

平成 21 年 6 月 21 日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19770092  
 研究課題名 (和文) コラーゲン 3 本らせんとシャペロン HSP47 との共進化の可能性  
 研究課題名 (英文) Coevolved ability of Collagen and its molecular chaperon HSP47.  
 研究代表者  
 浅田 真一 (SHINICHI ASADA)  
 新潟薬科大学・薬学部・助教  
 研究者番号：50424883

## 研究成果の概要：

コラーゲンは全ての多細胞動物に存在しているが、その分子シャペロン HSP47 はほ乳類などの脊椎動物以上の高等動物にしか見られない。コラーゲン 3 本らせんは、その進化過程で、分子シャペロンである HSP47 を獲得することにより、体温では不安定な長いプロコラーゲン分子を産生できるようになったと考えられる。本研究では、この可能性を明らかにするツールとして、分子シャペロン HSP47 の発現を自由にコントロールすることが可能な「シャペロンスイッチ付き細胞」を作成した。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	0	1,800,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	450,000	3,750,000

## 研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物化学・構造生物化学

キーワード：フォールディング、分子シャペロン、HSP47、共進化

## 1. 研究開始当初の背景

HSP47 の分子機能については、アメリカ、カナダ、英国、日本の主要 4 グループが世界をリードしているが、どのグループによる報告も HSP47 機能の直接の証明には至っていなかった。HSP47 のコラーゲンに対するシャペロン機能の解析は、クライアントとして主に、ほ乳類タイプ I コラーゲンなどの分子進化上「新しい」コラーゲンをを用いて行われてきた。申請者は自ら HSP47 のクライアントタンパク質候補を予測するプログラムを開発し、

ヒトゲノムにコードされている全てのタンパク質をターゲットとして検索を行った。その結果、ヒトのタイプ I から XXVII までの全てのタイプのコラーゲンに HSP47 の結合認識配列が存在しているが、一方、分子進化上「古くて短い」コラーゲン様タンパク質には、HSP47 の結合認識配列を持たないものが存在していることを明らかにした (Koide, T., et al., *J. Biol. Chem.*, 2006b)。

## 2. 研究の目的

HSP47の発現をコントロール出来る細胞、即ちシャペロン発現スイッチ付き細胞にこれら分子進化の様々な過程にあるコラーゲン・コラーゲン様タンパク質の遺伝子を導入して発現させることで、以下の疑問に対する答えが明らかになると考えた。

1) HSP47のクライアントタンパク質検索プログラムで得られた結果は正しいのか？

2) 分子進化上「新しく長い」繊維性のコラーゲンの生合成に HSP47 は必要なのか？

3) 分子進化上「古くて短い」コラーゲン様タンパク質の生合成に HSP47 が必要なのか、不要なのか？(あるいは邪魔なのか？)

本研究により HSP47 のコラーゲンに対するシャペロン機能が解明できるものと考えた。

## 3. 研究の方法

### (1) Tet 調節因子発現株の樹立

*hsp47* ノックアウトマウスより樹立された繊維芽細胞(*hsp47*<sup>-/-</sup>細胞)ではコラーゲンの生合成及び分泌に必要な酵素やシャペロン類は、HSP47 を除き全て正常に機能していることが示唆されている。この細胞に HSP47 存在下と非存在下のそれぞれで、種々のコラーゲンを発現させ、それらの生合成を比較する必要がある。しかしながら、*hsp47*<sup>-/-</sup>細胞はその細胞株樹立の際のクローニングによる変異を含んでいる可能性があり、野生株由来の細胞と比較することは適当でない。そこで、薬剤誘導発現システムとして広く使用されているテトラサイクリン発現系を利用し、テトラサイクリン(ドキシサイクリン)添加/除去によって HSP47 の発現を自在に調節することが可能な細胞株(Tet-Off 調節因子発現株)を樹立することとした。

### (2) HSP47 の発現を自在に調節できる細胞株の確立“シャペロンスイッチ付細胞”の樹立

ハイグロマイシン抵抗遺伝子を持つ、Tet-Off誘導型 HSP47 用プラスミドの構築を行い、(1)で作成した Tet-Off 調節因子発現細胞に、導入し、シャペロンスイッチ付き細胞の樹立を試みた。ハイグロマイシン存在下で生存した細胞の抽出液を試料としてウエスタンブロッティングを行うことで、HSP47 の細胞内蓄積量を確認し、テトラサイクリンによる HSP47 の発現抑制/誘導を確認した。また、<sup>35</sup>S]メチオニンを培地中に加えて HSP47 の発現誘導を行うことで、テトラサイクリンによる HSP47 の合成量を比較した。

### (3) コラーゲン/コラーゲン様タンパク質発現プラスミドの構築

上記方法にて作成した Tet-Off 誘導型 HSP47 発現細胞や *hsp47* ノックダウン細胞のようなシャペロンスイッチ付き細胞に、進化上様々な過程にあると考えられるコラーゲンを発現させるためのプラスミドを構築した。発現させる種々のコラーゲン 3 本らせんを持つタンパク質として以下のタンパク質を用いる。

分子進化上「新しく長い？」コラーゲン: Type I, II, III, V コラーゲンなど

分子進化上「古くて短い？」コラーゲン(様タンパク質):MBL 2 (Mannose Binding Lectin 2)、Adiponectin、Macrophage Scavenger Receptor Type I、Collectin 10、Elastin など

## 4. 研究成果

### (1) Tet 調節因子発現株の樹立

ピューロマイシン抵抗遺伝子を持つテトラサイクリン誘導用転写因子発現プラスミドを構築し、*hsp47*<sup>-/-</sup>細胞にテトラサイクリン除去によって目的遺伝子の発現を誘導可能な細胞の樹立を試みた。計約 100 個のクローン株を得、-Gal をテトラサイクリン依存発現プロモーターの下流に持つプラスミドを構築し、得られた各クローン細胞に一過性導入を行ってその発現調節を確認した。その結果、培地からテトラサイクリンを除去することにより、-Gal 活性が見られる細胞株の樹立に成功した(図 1)

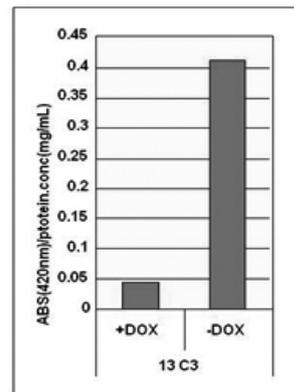


図 1 : Tet-Off 誘導型発現細胞

-DOX: ドキシサイクリン(テトラサイクリンアナログ)により -Gal の活性が約 10 倍に上昇した。

### (2) HSP47 の発現を自在に調節できる細胞株の確立“シャペロンスイッチ付細胞”の樹立

テトラサイクリン発現誘導プロモーターを上流に持つ HSP47 発現遺伝子の安定導入株作成を試みた。単離された 120 の細胞のうち、ウエスタン及び放射性同位元素を用いた HSP47 の発現確認の結果、4 つの細胞株の樹立に成功した。現在これらの細胞は、長いコラーゲン(Type I, III, V など)を発現しているが、より短いコラーゲン様タンパク質の発現が見られない。

(3) コラーゲン/コラーゲン様タンパク質  
発現プラスミドの構築

現在(2)で樹立した“シャペロンスイッチ  
付き細胞”に一過性に導入するコラーゲン分  
子発現プラスミドの構築を行っている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に  
は下線)

[雑誌論文](計 1件)

(1) Yamazaki CM, Asada S, Kitagawa K,  
Koide T.

“Artificial collagen gels via self-assembly  
of de novo designed peptides.”

Biopolymers. 査読有 2008;90(6):816-23.

[学会発表](計 3件)

(1) 遠藤裕之, 中瀬生彦, 二木史朗, 浅田真一,  
小出隆規

“Arg-rich なコラーゲン様ペプチドの細  
胞膜透過性”

日本薬学会第 129 回年会(京都)2009 年 3  
月

(2) 小杉日登美, 浅田真一, 北川幸己, 小出隆  
規

コラーゲン 3 重らせん上に存在するタン  
パク質結合配列の探索

第 55 回マトリックス研究会/第 40 回結合  
組織学会学術大会(東京) 2008 年 5 月

(3) 山崎ちさと, 浅田真一, 北川幸己, 小出隆  
規

ペプチドの自己集合による人工コラーゲ  
ンゲルの創製

第 54 回マトリックス研究会/第 39 回結  
合組織学会学術大会、東京都、2007 年 5  
月

6. 研究組織

(1)研究代表者

浅田 真一 (ASADA SHINITI)

新潟薬科大学・薬学部・助教

5 0 4 2 4 8 8 3

(2)研究協力者

小杉 日登美 (KOSUGI HITOMI)

新潟薬科大学・薬学部・研究系職員

8 0 4 5 4 2 1 3

小出 隆規 (KOIDE TAKAKI)

早稲田大学・先進理工学部・教授

7 0 3 2 2 2 5 3