで、cCMP7 の自己集合を抑制するために、環状骨格の変形を期待してペプチド鎖長の異なる 2 つの CMP を環化し、さらに電荷によるペプチド鎖間の反発を期待して荷電アミノ酸を組み込むことにした。

新たな cCMP の基本骨格は strand-offset cCMP6-7 (soCMP6-7) とし、そこに Glu 残基を 2 つまたは 4 つ組み込んだ cCMP を合成した (Table 2-3)。ペプチド鎖は Fmoc 固相合成により構築し、Fmoc-Lys[N- $\epsilon$ -4-methyltrityl (Mtt)]-OH を用いることで、Mtt 基の選択的な脱保護による枝分かれ構造を導入した (Figure 2-8)。N 末端をアセチル化したのち、脱保護カクテル (TFA:H<sub>2</sub>O:*m*-cresol:thioanisole:EDT = 82.5:5:5:5:2.5, v/v) を用いて、ペプチド鎖を樹脂から切り出した。さらに、ヨウ素酸化により N 末端の Cys(Acm) 残基間をジスルフィド架橋することでペプチドを環化した。

Table 2-3. soCMP の構造

Peptide	Sequence
<b>soCMP6-7</b>	$\begin{array}{c} \text{Ac-C-(POG)}_6 \\   \\ \text{Ac-C-(POG)}_7\text{-K-YK-amide} \end{array}$
<b>soCMP6-7(Glu)2</b>	$\begin{array}{c} \text{Ac-C-(POG)}_2\text{-}\underline{\text{E}}\text{OG-(POG)}_3 \\   \\ \text{Ac-C-(POG)}_2\text{-}\underline{\text{E}}\text{OG-(POG)}_4\text{-K-YK-amide} \end{array}$
<b>soCMP6-7(Glu)4</b>	$\begin{array}{c} \text{Ac-C-(POG)}_2\text{-}\underline{\text{E}}\text{O}\underline{\text{G}}\underline{\text{E}}\text{OG-(POG)}_2 \\   \\ \text{Ac-C-(POG)}_2\text{-}\underline{\text{E}}\text{O}\underline{\text{G}}\underline{\text{E}}\text{OG-(POG)}_3\text{-K-YK-amide} \end{array}$

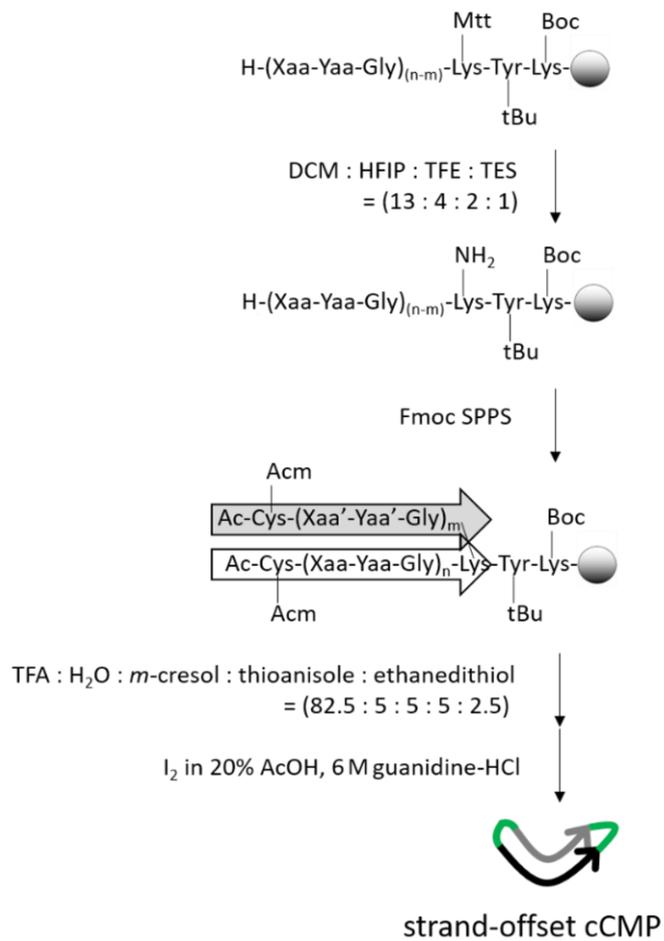


Figure 2-8. soCMP の合成スキーム

soCMP の合成スキームを示した。(m = 6, n = 7)

## 2.9. ELISA による soCMP と変性コラーゲンの親和性評価

soCMP が使用直前の熱処理なしに変性コラーゲン結合能をもつのかを明らかにするために、ビオチン標識 soCMP を用いて ELISA を行うことで、熱変性させた I 型コラーゲンに対する結合能を評価した。直前に加熱した soCMP は、cCMP7 と同程度の結合を示した (Figure 2-9)。加熱処理を行わなかった soCMP の変性コラーゲン結合能は、4°C においては Glu 残基の数が増加するにつれて高くなった (Figure 2-9a)。しかし、soCMP6-7(Glu)4 の変性コラーゲン結合能は、温度が高くなるにつれて cCMP7 と比較して低くなった (Figures 2-9b, c)。また、soCMP6-7(Glu)2 は soCMP6-7 と soCMP6-7(Glu)4 の中間の性質を示した。これらの結果は、使用する温度によって最適な cCMP が異なっていることを示している。

さらに、CD スペクトル測定を行うことで、ペプチドのコンフォメーション解析を行ったところ、soCMP は 4°C で自己集合して 3 重らせんを形成していることが明らかになった (Figure 2-10a)。自己集合体の熱安定性は、Glu 残基の数が増えるにつれて低下し、 $T_m$  は cCMP7 が 60°C、soCMP6-7(Glu)2 が 41°C、soCMP6-7(Glu)4 が 27°C であった (Figure 2-10b)。

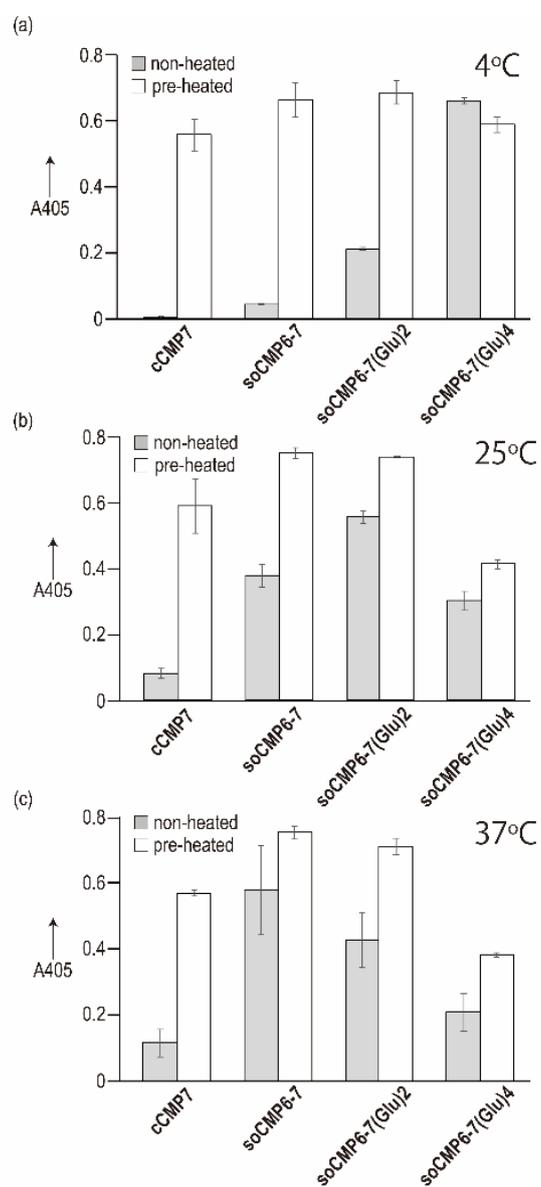


Figure 2-9. ELISA による soCMP と変性コラーゲンの結合評価

(a) 4°C、(b) 25°C、(c) 37°C における soCMP (5 µg/mL) の熱変性コラーゲンへの結合を評価した。ペプチドは直前に熱処理したもの (white) としていないもの (gray) を使用した。

Means ± SD (n = 3)。

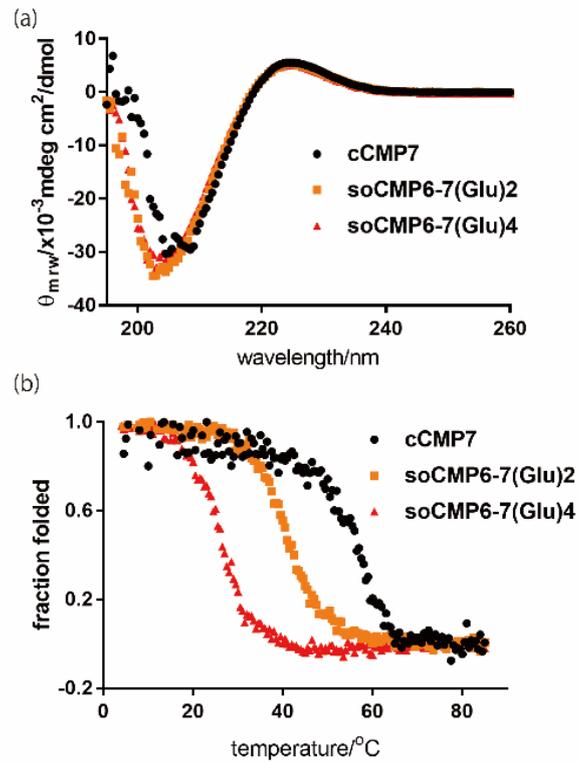


Figure 2-10. soCMP の CD スペクトルおよび 3 重らせんの熱融解曲線

(a) cCMP7 (black)、soCMP6-7(Glu)2 (orange)、soCMP6-7(Glu)4 (red) の 4°C における CD スペクトルを示した。(b) cCMP7 (black)、soCMP6-7(Glu)2 (orange)、soCMP6-7(Glu)4 (red) 溶液の温度を上昇させながら 225 nm における CD シグナルを測定することで熱融解曲線を得た。

## 2.10. 考察

本章では、Pro-4-Hyp-Gly 繰り返し配列をもつ 2 本の平行なペプチド鎖の両末端を共有結合的に結束することで、変性コラーゲンを高感度に検出できる新規化合物 cCMP7 を開発した。ELISA、western blotting の結果から、cCMP7 の変性コラーゲン結合能はこれまで報告されていた ssCMP よりも 100 倍程度高いことが示された (Figures 2-4, 5)。Western blotting では I から V 型の全てのコラーゲンを検出できたことから、cCMP7 はコラーゲンが共通してもつ Gly-X-Y の繰り返し配列を認識していると考えられる。さらに、cCMP7 を蛍光染色に利用することで、コラーゲン 3 重らせんの変性の度合いを評価できること (Figure 2-6)、抗体では可視化できなかった ER 内の変性コラーゲンやフォールディング中間体の検出が可能になることを示した (Figure 2-7)。また、MD シミュレーションの結果から、cCMP は他の 2 種類の CMP デザインよりも変性コラーゲンと安定な複合体を形成することが示唆された (Table 2-2)。これらの結果は、cCMP が変性したコラーゲンを *in vitro* で検出するための有用なツールであることを示している。

しかしながら、ssCMP 同様、cCMP も水溶液中で自己集合して 3 重らせんを形成し、コラーゲン結合能を失ってしまうため、使用直前に加熱する必要がある。そこで、cCMP の構造改変を行うことで、使用直前の加熱処理を必要とせず室温付近で cCMP7 と同程度の変性コラーゲン結合能をもつ soCMP6-7(Glu)2 を開発した。得られた CMP はコラーゲンの変性を伴う疾患の診断や病巣への薬物送達など、*in vivo* への応用も期待できる。

## 2.11. 第2章に関する実験

### ペプチドの合成

ペプチド鎖は、Rink amide 樹脂 (Novabiochem, San Diego, CA, USA) を用いて Fmoc 固相法により構築した。アミノ酸を縮合する際は、DMF (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) 中で Fmoc-アミノ酸 (5 当量; Novabiochem) を *N,N'*-diisopropylcarbodiimide (DIC; 5 当量; Fujifilm Wako Pure Chemical, Osaka, Japan) と 1-hydroxybenzotriazole (HOBt; 5 当量; Fujifilm Wako Pure Chemical) の存在下で 2 時間反応させた。Fmoc-Pro-4-Hyp-Gly-OH (3 当量) は DMF 中、DIC (3 当量) および HOBt (3 当量) の存在下で 2 時間反応させた。Fmoc 基の脱保護は 30% (v/v) piperidine (Fujifilm Wako Pure Chemical)/DMF で 15 分間処理することで行った。さらに、無水酢酸 (20 当量; Fujifilm Wako Pure Chemical) とピリジン (20 当量; Fujifilm Wako Pure Chemical) を加えた DMF で 1 時間処理することで、N 末端をアセチル化した。その後、ペプチド樹脂を TFA (Nacalai Tesque):H<sub>2</sub>O:*m*-cresol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA):thioanisole (Tokyo Chemical Industry, Tokyo, Japan):EDT (Sigma-Aldrich) = 82.5:5:5:5:2.5 (v/v) 中、室温で 2 時間処理することにより樹脂からペプチド鎖を切り離した。

cCMP の環化の際は、ペプチドを 60°C の 80% (v/v) 酢酸 (Fujifilm Wako Pure Chemical)/H<sub>2</sub>O 中 (cCMP4-6)、または 6 M guanidine を加えた 20% (v/v) 酢酸/H<sub>2</sub>O 中 (cCMP7-9) で 2 時間、ヨウ素処理を行った。ヨウ素を過剰なアスコルビン酸でクエンチしたのち、0.05% (v/v) TFA/H<sub>2</sub>O を移動相に用いてサイズ排除クロマトグラフィー (Sephadex G-25; GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) を行うことで cCMP を分離した。

得られた粗ペプチドは、移動相に 0.05% (v/v) TFA/CH<sub>3</sub>CN (Honeywell, Morris Plains, NJ, USA) と 0.05% (v/v) TFA/H<sub>2</sub>O を用いて、60°C で RP-HPLC によって精製した。カラムには Cosmosil 5C<sub>18</sub>-AR-II (20 mm × 250 mm, Nacalai Tesque) を用いた。

ビオチン標識は、精製 CMP を NHS-PEG4-Biotin (3 当量; Thermo Fisher Scientific, Waltham,

MA, USA) を含んだ 20 mM NaHCO<sub>3</sub> 溶液で処理したのち、0.05% (v/v) TFA/H<sub>2</sub>O を移動相としてサイズ排除クロマトグラフィー (Sephadex G-25) を行うことで達成した。

蛍光標識は、精製した CMP を 5-FAM, succinimidyl ester (3 当量; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を含んだ 20 mM NaHCO<sub>3</sub> 溶液で処理したのち、10 ppm アンモニア (Fujifilm Wako Pure Chemical) を含む H<sub>2</sub>O を移動相としてサイズ排除クロマトグラフィー (Sephadex G-25) を行うことで達成した。蛍光標識ペプチドは、上記のように RP-HPLC で精製した。

合成したペプチドは、移動相に 0.05% (v/v) TFA/CH<sub>3</sub>CN と 0.05% (v/v) TFA/H<sub>2</sub>O を用いて 60°C で RP-HPLC 分析を行った (Figure 2-11)。カラムには Cosmosil 5C<sub>18</sub>-AR-II (4.6 mm × 250 mm, Nacalai Tesque) を用いた。質量分析は、Autoflex III matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS; Bruker Daltonics, Leipzig, Germany) または micrOTOF electrospray ionization mass spectrometry (ESI MS; Bruker Daltonics) で行った (Table 2-4)。

Table 2-4. 合成ペプチドの質量分析

Peptide	Sequence	Found <i>m/z</i>	Calcd.
<b>ssCMP6</b>	Ac-(POG) <sub>6</sub> -Ahx-YK-amide	2066.834 <sup>[a]</sup>	2067.015 <sup>[c]</sup>
<b>ssCMP8</b>	Ac-(POG) <sub>8</sub> -Ahx-YK-amide	2601.251 <sup>[a]</sup>	2601.258 <sup>[c]</sup>
<b>ssCMP10</b>	Ac-(POG) <sub>10</sub> -Ahx-YK-amide	3135.553 <sup>[a]</sup>	3135.501 <sup>[c]</sup>
<b>bCMP4</b>	[Ac-(POG) <sub>4</sub> -Ahx] <sub>2</sub> -KYK-amide	2884.383 <sup>[a]</sup>	2884.447 <sup>[c]</sup>
<b>bCMP5</b>	[Ac-(POG) <sub>5</sub> -Ahx] <sub>2</sub> -KYK-amide	3418.733 <sup>[a]</sup>	3418.690 <sup>[c]</sup>
<b>bCMP6</b>	[Ac-(POG) <sub>6</sub> -Ahx] <sub>2</sub> -KYK-amide	3952.598 <sup>[a]</sup>	3952.993 <sup>[c]</sup>
<b>bCMP7</b>	[Ac-(POG) <sub>7</sub> -Ahx] <sub>2</sub> -KYK-amide	4486.887 <sup>[a]</sup>	4487.176 <sup>[c]</sup>
<b>bCMP8</b>	[Ac-(POG) <sub>8</sub> -Ahx] <sub>2</sub> -KYK-amide	1674.440 <sup>[b]</sup>	1674.478 <sup>[c]</sup>
<b>bCMP9</b>	[Ac-(POG) <sub>9</sub> -Ahx] <sub>2</sub> -KYK-amide	1852.501 <sup>[b]</sup>	1852.559 <sup>[c]</sup>
<b>cCMP4</b>	[Ac- <u>C</u> -Ahx-(POG) <sub>4</sub> -Ahx] <sub>2</sub> -KYK-amide	3314.770 <sup>[a]</sup>	3314.618 <sup>[c]</sup>
<b>cCMP5</b>	[Ac- <u>C</u> -Ahx-(POG) <sub>5</sub> -Ahx] <sub>2</sub> -KYK-amide	3848.487 <sup>[a]</sup>	3848.861 <sup>[c]</sup>
<b>cCMP6</b>	[Ac- <u>C</u> -Ahx-(POG) <sub>6</sub> -Ahx] <sub>2</sub> -KYK-amide	4382.730 <sup>[a]</sup>	4383.104 <sup>[c]</sup>
<b>cCMP7</b>	[Ac- <u>C</u> -Ahx-(POG) <sub>7</sub> -Ahx] <sub>2</sub> -KYK-amide	4917.449 <sup>[a]</sup>	4917.347 <sup>[c]</sup>
<b>cCMP8</b>	[Ac- <u>C</u> -Ahx-(POG) <sub>8</sub> -Ahx] <sub>2</sub> -KYK-amide	1817.963 <sup>[b]</sup>	1817.868 <sup>[c]</sup>
<b>cCMP9</b>	[Ac- <u>C</u> -Ahx-(POG) <sub>9</sub> -Ahx] <sub>2</sub> -KYK-amide	1995.974 <sup>[b]</sup>	1995.949 <sup>[c]</sup>
<b>Bio-ssCMP6</b>	Ac-(POG) <sub>6</sub> -Ahx-YK(Biotin)-amide	2562.144 <sup>[b]</sup>	2562.216 <sup>[d]</sup>
<b>Bio-ssCMP8</b>	Ac-(POG) <sub>8</sub> -Ahx-YK(Biotin)-amide	3096.138 <sup>[a]</sup>	3096.459 <sup>[d]</sup>
<b>Bio-ssCMP10</b>	Ac-(POG) <sub>10</sub> -Ahx-YK(Biotin)-amide	3630.332 <sup>[a]</sup>	3630.702 <sup>[d]</sup>
<b>Bio-bCMP4</b>	[Ac-(POG) <sub>4</sub> -Ahx] <sub>2</sub> -KYK(Biotin)-amide	3379.319 <sup>[a]</sup>	3379.648 <sup>[d]</sup>
<b>Bio-bCMP5</b>	[Ac-(POG) <sub>5</sub> -Ahx] <sub>2</sub> -KYK(Biotin)-amide	3913.516 <sup>[a]</sup>	3913.891 <sup>[d]</sup>
<b>Bio-bCMP6</b>	[Ac-(POG) <sub>6</sub> -Ahx] <sub>2</sub> -KYK(Biotin)-amide	4448.047 <sup>[a]</sup>	4448.134 <sup>[d]</sup>
<b>Bio-bCMP7</b>	[Ac-(POG) <sub>7</sub> -Ahx] <sub>2</sub> -KYK(Biotin)-amide	1654.153 <sup>[b]</sup>	1654.137 <sup>[c]</sup>

Table 2-4. Continued.

Peptide	Sequence	Found $m/z$	Calcd.
<b>Bio-bCMP8</b>	[Ac-(POG) <sub>8</sub> -Ahx] <sub>2</sub> -KYK(Biotin)-amide	1832.330 <sup>[b]</sup>	1832.218 <sup>[e]</sup>
<b>Bio-bCMP9</b>	[Ac-(POG) <sub>9</sub> -Ahx] <sub>2</sub> -KYK(Biotin)-amide	1507.788 <sup>[b]</sup>	1507.976 <sup>[f]</sup>
<b>Bio-cCMP4</b>	[Ac- <u>C</u> -Ahx-(POG) <sub>4</sub> -Ahx] <sub>2</sub> -KYK(Biotin)-amide	3787.600 <sup>[a]</sup>	3787.834 <sup>[e]</sup>
<b>Bio-cCMP5</b>	[Ac- <u>C</u> -Ahx-(POG) <sub>5</sub> -Ahx] <sub>2</sub> -KYK(Biotin)-amide	4322.615 <sup>[a]</sup>	4322.079 <sup>[e]</sup>
<b>Bio-cCMP6</b>	[Ac- <u>C</u> -Ahx-(POG) <sub>6</sub> -Ahx] <sub>2</sub> -KYK(Biotin)-amide	1214.847 <sup>[b]</sup>	1214.836 <sup>[f]</sup>
<b>Bio-cCMP7</b>	[Ac- <u>C</u> -Ahx-(POG) <sub>7</sub> -Ahx] <sub>2</sub> -KYK(Biotin)-amide	1797.543 <sup>[b]</sup>	1797.527 <sup>[e]</sup>
<b>Bio-cCMP8</b>	[Ac- <u>C</u> -Ahx-(POG) <sub>8</sub> -Ahx] <sub>2</sub> -KYK(Biotin)-amide	1975.695 <sup>[b]</sup>	1975.608 <sup>[e]</sup>
<b>Bio-cCMP9</b>	[Ac- <u>C</u> -Ahx-(POG) <sub>9</sub> -Ahx] <sub>2</sub> -KYK(Biotin)-amide	1615.437 <sup>[b]</sup>	1615.519 <sup>[f]</sup>
<b>FAM-ssCMP10</b>	Ac-(POG) <sub>10</sub> -Ahx-YK(FAM)-amide	1165.239 <sup>[b]</sup>	1165.188 <sup>[e]</sup>
<b>FAM-cCMP7</b>	[Ac- <u>C</u> -Ahx-(POG) <sub>7</sub> -Ahx] <sub>2</sub> -KYK(FAM)-amide	1759.225 <sup>[b]</sup>	1759.173 <sup>[e]</sup>
<b>soCMP6-7</b>	$\begin{array}{c} \text{Ac-C-(POG)}_6 \\   \quad \backslash \\ \text{Ac-C-(POG)}_7\text{-K-YK-amide} \end{array}$	1400.023 <sup>[b]</sup>	1399.969 <sup>[e]</sup>
<b>soCMP6-7 (Glu)2</b>	$\begin{array}{c} \text{Ac-C-(POG)}_2\text{-EOG-(POG)}_3 \\   \quad \backslash \\ \text{Ac-C-(POG)}_2\text{-EOG-(POG)}_4\text{-K-YK-amide} \end{array}$	1421.355 <sup>[b]</sup>	1421.295 <sup>[g]</sup>
<b>soCMP6-7 (Glu)4</b>	$\begin{array}{c} \text{Ac-C-POG-(POGEOG)}_2\text{-POG} \\   \quad \backslash \\ \text{Ac-C-POG-(POGEOG)}_2\text{-(POG)}_2\text{-K-YK-amide} \end{array}$	1442.678 <sup>[b]</sup>	1442.622 <sup>[g]</sup>
<b>Bio-soCMP6-7</b>	$\begin{array}{c} \text{Ac-C-(POG)}_6 \\   \quad \backslash \\ \text{Ac-C-(POG)}_7\text{-K-YK(Biotin)-amide} \end{array}$	1557.762 <sup>[b]</sup>	1557.708 <sup>[e]</sup>
<b>Bio-soCMP6-7 (Glu)2</b>	$\begin{array}{c} \text{Ac-C-(POG)}_2\text{-EOG-(POG)}_3 \\   \quad \backslash \\ \text{Ac-C-(POG)}_2\text{-EOG-(POG)}_4\text{-K-YK(Biotin)-amide} \end{array}$	1579.100 <sup>[b]</sup>	1579.035 <sup>[g]</sup>
<b>Bio-soCMP6-7 (Glu)4</b>	$\begin{array}{c} \text{Ac-C-POG-(POGEOG)}_2\text{-POG} \\   \quad \backslash \\ \text{Ac-C-POG-(POGEOG)}_2\text{-(POG)}_2\text{-K-YK(Biotin)-amide} \end{array}$	1600.428 <sup>[b]</sup>	1600.361 <sup>[g]</sup>
<b>FAM-soCMP6-7 (Glu)2</b>	$\begin{array}{c} \text{Ac-C-(POG)}_2\text{-EOG-(POG)}_3 \\   \quad \backslash \\ \text{Ac-C-(POG)}_2\text{-EOG-(POG)}_4\text{-K-YK(FAM)-amide} \end{array}$	1540.768 <sup>[b]</sup>	1540.644 <sup>[e]</sup>

<sup>[a]</sup>MALDI-TOF MS で測定 <sup>[b]</sup>ESI-MS で測定 <sup>[c]</sup>[M<sub>m</sub> + H]<sup>+</sup> <sup>[d]</sup>[M<sub>m</sub> + Na]<sup>+</sup> <sup>[e]</sup>[M<sub>m</sub> + 3H]<sup>3+</sup>/3 <sup>[f]</sup>[M<sub>m</sub> + 4H]<sup>4+</sup>/4

<sup>[g]</sup>[M<sub>m</sub> - 3H]<sup>3+</sup>/3. C は半シスチンを示す。

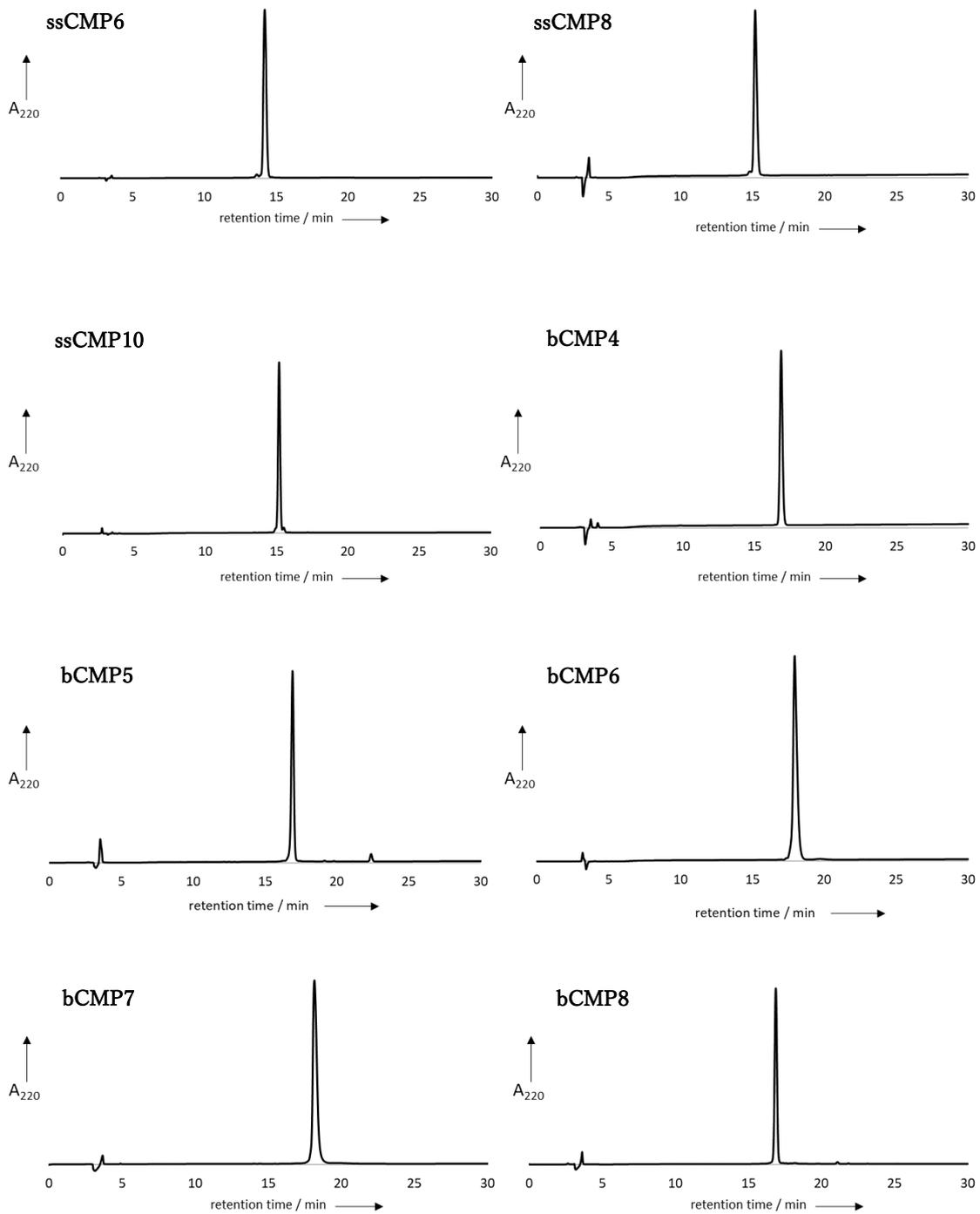


Figure 2-11. 合成 CMP の RP-HPLC 分析

0.05% (v/v) TFA を含む 10%–30% CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O の直線濃度勾配を 30 分間でかけてペプチドを溶出した。温度は 60°C、検出波長は 220 nm とした。

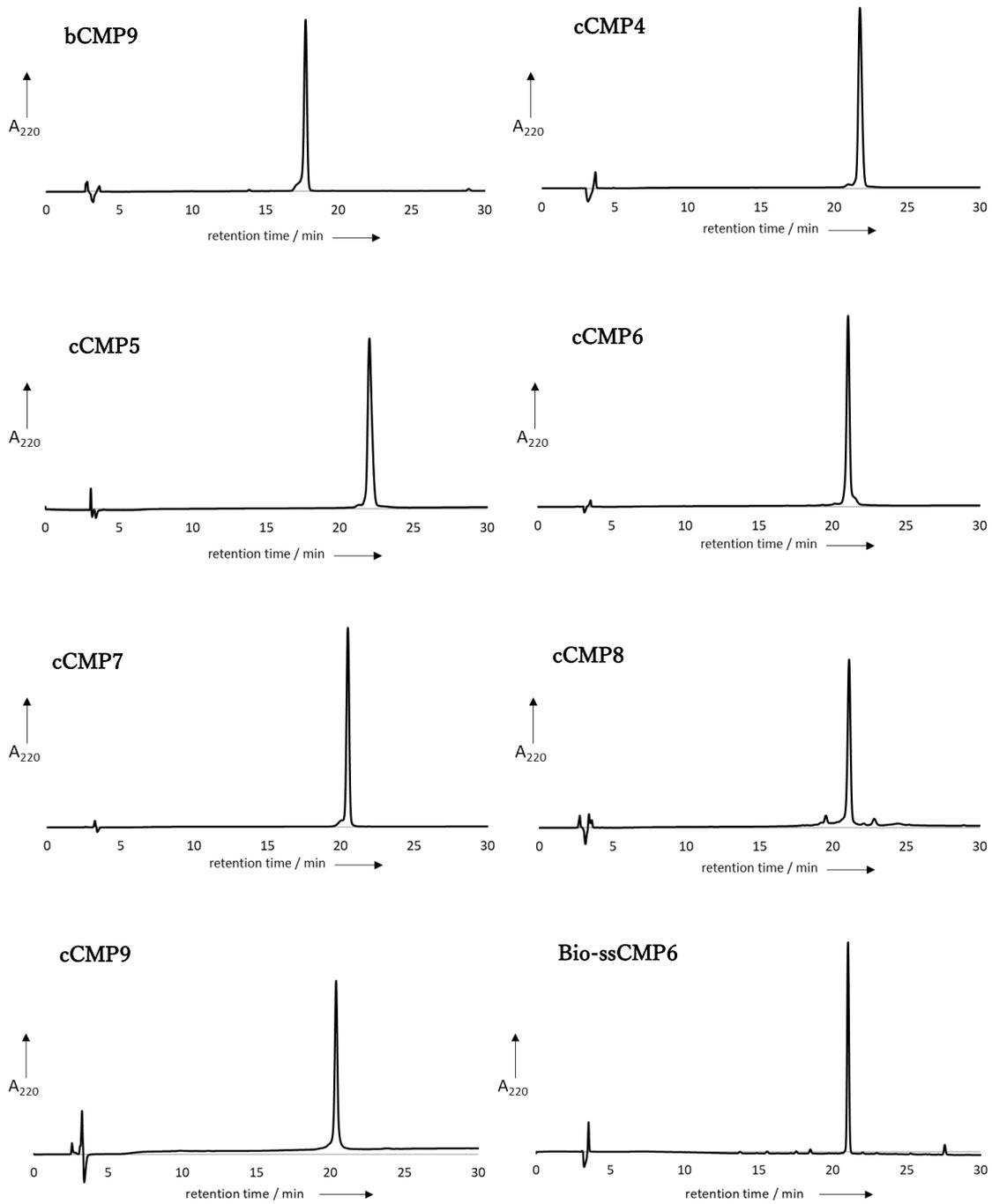


Figure 2-11. *Continued.*

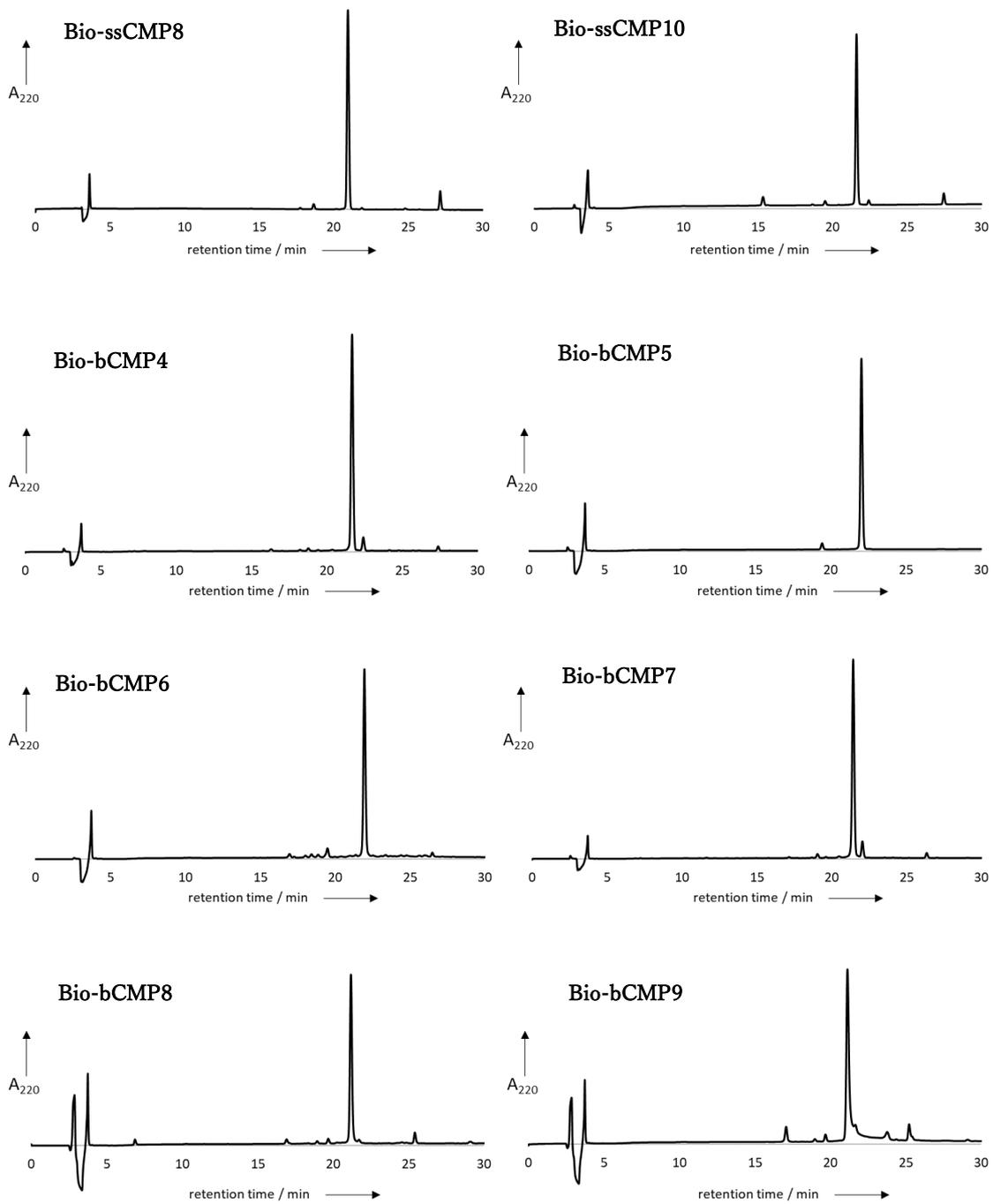


Figure 2-11. *Continued.*

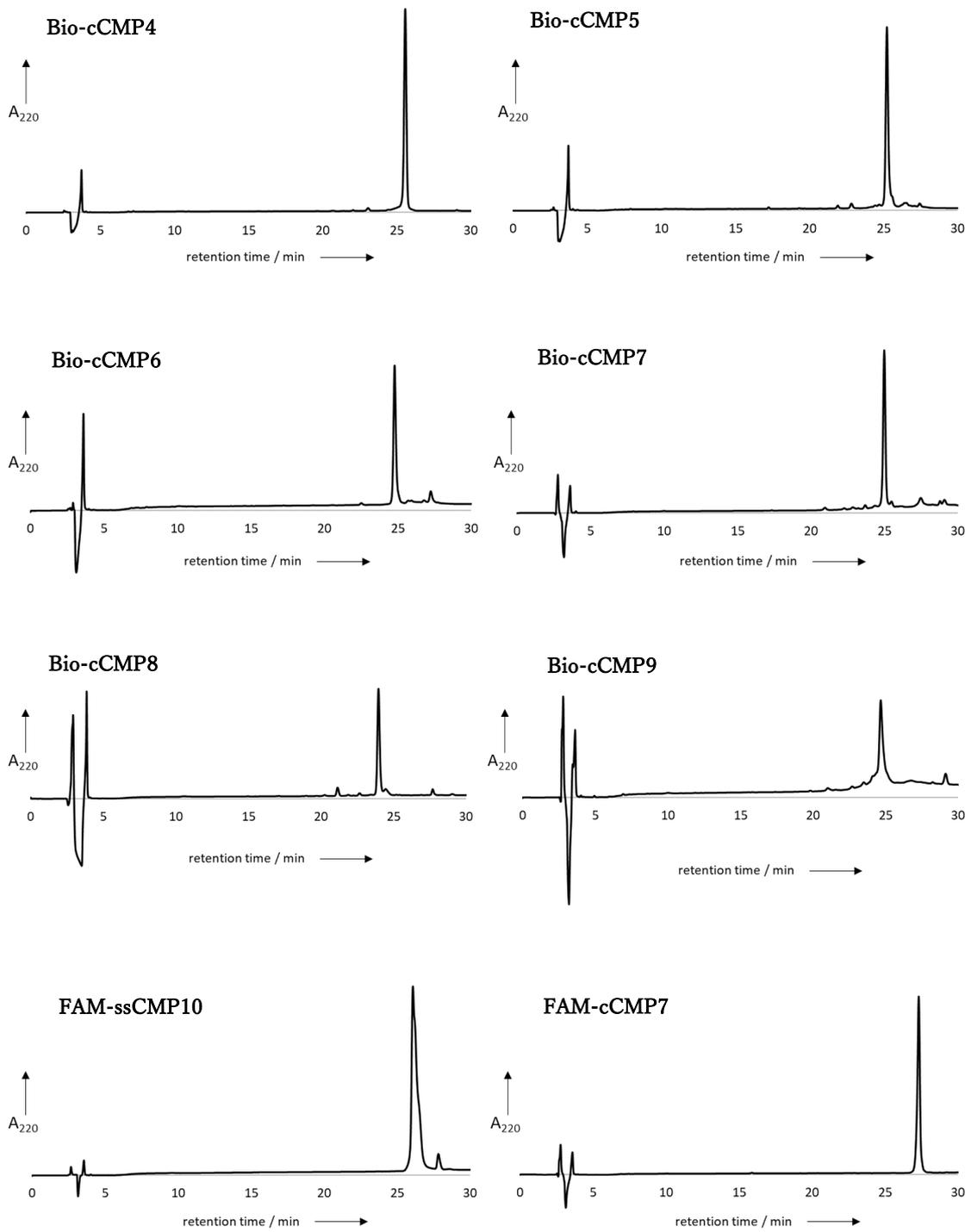


Figure 2-11. *Continued.*

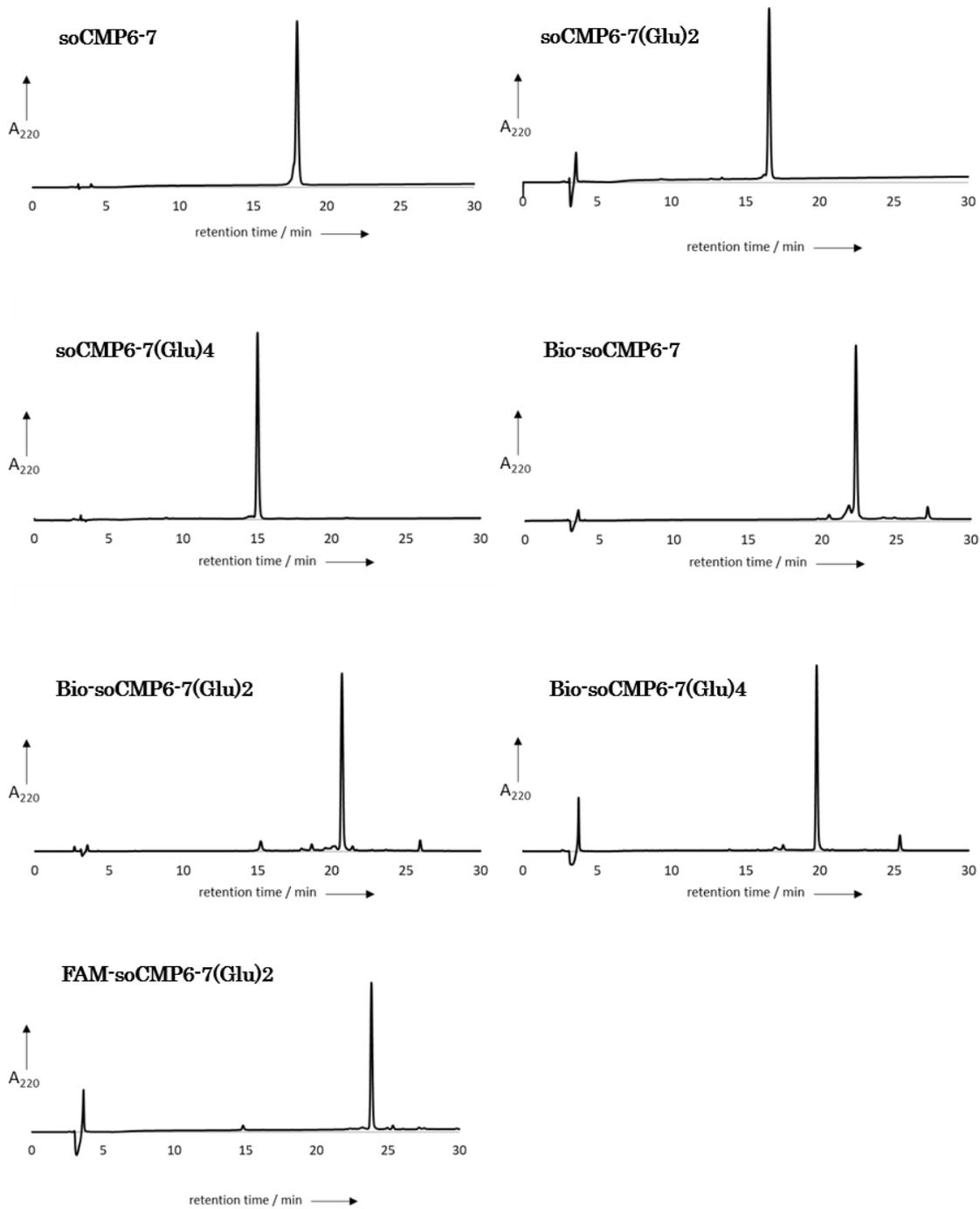


Figure 2-11. *Continued.*

## CD 測定

CD 測定は、0.5 mm 石英キュベットを用いて、ペルチェ式温度調節器を備えた J-820 CD 分光計 (Jasco, Tokyo, Japan) により行った。CMP を PBS に溶解し (0.5 mg/mL)、4、37 および 85°C の CD スペクトルを測定した (Figure 2-12)。Figure 2-10 では、1 mg/mL となるように CMP を PBS に溶解した。測定には、95°C で 5 分間加熱後に室温で 10 分間冷却し、さらに 4°C で少なくとも 12 時間静置した CMP 溶液を使用した。CD シグナルの強度はペプチドの (X-Y-Gly)<sub>n</sub> 部分の平均残基モル楕円率に変換した。また、225 nm の CD シグナルを 4°C から 85°C まで温度を上昇 (18°C/h) させながら測定し、それを正規化して fraction folded とすることで熱融解曲線を得た。熱融解曲線において最も傾きが大きい温度を  $T_m$  とした。

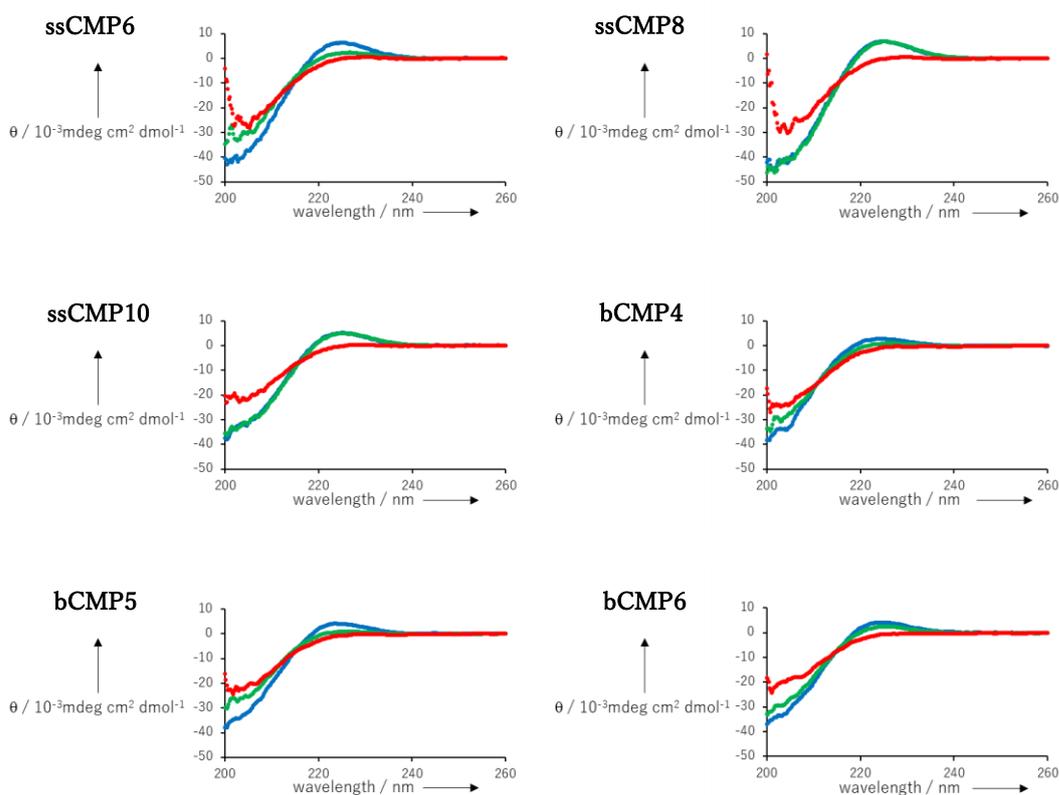


Figure 2-12. 4°C (blue)、37°C (green)、85°C (red) における CMP の CD スペクトル

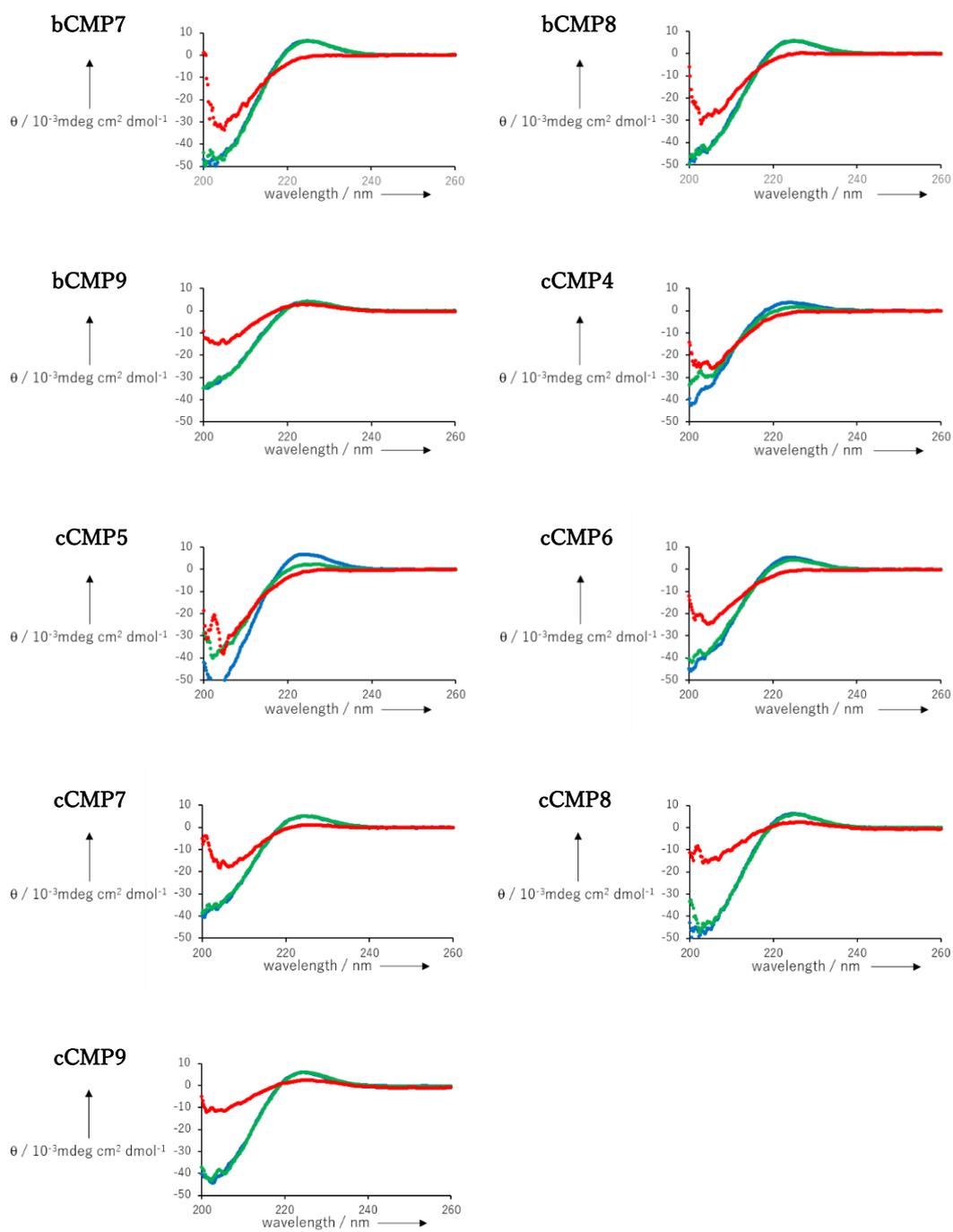


Figure 2-12. *Continued.*

## ELISA

ビオチン標識 CMP は、PBS に溶解して 95°C で 5 分間加熱したのち室温で 10 分間静置し、その後 4°C で少なくとも 12 時間静置することでアニーリングを行った。ペプチドの熱処理は、アニーリングした CMP を使用直前に 95°C で 5 分間加熱し、氷上で 1 分間冷却することで行った。I 型コラーゲン (AteloCell I-PC; KOKEN, Tokyo, Japan) 溶液を 10 mM 酢酸/H<sub>2</sub>O により 10 µg/mL に希釈し、4°C または 95°C で 5 分間処理することで、ネイティブ I 型コラーゲン溶液と熱変性 I 型コラーゲン溶液をそれぞれ作製した。各コラーゲン溶液を 96 ウェルマイクロプレート (Thermo Fisher Scientific) に 50 µL ずつ添加して静置することで、ウェルにネイティブコラーゲンあるいは変性コラーゲンをコートした。0.5% スキムミルクを加えた ELISA バッファー [20 mM 2-hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid (HEPES)-Na (pH 7.5), 100 mM NaCl, 0.005% Tween-20] を用いて 1 時間室温でブロッキングしたのち、ビオチン標識 CMP 溶液中 4°C、25°C または 37°C で 1 時間反応させた。ELISA バッファーで洗浄した後、4°C で horseradish peroxidase (HRP) 標識ストレプトアビジン (1:3000 dilution; Thermo Fisher Scientific) 処理を 30 分間行い、その後さらに ELISA バッファーで洗浄した。0.5 mg/mL 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) と 0.05% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を含んだリン酸-クエン酸バッファー [0.2 M phosphate, 0.1 M citrate (pH 5.0)] 中、37°C で 10 分間反応させ、405 nm の吸光度を測定した。GraphPad Prism7 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) を用いて濃度依存性曲線をシグモイド曲線にフィッティングし、K<sub>D</sub> 値を算出した。

## 細胞培養

MEF は京都産業大学永田研究室より譲り受けた。細胞はコンフルエントに達したのち、100 U/mL ペニシリン-100 µg/mL ストレプトマイシン (Sigma-Aldrich)、200 µM L-アスコルビン酸リン酸エステルマグネシウム塩 n 水和物 (Fujifilm Wako Pure Chemical)、2% fetal bovine serum (FBS; Thermo Fisher Scientific) を添加した L-グルタミンおよびフェノールレッド含有

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; 低グルコース; Fujifilm Wako Pure Chemical) で 37°C、5% CO<sub>2</sub> 雰囲気下 3 日間培養し、各実験で使用した。

#### 細胞ライセートの作製

PBS で洗浄後、4°C にて溶解バッファー [50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1 µg/mL leupeptin, 1 µg/mL pepstatin A] で 15 分間処理することにより、MEF を溶解した。この溶液を遠心分離したのち上清を回収し、500 µg/mL コラゲナーゼ (Fujifilm Wako Pure Chemical) と 5 mM CaCl<sub>2</sub> を添加して 37°C で 5 分間反応させることで、コラゲナーゼ処理サンプルを作製した。

#### Western blotting

ビオチン標識 ssCMP10 と cCMP7 溶液は、使用直前に 95°C、5 分間の加熱処理を行った。検出感度試験には I 型コラーゲン (AteloCell I-PC; KOKEN) を、コラーゲンの型特異性試験には、分子量マーカー (Table 2-5; APRO Life Science Institute Inc., Tokushima, Japan) と混合した I 型コラーゲン、II 型コラーゲン (AteloCell CL-22; KOKEN)、III 型コラーゲン (AteloCell CL-23; KOKEN)、IV 型コラーゲン (Cellmatrix, Nitta Gelatin, Osaka, Japan) または V 型コラーゲン (AteloCell CL-25; KOKEN) を電気泳動サンプルとして使用した。MEF ライセート中のコラーゲン検出アッセイでは、200 mM 1,4-dithiothreitol (DTT) 処理により sodium dodecyl sulfate (SDS) サンプルを還元し、タンパク質量が 40 µg となるようにサンプルを各 well にロードした。8%ゲルを用いて SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) を行うことでタンパク質を分離し、その後ニトロセルロース膜 (GE Healthcare) に転写した。この膜を、5%スキムミルクを含む Tris-buffered saline [TBS; 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl] を用いて室温で 1 時間処理し、20 µg/mL ビオチン標識 ssCMP10、20 µg/mL ビオチン標識 cCMP7 または抗 I 型コラーゲンウサギポリクローナル抗体 (600-401-103-0.1; Rockland, Gilbertsville,

PA, USA) と 1 時間反応させた。MEF ライセート中のコラーゲン検出試験には、抗マウス I 型コラーゲンウサギポリクローナル抗体 (AB765P; Merck Millipore, Billerica, MA, USA) を使用した。ペプチドまたは抗体処理したニトロセルロース膜は、それぞれ alkaline phosphatase (AP) 標識ストレプトアビジン (1:2000 dilution; V5591; Promega, Madison, WI, USA) または AP 標識抗ウサギ IgG ヤギ抗体 (1:2000 dilution; sc-2034; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) と 30 分間反応させた。タンパク質の検出は、AP conjugate substitute kit (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA) を用いて行った。

Table 2-5 タンパク質マーカーの内容物

Protein	Molecular mass (kDa)	ng/2 $\mu$ L
myosin heavy chain	<b>227</b>	-
$\beta$ -galactosidase	<b>116</b>	88.0
phosphorylase B	<b>97.2</b>	84.0
bovine serum albumin	<b>66.4</b>	320
glutamate dehydrogenase	<b>55.6</b>	160
ovalbumin	<b>45.0</b>	192
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<b>35.7</b>	160
carbonic anhydrase II	<b>29.0</b>	120
soybean trypsin inhibitor A	<b>20.1</b>	144
lysozyme	<b>14.3</b>	144
aprotinin	<b>6.5</b>	200

## コラーゲンの蛍光染色

細胞外コラーゲン線維の染色の際には、細胞を室温の PBS で処理したサンプルとコラーゲンを熱変性させるために 95°C に熱した PBS をかけて 1 分間静置したサンプルの 2 種類を用意した。これらのサンプルを 4% パラホルムアルデヒド・りん酸緩衝液 (Fujifilm Wako Pure Chemical) で 15 分間固定したのち、3% BSA/PBS で 1 時間ブロッキングした。FAM 標識 ssCMP10、cCMP7、または抗 I 型コラーゲンウサギポリクローナル抗体で 1 時間処理し、さらに fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識抗ウサギ IgG ヤギ抗体 (65-6111; Thermo Fisher Scientific) で 30 分間処理した。PBS で洗浄した細胞は共焦点蛍光顕微鏡 (FLUOVIEW FV1000; Olympus, Tokyo, Japan) で観察した。

細胞内染色を行う際は、固定処理後の細胞を 0.5% Triton X-100/PBS で 5 分間透過処理した。3% bovine serum albumin (BSA)/PBS で 1 時間ブロッキングした後、抗マウス I 型コラーゲンウサギポリクローナル抗体 (1:100 dilution; AB765P; Merck Millipore) または、使用直前に 95°C で 5 分間熱したのち 1 分間氷で冷却した 30 µg/mL FAM 標識 cCMP7 を添加して、室温で 1 時間処理した。このとき、抗 GM130 マウスモノクローナル抗体 (BD Transduction Laboratories, San Jose, CA, USA) または抗 KDEL マウスモノクローナル抗体 (Enzo Life Science Inc, Farmingdale, NY, USA) も同時に添加した。その後、FITC 標識抗ウサギ IgG ヤギ抗体 (65-6111; Thermo Fisher Scientific) および Alexa Fluor 594 標識抗マウス IgG ヤギ抗体 (ab150116; Abcam, Cambridge, UK) と 30 分間反応させた。PBS で洗浄した細胞は共焦点蛍光顕微鏡により観察した。

## Molecular dynamics による結合自由エネルギーの予測

初期座標にコラーゲン 3 重らせん構造 (Protein Data Bank ID: 3B0S) を使用し、Ac-(Pro-4-Hyp-Gly)<sub>7</sub>-NH<sub>2</sub>(ssCMP7) と ssCMP7 2 本 (組み合わせ 1)、bcCMP7 1 本 (組み合わせ 2)、cCMP7 1 本 (組み合わせ 3) からなる 3 重らせん構造を Discovery Studio 3.1 (Accelrys, San Diego, CA,

USA) を用いて生成した。コラーゲンの 3 本の鎖 (leading, middle, trailing) は幾何学的に等価ではないため、組み合わせ 2 と 3 は配置の異なる 6 つの分子を用意した。これらの系のエネルギーを最小化することで構造を最適化し、主鎖に拘束をかけて平衡化後に、30 ns の MD シミュレーションを行った。MD シミュレーションは TSUBAME (東京工業大学学術国際情報センター) 上で Amber 16 プログラムパッケージを用いて行った。力場には Amber ff14SB force field および general AMBER force field を使用し、溶媒和の効果は GB/SA モデルを用いて計算した。SHAKE アルゴリズムを用い、タイムステップは 2 fs とした。カットオフは 999.9Å とし、温度は Berendsen 法を用いて 300K で一定に保った。

30 ns 時点の 3 重らせん構造における ssCMP7 鎖と他の 2 つの鎖の間の結合自由エネルギーは、エネルギー最小化後の結合構造と非結合構造の全自由エネルギーの差 ( $\Delta G_{\text{bind score}}$ ) を計算することによって予測した。各組み合わせにおける全分子の平均  $\Delta G_{\text{bind score}}$  を Table 2-2 に示した。

## 第3章 プロコラーゲンの3重らせん構造はHSP47によって安定化される

### 3.1. 緒言

プロコラーゲン特異的な分子シャペロン HSP47 は、約 47 kDa の HSP であり、脊椎動物の ER 内腔に局在する。構成的に発現しているが熱ストレスで発現が亢進する、ER において知られている唯一の HSP である。

HSP47 は、プロコラーゲンの3重らせん構造に特異的に結合する (Koide et al. 2000; Tasab et al. 2000)。少なくとも哺乳類において HSP47 がプロコラーゲンの生合成に必須であることは、HSP47 遺伝子ノックアウト研究により明らかにされた。マウスの HSP47 を欠損させると、コラーゲンの広範な異常が生じ、胎生致死となる (Nagai et al. 2000)。また、*hsp47* の劣性突然変異はダックスフンド (Drögemüller et al. 2009) やヒト (Christiansen et al. 2010) における骨形成不全症 (osteogenesis imperfecta; OI) を引き起こすことが報告されている。これらの変異 HSP47 は ER 内腔で凝集体となりやすいうえプロコラーゲンへの結合能が低く、このような HSP47 を持つ細胞では様々なコラーゲン異常が生じる。

HSP47 はプロコラーゲン3重らせん部分の Gly-X-Arg モチーフを認識して相互作用する (Koide et al. 2006)。HSP47 が結合する可能性のある部位は、I型コラーゲンの各  $\alpha$  鎖あたり約 30 カ所と推定されている。3重らせん構造を形成したプロコラーゲン分子は、HSP47 とともに、TANGO1 が形成に関与する大型の COPII 小胞により ER から Golgi 体へと輸送されると考えられている (Saito et al. 2009; Yuan et al. 2018)。HSP47 は TANGO1 と相互作用することにより、プロコラーゲンの COPII 小胞への積み込みを促進していることが示唆されているが (Ishikawa et al. 2016)、プロコラーゲンの輸送には別の経路も提案されており (McCaughy et al. 2019)、ER から Golgi 体へのプロコラーゲンの輸送に関しては未解明な部分が多い。HSP47 とコラーゲン3重らせん構造の結合は pH 依存的であり、中性で相互作用

し、低 pH で解離する (Abdul-Wahab et al. 2013; Kitamura et al. 2018; Oecal et al. 2016)。このことから、HSP47 は *cis*-Golgi または ERGIC で pH 依存的にプロコラーゲンから解離し、C 末端にもつ ER 局在シグナル RDEL により ER に引き戻されると考えられている。しかし近年では、ERES で HSP47 の大部分が ER 局在シグナル依存的にプロコラーゲンから解離するとの報告もなされている (Omari et al. 2020)。

コラーゲンの生合成において、HSP47 は主に 2 つの役割を ER 内腔ではたしていると考えられている。一つ目の仮説は、プロコラーゲン 3 重らせん分子の側方的な会合を防ぐことによる凝集の抑制であり (Ishida et al. 2006)、もう一つの仮説は、プロコラーゲンのフォールディング中間体の安定化による 3 重らせん構造形成の促進である (Koide et al. 2000; Tasab et al. 2000)。

第一の仮説は、*hsp47*<sup>-/-</sup>マウス胎児から樹立した線維芽細胞 (*hsp47*<sup>-/-</sup> MEF) の ER 内におけるプロコラーゲンの凝集や、*in vitro* における HSP47 存在下のコラーゲン線維形成阻害により支持されている (Thomson and Ananthanarayanan 2000)。第二の仮説は、*hsp47*<sup>-/-</sup> MEF から分泌されるコラーゲンの異常な性質から支持されている (Ishida et al. 2006; Nagai et al. 2000)。さらに、線維形成前の哺乳類コラーゲンの 3 重らせん構造が体温で不安定であることを示す報告からも、この機能の存在が示唆される (Leikina et al. 2002)。

本章では、HSP47 がプロコラーゲンの 3 重らせん構造を安定化するという、この第二の仮説の証明を目指した。これまでに、*hsp47*<sup>-/-</sup> MEF では ER におけるプロコラーゲンの蓄積や細胞外に沈着するコラーゲン線維の減少や形成不全といった異常が生じることが報告されている。そこで、これらの異常が HSP47 欠損によるコラーゲン 3 重らせん構造の不安定化によって引き起こされるのであれば、3 重らせん構造が安定となるような低温で細胞を培養することで、異常は正常化するのではないかと考えた。本研究では、*hsp47*<sup>-/-</sup> MEF を 33°C の低温で培養し、HSP47 の欠損が補われるのかを検証した。

### 3.2. *Hsp47*<sup>+/+</sup>および *hsp47*<sup>-/-</sup> MEF が発現するタンパク質の western blotting 解析

本研究では、野生型 (*hsp47*<sup>+/+</sup>) および HSP47 遺伝子ノックアウト (*hsp47*<sup>-/-</sup>) マウス胚から樹立した線維芽細胞をそれぞれ 2 クローンずつ使用した。すべての MEF クローンは、37°C だけでなく、33°C でも増殖することができた。37°C または 33°C で培養した *hsp47*<sup>+/+</sup> および *-/-* MEF で発現する HSP47 量を western blotting により比較した (Figure 3-1a)。 *Hsp47*<sup>+/+</sup> #18 および #24 では HSP47 の発現が確認され、どちらのクローンでも 33°C では HSP47 の発現量がわずかに減少していた。また、*hsp47*<sup>-/-</sup> #11 および #13 では HSP47 が発現していないことが確かめられた。

MEF から分泌されるコラーゲンを、第 2 章で開発したビオチン標識 cCMP7 を用いて、western blotting により分析した。37°C 培養した *hsp47*<sup>-/-</sup> MEF のサンプルにおいて、 $\alpha 1(I)$  鎖と pC $\alpha 1(I)$  鎖の電気泳動移動度の低下がみられた (Figure 3-1b)。この結果は、HSP47 に異常をもつダックスフンドの細胞で観察された結果と一致している (Lindert et al. 2015)。 *Hsp47*<sup>-/-</sup> MEF の 33°C 培養サンプルではバンドシフトが正常化しており、*hsp47*<sup>+/+</sup> MEF のバンド位置とほとんど同じであった。

1.2 で述べたように、コラーゲンは生合成の過程で 3 重らせん領域に多数の翻訳後修飾を受ける。そこで、*hsp47*<sup>-/-</sup> MEF で見られたバンドシフトがコラーゲン 3 重らせん領域の分子サイズの増加によるものなのかを調べることにした。コラーゲンの 3 重らせん構造はペプシンによる分解に耐性をもつため、MEF を培養した培地を 4°C でペプシン処理し、その後塩析することでコラーゲン 3 重らせん領域を精製した。このサンプルを用いて SDS-PAGE を行ったところ、*hsp47*<sup>-/-</sup> MEF の 37°C 培養サンプルでは、 $\alpha 1(I)$  および  $\alpha 2(I)$  鎖の電気泳動移動度が *hsp47*<sup>+/+</sup> MEF サンプルと比較してどちらも低下していたが、33°C 培養では *hsp47*<sup>+/+</sup> MEF サンプルと同程度であった (Figure 3-1c)。この結果は、37°C で培養した *hsp47*<sup>-/-</sup> MEF から過剰修飾されたコラーゲンが分泌されていること、また、培養温度を 33°C

に下げることによってそれが正常化することを強く示唆するものである。

また、細胞外マトリックスに豊富に存在するタンパク質であるラミニンの western blotting 解析を行うことで、ラミニンの分泌量が細胞株や培養温度によらずほぼ一定であることが確かめられ、この現象はコラーゲンに特異的であることが示唆された (Figure 3-1d)。

さらに、MEF から分泌される色素上皮由来因子 (PEDF) 量を解析した。PEDF は分泌タンパク質であり、Lys-Gly-X-Arg-Gly-Phe-X-Gly-Leu 配列を認識してコラーゲンの 3 重らせん構造に結合する SERPIN ファミリータンパク質である (Sekiya et al. 2011)。PEDF が細胞内でプロコラーゲンに結合するかは明らかになっていないものの、PEDF とプロコラーゲンの相互作用は ER でも起こる可能性がある。したがって、HSP47 のように、細胞内で PEDF がプロコラーゲンのフォールディングと分泌に影響を与える可能性がある。Figure 3-1e に示すように、PEDF のバンドは *hsp47*<sup>-/-</sup> #13 では検出されなかったものの、他のクローンでは観察することができた。また、*hsp47*<sup>-/-</sup> #13 以外の PEDF 量は、細胞株や培養温度によらずほぼ一定であった。この結果は、PEDF が *hsp47*<sup>-/-</sup> MEF で観察された温度依存的なコラーゲンの分子サイズの変化に影響を与えていないことを示している。

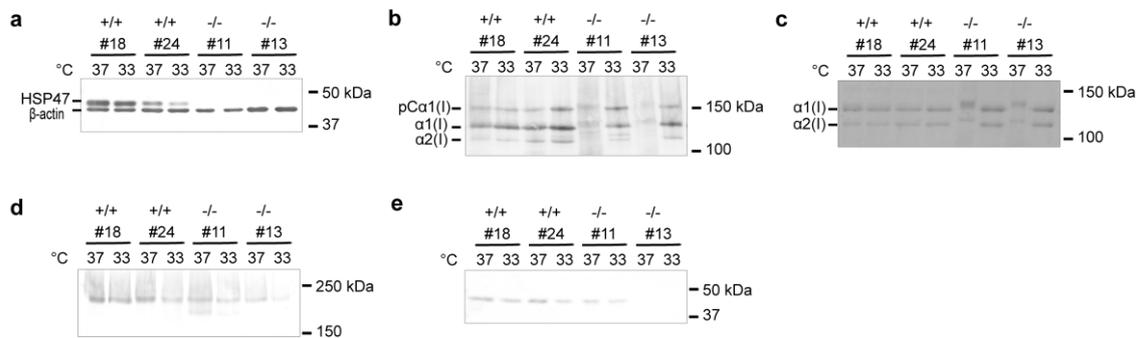


Figure 3-1. MEF から分泌されるタンパク質の特性と HSP47 発現量の比較

(a) HSP47 の発現量

HSP47 および  $\beta$ -actin に対する抗体を用いて、western blotting により MEF ライセートを解析した。SDS-PAGE ゲルには各 well に等量のタンパク質 (10  $\mu$ g/well) を非還元条件でロードした。

(b) MEF から分泌されたコラーゲンの比較

培養液量を細胞層から抽出したタンパク質量で正規化し、それに対応した量の培養液サンプルを還元条件で SDS-PAGE ゲルにロードした。ビオチン標識 cCMP7 を用いて、MEF から分泌されたコラーゲンを western blotting により解析した。

(c) I 型コラーゲン 3 重らせん領域の電気泳動移動度の比較

4°C でペプシン処理した培養液から塩析によってコラーゲンを単離し、非還元条件下で SDS-PAGE を行った。バンドは Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBB) で可視化した。SDS サンプルは、37°C の *hsp47*<sup>-/-</sup> MEF を除き、(b) と同様に SDS-PAGE ゲルにロードした。37°C の *hsp47*<sup>-/-</sup> MEF サンプルは、他のサンプルの 3 倍量をロードした。

(d, e) MEF クローンから分泌されたコラーゲン以外のタンパク質の比較

(d) ラミニンまたは (e) PEDF に対する抗体を使用し、培養液中のそれぞれのタンパク質を (b) と同様に western blotting で解析した。

### 3.3. 蛍光染色によるコラーゲンの局在解析

培養した MEF の周囲に沈着したコラーゲン線維を、抗 I 型コラーゲン抗体を用いた蛍光免疫染色で可視化した。Figure 3-2a に示すように、37°C 培養した *hsp47*<sup>-/-</sup> MEF の周囲のコラーゲン線維の沈着は *hsp47*<sup>+/+</sup> MEF よりも少なく、過去の報告と一致していた (Ishida et al. 2006)。この異常は *hsp47*<sup>-/-</sup> MEF を 33°C で培養することにより解消し、コラーゲン線維沈着量は野生型細胞と同程度となった。*Hsp47*<sup>+/+</sup> MEF では、37°C と 33°C 培養でコラーゲン線維の沈着量に差は見られなかった。

プロコラーゲンの細胞内局在は、透過処理した細胞の免疫蛍光染色により観察した。I 型コラーゲンと ER 局在シグナル配列 (Lys-Asp-Glu-Leu: KDEL) (ER マーカー) または GM130 (Golgi 体マーカー) に対する抗体を用いて二重染色を行った。過去の報告と一致して、37°C 培養時には *hsp47*<sup>-/-</sup> MEF の ER にプロコラーゲンの一部が蓄積していた (Figure 3-2b) (Ishida et al. 2006)。ER におけるプロコラーゲンの異常な蓄積は、33°C 培養で解消した。プロコラーゲンの Golgi 体への局在は全ての細胞株で観察された (Figure 3-2c)。

これらの結果から、*hsp47*<sup>-/-</sup> MEF 周囲におけるコラーゲン線維沈着量の減少および ER へのプロコラーゲンの蓄積は、培養温度を 33°C に下げることによって解消することが示された。

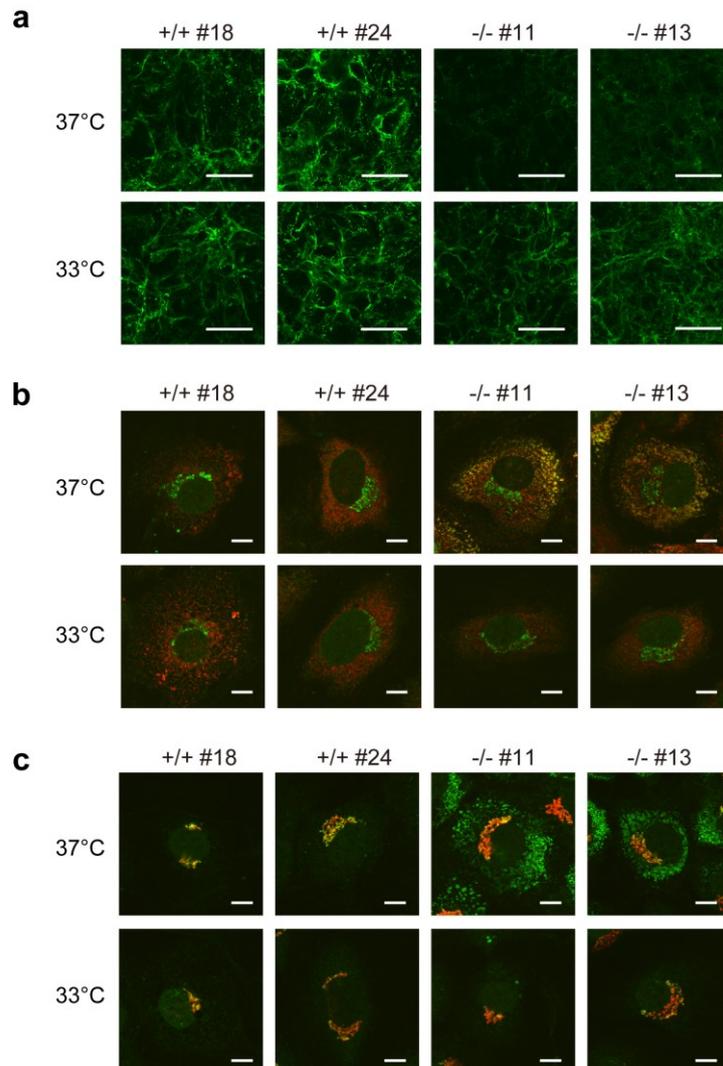


Figure 3-2. 細胞外および細胞内 I 型コラーゲンの蛍光免疫染色

(a) 抗 I 型コラーゲン抗体を用いて MEF 周囲に沈着した I 型コラーゲン線維の蛍光免疫染色を行った。スケールバーは 100  $\mu\text{m}$ 。

(b, c) 抗 I 型コラーゲン抗体 (green)、および (b) 抗 KDEL 抗体 (ER マーカー; red) または (c) 抗 GM130 抗体 (Golgi 体マーカー; red) を用いて、透過処理した MEF 内部のプロコラーゲンと ER または Golgi 体の二重染色を行った。スケールバーは 10  $\mu\text{m}$ 。

MEF 周囲のコラーゲン線維において 3 重らせん構造が変性しているのかを明らかにするために、FAM 標識した soCMP6-7(Glu)2 を用いて蛍光染色を行った。全てのコラーゲンを検出するために、培養した細胞に 95°C の PBS をかけて 1 分間静置することでコラーゲンを熱変性させたサンプルも作製した。熱処理したサンプルでは、抗体を用いた場合と同様 (Figure 3-2a)、37°C 培養の *hsp47*<sup>-/-</sup> MEF のみコラーゲン線維沈着量が少なかった (Figure 3-3)。また、*hsp47*<sup>-/-</sup> MEF を 37°C で培養した場合にのみ、熱処理の有無でコラーゲン線維の染色の強さにほとんど差がなく、多くのコラーゲン 3 重らせんが異常な構造をもっていることが示された。*hsp47*<sup>-/-</sup> MEF の 33°C 培養ではコラーゲン線維は検出されず、*hsp47*<sup>+/+</sup> MEF と同様、正常な 3 重らせんをもつコラーゲン線維が形成されていることが示唆された。

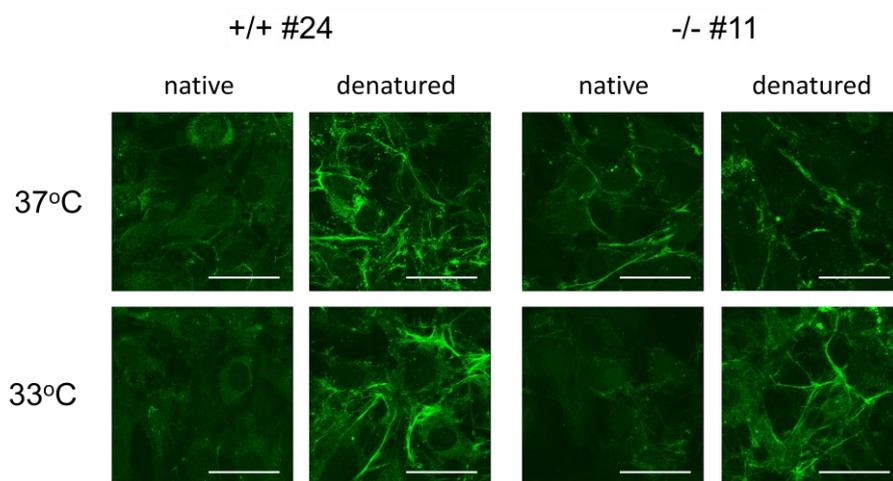


Figure 3-3. 変性コラーゲン結合ペプチドを用いた細胞外コラーゲンの蛍光染色  
FAM 標識 soCMP6-7(Glu)2 を用いて、MEF 周囲のコラーゲン線維および熱処理によって変性したコラーゲン線維の蛍光染色を行った。スケールバーは 50  $\mu$ m。

### 3.4. MEF から分泌された I 型コラーゲンにおける翻訳後修飾の定量

Figure 3-1b および c の結果から、37°C で *hsp47*<sup>-/-</sup> MEF クローンから分泌された I 型コラーゲンの 3 重らせん領域には、過剰な翻訳後修飾が生じていることが示唆された。1.2 で述べたように、コラーゲンの翻訳後修飾には、Pro の 3 位および 4 位水酸化、Lys 側鎖の水酸化があり、Hyl にはさらに糖鎖が付加され GHL、GGHL となる場合がある。そこで、各細胞株が 37、33°C で分泌するコラーゲンの翻訳後修飾をアミノ酸分析により定量した。

MEF を培養後、回収した培地を 4°C でペプシン処理し、その後コラーゲンを精製した。Arg、Lys、Pro 残基およびそれらの翻訳後修飾体が安定同位体標識されたコラーゲンと混合し (Taga et al. 2014)、SDS-PAGE で分離後、polyvinylidene fluoride (PVDF) 膜に転写した。CBB で染色したのち、PVDF 膜から  $\alpha 1(I)$  と  $\alpha 2(I)$  の両方を含む領域を切り出し、気相で酸加水分解を行った (Tous et al. 1989)。Pro、3-Hyp、4-Hyp、Lys および全 Hyl (Hyl + GHL + GGHL) を liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) で測定し、対応する安定同位体標識物を内部標準として用いて補正することで、3 重らせん領域 1000 残基あたりの残基数を算出した (Figure 3-4)。具体的には、安定同位体標識コラーゲン由来の分析物に対するサンプル由来分析物のピーク面積の比から、各アミノ酸量を算出した。

37°C で *hsp47*<sup>-/-</sup> #11 および <sup>-/-</sup> #13 から分泌されたコラーゲンでは、3-Hyp と Hyl 残基が野生型細胞から分泌されたコラーゲンと比べて増加しており、その基質である未修飾の Pro と Lys 残基は減少していた。これらの過剰な修飾は、33°C では *hsp47*<sup>+/+</sup> MEF と同程度まで抑制された。また、4-Hyp 残基は全てのサンプルで 1000 残基あたり約 100 残基であり、基質である Y 位の Pro 残基のほとんどが 4-Hyp 残基になっていることが示唆された。より詳細な比較のために、Figure 3-4 の結果から全 Pro (Pro + 3-Hyp + 4-Hyp) に対する 4-Hyp の比率を計算したところ、*hsp47*<sup>-/-</sup> MEF クローンから 37°C で分泌されたコラーゲンでは 4-Hyp 率がわずかに高く、33°C ではこれが抑制されていることが示された (Table 3-1)。

さらに、修飾部位を含むトリプシン分解ペプチドの LC-MS 分析により、I 型コラーゲンの部位特異的な Pro の 3 位水酸化、および Lys 側鎖の水酸化とさらなる糖鎖付加に対する HSP47 欠損および培養温度の影響を解析した。 $\alpha 1(I)$  および  $\alpha 2(I)$  の Pro716 と Pro719 における 3 位水酸化は腱に特異的であることがこれまで報告されていたが (Taga et al. 2016)、皮膚線維芽細胞由来のコラーゲンでもこの部位において水酸化が検出され、Pro が 3-Hyp となっていることが示唆された。この結果は、培養細胞が分泌するコラーゲンと組織内のコラーゲンにおける、Pro の 3 位水酸化パターンの違いによるものと考えられる (Weis et al. 2010)。37°C で培養した *hsp47*<sup>-/-</sup> MEF が分泌した  $\alpha 1(I)$  および  $\alpha 2(I)$  の Pro707、Pro716、Pro719 という連続した修飾部位を含むトリプシン分解ペプチドにおいて、Pro 水酸化の顕著な増加が観察された (Figure 3-5a)。この過剰な翻訳後修飾は、33°C では *hsp47*<sup>+/+</sup> MEF と同程度まで抑制されていた。一方で、OI に関連する  $\alpha 1(I)$  Pro986 の 3 位水酸化は (Cabral et al. 2007)、すべてのサンプルでほとんど完全に行われていることが示唆された。

翻訳後修飾されることが知られている 8 カ所の Lys の翻訳後修飾を定量すると、*hsp47*<sup>+/+</sup> MEF でもほとんど全てが水酸化されていた  $\alpha 2(I)$  Lys87、およびほとんど全てが糖鎖修飾されていた  $\alpha 1(I)$  Lys87 を除き、37°C 培養した *hsp47*<sup>-/-</sup> MEF で Hyl および GHL、GGHL 残基が増加していることが明らかになった (Figure 3-5b)。また、これらの過剰な修飾は 33°C で抑制された。

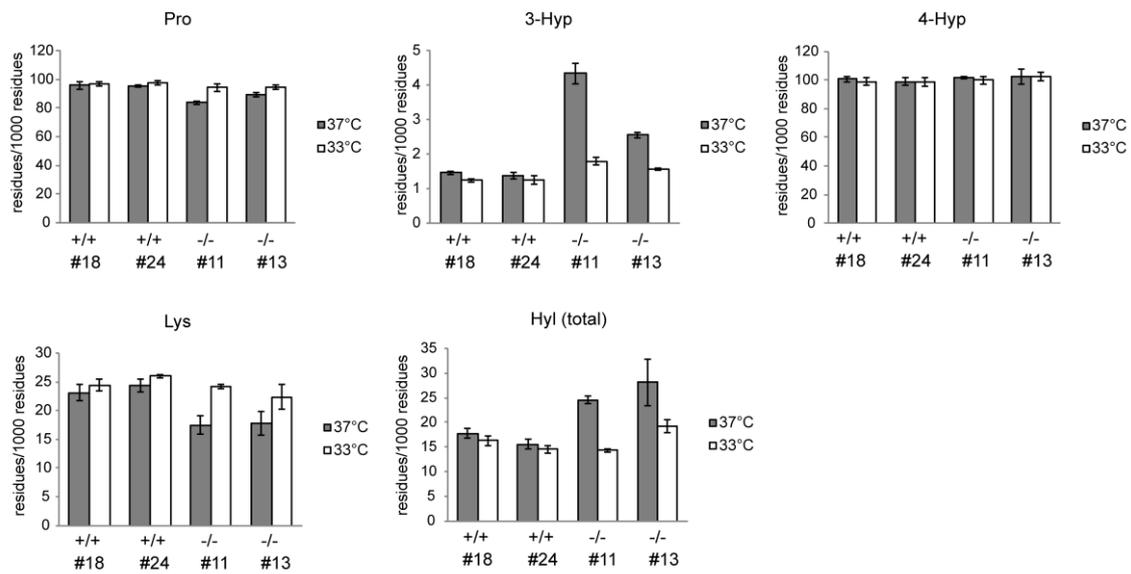


Figure 3-4. MEF から分泌された I 型コラーゲンにおける翻訳後修飾の定量

4°C でペプシン処理した培養液から、塩析によってコラーゲンを単離した。精製したコラーゲンに内部標準として安定同位体標識コラーゲンを混合し、SDS-PAGE を行った。タンパク質を PVDF 膜に転写し、CBB で膜を染色後に  $\alpha 1(I)$  と  $\alpha 2(I)$  鎖を含む領域を切り出し、酸加水分解を行った。Pro、Lys、3-Hyp、4-Hyp、全 Hyl を LC-MS で定量した。各アミノ酸の含有量は残基/1000 残基として示した。Means  $\pm$  SD (n = 3)。

Table 3-1. 全 Pro 残基中の 4-Hyp の割合

		<b>4-Hyp/(Pro + 3-Hyp + 4-Hyp)</b>
		<b>Mean ± SD (%)</b>
<b>+/+ #18</b>	<b>37°C</b>	50.9 ± 0.7
	<b>33°C</b>	50.2 ± 0.4
<b>+/+ #24</b>	<b>37°C</b>	50.7 ± 0.5
	<b>33°C</b>	50.0 ± 0.7
<b>-/- #11</b>	<b>37°C</b>	53.6 ± 0.3
	<b>33°C</b>	50.9 ± 0.1
<b>-/- #13</b>	<b>37°C</b>	52.7 ± 1.5
	<b>33°C</b>	51.6 ± 0.3

n = 3.

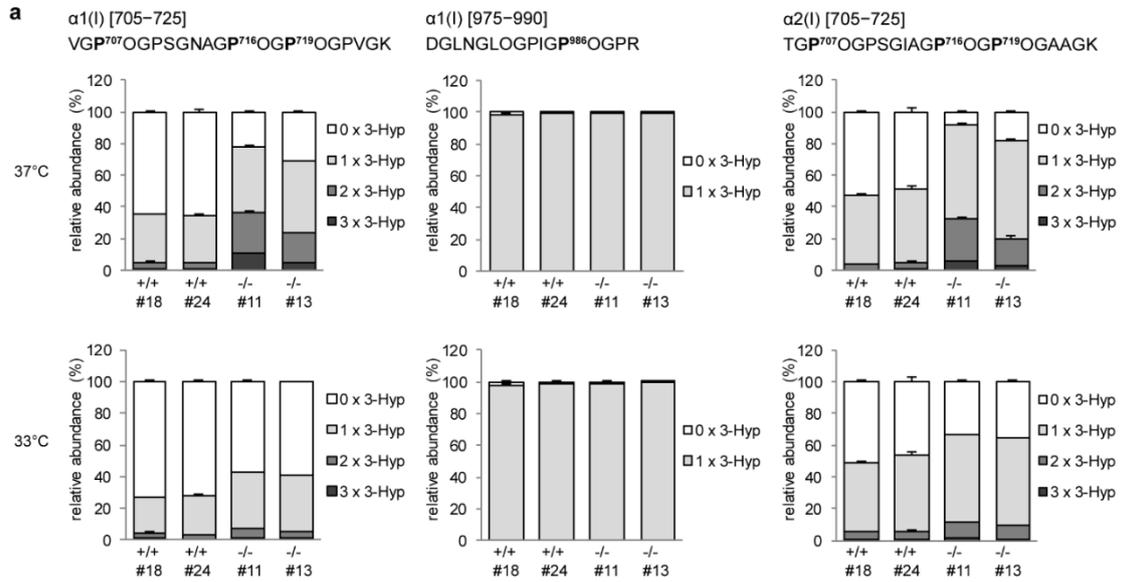


Figure 3-5. I型コラーゲンの部位特異的な翻訳後修飾の解析

(a) 4°C でペプシン処理した培地から精製したコラーゲンを熱変性させてトリプシンで分解した。配列中に太字で示した特定部位における Pro の 3 位水酸化を LC-MS で定量した。Means  $\pm$  SD (n = 3)。

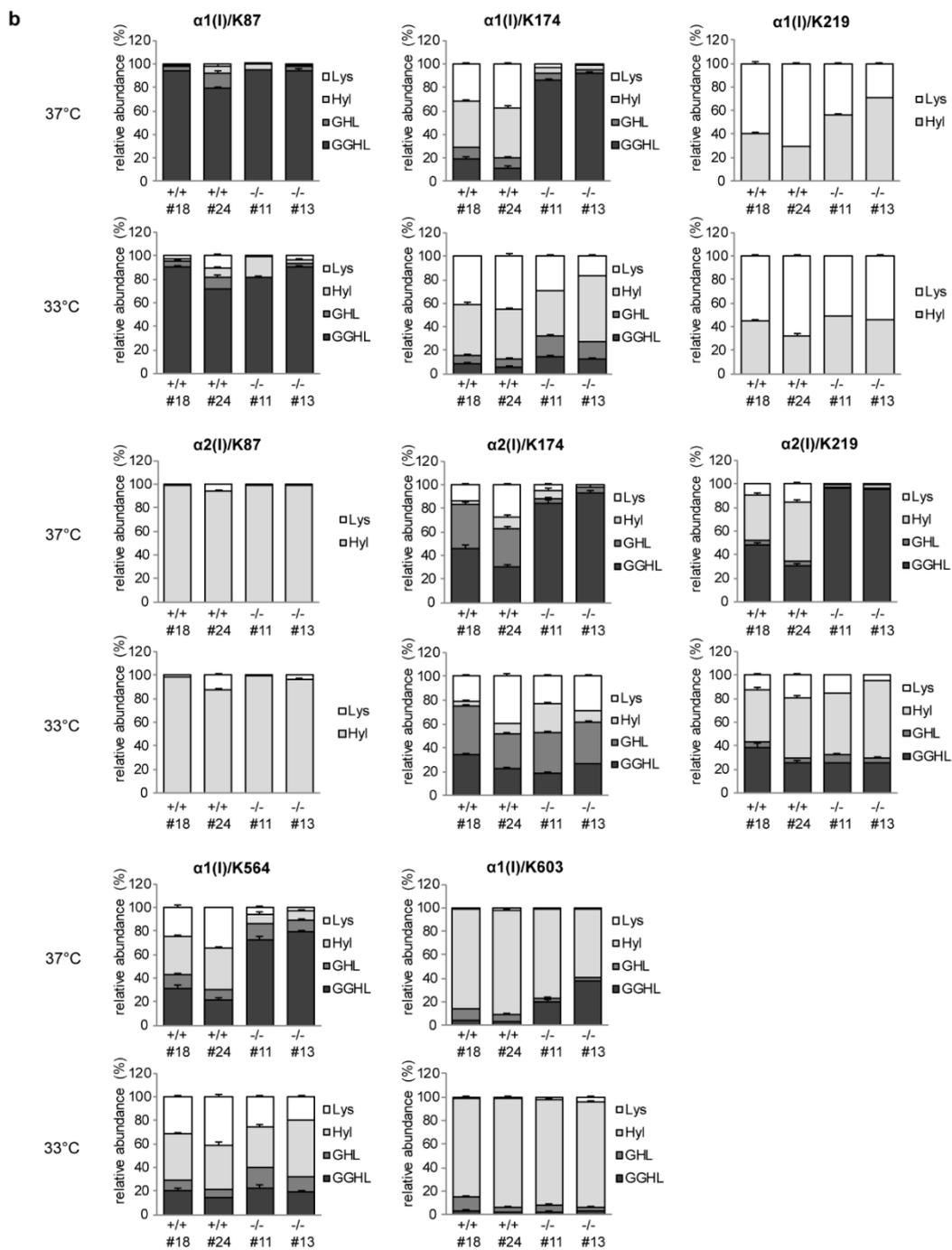


Figure 3-5. *Continued.*

(b) 4°C でペプシン処理した培地から精製したコラーゲンを熱変性させてトリプシンで分解した。配列中に太字で示した特定部位における Lys の翻訳後修飾を LC-MS で定量した。

Means  $\pm$  SD (n = 3)。

### 3.5. MEF から分泌された I 型コラーゲン $\alpha$ 鎖の定量

細胞から分泌されるコラーゲンの  $\alpha$  鎖の比率が *hsp47*<sup>+/+</sup>と<sup>-/-</sup> MEF で異なるかどうかを調べるために、MEF の培養液に内部標準として安定同位体標識コラーゲンを加えたのち、塩析によりコラーゲンを精製した。熱変性後にトリプシンで消化し、 $\alpha 1(I)$ 、 $\alpha 2(I)$ 、 $\alpha 1(III)$  鎖を定量するためのマーカーペプチド断片および安定同位体標識コラーゲン由来の対応する安定同位体標識ペプチド断片を、LC-MS により分析した (Taga et al. 2014)。既知量の合成マーカーペプチドを用いて安定同位体標識コラーゲン中の  $\alpha$  鎖組成をあらかじめ決定することで、マーカーペプチドと安定同位体標識ペプチドのピーク面積比に基づいて各  $\alpha$  鎖の絶対量を算出した。得られた  $\alpha$  鎖の定量値は (Table 3-3a) に示した。

$\alpha 1(I)$  鎖と  $\alpha 2(I)$  鎖の比率は、 $\alpha$  鎖の定量結果から算出した (Figure 3-6a)。 *Hsp47*<sup>+/+</sup> MEF では  $\alpha 1(I)/\alpha 2(I)$  が約 2 となり、分泌される I 型コラーゲンの多くは [ $\alpha 1(I)$ ]<sub>2</sub> $\alpha 2(I)$  ヘテロ 3 量体であることが明らかとなった。しかし、37°C で培養した *hsp47*<sup>-/-</sup> MEF では、 $\alpha 1(I)/\alpha 2(I)$  が約 4 から 5 と顕著に増加しており、 $\alpha 1$  鎖 3 本からなるホモ 3 量体の存在が示唆された。一般に I 型コラーゲン分子は 2 本の  $\alpha 1$  鎖と 1 本の  $\alpha 2$  鎖からなるヘテロ 3 量体であるが、胎児組織 (Jimenez and Bashey 1977)、線維性組織 (Ehrlich et al. 1982; Narayanan et al. 1980; Rojkind et al. 1979)、癌組織 (Makareeva et al. 2010; Minafra et al. 1985; Moro and Smith 1977; Shapiro and Eyre 1982; Yamagata and Yamagata 1984) には  $\alpha 1(I)$ <sub>3</sub> ホモ 3 量体が存在することが報告されている。Table 3-3 の結果から、*hsp47*<sup>-/-</sup> #11、#13 が分泌する I 型コラーゲンにおけるホモ 3 量体の割合を算出すると、それぞれ  $42.0 \pm 3.9\%$ 、 $52.5 \pm 3.4\%$  (means  $\pm$  SD) であった。*Hsp47*<sup>-/-</sup> MEF による  $\alpha 1(I)$ <sub>3</sub> ホモ 3 量体の異常な分泌は 33°C 培養で正常化し、*hsp47*<sup>+/+</sup> MEF と同様  $\alpha 1(I)/\alpha 2(I)$  の値は約 2 となった。

分泌されたコラーゲンのコンフォメーションを、4°C におけるペプシン処理前後の  $\alpha$  鎖量を比較することにより解析した。4°C でペプシン処理した培地から精製した I 型コラーゲン

$\alpha$  鎖の定量結果から (Table 3-3b)、ペプシンにより消化されたコラーゲン  $\alpha$  鎖の比率を算出した (Figures 3-6b, c)。37°C で培養した場合、*hsp47*<sup>+/+</sup> MEF よりも *hsp47*<sup>-/-</sup> MEF において、ペプシンで消化される  $\alpha$  鎖の割合が高いことが確認された。これは Figure 3-3 と一致した結果であり、37°C 培養した *hsp47*<sup>-/-</sup> MEF からは、3 重らせんが正常に形成できていないコラーゲンが分泌されていることを示している。37°C において異常に高かった  $\alpha$  鎖のペプシン消化率は、33°C では 10%以下に低下した。*Hsp47*<sup>+/+</sup> MEF の各  $\alpha$  鎖のペプシン消化率は 37°C と 33°C 培養で差がなく、どちらの  $\alpha$  鎖もわずか (~10%) しかペプシンによって消化されなかった。また、37°C ではすべての細胞株で  $\alpha 2(I)$  鎖が  $\alpha 1(I)$  鎖よりも高い消化率を示したが、その傾向は特に *hsp47*<sup>-/-</sup> MEF で顕著であった。この結果は、ペプシン消化されるアンフォールドまたはミスフォールドコラーゲンの割合が、 $[\alpha 1(I)]_3$  ホモ 3 量体よりも  $[\alpha 1(I)]_2\alpha 2$  ヘテロ 3 量体で高いことを示唆している。

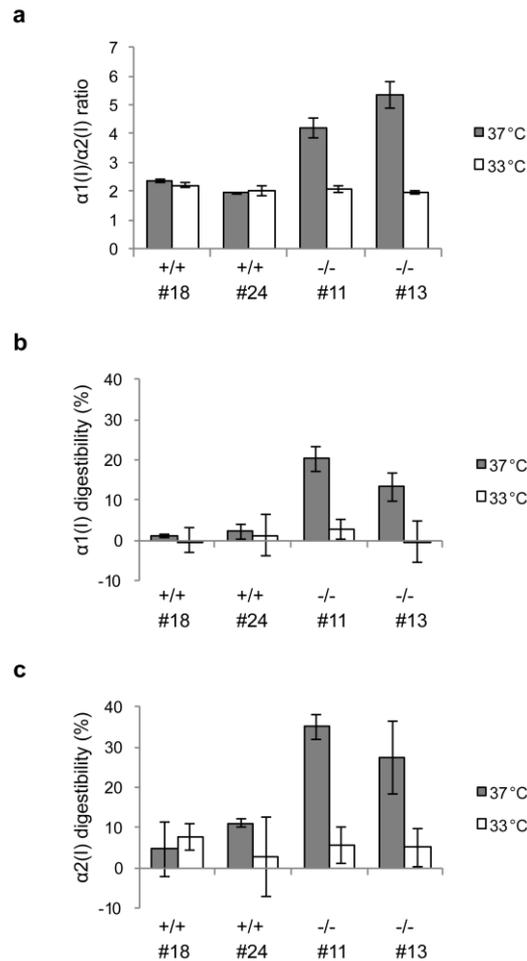


Figure 3-6. MEF から分泌された I 型コラーゲン  $\alpha$  鎖の定量

(a) 培養液に内部標準として安定同位体標識コラーゲンを添加した後、塩析によりコラーゲンを精製した。コラーゲンサンプルを熱変性後トリプシンで消化し、生成した  $\alpha 1(I)$  および  $\alpha 2(I)$  鎖の定量用マーカーペプチドを LC-MS で測定した。 $\alpha 1(I)/\alpha 2(I)$  比は各  $\alpha$  鎖の定量結果をもとに算出した。Means  $\pm$  SD (n = 3)。

(b, c) (a) において安定同位体標識コラーゲンを添加した培養液を 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  のペプシンで 4°C、16 時間処理し、ペプシンによる分解に抵抗性のある  $\alpha 1(I)$  鎖および  $\alpha 2(I)$  鎖を (a) と同様にして LC-MS で定量した。(b)  $\alpha 1(I)$  鎖と (c)  $\alpha 2(I)$  鎖の消化率は、(a) で分析したペプシン未処理培地から精製した  $\alpha$  鎖の定量値と、ペプシン処理培地から精製した  $\alpha$  鎖の定量値を用いて算出した。Means  $\pm$  SD (n = 3)。

### 3.6. MEF から分泌された $[\alpha 1(\text{I})]_2\alpha 2(\text{I})$ の熱変性温度測定

Pro の 4 位水酸化は 3 重らせん構造を安定化することが知られており (Berg and Prockop 1973a)、Pro の 3 位水酸化も 3 重らせんの熱安定性を高めることが報告されている (Mizuno et al. 2008)。Lys の側鎖水酸化やさらなる糖鎖修飾についても 3 重らせん構造の熱安定性に影響を与えることが示唆されている (Nokelainen et al. 1998; Takuwa et al. 2016)。*Hsp47*<sup>-/-</sup> MEF は 37°C で過剰に修飾されたコラーゲンを分泌したため (Figures 3-4, 5, Table 3-4)、3 重らせん領域の翻訳後修飾量の変化により、コラーゲンの熱安定性が変化している可能性がある。そこで、37°C または 33°C で培養した MEF が分泌する I 型コラーゲン  $[\alpha 1(\text{I})]_2\alpha 2(\text{I})$  ヘテロ 3 量体の熱安定性を測定した。

ペプシン処理した培地から精製した 3 重らせんコラーゲンサンプルを異なる温度で加熱した後、20°C でトリプシンおよびキモトリプシン消化を行った。SDS-PAGE による分離後 (Figure 3-7a)、画像解析ソフト ImageJ で  $\alpha 2(\text{I})$  鎖に対応するバンドの強度を測定することで、 $[\alpha 1(\text{I})]_2\alpha 2(\text{I})$  ヘテロ 3 量体の熱変性温度 ( $T_m$ ) を決定した (Figure 3-7b)。なお、この方法で得られた  $T_m$  は見かけの値であり、コラーゲンの  $T_m$  の絶対値を示すものではない。*Hsp47*<sup>+/+</sup> MEF から分泌された  $[\alpha 1(\text{I})]_2\alpha 2(\text{I})$  ヘテロ 3 量体の  $T_m$  には、培養温度間で顕著な差は認められなかった。これは、コラーゲンの翻訳後修飾量が 37°C と 33°C でほとんど変化していないことと一致した結果である (Figures 3-4, 5, Table 3-4)。一方、37°C において *hsp47*<sup>-/-</sup> MEF から分泌されたコラーゲンの  $T_m$  は、*hsp47*<sup>+/+</sup> MEF から分泌されたコラーゲンの  $T_m$  よりも高い値を示した。37°C における熱安定性の向上は、コラーゲンの過剰な修飾を反映していると考えられる (Figures 3-4, 5, Table 3-4)。この高い熱安定性は、*hsp47*<sup>-/-</sup> MEF を 33°C で培養することにより正常化した。また、Figure 3-7a で  $\alpha 1(\text{I})$  鎖のバンドが  $\alpha 2(\text{I})$  鎖のバンドより高温でも分解されずに残っていたのは、 $\alpha 1(\text{I})_3$  ホモ 3 量体が  $[\alpha 1(\text{I})]_2\alpha 2(\text{I})$  ヘテロ 3 量体よりも熱安定性の高い 3 重らせん構造をもつためだと考えられた (Kuznetsova et al. 2003;



### 3.7. 考察

マウス体温と同じ培養温度である 37°C において、*hsp47*<sup>-/-</sup> MEF ではコラーゲン生合成に様々な異常が生じていた。*Hsp47*<sup>-/-</sup> MEF が 37°C で分泌するコラーゲン中には、プロテアーゼ処理で分解されるアンフォールドまたはミスフォールド状態のコラーゲンが通常より高い割合で含まれていた。さらに、正常な 3 重らせんを形成しているコラーゲンの  $T_m$  は野生型細胞のものより高いことが明らかとなり、3 重らせん領域における過剰な翻訳後修飾が、 $T_m$  の上昇につながったことが示唆された。また、ER におけるプロコラーゲンの異常な蓄積や、細胞周囲のコラーゲン線維の減少が観察された。コラーゲンに関するこれらの異常は、これまでに報告されたものと本質的に一致した結果であった (Christiansen et al. 2010; Ishida et al. 2006; Lindert et al. 2015; Nagai et al. 2000)。さらに、*hsp47*<sup>-/-</sup> MEF が分泌する I 型コラーゲンには、野生型細胞からはほとんど分泌されない  $[\alpha 1(I)]_3$  ホモ 3 量体が含まれていることが明らかになった。これは、 $[\alpha 1(I)]_3$  ホモ 3 量体は  $[\alpha 1(I)]_2\alpha 2(I)$  ヘテロ 3 量体より 3 重らせんの熱安定性が高く (Kuznetsova et al. 2003; Miles et al. 2002)、HSP47 なしでも正常な 3 重らせん構造を形成しやすいためだと考えられる。観察されたこれらすべての異常は、培養温度を 37°C から 33°C に 4°C 下げることによって改善した (Figure 3-8)。この結果は、HSP47 がプロコラーゲン生合成において、熱によって生じる問題の解決に関与していることを示しており、HSP47 の発現が熱ストレスによって誘導されることにも説明を与えるものである。

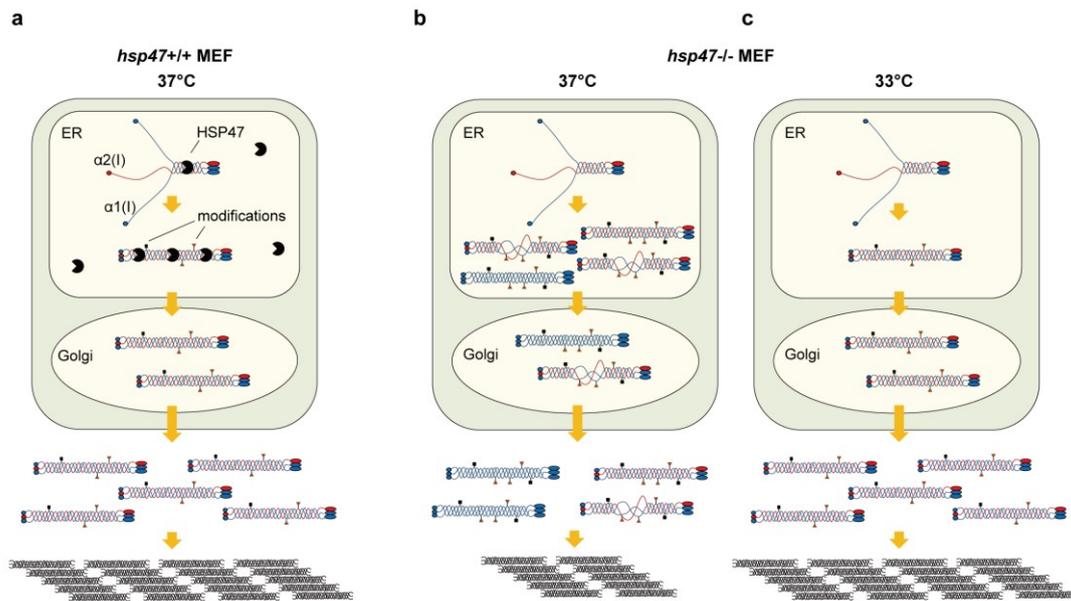


Figure 3-8. HSP 47 の欠損によるコラーゲン生合成の異常は培養温度を下げることで正常化する

(a-c) ER では3本の  $\text{pro}\alpha$  鎖が C-プロペプチド領域で3量体化し、3重らせんを形成する (a)。HSP47 の欠損により、ER でプロコラーゲンの異常な蓄積が生じた。また、分泌されたプロコラーゲンは過剰に修飾されており、I型コラーゲン中の  $[\alpha 1(I)]_3$  ホモ3量体の割合が増加していた。さらに、プロテアーゼで分解されるミスフォールディングまたはアンフォールディングコラーゲンの割合が増加した。細胞周囲の線維沈着は少なく、また、その3重らせんは変性していることが示唆された。*Hsp47*<sup>-/-</sup> MEF で観察された全ての異常は、培養温度を下げることによって正常化した (b, c)。

プロコラーゲンの3重らせん構造は翻訳後修飾によって熱的に安定化されるため、その熱安定性は遺伝子にコードされたアミノ酸配列によって一義的に決定されているわけではない。Gly-X-Pro配列のほとんどのPro残基で起こる4-Hyp化は、3重らせん構造の安定化に最も大きく寄与している (Berg and Prockop 1973a)。さらに、Proの3位水酸化も3重らせん構造を安定化し、Lys側鎖の修飾も熱安定性に影響を与える可能性がある (Mizuno et al. 2008; Nokelainen et al. 1998; Takuwa et al. 2016)。これらの修飾酵素は1本鎖部分のみを基質として認識するため、翻訳後修飾は3重らせんの形成が完了するまで継続すると考えられる (Figure 3-9)。このような3重らせんの熱安定性を確保する自律的なフィードバックシステムの存在は、40.5°Cの高温で培養したヒト皮膚線維芽細胞が分泌したコラーゲンが過剰修飾されていたという報告からも支持される (Torre-Blanco et al. 1992)。

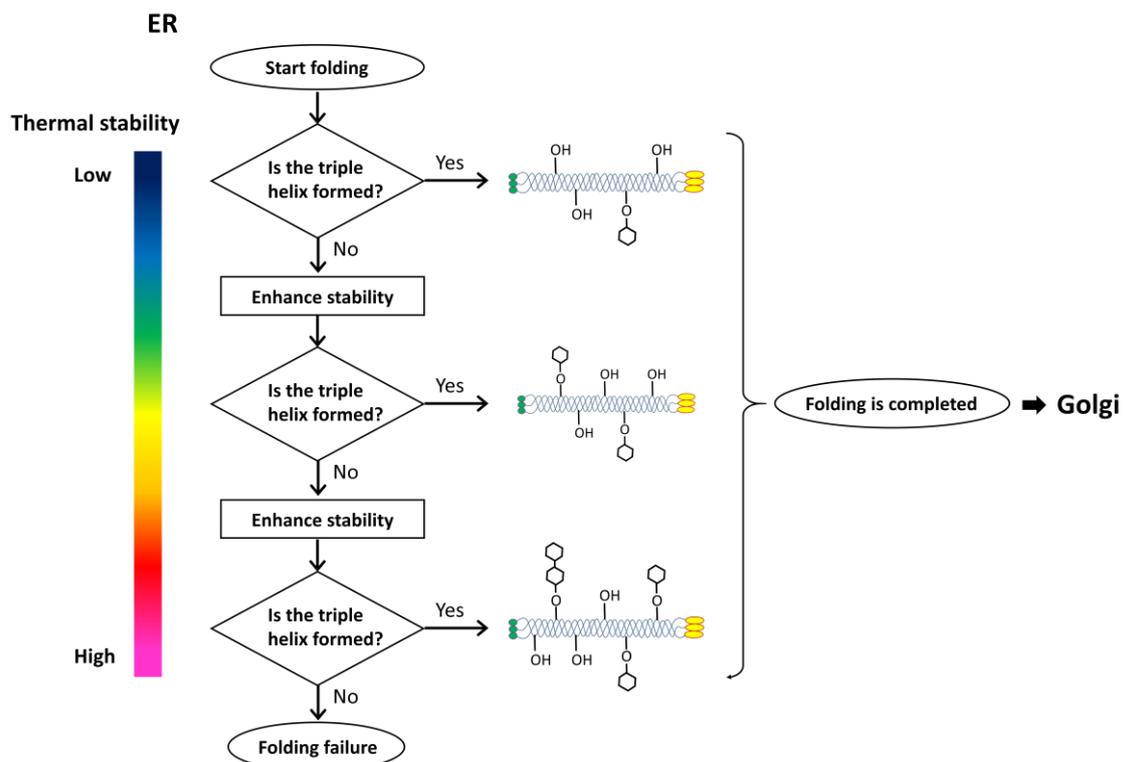


Figure 3-9. コラーゲン3重らせんの熱安定性獲得機構に関する仮説  
 プロコラーゲンはER内腔において、3重らせんを形成できるまで翻訳後修飾を受けて安定化される。

37°C で *hsp47*<sup>-/-</sup> MEF から分泌されたコラーゲンの過剰修飾は、HSP47 の欠損が ER におけるプロコラーゲンのフォールディングの遅れや部分的なアンフォールディングを生じさせたことを反映していると考えられる。しかし、37°C で *hsp47*<sup>-/-</sup> MEF から分泌されたコラーゲンの  $T_m$  の増加幅は約 1.5°C と小さく (Figure 3-7)、細胞周囲のコラーゲン線維は通常より変性しており (Figure 3-3)、分泌されたコラーゲン中にはプロテアーゼで分解されるものが含まれていた (Figures 3-6b, c)。これらの結果は、*hsp47*<sup>-/-</sup> MEF から分泌されたコラーゲン分子は過剰な翻訳後修飾を受けてさえ、37°C において正常な 3 重らせんを形成するのに十分な熱安定性を獲得することができなかったことを示唆している。これは、哺乳類において、HSP47 が体温では不安定な 3 重らせん構造を安定化することで、単独では不可能なプロコラーゲンのフォールディングを可能にしているという仮説を強く支持するものである。またこれらの結果は、哺乳類の I 型コラーゲン分子が線維形成前の状態では体温で不安定であることにも説明を与えるものである (Leikina et al. 2002)。

本研究の結果は、マウスプロコラーゲンの生合成のために、33°C は十分な低温であることを示唆しているが、3 重らせんの安定化に寄与する他の要因が 33°C におけるプロコラーゲンの正常な 3 重らせん形成に影響を与えている可能性もある。PEDF や FK506-binding protein 65 (FKBP65) といったタンパク質は、HSP47 同様正しくフォールディングしたプロコラーゲンに結合する (Ishikawa et al. 2008)。特に PEDF は、コラーゲン 3 重らせんに結合するもう一つの SERPIN として知られている。PEDF は分泌タンパク質であり、細胞内でプロコラーゲンと結合するという報告はないものの、ER 内腔でプロコラーゲンと相互作用する可能性がある。*Hsp47*<sup>-/-</sup>マウスは胎生致死の表現型を示すため、37°C においてこれらのタンパク質は HSP47 の機能を補うことはできない。本研究では、PEDF の分泌量は培養温度によらずほぼ一定であり (Figure 3-1e)、33°C においても PEDF の役割が大きく変化することはないであろう。33°C では HSP47 以外のタンパク質がプロコラーゲンを安定化する可能性を完全に否定することはできないが、*hsp47*<sup>-/-</sup> MEF においてプロコラーゲン 3 重らせ

ん構造を安定化した主な要因は低温培養であると考えられる。

33°C で培養した *hsp47*<sup>-/-</sup> MEF の ER において、プロコラーゲンの顕著な染色は観察されなかった (Figures 3-2b, c)。この結果は、ER 内腔で 3 重らせんプロコラーゲン分子間の側方的な会合による凝集を抑制するという HSP47 の機能が、プロコラーゲンの生合成にとって必須ではないことを示唆している。33°C ではプロコラーゲンの会合能が低下している可能性も考えられるが、*hsp47*<sup>+/+</sup> MEF 周囲の細胞外コラーゲン線維の形状は 37°C と 33°C ではほとんど差がないことから (Figures 3-2a, 3)、これらの温度間では ER 内腔においてもプロコラーゲンの側方的な会合能に大きな差のないことが示唆される。

TANGO1 は、ERES において、プロコラーゲンを積み込むことのできる巨大な COPII 小胞の形成に関与するタンパク質である (Saito et al. 2009; Yuan et al. 2018)。Tango1 欠損マウスではコラーゲンの分泌が遅延し、骨形成に異常が生じることが知られている (Wilson et al. 2011)。さらに、TANGO1 は小胞輸送に加えて、プロコラーゲン輸送のための ERES から Golgi 体へのトンネル形成にも関与している (McCaughey et al. 2019)。TANGO1 は HSP47 と相互作用することから (Ishikawa et al. 2016)、プロコラーゲンは TANGO1 周辺に濃縮されることで Golgi 体に輸送されると考えられている。しかし本研究では、*hsp47*<sup>-/-</sup> MEF は 33°C において *hsp47*<sup>+/+</sup> MEF と同程度の I 型コラーゲンを分泌した (Figures 3-2a, 3, Table 3-3)。この結果を考慮すると、プロコラーゲン 3 重らせんが正常に形成される場合には、コラーゲンの分泌における HSP47 の役割は重要ではない可能性がある。TANGO1 と HSP47 の相互作用は、正しくフォールディングしたプロコラーゲンの選択的な分泌のために、主に役立っているのかもしれない。また、HSP47 は ER ストレス応答シグナルタンパク質である inositol-requiring enzyme 1 (IRE1) の制御因子として機能していることが報告されており (Sepulveda et al. 2018)、HSP47 の新たな機能の可能性については今後さらなる研究が必要である。

本章では、プロコラーゲン特異的分子シャペロンである HSP47 の分子機能の本質を明らかにすることを目指し研究を行った。HSP47 は哺乳類では必須のタンパク質であり、ER 内腔

に存在し、プロコラーゲンの3重らせん部分を特異的に認識する。プロコラーゲン特異的シャペロンとしてのHSP47の分子機能については、二つの仮説が一般に受け入れられている。一つ目の仮説は、ER内腔においてプロコラーゲンの側方的な会合による凝集を抑制すること、もう一つの仮説は、熱的に不安定なプロコラーゲン3重らせんのフォールディング中間体を安定化することである。本研究では、*hsp47*<sup>-/-</sup>MEFを37°Cで培養した際に観察されたプロコラーゲン生合成における様々な異常が、33°Cの低温培養によってすべて正常化することを示した。この結果から、培養温度を下げることでHSP47の欠損が補われることが明らかとなり、HSP47が哺乳類の体温では不安定なプロコラーゲンのフォールディング中間体を安定化していることを証明した。また、33°C培養では*hsp47*<sup>-/-</sup>MEFのER内腔にプロコラーゲンが蓄積しなかったことから、ER内腔でプロコラーゲン分子間の側方的な会合を抑制するというHSP47の機能は、プロコラーゲンの生合成において必須ではないことも示唆された。

### 3.8. 第3章に関する実験

#### 細胞培養

使用した *hsp47*<sup>+/+</sup>および<sup>-/-</sup> MEF は、京都産業大学永田研究室より譲り受けた (Nagai et al. 2000)。細胞は、10% FBS (Thermo Fisher Scientific)、100 U/mL ペニシリン-100 µg/mL ストレプトマイシン (Sigma-Aldrich) を添加した L-グルタミン、フェノールレッド含有 DMEM (低グルコース) (Fujifilm Wako Pure Chemical) で 37°C、5% CO<sub>2</sub> 雰囲気下培養した。細胞がコンフルエントに達した後、100 U/mL ペニシリン-100 µg/mL ストレプトマイシンを含む線維芽細胞用無血清培養液 [human fibroblasts defined medium: HFDM-1(+)] (Cell Science & Technology Institute, Miyagi, Japan) に交換した。37°C または 33°C、5% CO<sub>2</sub> 雰囲気下で維持し、それぞれの実験に使用した。

#### ペプシン処理したコラーゲンの SDS-PAGE

HFDM-1(+) で 3 日間培養した MEF の培養液を 4°C で 15 分間遠心分離 (2290 × g) して培養上清を得た。0.1 M となるように HCl を加えて酸性にし、100 µg/mL ペプシン (Sigma-Aldrich) で 16 時間、4°C において処理したのち、4°C で 3 時間塩析 (1 M NaCl/0.1 M HCl) した。遠心分離 (4°C, 20,900 × g, 15 min) により沈殿させたコラーゲンを SDS-PAGE サンプルバッファー [50 mM Tris-HCl (pH 6.7), 10% glycerol, 2% SDS, 0.002% bromophenol blue] に溶解し、95°C で 5 分間加熱した。5%ゲルを用いて SDS-PAGE を非還元条件下で行い、タンパク質のバンドを CBB で可視化した。

#### Western blotting

HFDM-1(+) で MEF を 3 日間培養した。培養液を遠心分離し、培養上清を得た。また、細胞は PBS で洗浄し、溶解バッファー [50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA,

0.1% Nonidet P-40 (NP-40), 2 mM *N*-ethylmaleimide (NEM), 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 1 µg/mL leupeptin, 1 µg/mL pepstatin A] で 15 分間、氷上処理した。遠心分離 (20,600 × *g*, 4°C, 15 分) 後、上清中のタンパク質を Bradford 法により定量した。細胞ライセートおよび培養上清に 5 × SDS サンプルバッファーを加え、95°C で 5 分間加熱することで SDS サンプルを作製した。

細胞ライセートサンプルはサンプル間のタンパク質量が等しくなるようにゲルにロードした。培地サンプルは、細胞層のタンパク質量で培地量を正規化してゲルにロードした。SDS-PAGE は 91 mM の DTT の存在下、5%または 10%ゲルを用いて行った。タンパク質をニトロセルロース膜に転写した後、5%スキムミルク/TBS で 1 時間ブロッキングし、TBS で洗浄した。ニトロセルロース膜を 2%スキムミルク/TBS で希釈した 1 次抗体または PBS に溶解したビオチン標識変性コラーゲン結合ペプチド (cCMP7) で処理し、再度 TBS で洗浄した。2%スキムミルク/TBS で希釈した 2 次抗体または AP 標識ストレプトアビジン (Promega) で処理した後、0.1% Tween-20 を含む TBS (TBS-T) で洗浄した。HSP47、および β-actin、PEDF の検出の際は、Pierce Western Blotting substrate kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて発光させたタンパク質バンドを LAS-3000 CCD imager (Fujifilm, Tokyo, Japan) で可視化した。コラーゲンおよびラミニンの検出の際は、AP Conjugate Substrate Kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) を用いてバンドを可視化した。

抗体は、抗 laminin ウサギポリクローナル抗体 (ab11575; Abcam, Cambridge, MA, USA)、抗 PEDF マウスモノクローナル抗体 (KM037; Transgenic, Kumamoto, Japan)、抗 HSP47 マウスモノクローナル抗体 (SPA-470; StressGen Biotechnologies, San Diego, CA, USA)、抗 β-actin マウスモノクローナル抗体 (A5316; Sigma-Aldrich)、AP 標識抗ウサギ IgG ヤギポリクローナル抗体 (sc-2034; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA)、および HRP 標識抗マウス IgG ヤギポリクローナル抗体 (W402B; Promega) を使用した。

## 細胞外コラーゲン線維および細胞内プロコラーゲンの蛍光染色

35 mm ガラスボトムディッシュにおいてコンフルエントに達した MEF を、細胞外染色の場合は 1 日、細胞内染色の場合は 3 日間、HFDM-1(+) を用いて培養した。PBS で洗浄後、細胞を 4%パラホルムアルデヒド・りん酸緩衝液 (Fujifilm Wako Pure Chemical) で 15 分間固定した。コラーゲンを熱変性させる場合には、細胞の固定処理の直前に、95°C に熱した PBS をかけて 1 分間静置した。細胞内染色の際はさらに細胞を PBS で洗浄し、0.5% Triton X-100/PBS で 15 分間透過処理を行った。PBS 洗浄ののち、3% BSA/PBS で 1 時間ブロッキングした。1% BSA/PBS で希釈した一次抗体または FAM 標識 soCMP6-7(Glu)2 (3 µg/mL) による処理後、PBS で洗浄し、さらに 1% BSA/PBS で希釈した二次抗体と反応させた。PBS で洗浄後、FV-1000 共焦点レーザー顕微鏡 (Olympus) で細胞を観察した。

細胞外染色には、抗 I 型コラーゲンウサギポリクローナル抗体 (600-401-103-0.1; Rockland) および FITC 標識抗ウサギ IgG ヤギ抗体 (65-6111; Thermo Fisher Scientific) を用いた。細胞内染色には、抗マウス I 型コラーゲンウサギポリクローナル抗体 (AB765P; Merck Millipore)、抗 KDEL マウスモノクローナル抗体 (10C3) (ADI-SPA-827; Enzo life Sciences, Farmingdale, NY, USA)、抗 GM130 マウスモノクローナル抗体 (610822; BD Biosciences, San Jose, CA, USA)、FITC 標識抗ウサギ IgG ヤギ抗体 (65-6111; Thermo Fisher Scientific)、Alexa Fluor 594 標識抗マウス IgG ヤギ抗体 (ab150116; Abcam) を用いた。

## ペプチドの合成

Fmoc 固相法により、Wang 樹脂 (Novabiochem) 上にペプチド鎖を構築した。保護基のついたペプチド樹脂を TFA:H<sub>2</sub>O:*m*-cresol:thioanisole:EDT = 82.5:5:5:5:2.5 (v/v) 中、室温で 2 時間または 4 時間処理することにより、脱保護と同時に樹脂からペプチド鎖を切り離した。得られた粗ペプチドは RP-HPLC で精製したのち、移動相に 0.05% (v/v) TFA/CH<sub>3</sub>CN と 0.05% (v/v) TFA/H<sub>2</sub>O を用いて RP-HPLC 分析した (Figure 3-10)。カラムには Cosmosil 5C<sub>18</sub>-AR-II

column (4.6 mm × 250 mm, Nacalai Tesque) を使用した。質量分析は、 $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) をマトリックスとして使用し、Autoflex III MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics) により行った (Table 3-2)。

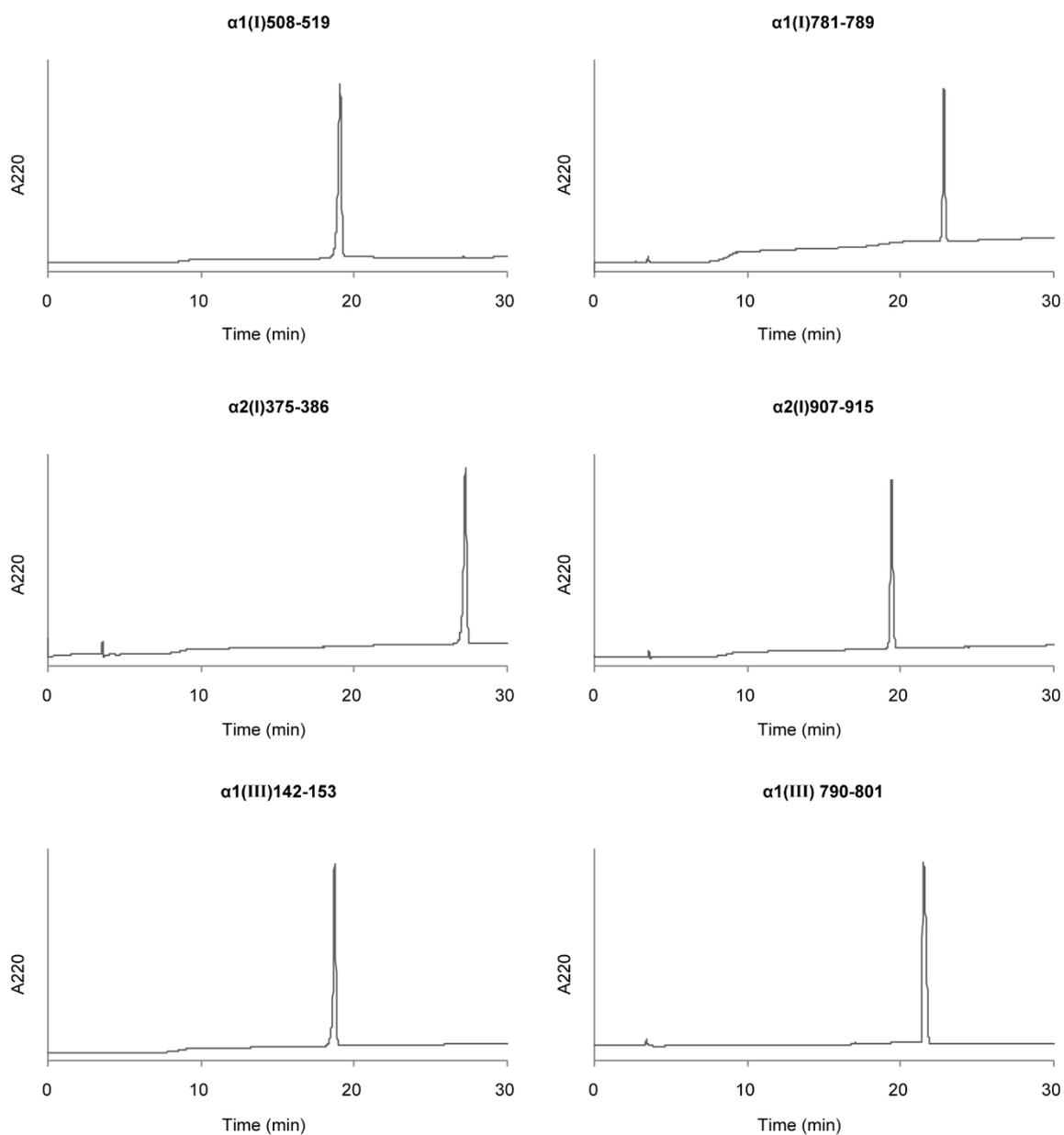


Figure 3-10. 合成ペプチドの RP-HPLC 分析

0.05% (v/v) TFA を含む 0%–30% CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O の直線濃度勾配を 30 分間でかけてペプチドを溶出した。検出波長は 220 nm とした。

Table 3-2. 合成ペプチドの質量分析

<b>peptide</b>	<b>sequence</b>	<b>found <math>m/z</math></b>	<b>calculated mass [M + H]<sup>+</sup> (monoisotopic)</b>
$\alpha$ 1(I) 508–519	GVQGPOGPAGPR	1105.708	1105.575
$\alpha$ 1(I) 781–789	GVVGLOGQR	898.425	898.511
$\alpha$ 2(I) 375–386	EGPVGLOGIDGR	1182.641	1182.612
$\alpha$ 2(I) 907–915	GPSGPQGIR	868.370	868.464
$\alpha$ 1(III) 142–153	GROGLOGAAGAR	1111.743	1111.597
$\alpha$ 1(III) 790–801	GLAGPOGMOGPR	1138.661	1138.568

## コラーゲン $\alpha$ 鎖の定量

MEF を HFD-1(+) で 3 日間培養した。細胞を PBS で洗浄し、15 分間溶解バッファーで氷上処理した。遠心分離 ( $20,600 \times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ , 15 min) 後、上清中のタンパク質を Bradford 法により定量した。回収した培養液に  $0.1 \text{ M}$  となるように HCl を加えて酸性にし、ヒト胎児肺線維芽細胞を用いて作製した安定同位体標識コラーゲンと混合した (Taga et al. 2014)。その後培養液を 2 つに分け、一方は  $4^{\circ}\text{C}$  で 16 時間ペプシン ( $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ ; Sigma-Aldrich) 処理し、他方はペプシン処理せずに  $4^{\circ}\text{C}$  で保存した。コラーゲンは、氷上で 1 時間塩析 ( $1 \text{ M NaCl}/0.1 \text{ M HCl}$ ) することにより培養液から単離した。このコラーゲンサンプルを  $60^{\circ}\text{C}$  で 30 分間加熱し、 $100 \text{ mM Tris-HCl}/1 \text{ mM CaCl}_2$  ( $\text{pH } 7.6$ ) 中、 $37^{\circ}\text{C}$  で 16 時間 sequencing grade modified trypsin (Promega) で消化した。Agilent 1200 Series HPLC system (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) と接続した hybrid QqQ/linear ion trap 3200 QTRAP mass spectrometer (AB Sciex, Foster City, CA, USA) を用いて、過去の報告に従いトリプシン分解溶液の LC-triple quadrupole (QqQ)-MS 分析を行った (Taga et al. 2014)。カラムには BIOshell A160 Peptide  $\text{C}_{18}$  HPLC column ( $5 \mu\text{m}$  particle size,  $L \times \text{I.D. } 150 \text{ mm} \times 2.1 \text{ mm}$ ; Supelco, Bellefonte, PA, USA) を使用した。これまでの研究で確立された  $\alpha 1(\text{I})$  鎖 (GVQGPOGPAGPR, GVVGLOGQR)、 $\alpha 2(\text{I})$  鎖 (EGPVGLOGIDGR, GPSGPQGIR)、 $\alpha 1(\text{III})$  鎖 (GROGLOGAAGAR, GLAGPOGMOGPR) のマーカーペプチドを multiple reaction monitoring (MRM) モードで検出した (Taga et al. 2014)。 $\alpha 1(\text{I})$ 、 $\alpha 2(\text{I})$  および  $\alpha 1(\text{III})$  鎖のモル濃度は、安定同位体標識コラーゲン由来の安定同位体標識ペプチドに対するマーカーペプチドのピーク面積の比から算出した。安定同位体標識コラーゲン中の各  $\alpha$  鎖の絶対濃度は、内部標準としてそれぞれの  $\alpha$  鎖に対応する濃度既知の非標識合成ペプチド (Figure 3-10, Table 3-2) を用いて、MRM 分析によりあらかじめ決定した。

Table 3-3. MEF から分泌された  $\alpha 1(I)$ 、 $\alpha 2(I)$ 、 $\alpha 1(III)$  鎖の定量

**a**

		<b>pepsin(-)</b>		
		$\alpha 1(I)$ Mean $\pm$ SD (pmol/mg)	$\alpha 2(I)$ Mean $\pm$ SD (pmol/mg)	$\alpha 1(III)$ Mean $\pm$ SD (pmol/mg)
+/+ #18	37°C	59.2 $\pm$ 3.6	25.0 $\pm$ 2.2	59.6 $\pm$ 3.1
	33°C	56.3 $\pm$ 2.7	25.5 $\pm$ 0.5	62.2 $\pm$ 11.4
+/+ #24	37°C	52.6 $\pm$ 0.8	27.3 $\pm$ 0.2	22.6 $\pm$ 1.4
	33°C	62.3 $\pm$ 5.4	31.1 $\pm$ 4.5	13.8 $\pm$ 1.1
-/- #11	37°C	55.0 $\pm$ 2.7	13.2 $\pm$ 0.9	5.2 $\pm$ 0.5
	33°C	48.0 $\pm$ 3.7	23.2 $\pm$ 0.4	24.9 $\pm$ 3.0
-/- #13	37°C	22.6 $\pm$ 0.8	4.3 $\pm$ 0.5	2.5 $\pm$ 0.4
	33°C	62.8 $\pm$ 5.0	32.1 $\pm$ 1.9	14.6 $\pm$ 1.0

n = 3.

**b**

		<b>pepsin(+)</b>		
		$\alpha 1(I)$ Mean $\pm$ SD (pmol/mg)	$\alpha 2(I)$ Mean $\pm$ SD (pmol/mg)	$\alpha 1(III)$ Mean $\pm$ SD (pmol/mg)
+/+ #18	37°C	58.5 $\pm$ 3.5	23.8 $\pm$ 1.0	59.5 $\pm$ 5.6
	33°C	56.2 $\pm$ 1.9	23.5 $\pm$ 0.8	58.3 $\pm$ 2.8
+/+ #24	37°C	51.4 $\pm$ 0.6	24.3 $\pm$ 0.1	22.1 $\pm$ 1.1
	33°C	61.6 $\pm$ 7.7	30.0 $\pm$ 1.7	15.2 $\pm$ 1.8
-/- #11	37°C	43.9 $\pm$ 2.7	8.6 $\pm$ 0.5	3.6 $\pm$ 0.1
	33°C	46.7 $\pm$ 2.5	21.9 $\pm$ 1.4	25.9 $\pm$ 1.9
-/- #13	37°C	19.6 $\pm$ 1.3	3.1 $\pm$ 0.7	2.1 $\pm$ 0.4
	33°C	62.8 $\pm$ 2.7	30.5 $\pm$ 1.9	16.0 $\pm$ 0.8

n = 3.

## I型コラーゲンにおける翻訳後修飾の定量

MEF を HFDM-1(+) で 3 日間培養した。回収した培養液に 0.1 M となるように HCl を加えて酸性とし、固定化ペプシン (100 µg/mL; Sigma-Aldrich) 処理および塩析 (1 M NaCl/0.1 M HCl) を行うことでコラーゲンを精製した。精製コラーゲンサンプルに内部標準として安定同位体標識コラーゲンを加え (Taga et al. 2014)、5%ゲルを用いて非還元条件下で SDS-PAGE を行った。タンパク質を PVDF 膜に転写したのち CBB で染色し、 $\alpha 1(I)$  および  $\alpha 2(I)$  鎖の両方を含む領域を膜から切り出した。10%酢酸/40% MeOH で 5 分間の洗浄を 2 回行ったのち、切り出した膜を PicoTag sample tube (Waters, Milford, MA, USA) に入れ、酸加水分解 (6 M HCl/1% phenol, 110°C, 20 h, under N<sub>2</sub>) した。コラーゲンの酸加水分解物を、0.1%酢酸と 5 mM 酢酸アンモニウムを含んだ 50% CH<sub>3</sub>CN を用いて膜から抽出し、過去の報告のように ZIC-HILIC column (3.5 µm particle size, L × I.D. 150 mm × 2.1 mm; Merck Millipore) を使用して LC-QqQ-MS 分析した (Taga et al. 2017)。Pro、Lys、Arg、3-Hyp、4-Hyp、Hyl は MRM モードで検出した。各アミノ酸の含有量は式 [(軽アミノ酸/重アミノ酸)/(軽 Arg/重 Arg)] に従って、安定同位体標識コラーゲン由来の分析物に対するサンプル由来分析物のピーク面積比から算出し、残基/1000 残基で表した。

Table 3-4. Figure 3-4 に示した I 型コラーゲンにおける翻訳後修飾定量の結果のまとめ (残基/1000 残基)

		<b>Pro</b>	<b>3-Hyp</b>	<b>4-Hyp</b>	<b>Lys</b>	<b>Hyl (total)</b>
		<b>Mean ± SD</b>				
<b>+/+ #18</b>	<b>37°C</b>	95.9 ± 2.5	1.5 ± 0.0	100.8 ± 1.8	23.1 ± 1.4	17.7 ± 1.0
	<b>33°C</b>	96.9 ± 1.7	1.2 ± 0.0	98.8 ± 2.7	24.4 ± 1.0	16.3 ± 0.9
<b>+/+ #24</b>	<b>37°C</b>	95.0 ± 0.8	1.4 ± 0.1	99.1 ± 2.7	24.4 ± 1.1	15.6 ± 1.0
	<b>33°C</b>	97.5 ± 1.6	1.2 ± 0.1	98.7 ± 3.0	26.0 ± 0.4	14.5 ± 0.7
<b>-/- #11</b>	<b>37°C</b>	83.9 ± 1.1	4.3 ± 0.3	101.8 ± 0.5	17.4 ± 1.6	24.5 ± 0.7
	<b>33°C</b>	94.4 ± 2.6	1.8 ± 0.1	99.9 ± 2.5	24.2 ± 0.3	14.3 ± 0.4
<b>-/- #13</b>	<b>37°C</b>	89.4 ± 1.6	2.5 ± 0.1	102.4 ± 5.1	17.7 ± 2.0	28.1 ± 4.6
	<b>33°C</b>	94.5 ± 1.7	1.6 ± 0.0	102.4 ± 3.0	22.3 ± 2.2	19.3 ± 1.3

n = 3.

## I 型コラーゲンにおける部位特異的な Pro および Lys の翻訳後修飾解析

特定の修飾部位における翻訳後修飾された Pro および Lys の相対的な存在量は、過去に報告されたようにして LC-MS 分析により推定した (Terajima et al. 2017)。ペプシン処理後の培地から精製したコラーゲンを、 $\alpha$  鎖定量と同様の方法で熱変性後にトリプシンで消化した。トリプシン消化物は、Prominence UFLC-XR system (Shimadzu, Kyoto, Japan) に接続した ultra-high resolution QTOF mass spectrometer (maXis II; Bruker Daltonics) を用いて LC-quadrupole time-of-flight (QTOF)-MS 分析した。カラムには、Ascentis Express C<sub>18</sub> HPLC column (5  $\mu$ m particle size, L  $\times$  I.D. 150 mm  $\times$  2.1 mm; Supelco) を使用した。それぞれの修飾部位における 3 位水酸化された Pro (3-Hyp) および修飾された Lys (Hyl, GHL, GGHL) の相対存在量は、それぞれを含むペプチドのピーク面積比から計算した。

## 分泌された I 型コラーゲンの熱変性温度測定の測定

HFDM-1(+) で MEF を 3 日間培養した。培養液を遠心分離 (2290  $\times$  g, 4°C, 15 min) 後、上清に 0.1 M となるように HCl を加えて酸性にした。4°C で 16 時間、100  $\mu$ g/mL ペプシン処理したのち、塩析 (1 M NaCl/0.1 M HCl) を 4°C で 3 時間行うことでコラーゲンを精製した。単離したコラーゲンは、150 mM NaCl、10 mM EDTA、1% (v/v) Triton X-100 を含んだ 50 mM Tris-HCl (pH7.4) に溶解した。このコラーゲン溶液を PCR チューブに分注し、サーマルサイクラー (Takara Bio, Shiga, Japan) を用いて 38°C から 43.5°C まで 5 分ごとに 0.5°C ずつ徐々に温度を上昇させた。所定の温度で 5 分間維持した後、PCR チューブをサーマルサイクラーから取り出し、20°C で 1 分間冷却した。この溶液にトリプシン (100  $\mu$ g/mL) とキモトリプシン (250  $\mu$ g/mL) を加え、20°C で 2 分間処理した。1 mM となるように PMSF を加えることで反応を停止させた後、5 $\times$  SDS-PAGE サンプルバッファーを添加して、95°C で 5 分間加熱した。非還元条件下で 5%ゲルを用いて SDS-PAGE を行い、タンパク質のバンドを silver best stain one kit (Nacalai Tesque) を用いた銀染色により可視化した。各温度における  $\alpha$ 2(I)

鎖のバンド強度を画像解析ソフト ImageJ で測定した (Schneider, Rasband, and Eliceiri 2012)。38°C の値が 1 となるように正規化し fraction-folded とした。また、4 係数ロジスティック曲線をフィッティングし、fraction-folded が 0.5 となる温度を  $[\alpha 1(I)]_2 \alpha 2(I)$  ヘテロ 3 量体の  $T_m$  とした。

## 第4章 コラーゲン3重らせん構造の熱安定性は環境温度によって調節される

### 4.1. 緒言

コラーゲン3重らせん構造の熱安定性が環境温度(体温)によって調節されるのか、また、翻訳後修飾量がそれに関与するのかについての詳細な研究は行われていないものの、夏に採取したコイの鱗のコラーゲンは、冬に採取したものより3重らせんの熱安定性が1.8°C高いとの報告もあるなど(Duan et al. 2010)、異なる環境温度で生育した生物のコラーゲンがもつ3重らせん構造の熱安定性は、同じ種や個体であっても異なる可能性が示唆されている。

第3章では、*hsp47*<sup>-/-</sup> MEFが分泌したI型コラーゲンは、野生型細胞が分泌したもの比べて $T_m$ が高く、過剰に翻訳後修飾されていることを明らかにした。また、*hsp47*<sup>-/-</sup> MEFが分泌するI型コラーゲンには、野生型細胞からはほとんど分泌されない $[\alpha 1(I)]_3$ ホモ3量体が多く含まれていることを示した。さらに、37°Cで観察されたこれらの異常は、より低温(33°C)で培養することにより正常化することを示し、HSP47がプロコラーゲンの3重らせん部分を安定化することで、マウスの体温付近の温度において、単独では不可能なプロコラーゲンの全長にわたるフォールディングを可能にしていることを明らかにした。これらの結果は、環境温度がコラーゲンの翻訳後修飾量や $T_m$ に影響を与えることを示しているものの、野生型細胞から分泌されたコラーゲンの性質には、37°Cと33°C培養の間でほとんど違いが生じていなかった。

そこで本章では、幅広い温度で培養できる変温動物の細胞を用い、「ER内腔において、プロコラーゲンの3重らせんはその構造形成が可能となるまで安定化され、環境温度に応じた熱安定性を獲得する(Figure 3-9)」という仮説を検証することにした。

哺乳類のコラーゲンと比較すると、変温動物のコラーゲンに関する研究は少ないものの、近年にはゼブラフィッシュをモデルとして用いることで、ヒトのI型コラーゲン異常症を

遺伝的にも表現的にも再現できることが示されている (Gistelinck et al. 2018)。また、ゼブラフィッシュは広い温度範囲 (約 10°C~40°C) で生存できることも報告されていることから (Cortemeglia and Beitinger 2005; Schaefer and Ryan 2006)、本研究ではゼブラフィッシュの I 型コラーゲンと環境温度の関係を明らかにすることにした。ゼブラフィッシュと哺乳類の I 型コラーゲンに関する相違点として、ゼブラフィッシュは哺乳類に見られる  $\alpha 1$  鎖、 $\alpha 2$  鎖に加え、 $\alpha 3$  鎖を有していることがあげられる。この  $\alpha 3$  鎖は  $\alpha 1$  鎖と高い相同性をもつことが知られているため (Morvan-Dubois et al. 2003)、ゼブラフィッシュの I 型コラーゲンに  $\alpha 1$  鎖の代わりとして組み込まれていると考えられる。本研究では、ゼブラフィッシュ線維芽細胞を 18°C から 33°C で培養し、分泌されるコラーゲンの熱安定性と翻訳後修飾量、I 型コラーゲンの  $\alpha$  鎖組成を分析した。

#### 4.2. 異なる温度で培養した ZF4 細胞が発現するタンパク質の解析

本研究で使用したゼブラフィッシュ胚線維芽細胞株 (ZF4) の一般的な培養温度は 28°C 前後であるが、18、23、28、33°C でも細胞が増殖することを確認した。また、この細胞は 37°C においては維持することができなかった。28°C でコンフルエントに達した ZF4 細胞を 18、23、28、33°C で 3 日間培養した。培地を回収後、ビオチン標識した変性コラーゲン結合ペプチド [soCMP6-7(Glu)2] を用いた western blotting を行うことで、細胞のタンパク質量あたりのコラーゲン分泌量を比較した (Figure 4-1a)。 $\alpha 1(I)$  と  $\alpha 3(I)$ 、および pC $\alpha 1(I)$  と pC $\alpha 3(I)$  に相当するバンドは SDS-PAGE で分離できなかった。全体として、中間の温度 (23°C と 28°C) に比べて低温 (18°C) と高温 (33°C) では分泌されるコラーゲン量は少なく、特に pC $\alpha 1(I)$  + pC $\alpha 3(I)$ 、 $\alpha 1(I)$  +  $\alpha 3(I)$ 、 $\alpha 2(I)$  鎖に相当するバンドは 23°C と 28°C サンプルにおいて 18°C と 33°C サンプルよりも濃く検出された。また、pC $\alpha 1(I)$  + pC $\alpha 3(I)$ 、pC $\alpha 2(I)$ 、 $\alpha 1(I)$  +  $\alpha 3(I)$  鎖の電気泳動移動度は、33°C サンプルで他のサンプルよりわずかに低下しており、これらのポリペプチド鎖の分子サイズが増加していることが示唆された。

コラーゲンの分子サイズの増加が 3 重らせん領域で生じているのかどうかを調べるために、4°C でペプシン処理した培地から塩析することで精製したコラーゲン 3 重らせん領域のサンプルを、SDS-PAGE で解析した。分離したタンパク質のバンドは CBB 染色で可視化した。33°C で分泌された  $\alpha 1(I)$  +  $\alpha 3(I)$  および  $\alpha 2(I)$  鎖は、他の培養温度で分泌されたものと比較して電気泳動移動度が低下していた (Figure 4-1b)。これは、33°C ではコラーゲンの 3 重らせん領域で過剰な翻訳後修飾が起こっていることを示している。Pro と Lys の水酸化 (+16 Da) のわずかな質量変化を考えると、33°C 培養時に分泌されたコラーゲンにおける電気泳動移動度の低下は、Hyl の糖鎖付加体の増加によって生じたと考えられた。さらに、各サンプル中の  $\alpha 1(I)$  +  $\alpha 3(I)$  と  $\alpha 2(I)$  のバンドの濃さを比較すると、33°C サンプルでは他の温度よりも  $\alpha 2(I)$  に対する  $\alpha 1(I)$  +  $\alpha 3(I)$  の割合が高くなっていることが示唆された。

HSP47 はプロコラーゲンの生合成に影響を与えるが、熱誘導性であるため培養温度によりその量が増加する可能性がある。そこで、各培養温度における ZF4 細胞の HSP47 発現量を比較した。18、23、28、33°C で 3 日間培養した ZF4 を 1% NP-40 を含む溶解バッファーで溶解し、そこから I 型コラーゲン担持ビーズを用いて HSP47 を濃縮後、western blotting によりサンプル中の HSP47 量を比較した (Figure 4-1c)。ローディングコントロールとしては、 $\beta$ -actin を使用した。抗 HSP47 (SERPINH1) ポリクローナル抗体では細胞ライセートからゼブラフィッシュ HSP47 を十分な感度で検出することはできなかったが、コラーゲン固定化ビーズを用いた濃縮により、HSP47 のバンドを検出することができた。50 kDa 付近のバンドは、細胞ライセートサンプルでのみ観察され、コラーゲン結合性を示さなかったことから、非特異的なものであることが示唆された。HSP47 量は 18 から 28°C 培養時にはほぼ一定であり、33°C 培養時にのみ顕著に増加した。DNA マイクロアレイによるゼブラフィッシュの遺伝子発現解析では、HSP47 の遺伝子発現は 28°C 以下ではほとんど変化しないが、高温 (34°C) で 10 倍以上に増加することが示されており、本研究の結果はこれと一致していた (Long et al. 2012)。Figure 4-1c では、33°C 培養サンプルで 2 種類の異なる HSP47 のバンドが検出された。ゼブラフィッシュは HSP47 (*serpinh1b*) に加え、HSP47-like (*serpinh1a*) をもっており、これらが異なるバンドとして検出されたと考えられる。また、HSP47 および HSP47-like はどちらも糖鎖修飾部位を 2 カ所もっているため (Liang et al. 2021)、2 つのバンドが糖鎖修飾の違いによって生じた可能性も考えられる。

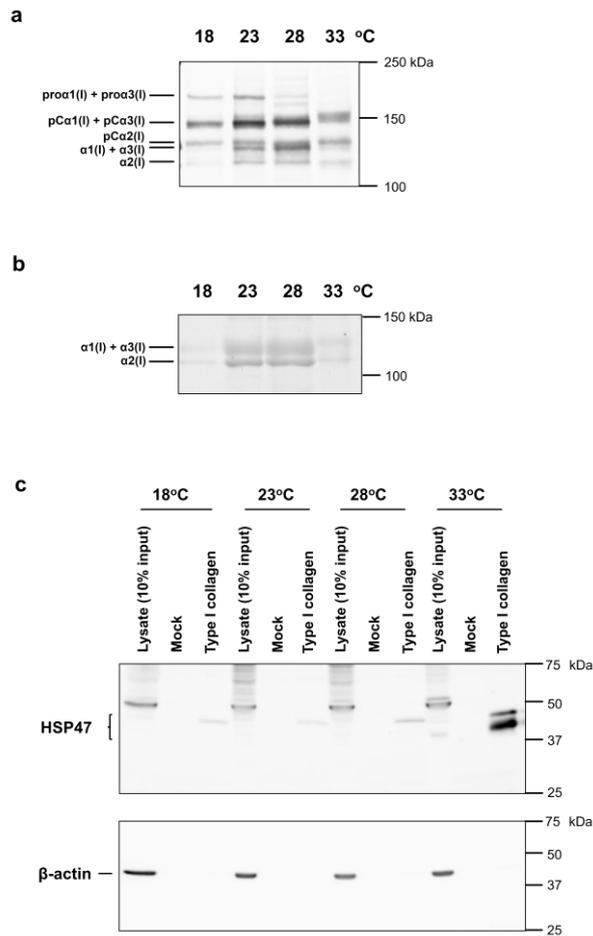


Figure 4-1. 異なる温度で培養した ZF4 細胞から分泌されたコラーゲンおよび細胞内 HSP47 の解析

- (a) 培養液から作製した SDS サンプルは、細胞のタンパク質量で正規化して還元条件下、SDS-PAGE ゲル (5%) にロードした。タンパク質をニトロセルロース膜に転写後、ビオチン標識 soCMP6-7(Glu)2 を用いて、コラーゲンのポリペプチド鎖を検出した。
- (b) 培養液を 4°C でペプシン処理したのち、塩析することでコラーゲンの 3 重らせん領域を精製した。5%ゲルを用いて非還元条件下で SDS-PAGE を行い、CBB 染色によってタンパク質を検出した。
- (c) I 型コラーゲン固定化ビーズまたはモック固定化ビーズを用いて、ZF4 細胞のライセートから HSP47 をプルダウンした。非還元条件下で SDS-PAGE (10%ゲル) を行い、HSP47 に対する抗体を用いて western blotting を行ったのち (top)、抗  $\beta$ -actin 抗体でリプローブした (bottom)。

#### 4.3. ZF4 細胞から分泌された I 型コラーゲンにおける翻訳後修飾の定量

Figure 4-1b において 33°C の ZF4 細胞が分泌するコラーゲンの 3 重らせん領域の分子サイズが増加していたことから、翻訳後修飾量が増加していることが示唆された。そこで、酸加水分解したサンプルのアミノ酸分析を行うことで、異なる培養温度で分泌されたコラーゲンにおける翻訳後修飾の程度を比較した。ZF4 を各培養温度で 3 日間培養し、ペプシン処理および塩析を行うことで、培地からコラーゲンの 3 重らせん領域を精製した。

コラーゲンサンプルを SDS-PAGE で分離し、PVDF 膜に転写後に  $\alpha 1(I) + \alpha 3(I)$  および  $\alpha 2(I)$  に相当するバンドを切り出した。安定同位体標識コラーゲンを内部標準として加え、酸加水分解の後、LC-MS を用いて Pro、3-Hyp、4-Hyp、Lys、total Hyl (Hyl および glycosylated Hyl) の分析を行った (Taga et al. 2014)。1000 残基あたりの残基数で表した定量結果を Table 4-6 に示す。さらに、得られた結果から 4-Hyp 比 [ $4\text{-Hyp}/(\text{Pro} + 4\text{-Hyp} + 3\text{-Hyp})$ ]、3-Hyp 比 [ $3\text{-Hyp}/(\text{Pro} + 4\text{-Hyp} + 3\text{-Hyp})$ ]、total Hyl 比 [ $\text{total Hyl}/(\text{Lys} + \text{total Hyl})$ ] を算出した (Figure 4-2)。

$\alpha 1(I) + \alpha 3(I)$  と  $\alpha 2(I)$  のどちらにおいても 4-Hyp 比および total Hyl 比は温度依存的に増加した。ゼブラフィッシュコラーゲンの 3 重らせん領域において、Y 位 Pro 残基が全 Pro 残基に占める割合は、 $\alpha 1(I)$ 、 $\alpha 3(I)$  では 50%、 $\alpha 2(I)$  では 43%である (Table 4-7a)。ZF4 細胞から分泌されたコラーゲンでは、18°C でも 4-Hyp 比が  $\alpha 1(I) + \alpha 3(I)$  で 48%、 $\alpha 2(I)$  で 40%であり、Y 位の Pro 残基のほぼ全てが 4-Hyp となっていた (Figure 4-2 left)。そのため、温度上昇に伴う 4-Hyp 比の増加の割合は比較的小さかった。全 Lys 残基に対して Hyl となりうる Y 位 Lys 残基が占める割合は、 $\alpha 1(I)$  と  $\alpha 3(I)$  ではそれぞれ 66%と 63%、 $\alpha 2(I)$  では 71%である (Table 4-7b)。18°C の ZF4 細胞から分泌されたコラーゲンでは、 $\alpha 1(I) + \alpha 3(I)$  および  $\alpha 2(I)$  とともに全 Lys の 26%しか Hyl になっておらず、未修飾の部位が多く残っていることが示された (Figure 4-2 middle)。環境温度の上昇に伴い、Hyl 比は顕著に増加し、33°C では  $\alpha 1(I) + \alpha 3(I)$  で 49%、 $\alpha 2(I)$  で 50%に達した。Hyl の糖鎖付加体は酸に不安定なため本研究では解析でき

なかったが、33°CにおけるProとLysの水酸化の増加の程度とFigure 4-1aの結果から、33°C培養時に分泌されたコラーゲンでは、Hylの糖鎖付加体が増加していることが強く示唆される。一方、3-Hyp残基は33°CのZF4細胞から分泌されたコラーゲンでのみ顕著に増加した(Figure 4-2 right)。これらの結果は、翻訳後修飾量は環境温度の上昇により増加するものの、その温度感受性は修飾の種類によって異なることを示している。

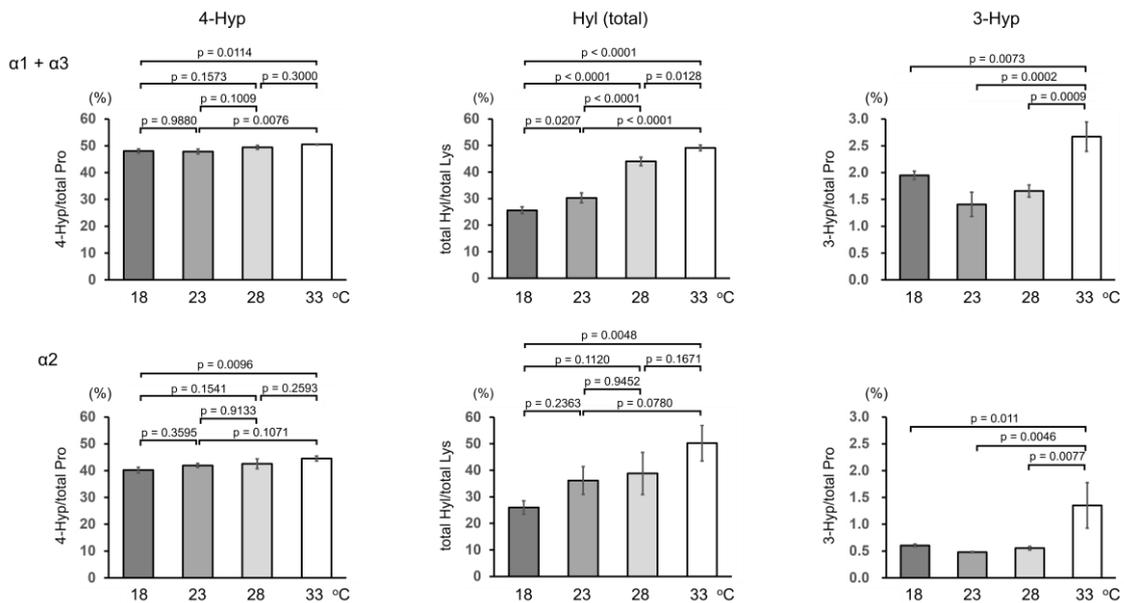


Figure 4-2. ZF4細胞から分泌されたI型コラーゲンにおける翻訳後修飾の定量

4°Cでペプシン処理した培養液から、塩析によってコラーゲンを単離した。精製したコラーゲンはSDS-PAGEを行ったのち、PVDF膜に転写した。その後、 $\alpha 1(I) + \alpha 3(I)$ と $\alpha 2(I)$ のバンドを切り出し、安定同位体標識コラーゲンを添加して酸加水分解を行った。Pro、Lys、3-Hyp、4-Hyp、total Hyl (Hyl + glycosylated Hyl)をLC-MSで定量し、4-Hyp比 [4-Hyp/(Pro + 4-Hyp + 3-Hyp)]、total Hyl比 [total Hyl/(Lys + total Hyl)]、3-Hyp比 [3-Hyp/(Pro + 4-Hyp + 3-Hyp)]の値を算出した。Means  $\pm$  SD (n = 3)。平均値の相違は一元配置分散分析およびTukey's testによって検定した。

#### 4.4. ZF4 細胞から分泌された I 型コラーゲンにおける部位特異的な 3-Hyp の解析

コラーゲンにおいて比較的数量が少ない翻訳後修飾である 3-Hyp に着目し、I 型コラーゲンの各  $\alpha$  鎖について、培養温度が特定の Pro の 3-Hyp 化に与える影響を分析した。魚類 I 型コラーゲンにおいて、どの Pro が 3-Hyp 化されるのかに関する報告はこれまでなされていないものの、哺乳類コラーゲンの既知の修飾部位 (Gly-X-4-Hyp の X 位 Pro707、Pro716、Pro719、Pro986) は (Taga et al. 2016)、ゼブラフィッシュでもほとんどが保存されている (Figure 4-8)。そこで、ZF4 細胞を異なる温度で 3 日間培養してコラーゲンサンプルを調製し、トリプシン消化後に LC-MS で分析することで、これらの特定部位における 3-Hyp の相対量を求めた。

ゼブラフィッシュを含む硬骨魚類の I 型および II 型コラーゲンでは、哺乳類のコラーゲンでこれまで知られているどの 3-Hyp 化部位でも 3-Hyp を発見できなかったと報告されている (Tonelli et al. 2020)。本研究ではゼブラフィッシュの  $\alpha 1(I)$ 、 $\alpha 2(I)$ 、 $\alpha 3(I)$  において、LC-MS 分析により、ラットコラーゲンに関する研究で報告された既知の 3-Hyp 化部位の Pro 残基で +16 Da の質量変化が検出された (Figures 4-3, 8)。この結果は、これらの部位に 3-Hyp が存在することを強く示唆するものである。さらに、哺乳類では  $\alpha 2(I)$  Pro986 の 3-Hyp 化は報告されていないが、ZF4 細胞の分泌するコラーゲンではこの部位の Pro が水酸化されていることも明らかになった。18、23、28°C で ZF4 細胞から分泌されたコラーゲンでは、解析したどのペプチド断片でも 3-Hyp の量にほとんど差はなかったが、33°C の ZF4 細胞から分泌されたコラーゲンでのみ 3-Hyp が顕著に増加した。これは、Figure 4-2 に示した総 3-Hyp 量の変化と一致した傾向であった。

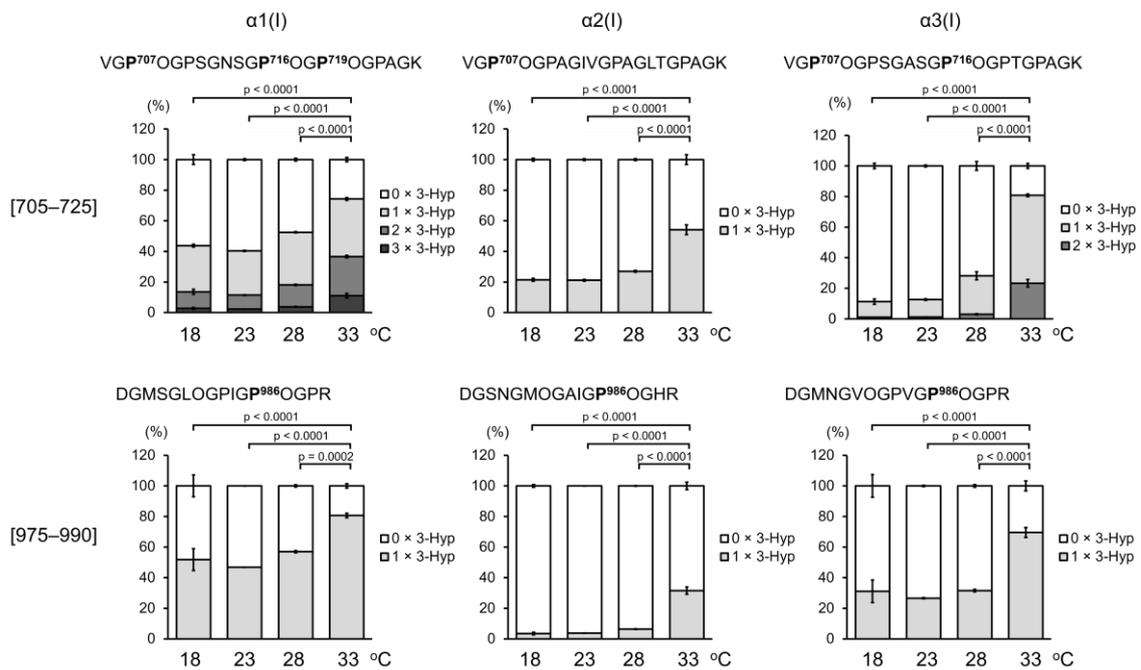


Figure 4-3. ZF4 細胞から分泌された I 型コラーゲンにおける部位特異的 3-Hyp の定量  
ZF4 細胞の培養液を 4°C でペプシン処理した後、塩析によりコラーゲンを精製した。精製したコラーゲンを熱変性させ、トリプシン消化を行った。LC-MS 分析により、配列中に太字で示した特定部位における 3-Hyp を定量した。Means ± SD (n = 3)。平均値の相違は一元配置分散分析および Tukey's test によって検定した。

#### 4.5. ZF4 細胞から分泌された I 型コラーゲン $\alpha$ 鎖の定量

I 型コラーゲン各  $\alpha$  鎖の分泌量は培養温度によって変化することが明らかになったため (Figures 4-1a, b)、さらなる解析を行うべくこれらを定量した。ZF4 細胞を 3 日間培養した培養液を 4°C でペプシン処理した後、塩析することでコラーゲンサンプルを調製した。熱変性後にトリプシン消化し、各  $\alpha$  鎖に特異的な配列をもつマーカーペプチドを LC-MS で分析した。この際、各マーカーペプチドに対応する  $^{15}\text{N}$  標識合成ペプチドを内部標準として使用することで (Figure 4-7, Table 4-3)、I 型コラーゲンの各  $\alpha$  鎖を定量した (Tables 4-4, 5)。全  $\alpha$  鎖中の各  $\alpha$  鎖の割合は、28°C 以下ではほぼ一定であったが、33°C 培養では  $\alpha 1$  鎖の割合が 40–42% から 55% に増加し、 $\alpha 2$  および  $\alpha 3$  鎖の割合は 28–31% から 22–23% に減少した (Figure 4-4)。この結果は、ZF4 細胞から分泌される I 型コラーゲンにおいて、各  $\alpha$  鎖の割合が培養温度によって変化し、その変化は 33°C 付近で顕著であることを示している。

続いて、各培養温度でこれらの  $\alpha$  鎖がどのような組成の 3 量体を形成しているのかを推定することにした。3 重らせんを形成可能な  $\alpha$  鎖の組み合わせは、 $\alpha$  鎖の C-プロペプチド領域における Cys 残基の位置によって決まっていることが、これまでに示唆されている (DiChiara et al. 2018)。この報告から、ゼブラフィッシュの I 型コラーゲンでは、 $(\alpha 1)_3$ 、 $[(\alpha 1)_2\alpha 3]$ 、 $[(\alpha 1)_2\alpha 2]$ 、 $[\alpha 1\alpha 2\alpha 3]$  という鎖組成の 3 量体が可能であると考えられる。Table 4-5 に示すデータから、各温度で ZF4 細胞から分泌される I 型コラーゲン中のこれらの 3 量体の割合を計算した (Table 4-1)。実際の 3 量体の割合を算出するにはデータが不足しているため、ここでは 18、23、28、33°C における  $[(\alpha 1)_2\alpha 3]$  の割合を、それぞれ変数  $x$ 、 $y$ 、 $z$ 、 $w$  (%) とおいて計算を行っている。Table 4-1 に示すように、I 型コラーゲンの全 3 量体中の  $[\alpha 1\alpha 2\alpha 3]$  の割合は、18 から 28°C では少なくとも 75.3 から 78.5%、33°C では最大でも 65.2% であり、33°C では他の温度より  $[\alpha 1\alpha 2\alpha 3]$  の割合が低下していることが示唆された。一方で、他の 3 量体の割合を異なる温度間で正確に比較することは、これらが変数の影響により幅広い値をと

るため困難であった。そこで、それぞれの 3 量体の割合を比較するのではなく、2 種類の 3 量体の割合の和を比較した。 $(\alpha 1)_3$  と  $[(\alpha 1)_2\alpha 3]$  の割合の和は、18°C で 15.1%、23°C で 9.4%、28°C で 11.1%、33°C で 29.9%、 $(\alpha 1)_3$  および  $[(\alpha 1)_2\alpha 2]$  の割合の和は、18°C で 6.1%、23°C で 13.1%、28°C で 13.6%、33°C で 34.8%と算出され、 $(\alpha 1)_3$  と  $[(\alpha 1)_2\alpha 3]$  の割合の和および  $(\alpha 1)_3$  と  $[(\alpha 1)_2\alpha 2]$  の割合の和は 33°C で最も高いことが推定された。これらの結果から、培養温度によって、分泌された I 型コラーゲンにおける各 3 量体の組成が変化していることが示され、33°C では、 $\alpha 1$  鎖を 1 本しか含まない  $[\alpha 1\alpha 2\alpha 3]$  の割合が低下し、 $\alpha 1$  鎖を 2 本以上含む  $(\alpha 1)_3$  と  $[(\alpha 1)_2\alpha 3]$  の割合の和および  $(\alpha 1)_3$  と  $[(\alpha 1)_2\alpha 2]$  の割合の和が増加していることが示された。

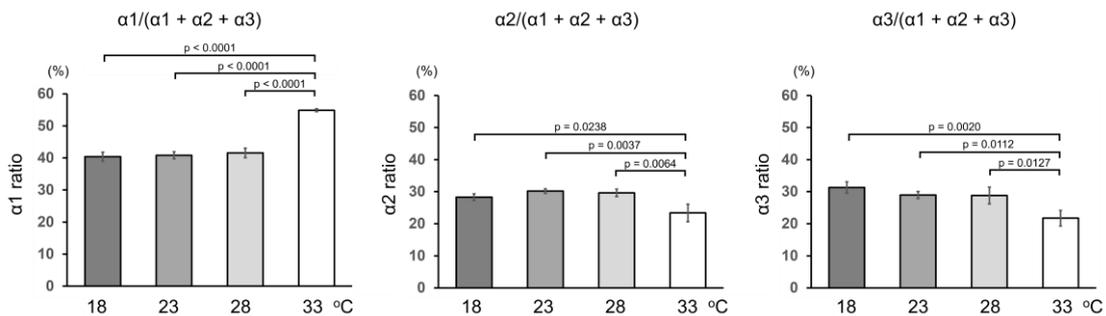


Figure 4-4. ZF4 細胞から分泌された I 型コラーゲン  $\alpha$  鎖の定量

4°C でペプシン処理した培養液から塩析によりコラーゲンを精製した。安定同位体標識した合成ペプチドを内部標準として添加した後、熱変性させたコラーゲンをトリプシンで分解した。マーカーペプチドを LC-MS で測定することで、I 型コラーゲンの各  $\alpha$  鎖を定量した。Means  $\pm$  SD (n = 3)。平均値の相違は一元配置分散分析および Tukey's test によって検定した。

Table 4-1. ZF4 細胞から分泌される I 型コラーゲンにおける各 3 量体の割合

Culture Temperature	$(\alpha 1)_3$	$[(\alpha 1)_2\alpha 3]$	$[(\alpha 1)_2\alpha 2]$	$[\alpha 1\alpha 2\alpha 3]$	$(\alpha 1)_3 + [(\alpha 1)_2\alpha 3]$	$(\alpha 1)_3 + [(\alpha 1)_2\alpha 2]$
	Average (SD) (%)	Average (SD) (%)	Average (SD) (%)	Average (SD) (%)	Average (SD) (%)	Average (SD) (%)
18°C	15.1 (3.1) - x max: 6.1 (x = 9.0) min: 0 (x = 15.1)	x max: 15.1 (x = 15.1) min: 9.0 (x = 9.0)	-9.0 (7.6) + x max: 6.1 (x = 15.1) min: 0 (x = 9.0)	93.9 (5.4) - x max: 84.6 (x = 9.0) min: 78.5 (x = 15.1)	15.1 (3.1)	6.1 (5.4)
23°C	9.4 (2.2) - y max: 9.4 (y = 0) min: 0 (y = 9.4)	y max: 9.4 (y = 9.4) min: 0 (y = 0)	3.7 (4.5) + y max: 13.1 (y = 9.4) min: 3.7 (y = 0)	86.9 (3.3) - y max: 86.9 (y = 0) min: 77.8 (y = 9.1)	9.4 (2.2)	13.1 (3.3)
28°C	11.1 (3.5) - z max: 11.1 (z = 0) min: 0 (z = 11.1)	z max: 11.1 (z = 11.1) min: 0 (z = 0)	2.4 (11.2) + z max: 13.5 (z = 11.1) min: 2.4 (z = 0)	86.4 (7.8) - z max: 86.4 (z = 0) min: 75.3 (z = 11.1)	11.1 (3.5)	13.6 (7.8)
33°C	29.9 (8.2) - w max: 29.9 (w = 0) min: 0 (w = 29.9)	w max: 29.9 (w = 29.9) min: 0 (w = 0)	4.9 (15.4) + w max: 34.8 (w = 29.9) min: 4.9 (w = 0)	65.2 (7.3) - w max: 65.2 (w = 0) min: 35.3 (w = 29.9)	29.9 (8.2)	34.8 (7.3)

$9.0 \leq x \leq 15.1, 0 \leq y \leq 9.4, 0 \leq z \leq 11.1, 0 \leq w \leq 29.9. n = 3.$

#### 4.6. ZF4 細胞から分泌されたコラーゲンの構造熱安定性

異なる温度で培養した ZF4 細胞から分泌されたコラーゲンがもつ 3 重らせん構造の熱安定性を比較するために、ペプシン処理した培地からコラーゲンを精製し、CD 測定によりコンフォメーションを解析した。コラーゲン溶液の温度を上昇させながら 221 nm の CD シグナルを測定し、これを正規化することで算出した fraction folded をプロットすることで、3 重らせんの熱融解曲線を得た (Figure 4-5)。コラーゲン 3 重らせんの  $T_m$  は、18、23、28、33°C 培養サンプルで、それぞれ 34.2、34.8、34.4、36.4°C と推定された。この結果は、培養温度が 28°C 以下ではコラーゲンの熱安定性がほぼ一定であること、また、それ以上の温度 (33°C) では顕著に高くなることを示している。この  $T_m$  の上昇は、コラーゲンにおける翻訳後修飾の増加や I 型コラーゲンの  $\alpha$  鎖組成の変化によって引き起こされたと考えられる。

I 型コラーゲンの  $\alpha$  鎖組成が 3 重らせんの熱安定性に与える影響を調べるため、ゼブラフィッシュ I 型コラーゲン分子がもつ 3 重らせんの相対的な熱安定性を、 $\alpha$  鎖組成ごとにシミュレートした。このシミュレーションには、コラーゲン様ペプチドが形成する 3 重らせん構造の  $T_m$  を予測可能な、経験的パラメータを用いたアルゴリズムである SCEPTTr を使用した (Walker et al. 2021)。

コラーゲンの 3 重らせん構造は、3 本のポリペプチド鎖が互いに長軸方向に 1 残基ずつずれて絡み合うことで形成される (Figure 1-1)。したがって、2 本の A 鎖と 1 本の B 鎖からなるヘテロ 3 量体の場合、B 鎖が leading (BAA)、middle (ABA)、trailing (AAB) のいずれの位置を占めるのかによって、異なる 3 種類の 3 量体が考えられる。A 鎖 1 本、B 鎖 1 本、C 鎖 1 本からなるヘテロ 3 量体においては 6 種類の異性体 (ABC, ACB, BAC, BCA, CAB, CBA) が考えられる。

ゼブラフィッシュ I 型コラーゲンとしては  $(\alpha 1)_3$ 、 $[(\alpha 1)_2\alpha 2]$ 、 $[(\alpha 1)_2\alpha 3]$ 、 $[\alpha 1\alpha 2\alpha 3]$  のみ形成可能であることが示唆されていることから、鎖ずれによる異性体を考慮すると計 13 種類の

I型コラーゲン分子が存在すると考えられる。さらに、哺乳類のI型コラーゲンの  $[(\alpha 1)_2\alpha 2]$  ヘテロ 3 量体に関する研究により、I型コラーゲン分子は  $\alpha 1\alpha 2\alpha 1$  の鎖ずれ構造ではないと示唆されていること (Jalan et al. 2020; Kawahara et al. 2020)、ゼブラフィッシュの  $\alpha 3$  鎖はその相同性から  $\alpha 1$  鎖の代わりに利用されると考えられることから (Morvan-Dubois et al. 2003)、 $\alpha 2$  鎖を middle 鎖としてもつ分子は形成しないものとして除外し、Table 4-2 に示す 10 種類の I型コラーゲン分子がゼブラフィッシュにおいて形成されると仮定した。

各 3 量体の仮想相対熱安定性は、各  $\alpha$  鎖に由来するそれぞれ 334 個のペプチド断片の N 末端と C 末端に (Pro-4-Hyp-Gly)<sub>5</sub> を追加した 45 アミノ酸残基からなるペプチドを用いて、各 3 量体の 334 カ所の 3 重らせんの相対的な熱安定性を計算したのち、その平均として算出した (Figure 4-9)。この際、Y 位の Pro 残基はすべて 4-Hyp 残基として計算した (Table 4-2)。ゼブラフィッシュ I型コラーゲンとして形成可能なアイソフォームの熱安定性は、 $(\alpha 1)_3$ 、 $[(\alpha 1)_2\alpha 3]$ 、 $[(\alpha 1)_2\alpha 2]$ 、 $[\alpha 1\alpha 2\alpha 3]$  の順に高いことが推測された。鎖ずれの違いは、このアイソフォームの熱安定性の順序には影響を与えなかった。

このシミュレーションから、 $\alpha 1$  鎖を多くもつアイソフォームは相対的に高い熱安定性を持つことが示唆された。Table 4-1 において、33°C 培養では相対的に安定なアイソフォームの割合の和  $(\alpha 1)_3 + [(\alpha 1)_2\alpha 3]$ 、 $(\alpha 1)_3 + [(\alpha 1)_2\alpha 2]$  が増加し、比較的不安定な  $[\alpha 1\alpha 2\alpha 3]$  の割合は低下していることが示されている。これらの結果は、 $\alpha$  鎖組成の変化が 33°C で ZF4 細胞から分泌されるコラーゲンの熱安定性の向上に寄与していることを示唆している。

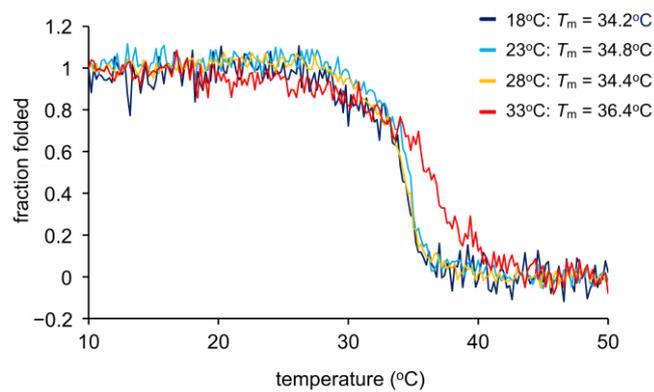


Figure 4-5. コラーゲン 3 重らせんの熱融解曲線

4°C でペプシン処理した培養液から塩析によりコラーゲンを精製した。コラーゲン溶液の温度を上昇 (0.25°C/min) させながら、221 nm の CD シグナルを測定した。3 重らせんの  $T_m$  は、fraction folded が 0.5 となる温度とした。

Table 4-2. ゼブラフィッシュ I 型コラーゲンとして形成しうる 3 量体の相対的な熱安定性のシミュレーション

$\alpha$ -Chain composition	Chain stagger	Virtual relative thermal stability (°C)
$(\alpha 1)_3$	$\alpha 1\alpha 1\alpha 1$	40.7
	$\alpha 1\alpha 1\alpha 3$	39.9
$[(\alpha 1)_2\alpha 3]$	$\alpha 3\alpha 1\alpha 1$	39.7
	$\alpha 1\alpha 3\alpha 1$	39.3
$[(\alpha 1)_2\alpha 2]$	$\alpha 2\alpha 1\alpha 1$	39.0
	$\alpha 1\alpha 1\alpha 2$	38.8
$[\alpha 1\alpha 2\alpha 3]$	$\alpha 2\alpha 3\alpha 1$	38.0
	$\alpha 2\alpha 1\alpha 3$	37.9
	$\alpha 1\alpha 3\alpha 2$	37.7
	$\alpha 3\alpha 1\alpha 2$	37.5

#### 4.7. 考察

プロコラーゲンの翻訳後修飾酵素は 1 本鎖部分のみを基質として認識するため (Mylyharju 2005)、ER 内で行われるプロコラーゲンの修飾は 3 重らせん形成が完了するまで続くと考えられる (Figure 3-9)。実際、未修飾のコラーゲンポリペプチド鎖をプロリン 4-水酸化酵素で処理すると、温度依存的にコラーゲンの 4-Hyp 量が増加することが報告されている (Berg and Prockop 1973b; Jimenez et al. 1974; Murphy and Rosenbloom 1973)。4-Hyp 化は 3 重らせん構造の安定化に大きく寄与していることが知られており (Berg and Prockop 1973a)、Pro の 3-Hyp 化も 3 重らせんの安定性を向上させる (Mizuno et al. 2008)。また、Lys 側鎖の修飾も 3 重らせんの熱安定性に影響を与える可能性が示されている (Nokelainen et al. 1998; Takuwa et al. 2016)。プロコラーゲンの分泌には TANGO1 が関与しており、TANGO1 は HSP47 と相互作用することで、3 重らせんを形成したプロコラーゲンの分泌に寄与していることが示唆されている (Ishikawa et al. 2016)。一方で、ミスフォールドしたプロコラーゲンは ER 内腔でカルネキシンに認識され、オートファジーにより分解される (Forrester et al. 2019)。これらのことから、ER 内腔においてプロコラーゲンは、HSP47 による補助をうけつつ全長にわたる 3 重らせんが形成されるまで翻訳後修飾によって安定化され、構造形成が完了後、選択的に Golgi 体に輸送され、そののち細胞外に分泌されることが示唆される。そこで本章では、このようなシステムによって、プロコラーゲン 3 重らせん構造が環境温度に応じた熱安定性を獲得すると仮説を立て、これを検証した。

ZF4 細胞を異なる温度で培養し、分泌された I 型コラーゲンの翻訳後修飾を定量したところ、4-Hyp 量は培養温度依存的に増加していた (Figure 4-2 left)。しかし、Y 位の Pro 残基のほとんどが 18°C でもすでに 4-Hyp 化されていたため、その変化の割合はわずかであった。また、培養温度の上昇にともない、全 Hyl 量も増加した (Figure 4-2 middle)。一方で、3-Hyp と Hyl の糖鎖付加体の量は、33°C でのみ顕著に増加していることが示唆された (Figures 4-

1b, 2 right, 3)。これらのまれな修飾は進行しにくく、未修飾の基質部位が多く残っていたために、33°C においてのみ修飾率の顕著な増加を示したと考えられる。すなわちこの結果は、33°C においてプロコラーゲンの 3 重らせん形成にかかる時間が長くなっていることを示唆している。

異なる温度で分泌された I 型コラーゲンの  $\alpha$  鎖を定量したところ、33°C でのみ  $\alpha 1$  鎖の割合が高く、 $\alpha 2$  鎖と  $\alpha 3$  鎖の割合が低いことが明らかになった (Figure 4-4)。さらに、コラーゲン様ペプチドが形成する 3 重らせん構造の  $T_m$  を予測可能なアルゴリズムを用いて、I 型コラーゲンとして形成可能な 3 量体の相対的な熱安定性をシミュレートしたところ、33°C における  $\alpha$  鎖組成の変化はコラーゲンの熱安定性の向上に寄与していることが示唆された (Tables 4-1, 2)。このシミュレーションでは実際のコラーゲン 3 重らせんの  $T_m$  を予測することはできないものの、得られた値を用いて 3 量体間の熱安定性を相対的に比較することが可能である。さらに、実際にコラーゲン 3 重らせんの  $T_m$  を測定すると、培養温度が 18°C から 28°C の範囲ではほぼ一定であり、33°C で分泌されたコラーゲンのみ  $T_m$  が高かった (Figure 4-5)。これは、3-Hyp の増加や I 型コラーゲン  $\alpha$  鎖組成の変化といった要因によるものと考えられた (Figures 4-2 right, 3, Table 4-1)。また、Hyl の糖鎖付加体の増加も熱安定性に影響を与えている可能性がある (Figures 4-1a, b)。

ZF4 細胞から分泌されるコラーゲンの性質は、33°C 培養時のみ大きく異なっていた。これは、コラーゲン 3 重らせん構造の熱安定性を確保する品質管理機構の働きによるものだと考えられる。しかしながら、ミスフォールドまたはアンフォールド状態のまま細胞外に漏れ出てしまったコラーゲンが、サンプル作製時の 4°C におけるペプシン処理で分解されている可能性を否定することはできない。

HSP47 のコラーゲンに対する結合能は酸性条件下で低下することが報告されているため (Abdul-Wahab et al. 2013; Kitamura et al. 2018; Oecal et al. 2016)、培養液の pH はコラーゲンの生合成に影響を与える可能性がある。本研究の実験温度条件では培養液の pH は 7.3 から 7.

4であった。このことは、培養液の pH の違いが結果に与える影響は、本研究において無視できる程度であることを示している。

プロコラーゲン  $\alpha$  鎖の修飾は翻訳開始直後から行われるため (Myllyharju 2005)、HSP47 との相互作用や翻訳時および 3 重らせん形成時の修飾により、28°C 以下では 3 重らせんの熱安定性が十分に確保されていた (Figure 4-6)。一方で、33°C の ZF4 細胞から分泌されたコラーゲンでは翻訳後修飾の増加、 $\alpha$  鎖組成の変化および、それに伴う  $T_m$  の上昇が観察された。これらの変化は、第 3 章において *hsp47*<sup>-/-</sup> MEF で観察されたコラーゲン異常と同様であったことから、ER 内腔におけるプロコラーゲン 3 重らせんの不安定化に起因するものと考えられる。33°C の ZF4 細胞では HSP47 の発現量が増加していたが (Figure 4-1c)、プロコラーゲン 3 重らせん構造の不安定化に対処するには HSP47 の増加だけでは不十分であった可能性がある。そのため、プロコラーゲンはさらなる翻訳後修飾や  $\alpha$  鎖組成の変化により、高い熱安定性を獲得することとなった。本研究の結果と一致して、40.5°C の高温で培養したヒト皮膚線維芽細胞は過剰修飾されたコラーゲンを分泌することが報告されている (Torre-Blanco et al. 1992)。

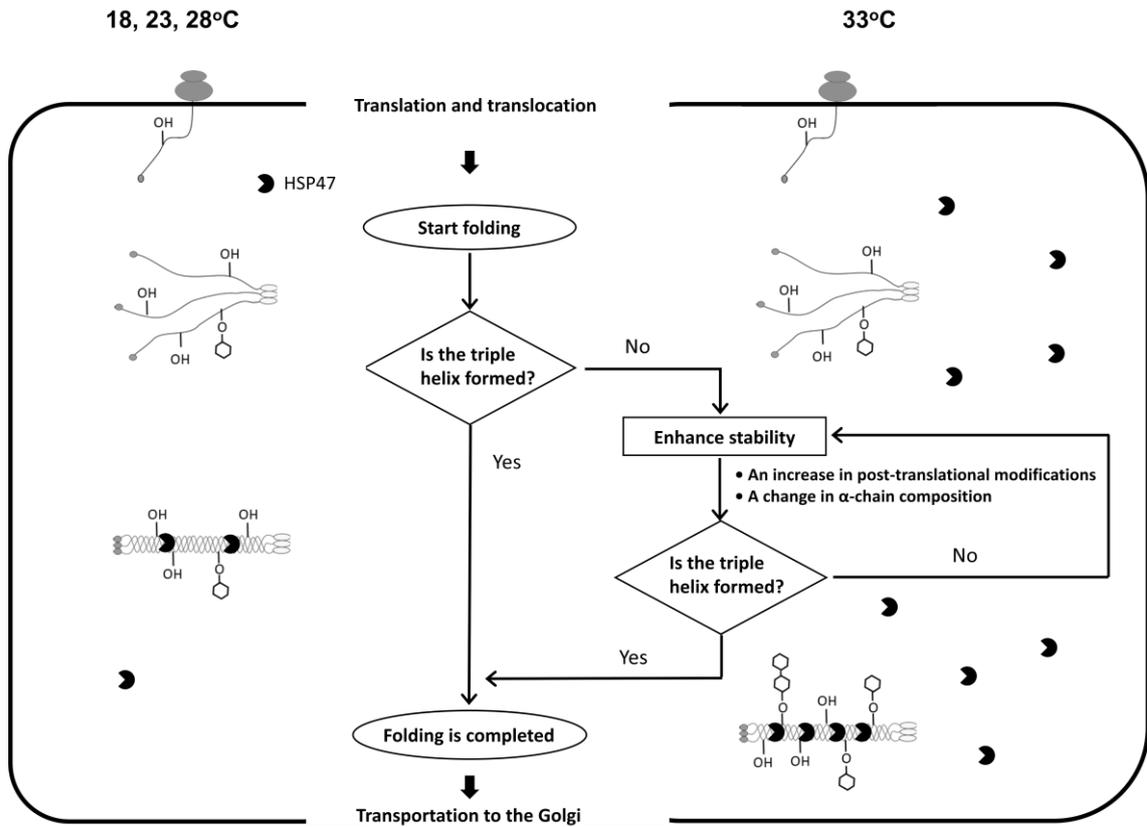


Figure 4-6. 3 重らせんの熱安定性は環境温度に応じて調節される

ZF4 細胞を 28°C 以下で培養した場合、プロコラーゲン 3 重らせんの熱安定性はほぼ一定に保たれる。33°C の高温下では、3 重らせんの熱安定性を確保するためのシステムが働く。

本研究の結果は、変温動物が生息する環境の温度だけでなく、生体内の組織温度の違いが、異なる性質をもつコラーゲンの産生につながる可能性を示している。実際、魚類の筋肉組織のコラーゲンは皮膚組織のコラーゲンよりも高い熱安定性を示すことが報告されている (Kimura et al. 1988; Saito et al. 2001; Saito et al. 2014)。さらにコラーゲン中の 4-Hyp や Hyl の量も組織によって異なる場合がある (Duan et al. 2009)。また一般に、恒温動物でも深部体温と表皮体温は異なることが知られており、深部は表皮よりも温度が高い。これと一致するよう、ヒトの骨コラーゲンの  $T_m$  は皮膚のそれよりも高く、翻訳後修飾量も増加していると報告されている (Notbohm et al. 1992)。

哺乳類の I 型コラーゲン分子は、通常  $[(\alpha 1)_2\alpha 2]$  ヘテロ 3 量体である。しかし、胎児 (Jimenez and Bashey 1977) や癌 (Makareeva et al. 2010; Minafra et al. 1985; Moro and Smith 1977; Shapiro and Eyre 1982; Yamagata and Yamagata 1984) 組織には  $(\alpha 1)_3$  ホモ 3 量体が存在することが報告されている。ゼブラフィッシュ I 型コラーゲンのアイソフォーム間で、3 重らせん構造の熱安定性を比較したシミュレーション結果と一致して (Table 4-2)、哺乳類の  $(\alpha 1)_3$  ホモ 3 量体の  $T_m$  は、 $[(\alpha 1)_2\alpha 2]$  ヘテロ 3 量体よりも高いことが知られている (Kuznetsova et al. 2003; Miles et al. 2002)。本研究において、33°C の高温でゼブラフィッシュ細胞が分泌する I 型コラーゲンでは、 $\alpha 1$  鎖を多くもつ比較的熱安定性の高いアイソフォーム  $\{(\alpha 1)_3 + [(\alpha 1)_2\alpha 3], (\alpha 1)_3 + [(\alpha 1)_2\alpha 2]\}$  の割合が高いことが示唆された (Tables 4-1, 2)。哺乳類においても、高温の組織ではより高い熱安定性をもつ  $(\alpha 1)_3$  ホモ 3 量体の分泌が促進されているものと考えられる。実際、乳癌組織の温度は周囲の正常組織よりも高く、その差は最大で 3.5°C であるといった報告もある (Bray et al. 2018; Lawson and Chughtai 1963)。また、 $(\alpha 1)_3$  ホモ 3 量体は MMP による分解を受けにくく、癌細胞はこれを足場として移動することが示唆されている (Makareeva et al. 2010)。本章では、翻訳後修飾量と  $\alpha$  鎖組成の変化により、コラーゲン 3 重らせんの熱安定性が環境温度に応じて調節されることを示した。生体内ではこの自律的な熱安定性獲得システムにより産生される様々な性質のコラーゲンが使い分けられ、異なる

役割を担っている可能性が考えられる。

#### 4.8. 第4章に関する実験

##### 細胞培養

ZF4 細胞は American Type Culture Collection (CRL-2050; Manassas, VA, USA) から購入し、10% FBS (Thermo Fisher Scientific)、100 U/mL ペニシリン-100 µg/mL ストレプトマイシン (Sigma-Aldrich) を添加した L-グルタミン、フェノールレッド含有 DMEM/Ham's F12 (Fujifilm Wako Pure Chemical) で 28°C、5% CO<sub>2</sub> 雰囲気下培養した。

細胞はコンフルエントに達したのち、馴化のために 18、23、28 または 33°C で 1 日維持した。さらに、培地を 200 µM L-アスコルビン酸リン酸エステルマグネシウム塩 n 水和物 (Fujifilm Wako Pure Chemical)、2% FBS、100 U/mL ペニシリン-100 µg/mL ストレプトマイシンを含む DMEM/Ham's F12 に交換した。18、23、28 または 33°C、5% CO<sub>2</sub> 雰囲気下で 3 日間維持し、それぞれの実験に使用した。

##### ペプシン処理したコラーゲンサンプルの SDS-PAGE

異なる温度で 3 日間培養した ZF4 細胞の培養液を 4°C で 15 分間遠心分離 (2290 × g) することで培養上清を得た。0.1 M となるように HCl を加えて酸性にし、4°C において 16 時間、100 µg/mL ペプシン (Sigma-Aldrich) 処理したのち、塩析 (1 M NaCl/0.1 M HCl) を 3 時間行った。遠心分離 (4°C, 20,900 × g, 15 min) により沈殿させたコラーゲンを SDS-PAGE サンプルバッファー (50 mM Tris-HCl, pH 6.7, 10% glycerol, 2% SDS, 0.002% bromophenol blue) に溶解し、95°C で 5 分間加熱した。5%ゲルを用いて非還元条件下で SDS-PAGE を行い、タンパク質のバンドを CBB で可視化した。

##### 培養液サンプルおよびコラーゲンビーズによるプルダウンサンプルの western blotting 解析

異なる温度で ZF4 細胞を 3 日間培養し、培養液を回収した。細胞は PBS を用いて洗浄し

たのち、溶解バッファー [50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% NP-40, 2 mM NEM, 1 mM PMSF, 1 µg/mL leupeptin, 1 µg/mL pepstatin A] を添加して 15 分間、氷上で静置した。遠心分離 (20,600 × g, 4°C, 15 min) 後、上清中のタンパク質を Bradford 法により定量した。HSP47 を濃縮するために、細胞ライセート 500 µL (タンパク質濃度 : 5 mg/mL) を、メーカーのプロトコルに従って I 型コラーゲン (AteloCell I-AC30, Koken, Tokyo, Japan) をカップリングした CNBr-activated Sepharose 4B (GE Healthcare) ビーズ 100 µL (bed volume) またはモック固定化ビーズ 100 µL (bed volume) と混合した。サンプルは 4°C で 2 時間回転撹拌したのち、0.4 M NaCl/PBS で洗浄した。その後、100 µL の 2 × SDS-PAGE サンプルバッファーを加え、95°C で 5 分間熱することにより、ビーズに結合したタンパク質を溶出させ、プルダウンサンプルとした。ライセートサンプルおよび培養液サンプルの調製は、ライセートと培養液のそれぞれに 5 × SDS-PAGE サンプルバッファーを加え、95°C で 5 分間熱することで行った。

培養液サンプルの western blotting 解析の際には、細胞から抽出した単位タンパク質あたりの培地量を算出し、ゲルにロードした。91 mM DTT 存在下、培養液サンプルには 5%ゲル、プルダウンサンプルには 10%ゲルを用いて SDS-PAGE を行った。タンパク質をニトロセルロース膜に転写したのち、5%スキムミルク/TBS で 1 時間ブロッキングした。TBS で洗浄したのち、HSP47 またはコラーゲンを検出するために、2%スキムミルク/TBS で希釈した一次抗体または 3 µg/mL ビオチン標識 soCMP6-7(Glu)2 を用いてニトロセルロース膜を処理した。再度 TBS で洗浄し、2%スキムミルク/TBS で希釈した二次抗体または AP 標識ストレプトアビジン (1:1,000 dilution; Promega) でそれぞれ処理した後、TBS-T で洗浄を行った。HSP47 の検出の際は、Pierce Western Blotting substrate kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて発光したタンパク質バンドを LAS-3000 CCD imager (Fujifilm) で可視化した。コラーゲンのバンドは Alkaline Phosphatase Conjugate Substrate Kit (Bio-Rad Laboratories) を用いて可視化した。

一次抗体には、抗 SERPINH1 ウサギポリクローナル抗体 (1:250 dilution; MBS835022; MyBioSource, San Diego, CA) および抗  $\beta$ -actin マウスモノクローナル抗体 (1:2,000 dilution; A5316; Sigma-Aldrich) を使用した。二次抗体にはそれぞれ HRP 標識抗ウサギ IgG ヤギポリクローナル抗体 (1:2,000 dilution; 7074S; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)、HRP 標識抗マウス IgG ヤギポリクローナル抗体 (1:5,000 dilution; W402B; Promega) を使用した。

#### 安定同位体標識ペプチドの合成

ゼブラフィッシュ  $\alpha 1(I)$ 、 $\alpha 2(I)$ 、 $\alpha 3(I)$  鎖の定量用マーカーペプチドに対応する安定同位体標識マーカーペプチドは、Fmoc 固相法により合成した (Table 4-3)。ペプチド鎖は Fmoc- $^{15}N$ -Gly-OH (Sigma-Aldrich) を用いて Wang 樹脂 (Novabiochem) 上に構築し、TFA:H<sub>2</sub>O:*m*-cresol:thioanisole:EDT (82.5:5:5:2.5, v/v) で2時間または4時間処理することにより、脱保護と同時に樹脂から切り離した。脱保護したペプチドは、Cosmosil 5C<sub>18</sub>-AR-II column (6.0 mm  $\times$  250 mm, Nacalai Tesque) を使い、0.05% (v/v) TFA を添加した CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O を移動相として RP-HPLC により精製した。精製したペプチドは、移動相に 0.05% (v/v) TFA/CH<sub>3</sub>CN と 0.05% (v/v) TFA/H<sub>2</sub>O を用いて RP-HPLC 分析した (Figure 4-7)。カラムには Cosmosil 5C<sub>18</sub>-AR-II column (4.6 mm  $\times$  250 mm, Nacalai Tesque) を使用した。質量分析は、CHCA をマトリックスとして使用し、Autoflex III MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics) により行った (Table 4-3)。さらにこれらのペプチドの絶対量を決定するために、6 M HCl/1% phenol で 110°C、20 時間、N<sub>2</sub> 下の気相中酸加水分解し、L-8900 アミノ酸分析計 (Hitachi, Tokyo, Japan) を使用してアミノ酸分析を行った。

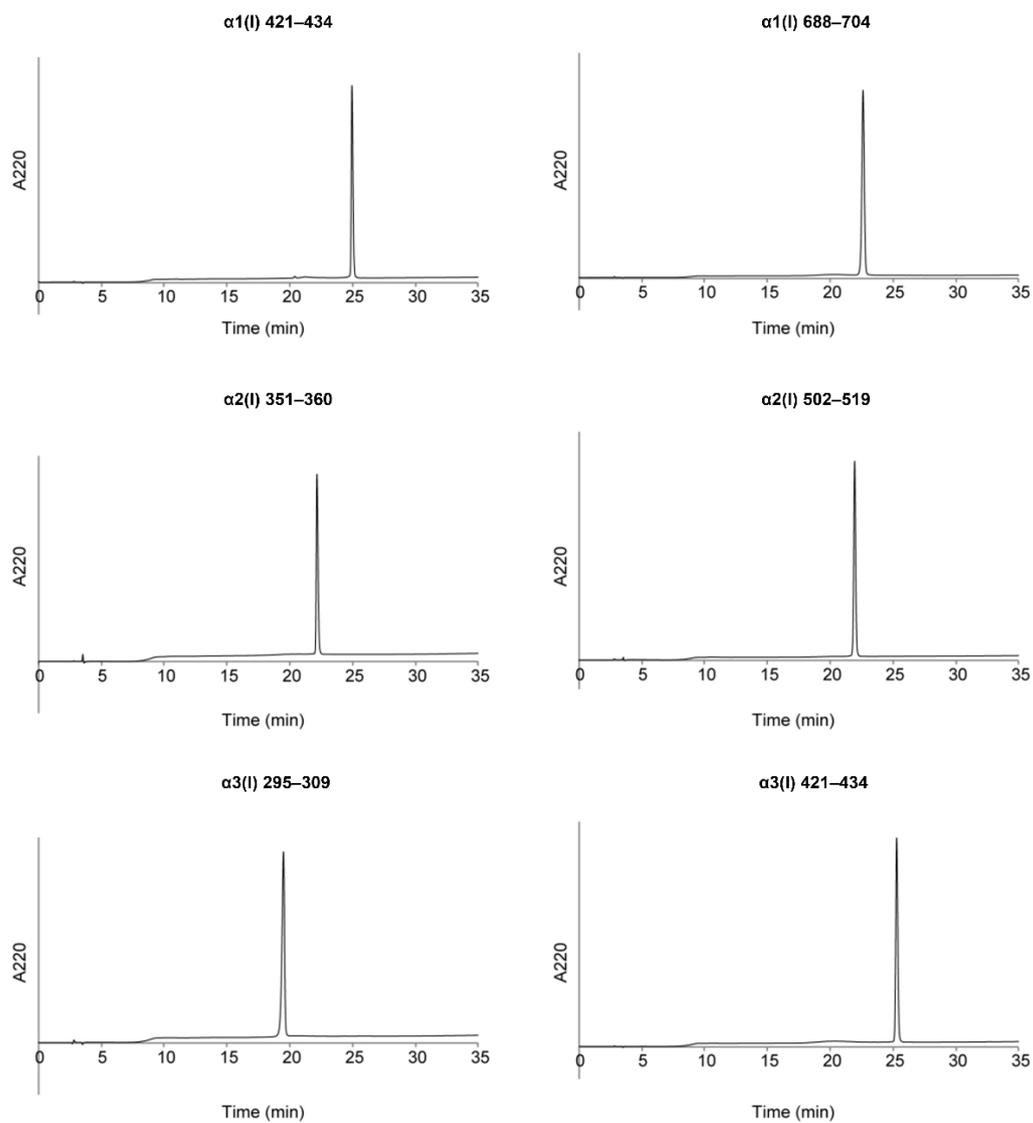


Figure 4-7. 合成ペプチドの RP-HPLC 分析

0.05% (v/v) TFA を含む 0%–30% CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O の直線濃度勾配を 30 分間でかけたのち、0.05% (v/v) TFA を含む 90% CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O を 5 分間流した。検出波長は 220 nm とした。

Table 4-3. 合成ペプチドの質量分析

Peptide	Sequence	Found $m/z$	Calculated monoisotopic mass [M + H] <sup>+</sup>
$\alpha$ 1(I) 421–434	GVMGAIGATGAOGK	1207.793	1207.605
$\alpha$ 1(I) 688–704	GAAGPOGATGFOGAAGR	1449.541	1449.680
$\alpha$ 2(I) 351–360	AGEAGLVGAR	903.700	903.481
$\alpha$ 2(I) 502–519	GNOGPAGAAGAQQPIGAR	1541.095	1540.755
$\alpha$ 3(I) 295–309	GEOGAAGPVGPOGAR	1326.983	1326.635
$\alpha$ 3(I) 421–434	GLAGPTGPLGAOGK	1213.869	1213.649

全ての Gly は <sup>15</sup>N-Gly である。

#### ZF4 細胞から分泌された I 型コラーゲン $\alpha$ 鎖の定量

3 日間培養した ZF4 細胞の培養液を遠心 ( $2290 \times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ , 15 min) し、上清を回収した。安定同位体標識コラーゲンを加えたのち、 $0.1 \text{ M HCl}$  中、 $4^{\circ}\text{C}$  でペプシン処理した上清から、塩析によりコラーゲンを精製した。コラーゲンを  $60^{\circ}\text{C}$  で 30 分間処理することで熱変性させ、内部標準として安定同位体標識合成ペプチドを加えた後、 $100 \text{ mM Tris-HCl}/1 \text{ mM CaCl}_2$  ( $\text{pH } 7.6$ ) 中、 $37^{\circ}\text{C}$  で 16 時間、sequencing grade modified trypsin (Promega) で消化した。トリプシン消化液は、Agilent 1200 Series HPLC system (Agilent Technologies) と接続した 3200 QTRAP hybrid triple quadrupole (QQQ)/linear ion trap mass spectrometer (AB Sciex) で LC-MS 分析した。カラムには、BIOshell A160 Peptide  $\text{C}_{18}$  HPLC column ( $5 \mu\text{m}$  particle size,  $\text{L} \times \text{I.D. } 150 \text{ mm} \times 2.1 \text{ mm}$ ; Supelco) を使用した。各  $\alpha$  鎖について 2 種類のマーカーペプチド [ $\alpha 1(\text{I})$  421–434,  $\alpha 1(\text{I})$  688–704,  $\alpha 2(\text{I})$  351–360,  $\alpha 2(\text{I})$  502–519,  $\alpha 3(\text{I})$  295–309,  $\alpha 3(\text{I})$  421–434] を選択し、MRM モードで検出した。マーカーペプチドとそれに対応する内部標準ペプチドのピーク面積比から、各  $\alpha$  鎖を定量した。また、コラーゲン精製時の誤差を補正するために、安定同位体標識コラーゲン由来の安定同位体標識ヒト I 型コラーゲンマーカーペプチドも分析した (Taga et al. 2014)。さらに、プルダウンサンプルの作製と同様にして細胞ライセート中のタンパク質を定量することで、細胞タンパク質量あたりの I 型コラーゲン各  $\alpha$  鎖の分泌量を算出した (Table 4-4)。この定量値にもとづいて、I 型コラーゲン中の各  $\alpha$  鎖の割合を算出した (Figure 4-4, Table 4-5)。

Table 4-4. ZF4 細胞から分泌された I 型コラーゲン各  $\alpha$  鎖の定量結果

	$\alpha 1$		$\alpha 2$		$\alpha 3$	
	Average (pmol/mg)	SD (pmol/mg)	Average (pmol/mg)	SD (pmol/mg)	Average (pmol/mg)	SD (pmol/mg)
<b>18°C</b>	4.40	0.88	3.07	0.48	3.42	0.73
<b>23°C</b>	10.71	0.78	7.93	0.69	7.59	0.33
<b>28°C</b>	14.05	1.41	10.01	0.97	9.69	0.47
<b>33°C</b>	8.66	2.63	3.76	1.49	3.38	0.85

n = 3.

Table 4-5. ZF4 細胞から分泌された I 型コラーゲン中の各  $\alpha$  鎖の割合

	$\alpha 1$ ratio ( $r_{\alpha 1}$ )		$\alpha 2$ ratio ( $r_{\alpha 2}$ )		$\alpha 3$ ratio ( $r_{\alpha 3}$ )	
	Average (%)	SD (%)	Average (%)	SD (%)	Average (%)	SD (%)
<b>18°C</b>	40.4	1.4	28.3	1.0	31.3	1.8
<b>23°C</b>	40.8	1.1	30.2	0.7	29.0	1.1
<b>28°C</b>	41.6	1.5	29.6	1.2	28.8	2.6
<b>33°C</b>	54.9	0.5	23.4	2.7	21.7	2.4

n = 3.

#### ZF4 細胞から分泌された I 型コラーゲンにおける翻訳後修飾の定量

3 日間培養した ZF4 細胞の培養上清に 0.1 M HCl を加えて酸性にした。固定化ペプシン (0.1 mg/mL; Sigma-Aldrich) 処理および塩析 (1 M NaCl/0.1 M HCl) を行うことでコラーゲンを精製した。精製したコラーゲンサンプルを非還元条件下で SDS-PAGE (5%ゲル) に供したのち、タンパク質を PVDF 膜に転写した。CBB 染色により可視化した  $\alpha 1(I) + \alpha 3(I)$  および  $\alpha 2(I)$  鎖のバンドを膜から切り出し、内部標準として安定同位体標識コラーゲンを加えて酸加水分解 (6 M HCl/1% phenol, 110°C, 20 h, under N<sub>2</sub>) した。Pro、3-Hyp、4-Hyp、Lys、および total Hyl (Hyl + glycosylated Hyl) は、ZIC-HILIC column (3.5  $\mu$ m particle size, L×I.D. 150 mm × 2.1 mm; Merck Millipore) によるクロマトグラフィーで分離後に LC-QqQ-MS による MRM モードで、第 3 章と同様に定量した (Table 4-6)。

Table 4-6. ZF4 細胞から分泌された I 型コラーゲンのアミノ酸定量 (残基/1000 残基)

		Pro		3-Hyp		4-Hyp		Lys		Hyl (total)	
		Average	SD	Average	SD	Average	SD	Average	SD	Average	SD
$\alpha 1(I) + \alpha 3(I)$	18°C	126.8	6.7	4.9	0.1	121.7	2.7	33.1	1.3	11.4	0.8
	23°C	126.5	16.3	3.5	0.4	119.1	13.2	29.1	2.0	12.6	0.7
	28°C	132.7	8.9	4.5	0.6	134.2	13.0	25.9	1.6	20.4	2.2
	33°C	109.2	7.8	6.2	0.4	117.7	7.2	25.2	0.6	24.3	1.6
$\alpha 2(I)$	18°C	124.6	14.0	1.3	0.2	84.8	12.8	31.3	1.6	11.0	1.4
	23°C	144.0	12.0	1.2	0.1	104.8	7.7	29.7	2.5	16.8	2.5
	28°C	131.5	15.4	1.3	0.2	99.0	19.0	29.3	7.0	18.2	2.4
	33°C	137.6	12.3	3.4	0.9	113.1	7.9	22.7	1.1	23.2	4.9

n = 3.

#### 4-Hyp または Hyl になりうる Pro または Lys 残基の割合の算出

ゼブラフィッシュ I 型コラーゲンにおいて、4-Hyp に変換される可能性のある Pro 残基の割合を、Y 位の Pro 残基数を全 Pro 残基数の数で割った値として算出した (Table 4-7a)。Hyl に変換される可能性のある Lys 残基の割合は、Y 位の Lys 残基数を全 Lys 残基数の数で割った値として算出した (Table 4-7b)。3 重らせん領域 (1014 アミノ酸残基) におけるこれらのアミノ酸残基数は、ゼブラフィッシュの  $\alpha 1(I)$  (NCBI accession number: NP\_954684.1)、 $\alpha 2(I)$  (NCBI accession number: NP\_892013.2) および  $\alpha 3(I)$  (NCBI accession number: NP\_958886.1) のアミノ酸配列から決定した。

Table 4-7. ゼブラフィッシュ I 型コラーゲンの 3 重らせん領域における Pro および Lys 残基数

(a)

	Pro in X position (x)	Pro in Y position (y)	putative 4-Hyp ratio (y/(x + y))
$\alpha 1$	101	102	50.2% (102/203)
$\alpha 2$	111	85	43.4% (85/196)
$\alpha 3$	105	103	49.5% (103/208)

(b)

	Lys in X position (x)	Lys in Y position (y)	putative Hyl ratio (y/(x + y))
$\alpha 1$	12	23	65.7% (23/35)
$\alpha 2$	9	22	71.0% (22/31)
$\alpha 3$	12	20	62.5% (20/32)

ZF4 細胞から分泌された I 型コラーゲンにおける部位特異的な Pro の 3 位水酸化解析

トリプシン処理後の培地から精製したコラーゲンを、 $\alpha$  鎖定量と同様の方法で熱変性、トリプシン消化した。LC-MS により、ゼブラフィッシュ I 型コラーゲンの特定部位において 3 位水酸化された Pro の相対的な存在量を評価した。トリプシン消化物は、Prominence UFLC-XR system (Shimadzu) と接続した maXis II quadrupole time-of-flight mass spectrometer (Bruker Daltonics) を使って LC-MS 分析した。カラムには Ascentis Express C<sub>18</sub> HPLC column (5  $\mu$ m particle size, L  $\times$  I.D. 150 mm  $\times$  2.1 mm; Supelco) を用いた。それぞれの修飾部位における 3-Hyp の相対存在量は、これまでに報告された修飾部位を含むペプチドのモノアイソトピック抽出イオンクロマトグラムのピーク面積から比較定量した (Ishikawa et al. 2021)。

(a)

		707			716		719
zebrafish	$\alpha$ 1[705–725]	V	G	<b>P</b>	O	G	P
		S	G	N	S	G	<b>P</b>
		O	G	<b>P</b>	O	G	<b>P</b>
		A	G	K			
zebrafish	$\alpha$ 3[705–725]	V	G	<b>P</b>	O	G	<b>P</b>
		S	G	A	S	G	<b>P</b>
		O	G	<b>P</b>	O	G	<b>P</b>
		T	G	<b>P</b>	T	G	<b>P</b>
		A	G	K			
rat	$\alpha$ 1[705–725]	V	G	<u>P</u>	O	G	<u>P</u>
		S	G	N	A	G	<u>P</u>
		O	G	<u>P</u>	O	G	<u>P</u>
		V	G	K			

		707			716		719
zebrafish	$\alpha$ 2[705–725]	V	G	<b>P</b>	O	G	<b>P</b>
		A	G	I	V	G	<b>P</b>
		A	G	L	T	G	<b>P</b>
		A	G	K			
rat	$\alpha$ 2[705–725]	T	G	<u>P</u>	O	G	<u>P</u>
		S	G	I	T	G	<u>P</u>
		O	G	<u>P</u>	O	G	<u>P</u>
		A	A	G	K		

(b)

						986
zebrafish	$\alpha$ 1[975–990]	D	G	M	S	G
		L	O	G	P	I
		G	<b>P</b>	O	G	<b>P</b>
		R				
zebrafish	$\alpha$ 3[975–990]	D	G	M	N	G
		V	O	G	P	V
		G	<b>P</b>	O	G	<b>P</b>
		R				
rat	$\alpha$ 1[975–990]	D	G	L	N	G
		L	O	G	P	I
		G	<u>P</u>	O	G	<u>P</u>
		R				

						986
zebrafish	$\alpha$ 2[975–990]	D	G	S	N	G
		M	O	G	A	I
		G	<b>P</b>	O	G	<b>H</b>
		R				
rat	$\alpha$ 2[975–990]	D	G	R	S	G
		H	O	G	P	V
		G	<u>P</u>	A	G	<u>V</u>
		R				

Figure 4-8. 3 位水酸化される Pro 残基周辺のアミノ酸配列の比較

ゼブラフィッシュ I 型コラーゲンのトリプシン消化ペプチド (a) [705–725] および (b) [975–990] とラット I 型コラーゲンの対応するアミノ酸配列を比較した。本研究で 3-Hyp となっていることが示唆された Pro 残基を太字で示した。また、ラットの配列中で 3 位水酸化可能な Pro 残基に下線を引いた (Taga et al. 2016)。

## I 型コラーゲンにおける各アイソフォームの存在割合

I 型コラーゲンの全  $\alpha$  鎖 ( $\alpha_1 + \alpha_2 + \alpha_3$ ) 中の  $\alpha_1$  鎖、 $\alpha_2$  鎖、 $\alpha_3$  鎖の割合をそれぞれ  $r_{\alpha_1}$ 、 $r_{\alpha_2}$ 、 $r_{\alpha_3}$  とおき、I 型コラーゲンの全 3 量体中の  $(\alpha_1)_3$ 、 $[(\alpha_1)_2\alpha_3]$ 、 $[(\alpha_1)\alpha_2\alpha_3]$  の割合を  $R_{(\alpha_1)_3}$ 、 $R_{[(\alpha_1)_2\alpha_3]}$ 、 $R_{[(\alpha_1)\alpha_2\alpha_3]}$  とおいた。 $r_{\alpha_1}$ 、 $r_{\alpha_2}$ 、 $r_{\alpha_3}$  は  $R_{(\alpha_1)_3}$ 、 $R_{[(\alpha_1)_2\alpha_3]}$ 、 $R_{[(\alpha_1)\alpha_2\alpha_3]}$  から以下のように表せる。

$$r_{\alpha_1} = (3R_{(\alpha_1)_3} + 2R_{[(\alpha_1)_2\alpha_3]} + 2R_{[(\alpha_1)\alpha_2\alpha_3]} + R_{[\alpha_1\alpha_2\alpha_3]})/3 \quad (1)$$

$$r_{\alpha_2} = (R_{[(\alpha_1)\alpha_2\alpha_3]} + R_{[\alpha_1\alpha_2\alpha_3]})/3 \quad (2)$$

$$r_{\alpha_3} = (R_{[(\alpha_1)_2\alpha_3]} + R_{[\alpha_1\alpha_2\alpha_3]})/3 \quad (3)$$

Table 4-5 で示した  $r_{\alpha_1}$ 、 $r_{\alpha_2}$ 、 $r_{\alpha_3}$  の値から各アイソフォームの割合を計算するために、式 (1) から (3) を変形して式 (4) から (6) とした。

$$R_{(\alpha_1)_3} = r_{\alpha_1} - 2r_{\alpha_2} + r_{\alpha_3} - R_{[(\alpha_1)_2\alpha_3]} \quad (4)$$

$$R_{[(\alpha_1)\alpha_2\alpha_3]} = 3(r_{\alpha_2} - r_{\alpha_3}) + R_{[(\alpha_1)_2\alpha_3]} \quad (5)$$

$$R_{[\alpha_1\alpha_2\alpha_3]} = 3r_{\alpha_3} - R_{[(\alpha_1)_2\alpha_3]} \quad (6)$$

式 (4) から (6) を用いてそれぞれのアイソフォームの存在割合を計算し、結果を Table 4-1 に示した。18、23、28、33°C における  $R_{[(\alpha_1)_2\alpha_3]}$  は、それぞれ変数  $x$ 、 $y$ 、 $z$ 、 $w$  で表した。各アイソフォームの割合はすべて正の値でなければならないため、18°C における  $R_{[(\alpha_1)_2\alpha_3]}$  が 0 以上となるように、変数  $x$  は 9.0 以上である。その他の変数  $y$ 、 $z$ 、 $w$  は、23、28、33°C における  $R_{[(\alpha_1)_2\alpha_3]}$  が 0 以上となるように、いずれも 0 以上の値となる。また、 $R_{(\alpha_1)_3}$  が 0 以上となるように、 $x$ 、 $y$ 、 $z$ 、 $w$  はそれぞれ  $x \leq 15.1$ 、 $y \leq 9.4$ 、 $z \leq 11.1$ 、 $w \leq 29.9$  である。

## ZF4 細胞から分泌されたコラーゲン 3 重らせんの熱変性温度測定

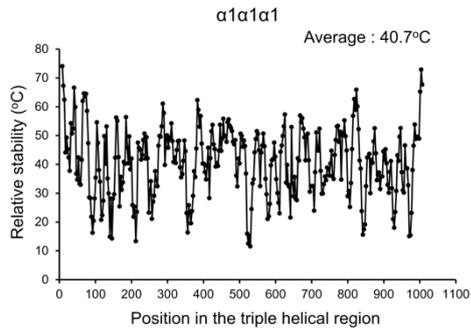
ペプシン処理した培養液から塩析することでコラーゲンを精製した。精製コラーゲンを 10 mM 酢酸に溶解し、ペルチェ式温度調節器を備えた CD 分光計 J-820 (Jasco) を用いて、加熱 (0.25°C/min) しながら 221 nm の CD シグナルを測定した。CD シグナルを正規化する

ことで fraction folded とし、その値が 0.5 となる温度を  $T_m$  とした。

#### ゼブラフィッシュ I 型コラーゲンの各 3 量体の相対的な熱安定性予測

ゼブラフィッシュ I 型コラーゲンの  $\alpha 1$  鎖、 $\alpha 2$  鎖、 $\alpha 3$  鎖のアミノ酸配列は UniProt から取得した (D. rerio  $\alpha 1$ (I): NP\_954684.1,  $\alpha 2$ (I): NP\_892013.2,  $\alpha 3$ (I): NP\_958886.1)。1014 アミノ酸残基からなる 3 重らせん領域 (Gly-X-Y) の Y 位の Pro 残基は全て 4-Hyp 残基に変換した。変換後の 3 重らせん領域の配列から、3 残基ずつずらしながら 15 アミノ酸残基の断片を切り出すことで、各  $\alpha$  鎖につき 334 の配列を得た。ゼブラフィッシュ I 型コラーゲン分子として形成可能な 10 種類の 3 量体について、それぞれのコラーゲン分子中の 334 カ所の相対熱安定性を SCEPTTr により予測した (Walker et al. 2021)。この際、 $\alpha$  鎖から切り出した 15 アミノ酸残基の断片の N および C 末端の両方には、Gly-Pro-4-Hyp の 5 回繰り返し配列を付け加えて計算を行った。各 3 量体の仮想相対熱安定性は、45 アミノ酸残基のペプチド鎖 3 本からなる 334 の 3 重らせんについて予測された相対熱安定性を平均することで算出した (Figure 4-9)。

**( $\alpha 1$ )<sub>3</sub>**



**[( $\alpha 1$ )<sub>2</sub> $\alpha 3$ ]**

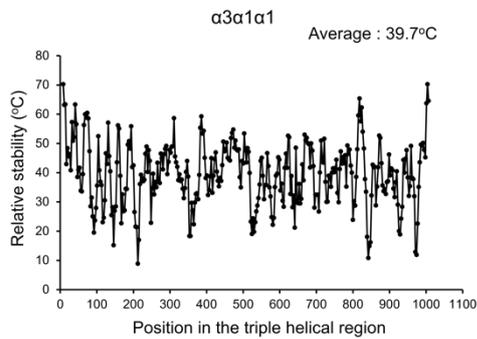
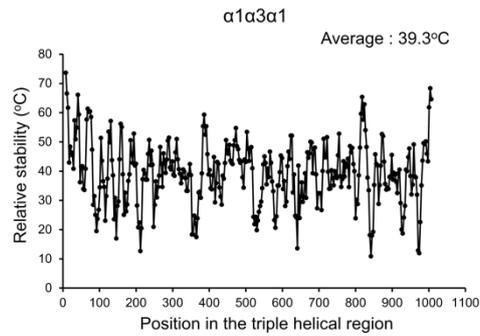
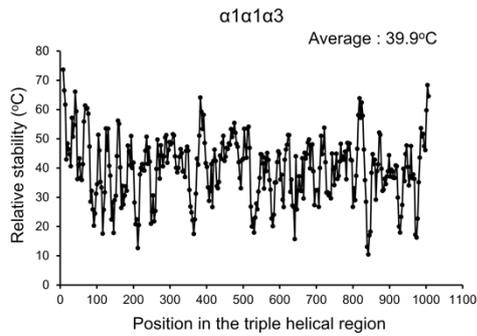
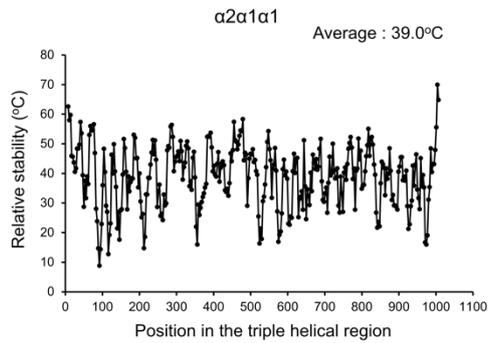
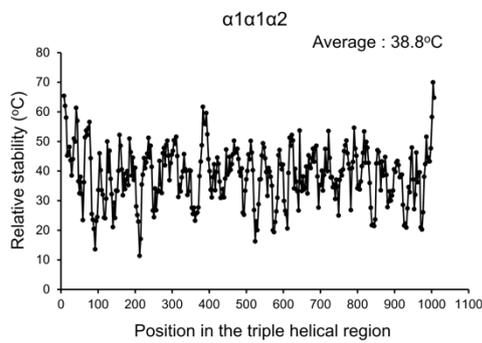


Figure 4-9. ゼブラフィッシュ I 型コラーゲンの各アイソフォームの仮想相対熱安定性  
ゼブラフィッシュ I 型コラーゲンとして形成可能な 3 量体について、それぞれ 334 カ所の相対熱安定性を SCEPTTr によって予測し、1014 アミノ酸残基からなるコラーゲン 3 重らせん領域の対応した位置にプロットした。各 3 量体の仮想相対熱安定性は、334 カ所の相対熱安定性を平均することで算出した。

**[( $\alpha 1$ )<sub>2</sub> $\alpha 2$ ]**



**[ $\alpha 1\alpha 2\alpha 3$ ]**

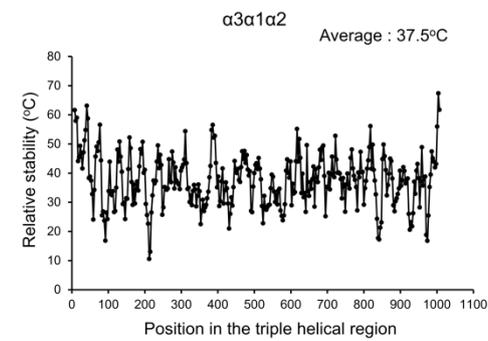
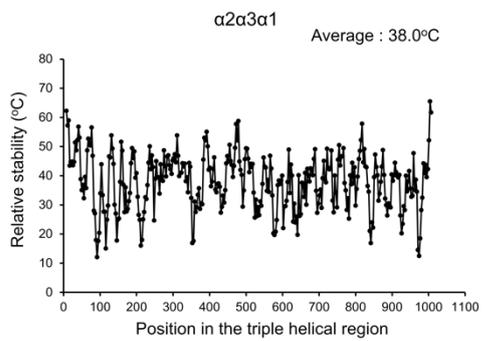
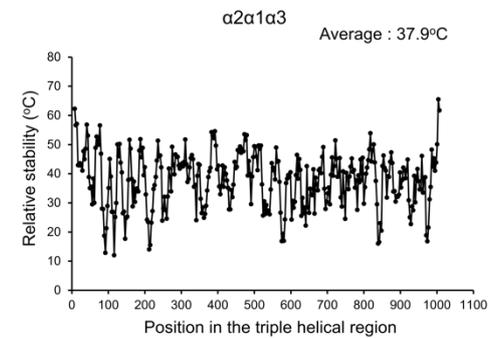
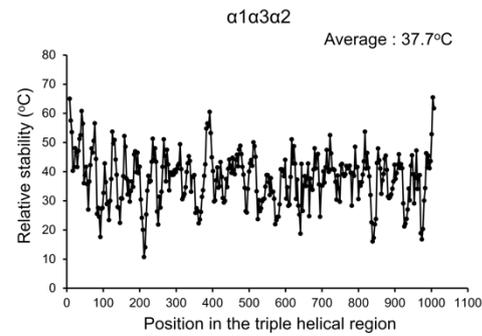


Figure 4-9. *Continued.*

統計解析

平均値の差異は、GraphPad Prism ソフトウェアバージョン 7.04 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) を用いて、一元配置分散分析と Tukey の多重比較検定により評価した。

## 第5章 総括

一般に、タンパク質は、アミノ酸配列によって決定された立体構造の熱安定性をもっており、その生物の体温で安定である。一方、コラーゲンの3重らせん構造は多数の修飾により翻訳後に安定化されるうえ、線維形成していないコラーゲンの3重らせん構造は少なくとも哺乳類の体温では修飾を受けてもなお不安定であるなど、コラーゲンの立体構造と熱安定性の関係には注目すべき点が多い。これまで、コラーゲン3重らせんの熱安定性が生合成の過程でどのように決定されているのか、またいかにしてそのフォールディングが達成されるのかについての詳細は明らかになっていなかった。そこで本論文では、コラーゲン3重らせん構造の熱安定性がどのようにして確保され、構造形成が可能になるのかを明らかにすることを目的として、プロコラーゲン特異的シャペロン HSP47 による外部からの安定化と、コラーゲンの3重らせん構造自体の熱安定化という2つの視点から研究を行った。

第2章では、コラーゲンの分子構造に関する研究を行うにあたって利用できる、3重らせんのほどけた変性コラーゲンに対して高い結合能を持つ新規ペプチドの開発を行った。このペプチドはコラーゲンに特徴的な Gly-X-Y くり返し配列にハイブリダイズするため、幅広い種や型のコラーゲンに関する研究に利用できるが示された。第3、4章では第2章で開発したペプチドを使用して実験を行った。

第3章では、プロコラーゲンの3重らせん構造が、生合成の過程で、プロコラーゲン特異的分子シャペロン HSP47 によって安定化されていることを証明した。*Hsp47*<sup>-/-</sup>MEF を哺乳類細胞の通常の培養温度である 37°C で培養すると、コラーゲンの生合成における様々な異常が観察された。33°C の低温で培養することにより観察されたすべての異常は正常化し、HSP47 の欠損が培養温度を下げることによって補われることが明らかになった。これにより、HSP47 が ER 内腔でプロコラーゲンフォールディング中間体の3重らせん部分を安定化することで、哺乳類の体温において単独では不可能な、プロコラーゲンの構造形成を可能に

していることを示した。

第4章では、変温動物である魚類細胞が分泌するコラーゲンの熱安定性と環境（培養）温度の関係を解析することで、コラーゲン3重らせん構造の熱安定性が環境温度によって変化することを明らかにした。様々な温度（18、23、28、33°C）で培養したZF4細胞から分泌されたI型コラーゲンにおける翻訳後修飾量および $\alpha$ 鎖組成、コラーゲン3重らせんの $T_m$ を解析し、培養温度が28°C以下の場合にはこれらの性質はほぼ一定であることを示した。一方、より高い温度（33°C）で培養すると、分泌されたI型コラーゲンにおける翻訳後修飾量およびI型コラーゲン中の $\alpha 1$ 鎖の割合が増加した。さらに、コラーゲンはより高い構造熱安定性を獲得していた。これらの結果により、コラーゲン3重らせんの熱安定性が環境温度に応じて調節されることを示した。

本論文では、ER内腔において、プロコラーゲンの3重らせん構造がHSP47による外部からの補助により安定化されていること、さらに、3重らせん構造自体の熱安定性が、環境温度に応じた翻訳後修飾量や $\alpha$ 鎖組成の変化により自律的に調節されていることを明らかにした。この成果はコラーゲンの生合成に関する基礎研究として、タンパク質科学に貢献するものと考えられる。

さらに、得られた知見から以下のような仮説が導き出せる。哺乳類のプロコラーゲンは、HSP47により熱的に安定化されることではじめてその構造形成を実現するが、その一方で、無脊椎動物はHSP47を持たないにもかかわらず3重らせんコラーゲンを生合成できる。このことからHSP47は、3重らせんの見かけの熱安定性を高めることによりコラーゲン遺伝子の突然変異を許容し、コラーゲンの分子進化を促進している可能性が考えられる。この仮説を裏付けるように、*hsp47*<sup>-/-</sup>MEFが分泌するI型コラーゲンでは $\alpha 1$ 鎖2本と $\alpha 2$ 鎖1本からなるヘテロ3量体が減少し、より原始的で熱安定性の高い $\alpha 1$ 鎖3本からなるホモ3量体の割合が増加していた。

また、哺乳類同様HSP47をもち、より体温の低い魚類のI型コラーゲンは3種類の $\alpha$ 鎖

を有しているが、ZF4 細胞が分泌する I 型コラーゲンの  $\alpha$  鎖組成は 33°C の高温において変化し、 $\alpha 1$  鎖の割合の増加と、 $\alpha 2$  および  $\alpha 3$  鎖の割合の減少が観察された。このことは、環境温度に対するコラーゲンの熱安定性の余裕が、コラーゲンの多様化や機能化を促進している可能性を示している。またこれは、HSP47 が、コラーゲン 3 重らせんを安定化する機能により、コラーゲン分子進化 (多様化・高機能化) のキャパシタとして働いているという仮説を支持するものでもある。HSP47 に関するこの仮説は、Rutherford と Lindquist が HSP90 について提案した仮説と本質的に同様のものである (Rutherford and Lindquist 1998)。HSP90 は、クライアントタンパク質に生じた構造安定性の低下を伴う変異をマスクすることによって、分子進化を促進することが示唆されている。HSP47 は HSP90 同様、クライアントタンパク質を安定化することで、その分子進化に寄与している可能性が考えられる。また、HSP47 の獲得は、より高い体温におけるコラーゲンの生合成を可能にするため、変温動物から恒温動物への進化に役立った可能性も考えられる。

## 参考文献

- Abdul-Wahab, M.F., Homma, T., Wright, M., Olerenshaw, D., Dafforn, T.R., Nagata, K., and Miller, A.D. (2013). The pH sensitivity of murine heat shock protein 47 (HSP47) binding to collagen is affected by mutations in the breach histidine cluster. *J Biol Chem* 288, 4452–4461.
- Acerbo, A.S., Kwaczala, A.T., Yang, L., Judex, S., and Miller, L.M. (2014). Alterations in collagen and mineral nanostructure observed in osteoporosis and pharmaceutical treatments using simultaneous small- and wide-angle X-ray scattering. *Calcif Tissue Int* 95, 446–456.
- Berg, R.A., and Prockop, D.J. (1973a). The thermal transition of a non-hydroxylated form of collagen. Evidence for a role for hydroxyproline in stabilizing the triple-helix of collagen. *Biochem Biophys Res Commun* 52, 115–120.
- Berg, R.A., and Prockop, D.J. (1973b). Purification of (<sup>14</sup>C) procollagen and its hydroxylation by prolyl-hydroxylase. *Biochemistry* 12, 3395–3401.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R.L., Torre, L.A., and Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 68, 394–424.
- Cabral, W.A., Chang, W., Barnes, A.M., Weis, M., Scott, M.A., Leikin, S., Makareeva, E., Kuznetsova, N.V., Rosenbaum, K.N., Tiff, C.J., et al. (2007). Prolyl 3-hydroxylase 1 deficiency causes a recessive metabolic bone disorder resembling lethal/severe osteogenesis imperfecta. *Nat Genet* 39, 359–365.
- Chattopadhyay, S., Murphy, C.J., McAnulty, J.F., and Raines, R.T. (2012). Peptides that anneal to natural collagen *in vitro* and *ex vivo*. *Org Biomol Chem* 10, 5892–5897.
- Chattopadhyay, S., Guthrie, K.M., Teixeira, L., Murphy, C.J., Dubielzig, R.R., McAnulty, J.F., and Raines, R.T. (2016). Anchoring a cytoactive factor in a wound bed promotes healing. *J Tissue Eng Regen Med* 10, 1012–1020.
- Christiansen, H.E., Schwarze, U., Pyott, S.M., AlSwaid, A., Al Balwi, M., Alrasheed, S., Pepin, M.G., Weis, M.A., Eyre, D.R., and Byers, P.H. (2010). Homozygosity for a missense mutation in *SERPINH1*, which encodes the collagen chaperone protein HSP47, results in severe recessive osteogenesis imperfecta. *Am J Hum Genet* 86, 389–398.

- Cinque, L., Forrester, A., Bartolomeo, R., Svelto, M., Venditti, R., Montefusco, S., Polishchuk, E., Nusco, E., Rossi, A., Medina, D.L., et al. (2015). FGF signalling regulates bone growth through autophagy. *Nature* *528*, 272–275.
- Cortemeglia, C., and Beitingger, T.L. (2005). Temperature tolerances of wild-type and red transgenic zebra danios. *Trans Am Fish Soc* *134*, 1431–1437.
- Delsuc, N., Uchinomiya, S., Ojida, A., and Hamachi, I. (2017). A host-guest system based on collagen-like triple-helix hybridization. *Chem Commun (Camb)* *53*, 6856–6859.
- DiChiara, A.S., Li, R.C., Suen, P.H., Hosseini, A.S., Taylor, R.J., Weickhardt, A.F., Malhotra, D., McCaslin, D.R., and Shoulders, M.D. (2018). A cysteine-based molecular code informs collagen C-propeptide assembly. *Nat Commun* *9*, 4206.
- Dong, W., Li, H., Zhang, Y., Yang, H., Guo, M., Li, L., and Liu, T. (2011). Matrix metalloproteinase 2 promotes cell growth and invasion in colorectal cancer. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* *43*, 840–848.
- Drögemüller, C., Becker, D., Brunner, A., Haase, B., Kircher, P., Seeliger, F., Fehr, M., Baumann, U., Lindblad-Toh, K., and Leeb, T. (2009). A missense mutation in the *SERPINH1* gene in dachshunds with osteogenesis imperfecta. *PLOS Genet* *5*, e1000579.
- Duan, R., Zhang, J., Du, X., Yao, X., and Konno, K. (2009). Properties of collagen from skin, scale and bone of carp (*Cyprinus carpio*). *Food Chem* *112*, 702–706.
- Duan, R., Konno, K., Zhang, J., Wang, S., and Yuan, C. (2010). Different thermostability of collagens from scale of carp (*Cyprinus carpio*) in winter and summer. *J Food Biochem* *34*, 1275–1287.
- Ehrlich, H.P., Brown, H., and White, B.S. (1982). Evidence for type V and I trimer collagens in Dupuytren's contracture palmar fascia. *Biochem Med* *28*, 273–284.
- Engel, J., and Prockop, D.J. (1991). The zipper-like folding of collagen triple helices and the effects of mutations that disrupt the zipper. *Annu Rev Biophys Biophys Chem* *20*, 137–152.
- Forrester, A., De Leonibus, C., Grumati, P., Fasana, E., Piemontese, M., Staiano, L., Fregno, I., Raimondi, A., Marazza, A., Bruno, G., et al. (2019). A selective ER-phagy exerts procollagen quality control via a calnexin-FAM134B complex. *EMBO J* *38*, e99847.
- Gistelink, C., Kwon, R.Y., Malfait, F., Symoens, S., Harris, M.P., Henke, K., Hawkins, M.B., Fisher, S., Sips, P., Guillemin, B., et al. (2018). Zebrafish type I collagen mutants faithfully

- recapitulate human type I collagenopathies. *Proc Natl Acad Sci U S A* *115*, E8037–E8046.
- Hentzen, N.B., Smeenk, L.E.J., Witek, J., Riniker, S., and Wennemers, H. (2017). Cross-linked collagen triple helices by oxime ligation. *J Am Chem Soc* *139*, 12815–12820.
- Hornig, J.-C., Hawk, A.J., Zhao, Q., Benedict, E.S., Burke, S.D., and Raines, R.T. (2006). Macrocyclic scaffold for the collagen triple helix. *Org Lett* *8*, 4735–4738.
- Ishida, Y., Kubota, H., Yamamoto, A., Kitamura, A., Bächinger, H.P., and Nagata, K. (2006). Type I collagen in *Hsp47*-null cells is aggregated in endoplasmic reticulum and deficient in N-propeptide processing and fibrillogenesis. *Mol Biol Cell* *17*, 2346–2355.
- Ishida, Y., Yamamoto, A., Kitamura, A., Lamandé, S.R., Yoshimori, T., Bateman, J.F., Kubota, H., and Nagata, K. (2009). Autophagic elimination of misfolded procollagen aggregates in the endoplasmic reticulum as a means of cell protection. *Mol Biol Cell* *20*, 2744–2754.
- Ishikawa, Y., Vranka, J., Wirz, J., Nagata, K., and Bächinger, H.P. (2008). The rough endoplasmic reticulum-resident FK506-binding protein FKBP65 is a molecular chaperone that interacts with collagens. *J Biol Chem* *283*, 31584–31590.
- Ishikawa, Y., Ito, S., Nagata, K., Sakai, L.Y., and Bächinger, H.P. (2016). Intracellular mechanisms of molecular recognition and sorting for transport of large extracellular matrix molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* *113*, E6036–E6044.
- Ishikawa, Y., Rubin, K., Bächinger, H.P., and Kalamajski, S. (2018). The endoplasmic reticulum-resident collagen chaperone Hsp47 interacts with and promotes the secretion of decorin, fibromodulin, and lumican. *J Biol Chem* *293*, 13707–13716.
- Ishikawa, Y., Taga, Y., Zientek, K., Mizuno, N., Salo, A.M., Semenova, O., Tufa, S.F., Keene, D.R., Holden, P., Mizuno, K., et al. (2021). Type I and type V procollagen triple helix uses different subsets of the molecular ensemble for lysine posttranslational modifications in the rER. *J Biol Chem* *296*, 100453.
- Jalan, A.A., Sammon, D., Hartgerink, J.D., Brear, P., Stott, K., Hamaia, S.W., Hunter, E.J., Walker, D.R., Leitinger, B., and Farndale, R.W. (2020). Chain alignment of collagen I deciphered using computationally designed heterotrimers. *Nat Chem Biol* *16*, 423–429.
- Jimenez, S., and Bashey, R. (1977). Identification of collagen  $\alpha 1(I)$  trimer in embryonic chick tendons and calvaria. *Biochem Biophys Res Commun* *78*, 1354–1361.

- Jimenez, S.A., Harsch, M., Murphy, L., and Rosenbloom, J. (1974). Effects of temperature on conformation, hydroxylation, and secretion of chick tendon procollagen. *J Biol Chem* *249*, 4480–4486.
- Kawahara, K., Yoshida, T., Maruno, T., Oki, H., Ohkubo, T., Koide, T., and Kobayashi, Y. (2020). Spatiotemporal regulation of PEDF signaling by type I collagen remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A* *117*, 11450–11458.
- Kessenbrock, K., Plaks, V., and Werb, Z. (2010). Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell* *141*, 52–67.
- Kimura, S., Zhu, X., Matsui, R., Shijoh, M., and Takamizawa, S. (1988). Characterization of fish muscle type I collagen. *J Food Sci* *53*, 1315–1318.
- Kitamura, A., Ishida, Y., Kubota, H., Pack, C.-G., Homma, T., Ito, S., Araki, K., Kinjo, M., and Nagata, K. (2018). Detection of substrate binding of a collagen-specific molecular chaperone HSP47 in solution using fluorescence correlation spectroscopy. *Biochem Biophys Res Commun* *497*, 279–284.
- Koide, T., Aso, A., Yorihuzi, T., and Nagata, K. (2000). Conformational requirements of collagenous peptides for recognition by the chaperone protein HSP47. *J Biol Chem* *275*, 27957–27963.
- Koide, T., Nishikawa, Y., Asada, S., Yamazaki, C.M., Takahara, Y., Homma, D.L., Otaka, A., Ohtani, K., Wakamiya, N., Nagata, K., et al. (2006). Specific recognition of the collagen triple helix by chaperone HSP47. II. The HSP47-binding structural motif in collagens and related proteins. *J Biol Chem* *281*, 11177–11185.
- Kuznetsova, N.V., McBride, D.J., and Leikin, S. (2003). Changes in thermal stability and microunfolded pattern of collagen helix resulting from the loss of  $\alpha 2(I)$  chain in osteogenesis imperfecta murine. *J Mol Biol* *331*, 191–200.
- Lawson, R.N., and Chughtai, M.S. (1963). Breast cancer and body temperature. *Can Med Assoc J* *88*, 68–70.
- Leikina, E., Merts, M.V., Kuznetsova, N., and Leikin, S. (2002). Type I collagen is thermally unstable at body temperature. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 1314–1318.
- Li, Y., Foss, C.A., Summerfield, D.D., Doyle, J.J., Torok, C.M., Dietz, H.C., Pomper, M.G., and Yu, S.M. (2012). Targeting collagen strands by photo-triggered triple-helix hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A* *109*, 14767–14772.

- Liang, X., Wan, Y., Shen, Z., Liu, Y., Li, D., Li, L., Tang, R., and Zhang, X. (2021). Molecular characterization of Hsp47 in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) and its correlation with type I collagen in response to fish aerobic exercise. *Fishes* 6, 17.
- Lindert, U., Weis, M.A., Rai, J., Seeliger, F., Hausser, I., Leeb, T., Eyre, D., Rohrbach, M., and Giunta, C. (2015). Molecular consequences of the *SERPINH1/HSP47* mutation in the dachshund natural model of osteogenesis imperfecta. *J Biol Chem* 290, 17679–17689.
- Long, C.G., Braswell, E., Zhu, D., Apigo, J., Baum, J., and Brodsky, B. (1993). Characterization of collagen-like peptides containing interruptions in the repeating Gly-X-Y sequence. *Biochemistry* 32, 11688–11695.
- Long, Y., Li, L., Li, Q., He, X., and Cui, Z. (2012). Transcriptomic characterization of temperature stress responses in larval zebrafish. *PLOS ONE* 7, e37209.
- Makareeva, E., Han, S., Vera, J.C., Sackett, D.L., Holmbeck, K., Phillips, C.L., Visse, R., Nagase, H., and Leikin, S. (2010). Carcinomas contain a matrix metalloproteinase-resistant isoform of type I collagen exerting selective support to invasion. *Cancer Res* 70, 4366–4374.
- McCaughey, J., Stevenson, N.L., Cross, S., and Stephens, D.J. (2019). ER-to-Golgi trafficking of procollagen in the absence of large carriers. *J Cell Biol* 218, 929–948.
- Melacini, G., Feng, Y., and Goodman, M. (1996). Acetyl-terminated and template-assembled collagen-based polypeptides composed of Gly-Pro-Hyp sequences. 3. Conformational analysis by <sup>1</sup>H-NMR and molecular modeling studies. *J Am Chem Soc* 118, 10359–10364.
- Miles, C.A., Sims, T.J., Camacho, N.P., and Bailey, A.J. (2002). The role of the  $\alpha 2$  chain in the stabilization of the collagen type I heterotrimer: a study of the type I homotrimer in oim mouse tissues. *J Mol Biol* 321, 797–805.
- Minafra, I.P., Luparello, C., Sciarrino, S., Tomasino, R.M., and Minafra, S. (1985). Quantitative determination of collagen types present in the ductal infiltrating carcinoma of human mammary gland. *Cell Biol Int Rep* 9, 291–296.
- Mizuno, K., Peyton, D.H., Hayashi, T., Engel, J., and Bächinger, H.P. (2008). Effect of the -Gly-3(S)-hydroxyprolyl-4(R)-hydroxyprolyl- tripeptide unit on the stability of collagen model peptides. *FEBS J* 275, 5830–5840.
- Moro, L., and Smith, B.D. (1977). Identification of collagen  $\alpha 1$ (I) trimer and normal type I collagen in a polyoma virus-induced mouse tumor. *Arch Biochem Biophys* 182, 33–41.

- Morvan-Dubois, G., Le Guellec, D., Garrone, R., Zylberberg, L., and Bonnaud, L. (2003). Phylogenetic analysis of vertebrate fibrillar collagen locates the position of zebrafish  $\alpha 3(I)$  and suggests an evolutionary link between collagen  $\alpha$  chains and hox clusters. *J Mol Evol* 57, 501–514.
- Murphy, L., and Rosenbloom, J. (1973). Evidence that chick tendon procollagen must be denatured to serve as substrate for proline hydroxylase. *Biochem J* 135, 249–251.
- Myllyharju, J. (2005). Intracellular post-translational modifications of collagens. In *Topics in Current Chemistry*, pp. 115–147.
- Nagai, N., Hosokawa, M., Itohara, S., Adachi, E., Matsushita, T., Hosokawa, N., and Nagata, K. (2000). Embryonic lethality of molecular chaperone Hsp47 knockout mice is associated with defects in collagen biosynthesis. *J Cell Biol* 150, 1499–1506.
- Nakai, A., Satoh, M., Hirayoshi, K., and Nagata, K. (1992). Involvement of the stress protein HSP47 in procollagen processing in the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 117, 903–914.
- Narayanan, A.S., Page, R.C., and Meyers, D.F. (1980). Characterization of collagens of diseased human gingiva. *Biochemistry* 19, 5037–5043.
- Nokelainen, M., Helaakoski, T., Myllyharju, J., Notbohm, H., Pihlajaniemi, T., Fietzek, P.P., and Kivirikko, K.I. (1998). Expression and characterization of recombinant human type II collagens with low and high contents of hydroxylysine and its glycosylated forms. *Matrix Biol* 16, 329–338.
- Notbohm, H., Mosler, S., Bodo, M., Yang, C., Lehmann, H., Bätge, B., and Müller, P.K. (1992). Comparative study on the thermostability of collagen I of skin and bone: influence of posttranslational hydroxylation of prolyl and lysyl residues. *J Protein Chem* 11, 635–643.
- Oecal, S., Socher, E., Uthoff, M., Ernst, C., Zaucke, F., Sticht, H., Baumann, U., and Gebauer, J.M. (2016). The pH-dependent client release from the collagen-specific chaperone HSP47 is triggered by a tandem histidine pair. *J Biol Chem* 291, 12612–12626.
- Omari, S., Makareeva, E., Gorrell, L., Jarnik, M., Lippincott-Schwartz, J., and Leikin, S. (2020). Mechanisms of procollagen and HSP47 sorting during ER-to-Golgi trafficking. *Matrix Biol* 93, 79–94.
- Pace, C.N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G., and Gray, T. (1995). How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci* 4, 2411–2423.

- Rojkind, M., Giambone, M.A., and Biempica, L. (1979). Collagen types in normal and cirrhotic liver. *Gastroenterology* 76, 710–719.
- Rutherford, S.L., and Lindquist, S. (1998). Hsp90 as a capacitor for morphological evolution. *Nature* 396, 336–342.
- Saga, S., Nagata, K., Chen, W.T., and Yamada, K.M. (1987). pH-dependent function, purification, and intracellular location of a major collagen-binding glycoprotein. *J Cell Biol* 105, 517–527.
- Saito, K., Chen, M., Bard, F., Chen, S., Zhou, H., Woodley, D., Polischuk, R., Schekman, R., and Malhotra, V. (2009). TANGO1 facilitates cargo loading at endoplasmic reticulum exit sites. *Cell* 136, 891–902.
- Saito, M., Takenouchi, Y., Kunisaki, N., and Kimura, S. (2001). Complete primary structure of rainbow trout type I collagen consisting of  $\alpha 1(I)\alpha 2(I)\alpha 3(I)$  heterotrimers. *European Journal of Biochemistry* 268, 2817–2827.
- Saito, M., Higuchi, T., and Uchida, N. (2014). Identification and primary structures of eel type I collagen pro $\alpha 1$ , pro $\alpha 2$  and pro $\alpha 3$ . *Fisheries Sci* 80, 1323–1335.
- Satoh, M., Hirayoshi, K., Yokota, S., Hosokawa, N., and Nagata, K. (1996). Intracellular interaction of collagen-specific stress protein HSP47 with newly synthesized procollagen. *J Cell Biol* 133, 469–483.
- Schaefer, J., and Ryan, A. (2006). Developmental plasticity in the thermal tolerance of zebrafish *Danio rerio*. *J Fish Biol* 69, 722–734.
- Schneider, C.A., Rasband, W.S., and Eliceiri, K.W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 9, 671–675.
- Sekiya, A., Okano-Kosugi, H., Yamazaki, C.M., and Koide, T. (2011). Pigment epithelium-derived factor (PEDF) shares binding sites in collagen with heparin/heparan sulfate proteoglycans. *J Biol Chem* 286, 26364–26374.
- Sepulveda, D., Rojas-Rivera, D., Rodríguez, D.A., Groenendyk, J., Köhler, A., Lebeaupin, C., Ito, S., Urra, H., Carreras-Sureda, A., Hazari, Y., et al. (2018). Interactome screening identifies the ER luminal chaperone Hsp47 as a regulator of the unfolded protein response transducer IRE1 $\alpha$ . *Mol Cell* 69, 238-252.e7.
- Shapiro, F.D., and Eyre, D.R. (1982). Collagen polymorphism in extracellular matrix of human

- osteosarcoma. *J Natl Cancer Inst* 69, 1009–1016.
- Taga, Y., Kusubata, M., Ogawa-Goto, K., and Hattori, S. (2014). Stable Isotope-Labeled Collagen: A novel and versatile tool for quantitative collagen analyses using mass spectrometry. *J Proteome Res* 13, 3671–3678.
- Taga, Y., Kusubata, M., Ogawa-Goto, K., and Hattori, S. (2016). Developmental stage-dependent regulation of prolyl 3-hydroxylation in tendon Type I collagen. *J Biol Chem* 291, 837–847.
- Taga, Y., Tanaka, K., Hamada, C., Kusubata, M., Ogawa-Goto, K., and Hattori, S. (2017). Hydroxyhomocitrulline is a collagen-specific carbamylation mark that affects cross-link formation. *Cell Chem Biol* 24, 1276-1284.e3.
- Takuwa, A., Yoshida, T., Maruno, T., Kawahara, K., Mochizuki, M., Nishiuchi, Y., Kobayashi, Y., and Ohkubo, T. (2016). Ordered self-assembly of the collagenous domain of adiponectin with noncovalent interactions via glycosylated lysine residues. *FEBS Lett* 590, 195–201.
- Tanrikulu, I.C., and Raines, R.T. (2014). Optimal interstrand bridges for collagen-like biomaterials. *J Am Chem Soc* 136, 13490–13493.
- Tasab, M., Batten, M.R., and Bulleid, N.J. (2000). Hsp47: a molecular chaperone that interacts with and stabilizes correctly-folded procollagen. *EMBO J* 19, 2204–2211.
- Terajima, M., Taga, Y., Cabral, W.A., Nagasawa, M., Sumida, N., Hattori, S., Marini, J.C., and Yamauchi, M. (2017). Cyclophilin B deficiency causes abnormal dentin collagen matrix. *J Proteome Res* 16, 2914–2923.
- Thomson, C.A., and Ananthanarayanan, V.S. (2000). Structure-function studies on hsp47: pH-dependent inhibition of collagen fibril formation *in vitro*. *Biochem J* 349 Pt 3, 877–883.
- Tonelli, F., Cotti, S., Leoni, L., Besio, R., Gioia, R., Marchese, L., Giorgetti, S., Villani, S., Gistelinck, C., Wagener, R., et al. (2020). *Crtap* and *p3h1* knock out zebrafish support defective collagen chaperoning as the cause of their osteogenesis imperfecta phenotype. *Matrix Biol* 90, 40–60.
- Torre-Blanco, A., Adachi, E., Hojima, Y., Wootton, J.A., Minor, R.R., and Prockop, D.J. (1992). Temperature-induced post-translational over-modification of type I procollagen. Effects of over-modification of the protein on the rate of cleavage by procollagen N-proteinase and on self-assembly of collagen into fibrils. *J Biol Chem* 267, 2650–2655.
- Tous, G.I., Fausnaugh, J.L., Akinyosoye, O., Lackland, H., Winter-Cash, P., Vitorica, F.J., and Stein,

- S. (1989). Amino acid analysis on polyvinylidene difluoride membranes. *Anal Biochem* 179, 50–55.
- Walker, D.R., Hulgán, S.A.H., Peterson, C.M., Li, I.-C., Gonzalez, K.J., and Hartgerink, J.D. (2021). Predicting the stability of homotrimeric and heterotrimeric collagen helices. *Nat Chem* 13, 260–269.
- Wang, A.Y., Mo, X., Chen, C.S., and Yu, S.M. (2005). Facile modification of collagen directed by collagen mimetic peptides. *J Am Chem Soc* 127, 4130–4131.
- Weis, M.A., Hudson, D.M., Kim, L., Scott, M., Wu, J.-J., and Eyre, D.R. (2010). Location of 3-hydroxyproline residues in collagen types I, II, III, and V/XI implies a role in fibril supramolecular assembly. *J Biol Chem* 285, 2580–2590.
- Wilson, D.G., Phamluong, K., Li, L., Sun, M., Cao, T.C., Liu, P.S., Modrusan, Z., Sandoval, W.N., Rangell, L., Carano, R.A.D., et al. (2011). Global defects in collagen secretion in a *Mia3/TANGO1* knockout mouse. *J Cell Biol* 193, 935–951.
- Xie, T., Dong, B., Yan, Y., Hu, G., and Xu, Y. (2016). Association between MMP-2 expression and prostate cancer: A meta-analysis. *Biomed Rep* 4, 241–245.
- Yamagata, S., and Yamagata, T. (1984). FBJ virus-induced osteosarcoma contains type I, type I trimer, type III as well as type V collagens. *J Biochem* 96, 17–26.
- Yamamura, T., Nakanishi, K., Hiroi, S., Kumaki, F., Sato, H., Aida, S., and Kawai, T. (2002). Expression of membrane-type-1-matrix metalloproteinase and metalloproteinase-2 in nonsmall cell lung carcinomas. *Lung Cancer* 35, 249–255.
- Yuan, L., Kenny, S.J., Hemmati, J., Xu, K., and Schekman, R. (2018). TANGO1 and SEC12 are copackaged with procollagen I to facilitate the generation of large COPII carriers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115, E12255–E12264.



## 謝辞

本論文をまとめるにあたり、研究の機会をいただきました早稲田大学の小出隆規教授に深く感謝いたします。研究室に配属されて以来、ご指導ご鞭撻を賜り充実した研究生生活を送ることができました。

副査をお引き受けくださり、ご指導いただきました、早稲田大学の寺田泰比古教授および中尾洋一教授に厚く御礼申し上げます。

株式会社ニッピバイオマトリックス研究所の服部俊治顧問ならびに LC-MS 分析 (第 3、4 章) を行っていたいただきました多賀祐喜博士には、多くのご助言と励ましの言葉をいただきました。深く感謝いたします。

*Hsp47* および *MEF* を供与していただくとともに、ご助言もいただきました、京都産業大学の永田和宏名誉教授 (現、JT 生命誌研究館・館長)、伊藤進也博士に感謝いたします。

MD シミュレーション (第 2 章) を行っていたいただきました、東京工業大学の門之園哲哉助教に感謝いたします。

本研究の遂行にあたり、実験にご協力いただきました瀧田講氏、阪井貴之氏、石井健斗氏、高木佑恭氏、ご助言をいただきました増田亮博士、市瀬慎一郎氏に感謝いたします。特に瀧田氏には、第 2 章においてたくさんの実験を行っていただきました。また、平和馬氏、黒田一稀氏、宇田川雛子氏、金井沙也伽氏をはじめ、小出研究室の皆様には研究室生活において様々な形でご支援とご協力をいただき、大変お世話になりました。

最後に、これまで支えてくれた家族に心より感謝いたします。

2022 年 3 月



研究業績

種類別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
論文	<p>○“The Thermal Stability of the Collagen Triple Helix Is Tuned According to the Environmental Temperature”  <i>International Journal of Molecular Sciences</i>, <b>23</b>, 2040 (2022).  <u>Kazunori K. Fujii</u>, Yuki Taga, Yusuke K. Takagi, Ryo Masuda, Shunji Hattori, Takaki Koide</p> <p>○“Lowering the culture temperature corrects collagen abnormalities caused by HSP47 gene knockout”  <i>Scientific Reports</i>, <b>9</b>, 17433 (2019).  <u>Kazunori K. Fujii</u>, Yuki Taga, Takayuki Sakai, Shinya Ito, Shunji Hattori, Kazuhiro Nagata, Takaki Koide</p> <p>“Structural optimization of cyclic peptides that efficiently detect denatured collagen”  <i>Organic &amp; Biomolecular Chemistry</i>, <b>17</b>, 7380-7387 (2019).            Koh K. Takita, <u>Kazunori K. Fujii</u>, Kento Ishii, Takaki Koide</p> <p>○“Cyclic Peptides for Efficient Detection of Collagen”  <i>ChemBioChem</i>, <b>19</b>, 1613-1617 (2018).            Koh K. Takita, <u>Kazunori K. Fujii</u>, Tetsuya Kadonosono, Ryo Masuda, Takaki Koide</p>
講演	<p>「魚類細胞が分泌するコラーゲンの性質と培養温度の関係」            第 52 回日本結合組織学会学術大会, WEB 開催, 2020 年 9 月.  <u>藤井一徳</u>, 多賀祐喜, 服部俊治, 小出隆規</p> <p>「プロコラーゲン特異的分子シャペロン HSP47 の機能」            第 50 回若手ペプチド夏の勉強会, 浜松, 2018 年 8 月.  <u>藤井一徳</u></p> <p>「変性コラーゲンに結合する環状ペプチドの開発と <i>in vivo</i> への応用」            第 50 回日本結合組織学会学術大会, 福岡, 2018 年 6 月.            瀧田講, <u>藤井一徳</u>, 木村寛之, 小出隆規</p>

<p>講演 (つづき)</p>	<p>“HSP47 stabilizes folding intermediates of procollagen which are unstable at body temperature”  第 70 回日本細胞生物学会第 51 回日本発生生物学会合同大会, 東京, 2018 年 6 月.  <u>Kazunori K. Fujii</u>, Yuki Taga, Shinya Ito, Shunji Hattori, Kazuhiro Nagata, Takaki Koide</p> <p>“Cyclic peptides for efficient detection of collagen”  第 54 回ペプチド討論会, 大阪, 2017 年 11 月.  Koh K. Takita, <u>Kazunori K. Fujii</u>, Takaki Koide</p> <p>「コラーゲンの成熟過程において HSP47 が果たす役割」  第 49 回日本結合組織学会学術大会, 津, 2017 年 6 月.  <u>藤井一徳</u>, 多賀祐喜, 伊藤進也, 服部俊治, 永田和宏, 小出隆規</p> <p>「コラーゲン 3 重らせんに着目した研究 -基礎から応用まで-」  第 48 回日本結合組織学会学術大会, 長崎, 2016 年 6 月.  <u>藤井一徳</u>, 小出隆規</p>
---------------------	---