

## 論文の内容の要旨

論文題目

Role of Osteomodulin in the regulation of morphogenesis of Type I collagen  
(I型コラーゲンの形態形成制御におけるOsteomodulinの役割)

氏名 田島 卓実

### 第1章 序論

細胞外マトリックス(ECM)は組織支持や細胞活動に重要な役割を担っている。その中でもI型コラーゲンは生体内に最も豊富に存在する蛋白質であり、生命活動に必須の蛋白質である。I型コラーゲンは細胞外に分泌された後に、自己会合し、線維を形成する。この線維は各組織中で特定のサイズを示すことで、組織特有の強度を担っているとされている。また、この線維が細胞への特定のシグナルを伝えることで、細胞の増殖や移動の制御を行っている。

コラーゲン線維の形態制御が失われると生体内に多大な悪影響をもたらすことが知られている。例えばコラーゲンが過剰に分泌され、太く硬い異常な線維を形成する線維症がある。特に肺線維症患者では5年生存率が20~40%と予後が悪く、未だ根治療法がない。また、がん細胞周辺では既存のコラーゲン線維が分解され、新しくコラーゲン線維を再構築する現象が起きている。この新しいコラーゲンはがん細胞が転移しやすいように通常とは異なった構造、そして硬い線維が作られることが知られている。よって通常のコラーゲン線維の制御機構を知ることが生命現象の理解とともに、様々な疾患への治療ターゲットになると考えられる。

このコラーゲン線維の制御を担う分子の一種として **Small Leucine rich repeat Proteoglycans (SLRPs)**が挙げられる。SLRPsは約20種の蛋白質ファミリーであり、ECM構築や細胞シグナル制御を担っていることが知られている。その中でもコラーゲン線維形成に深く関与していることが種々の蛋白質で報告されている。例えば、SLRPsの一種をノックアウトしたマウスの皮膚組織で不均一なコラーゲン線維が形成され、脆い皮膚が形成されるといった報告もある。しかしながら、コラーゲン線維形態の制御機構は未だに解明されていない。その

理由の一つとして、これまでにマウスや細胞を用いた実験が行われてきたが、SLRPsはファミリー蛋白質であるため、しばしば機能の補完により、1分子の正確な機能の解析ができないことがある。

解決策として、私はSLRPsの一種であるOsteomodulin (OMD)の組換え蛋白質を用いてOMD-コラーゲン間相互作用の物理化学的解析を行い、得られたパラメータに基づいて議論することにより、1対1の相互作用機構の詳細な解明を行うこととした。また、形成される線維への影響を電子顕微鏡により解析することにより、線維を”制御する”分子メカニズムの解明について考察し、その全容を明らかにすることを目的とした。

本論文では第2章から第5章まで上述した制御メカニズムに関する研究を行い、第6章において各章のまとめを記述した(図1)。まず、第2章においては組み換え蛋白質としてのOMDの物性・構造解析を行った。コラーゲンにお

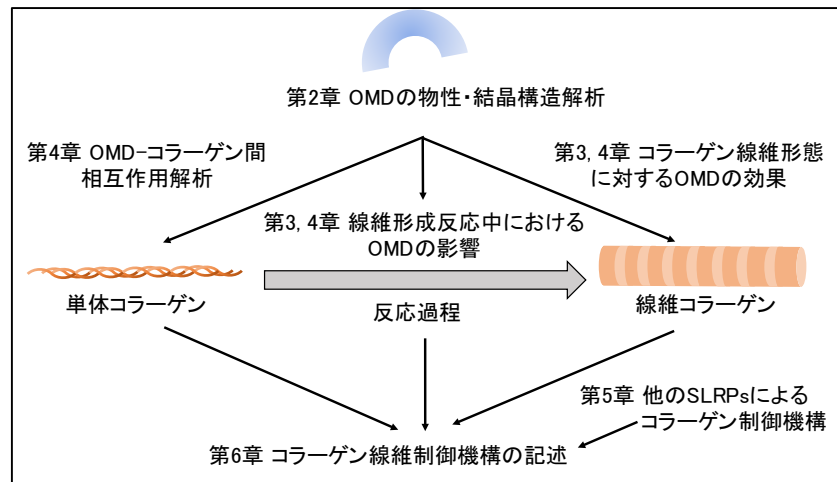


図1 研究方針

いてもその後の実験条件の設定を行うために溶媒・温度条件における物性解析を行った。第3章においてはOMDがコラーゲン線維形成に与える効果、制御能を明らかにするために、主に電子顕微鏡を活用した解析を行った。第4章では第3章で明らかにした制御メカニズムを解明するために、OMDとコラーゲンの詳細な変異体解析、物理化学的相互作用解析を行った。第5章においては他のSLRPsの特徴、コラーゲンに対する機能を解析することでSLRPsファミリーにおける本研究の一般性について記述した。

## 第2章 OMD、I型コラーゲンの物性解析

OMDはバキュロウイルスにより昆虫細胞から発現させた組み換え蛋白質を用いた。精製後のOMDの溶液物性を精査した。CD測定の結果、OMDはLRR特有のβシート構造を有していた。示差走査型熱量測定(DSC)より、OMDは変性中間温度T<sub>m</sub>が50°C程度であった。また溶液中での分子量を多角度光散乱法により解析したところ、54 kDaと理論分子量54 kDaとほぼ同様に単量体で存在していることが明らかになった。

SLRPsは二量体蛋白質として知られている。OMDの結晶中での構造を明らかにする

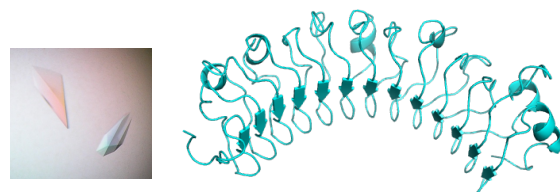


図2 OMDの結晶(左)と構造解析結果(右)

ために結晶構造解析を行った。結果、分解能 2.17Å の構造を取得することに成功した (図 2)。三次構造は他の SLRPs と比較して RMSD が 1.3 Å とほぼ同様の構造を示したものの、溶液系と同様の単量体を示した。以上より、OMD は SLRPs ファミリーで初めて安定に単量体で存在する蛋白質であることを明らかにした。

### 第 3 章 OMD のコラーゲン線維形成及び形態に対する効果

OMD と I 型コラーゲンを ELISA 法により解析したところ、OMD 濃度依存的に結合シグナルが上昇した。これより OMD がコラーゲンに結合することが示された。またコラーゲン溶液に OMD を濃度依存的に添加し、線維形成を観察した。線維形成は 400 nm の吸光度の上昇として測定できる。その結果、OMD 添加に伴い線維形成速度は低下し、終状態の値も低い値を示した。

線維形成後のコラーゲンを TEM 観察した結果、OMD 添加により、均一な線維幅を持ったコラーゲン線維が形成された。SEM 解析の結果、コラーゲンのみではねじれた線維があるのに対し、OMD 添加では直線状の絡まりのないコラーゲン線維が形成された (図 3)。以上より、OMD はコラーゲン

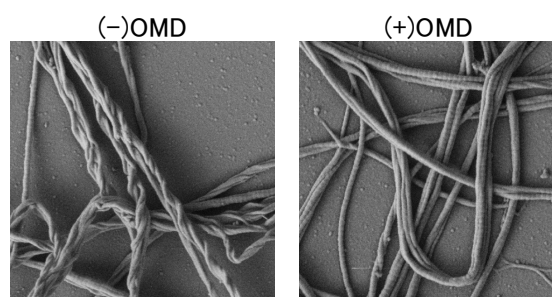


図 3 コラーゲン線維形態(SEM)

線維を均一な線維幅及び直線状の線維へと形態制御していることが証明された。

### 第 4 章 OMD とコラーゲン相互作用の精密解析

線維形成中のコラーゲンに対する OMD の局在を免疫電顕法により明らかにした。金粒子を付加した抗体を用いて OMD を検出しているため、OMD の局在は黒点として観察された。解析の結果、OMD は線維形成途中の線維(反応 10 分)及び線維形成後の線維(12 時間)、両方ともに局在していた。SPR の結果と合わせると、OMD はコラーゲン単体から線維までの各状態のコラーゲンと相互作用していることが明らかになった。

SPR により OMD-コラーゲン間の相互作用を測定したところ、解離定数は 24  $\mu\text{M}$  と比較的弱い結合親和性を示し、非常に速い反応の相互作用であった。さらに塩濃度変化及び温度変化に伴う親和性測定を行い、相互作用の駆動力を議論した。塩濃度変化による解析を行ったところ、OMD は塩濃度増加に伴い、コラーゲンへの親和性及び結合量が低下した。このことは OMD-コラーゲン間相互作用には静電相互作用が働くことを示唆する。また温度変化に伴う親和性変化を van't hoff の式に代入し、熱力学的パラメータを算出した結果、OMD-コラーゲン間相互作用はエントロピー駆動の相互作用であることが明らかとなった。

さらなる精密な相互作用解析を可能とするために、高い収量と安定を示すキメラ OMD を設計し、精製することに成功した。変異体のコラーゲンに対する親和性を SPR で解析した結果、E284, E303 の結合への関与が示唆された。全長 OMD を用いて候補アミノ酸の変異体解析を行った。E284R/E303R 変異体ではコラーゲンへの結合能が失われた。また、幅制御や形状制御能も失われたことから、この二つの負電荷アミノ酸はコラーゲン結合・制御に必須のアミノ

酸であることが明らかとなった。

OMD とコラーゲンペプチドとのドッキングシミュレーションを行ったところ、約 1300 アミノ酸存在するコラーゲンの中でもコラーゲン同士の相互作用開始領域において OMD と最も安定に結合することが明らかになった。

以上より、OMD はコラーゲン線維形成過程において E284, E303 を主体とした弱い静電相互作用によりコラーゲンと結合し、速い解離反応を繰り返すことで線維形成速度を低下させていることが明らかとなった。

### 第 5 章 他の SLRPs の I 型コラーゲンに対する効果

他の SLRPs に関しては Decorin, Fibromodulin, PRELP, Asporin を解析した。SLRP の中で最もよく研究されている Decorin は OMD と同様にコラーゲン線維形成速度は低下させ、さらに線維幅の制御も行っていることが明らかになった。また Fibromodulin もコラーゲンと相互作用することから同様の機能がうかがえた。一方で PRELP, Asporin は構造安定性の問題から十分に解析することはできなかった。これらのことから、同様の三次構造と考えられているファミリー間でも多様な構造安定性、四次構造を有し、それが分子機能の違いを生んでいる可能性が示唆された。

### 第 6 章 総括

OMD は I 型コラーゲンに E284, E303 を主体として静電相互作用し、脱水和を基にしたエントロピー駆動で複合体を形成する。またコラーゲンに対する結合解離は速いため、OMD はコラーゲンからすぐに解離し、その間はコラーゲン同士の会合が行われると考えられる。このような相互作用メカニズムから線維形成速度が減少すると考えられた。以上の結果に基づき、OMD によるコラーゲン線維の均一な幅、形状が、線維形成過程において OMD の結合解離の繰り返しから線維形成速度が低下、つまり非特異的相互作用を防ぎつつ線維形成を進行させるといった精巧な相互作用システムから行われているという新規の制御メカニズムを提案する (図 4)。

本研究で明らかにした、コラーゲン線維形状の制御メカニズムは長年の課題の各組織におけるコラーゲン線維形態制御機構の解明に繋がる。また、その分子機構を足がかりとして、線維形状の自在なデザインが実現可能となることが期待される。例えば、線維症やがんにおいて、疾病の進行に寄与する線維制御不全を改善するための新たな疾患治療法の開発などが考えられる。

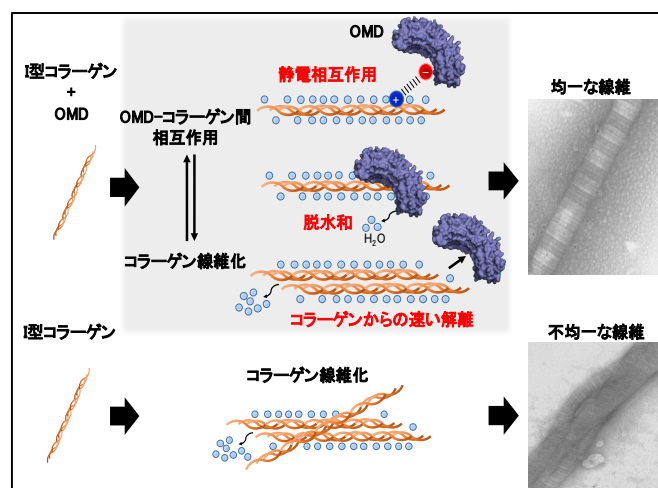


図 4 OMD のコラーゲン線維形態制御機構モデル