

平成22年 3月 31日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2006～2008

課題番号：18500361

研究課題名（和文） 生体内ゼラチンの機能解明と利用

研究課題名（英文） Analysis and application of gelatin form of type IV collagen

研究代表者

今村 保忠（IMAMURA YASUTADA）

工学院大学 工学部 教授

研究者番号：40201339

研究成果の概要：

1. I V型コラーゲンのらせん形成には N-アセチルシステインが酸化ストレスを介して間接的に作用する
2. ゼラチンフォームのポリペプチド鎖の精製を行なった。
3. I V型コラーゲンの転写は、I 型コラーゲンと異なりアスコルビン酸の直接の影響を受けない。I V型コラーゲンに対するアスコルビン酸の作用は転写を介するものではなく、翻訳後の細胞内環境に依存する。
4. I V型コラーゲン遺伝子の C 末端側の NC1 ドメインに相当する部位を単離し、I V型コラーゲンを分泌している細胞に導入し強制発現させたところ、3本らせん形成に干渉するという直接的な結果は得られなかった。
5. ゼラチンフォームの $\alpha 1(IV)$ 鎖は小胞体に滞留する。コラーゲンらせん形成不全で引き起こされるもので、コラーゲンペプチドへのムチン型糖鎖の修飾と関連する。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
年度			
2006年度	1,300,000	0	1,300,000
2007年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
総計	3,500,000	660,000	4,160,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学 医用生体工学・生体材料学

キーワード：人間医工学 医用生体工学・生体材料学

キーワード：コラーゲン、I V型コラーゲン、アスコルビン酸、ゼラチン、分泌フォーム、ムチン型糖鎖、Nアセチルシステイン

1. 研究開始当初の背景

我々は研究開始以前から生体中にはゼラ

チンが存在することを報告して来た。少なくとも IV 型コラーゲンポリペプチド鎖は3本らせん構造を持たないゼラチンとして細胞

から分泌され、組織に沈着する。アスコルビン酸は IV 型コラーゲンがゼラチンフォームか 3 本らせんフォームの 2 つのフォームのいずれかを決定する因子である。ユニークな糖鎖が付加される点で、3 本らせんフォームの分子由来のポリペプチド鎖とは異なり、特異的なレクチンを用いることで両者を識別することが可能である。しかしながら、このゼラチンの細胞内の分泌機構については分かっていなかった。また、ゼラチンの生理的な機能についても全く不明である。

2. 研究の目的

本研究ではゼラチンフォームの IV 型コラーゲンポリペプチド鎖がどのような分子機構で分泌されるのかについて、アスコルビン酸の関与、糖鎖の構造や糖鎖付加反応、細胞からの分泌ルートに重点を置き解明する。また、生体組織中に存在しうることが示されたので、MMP 阻害活性や血管新生作用の有無など生化学・生理学的機能について解明し、あらたな生体機能材料としての利用法を開発する。

3. 研究の方法

(1). 培養条件の検討

ヒト胎児肺線維芽細胞やヒト腎メサンジウム細胞は IV 型コラーゲンを産生する。種々の条件で細胞を培養し、IV 型コラーゲンの分泌フォームを調べる。特に代謝条件の変化や酸化ストレスの影響を調べる目的で、アスコルビン酸の他、グルコースやグルタチオン、N-アセチルシステインなどがどのように影響するか調べる。この研究によって生体内で実際に分泌フォームを制御する因子を明らかにしていく。

(2). ゼラチンフォームのポリペプチド鎖の精製と分析

ヒト肝がん由来の細胞株 JHH-1 からは 1 リットル当たりの培養上清からゼラチンフォームのポリペプチド鎖は約 10 mg を回収できるので、大量培養を行い充分量の培養上清から、らせん構造を持たない $\alpha 1(\text{IV})$ 鎖に特異的なモノクローナル抗体 JK132 を用いたアフィニティーカラムにより精製する。精製ポリペプチド鎖に対して、SS 結合の形成をふくめ化学的構造を調べる。

(3). 細胞内の分泌機構の解析

JK199 と JK132 は IV 型コラーゲンに対するモノクローナル抗体である。JK199 は 3 本らせん構造の分子と結合し、ゼラチンフォームのポリペプチドは認識できない。一方 JK132 は 3 本らせん構造の分子は認識でき

ないが、らせん構造を持たない $\alpha 1(\text{IV})$ 鎖を認識する。またマッシュルームレクチン ABA はゼラチンフォームのポリペプチドに付加した糖鎖を認識する。これらの組み合わせで、細胞内の分泌ルートを明らかにする。すなわち、翻訳直後では JK132 で染色され、3 本らせんを形成すると JK199 により染色される。ゼラチンフォームで糖鎖の付加が起きると JK132 とレクチン ABA で二重染色される。細胞内の小器官の特異染色と組み合わせることで、ゼラチンフォームのポリペプチド鎖の合成・分泌ルートを解明する。

(4). 3 ヒドロキシプロリンとの関係

3 ヒドロキシプロリンは、基底膜コラーゲンに比較的多く見られる修飾アミノ酸である。このアミノ酸を含む尿中ペプチド量はガンの指標になることが示されている。IV 型コラーゲン由来ペプチドもガンとの関連が指摘されており、ゼラチンフォームのポリペプチドとの関係を調べる。

4. 研究成果

(1). 種々の代謝・酸化ストレス条件を変化させて IV 型コラーゲンの分泌フォームを調べた。

アスコルビン酸の作用に対し拮抗的に作用する可能性のある薬剤として、N-アセチルシステイン (NAC) が見つかった。NAC はアスコルビン酸と異なり、IV 型コラーゲンの転写レベルを上げた。その結果、3 本らせんフォームとゼラチンフォームを分泌する条件で、分泌量が増加した。3 本らせん形成に及ぼす作用は、アスコルビン酸に比較すると、部分的であった。NAC は IV 型コラーゲンのらせん形成には酸化ストレスを介して間接的に作用すると考察される。

(2). ゼラチンフォームのポリペプチド鎖の精製を行なった。

ペプチド解析を可能な約 100 μg のペプチドは精製できた。TOF-Mass の解析条件を検討したが、十分な情報が得られていない。

(3). ヒトメサンギウム細胞による IV 型コラーゲン産生に及ぼすアスコルビン酸の作用を転写レベルで検討するために、リアルタイム PCR を行ない、I 型コラーゲンとの転写調節の相違を半定量的に調べた。特に IV 型コラーゲン産生可能な細胞として、ヒト胎児肺線維芽細胞 TIG1 との比較や細胞外マトリックスの産生に影響の大きい TGF β の作用を調べた。

IV 型コラーゲンの転写は、I 型コラーゲンと異なりアスコルビン酸の直接の影響を受けないことを明らかにした。この結果は、IV 型コラーゲンに対するアスコルビン酸の作用は転写を介するものではなく、翻訳後の細胞内環境、おそらく細胞内アスコルビン

酸濃度に依存することを強く示唆する。

(4). I V型コラーゲン遺伝子の単離と遺伝子発現系の開発を行なった。

$\alpha 1(\text{IV})$ 鎖および $\alpha 2(\text{IV})$ 鎖の遺伝子の全長を単離するには至っていない。C 末端側の NC1 ドメインのみを単離し、発現ベクターに組換えた。I V型コラーゲンを分泌している細胞に導入し強制発現させたところ、3本らせん形成に干渉するという直接的な結果は得られなかった。むしろ遺伝子導入操作のみで3本らせん形成が影響された。また、アスコルビン酸無添加の条件、すなわちゼラチンフォームのポリペプチドが分泌される条件で分泌された NC1 ドメインがゼラチンフォーム由来の NC1 と同じ検討を開始している。

(5). ゼラチンフォームの $\alpha 1(\text{IV})$ 鎖分泌過程を細胞内の抗体染色で解析した。

3本らせんフォームの場合に比べ、小胞体の染色が強くなることが示された。ER での滞留がおきると推定できた。同様の結果はコラーゲンペプチド中のプロリンやリジンの水酸化酵素の阻害でも見られた。この現象は、コラーゲンらせん形成不全で引き起こされるもので、コラーゲンペプチドへのムチン型糖鎖の修飾と密接に関連すると考えられる。

(6). I V型コラーゲンとガンとの関連の可能性が別研究グループにより指摘されている。尿中3ヒドロキシプロリン含有ペプチドはガンの指標になるが、これがゼラチンフォームのポリペプチドに由来するとの直接的な証拠は得られなかった。

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 4件)

(1) I. Saito J, Imamura Y, Itoh J, Matsuyama S, Maruta A, Hayashi T, Sato A, Wada N, Kashiwazaki K, Inagaki Y, Watanabe T, Kitagawa Y and Okazaki I. (2010) ELISA measurement for urinary 3-Hydroxyproline-containing peptides and its preliminary application to healthy persons and cancer patients. *Anticancer Res.* 30, 1007-1014

(2) T. Kihara, Y. Imamura, Y. Takemura, K. Mizuno, E. Adachi, and T. Hayashi (2008) Intercellular Accumulation of Type V Collagen Fibrils in Accordance with Cell Aggregation, *The Journal of Biochemistry*, 144 5 625-633

(3) Stephanie M. Jung, Yukitoshi Takemura, Yasutada Imamura, Toshihiko Hayashi, Eijiro Adachi, & Masaaki Moroi, (2008) Collagen-type specificity of glycoprotein VI as a determinant of platelet adhesion, *Platelets*, 19 1 32-42

(4) Takafumi WATANABE, Yasutada IMAMURA, Yoshinao HOSAKA, Hiromi UEDA, and Kazushige TAKEHANA (2007) Graded arrangement of collagen fibrils in the equine superficial digital flexor tendon, *Connective Tissue Research*, 48 6 332-337

[学会発表] (計 6件)

(1) Takanori Kihara, Yasutada Imamura, Yukitoshi Takemura, Kazunori Mizuno, Eijiro Adachi, Toshihiko Hayashi, Intercellular accumulation of type V collagen fibrils in accordance with cell aggregation, 8th Pan Pacific Connective Tissue Societies Symposium, 2009年6月6日

(2) Kenji Uchida, Takanori Kihara, Yongchol Shin, Toshihiko Hayashi, Yasutada Imamura, Culture conditions affecting cellular clump formation accompanying intercellular accumulation of type V collagen fibrils, 8th Pan Pacific Connective Tissue Societies Symposium, 2009年6月6日

(3) Yasutada Imamura, Junichi Saito, Joji Itoh, Shigeo Matsuyama, Akie Maruta, Toshihiko Hayashi, Chu Sato, Norihito Wada, Kazuo Kashiwazaki, Yutaka Inagaki, Tetsu Watanabe, Yuko Kitagawa and Isao Okazaki, Development of ELISA Measurement for Urinary 3-Hydroxyproline containing Peptides and its Preliminary Application to Community Healthy Persons and Cancer Patients, 8th Pan Pacific Connective Tissue Societies Symposium, 2009年6月5日

(4) Yasutada Imamura, Takeshi Watanabe, Daisuke Kajimura, Toshihiko Hayashi, Cellular meshwork formation by human mesangial cells on type IV collagen gel, 7th Pan Pacific Connective Tissue Societies Symposium, 2007年10月31日

(5) Takafumi WATANABE, Yoshinao HOSAKA, Hiromi UEDA, Kazushige TAKEHANA, Yasutada IMAMURA, A gradient motif of collagen fibril structure in the equine superficial digital flexor tendon, 7th Pan Pacific Connective Tissue Societies Symposium, 2007年10月31日

(6) 今村保忠, 渡邊武, 梶村大介, 林利彦, IV型コラーゲングル上でのヒトメサンギウム細胞による細胞メッシュワーク形成のタイ

ムラブス観察, 第 39 回日本結合組織学会学
術大会・第 54 回マトリックス研究会大会合
同学術集会, 2007 年 5 月 9 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者
今村保忠

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者