

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 7 月 20 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870262

研究課題名(和文) 高速原子間力顕微鏡を用いたコラゲナーゼによるコラーゲン消化メカニズムの解明

研究課題名(英文) Video imaging by high speed atomic force microscopy of collagenase movement on collagen fibrils

研究代表者

中山 隆宏 (Nakayama, Takahiro)

金沢大学・バイオAFM先端研究センター・助教

研究者番号：00532821

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：コラーゲン分解酵素の反応触媒メカニズムを明らかにすることを目的として、当該酵素が反応中にコラーゲンの高次構造の中でどのような挙動を示すかを観察し、挙動を解析した。本研究では、コラーゲン分解酵素の挙動とコラーゲン高次構造を同時に観察することが極めて有効であるため、高速原子間力顕微鏡を用いて観察した。細菌型コラゲナーゼがコラーゲン特有の高次構造によって活性が制御される様子、コラゲナーゼ分子がコラーゲンのカルボキシル末端からアミノ末端へ方向に運動する様子を録画することに成功した。この運動がコラーゲン分解活性と固く共役していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：To reveal the mechanism by which collagenases degrade collagen fibrils, we observed and analyzed the collagenase movement on the collagen quaternary structure. High-speed atomic force microscopy, which allows simultaneous observation of the enzyme movement and the substrate structure, is effective for achieving the goal of this study. We observed and analyzed the collagenase behavior. Our results clearly visualized that bacterial collagenases bind on and degrade from the lateral edge of collagen fibrils and that hierarchical structure of collagen prevents collagenase molecules from engaging in collagenolytic reactions. In addition, we also demonstrated that the bacterial collagenase molecules move on collagen fibrils from the amino- to the carboxyl terminus of collagen molecules, depending on their activities.

研究分野：生物物理学

キーワード：酵素反応の化学力学共役 1分子観察 原子間力顕微鏡 コラーゲン コラゲナーゼ

1. 研究開始当初の背景

Clostridium や *Vibrio* などのバクテリアはホストの組織を崩壊させて感染巣を拡大させる。これらのバクテリアが分泌する毒素は効率よくホストの結合組織を分解することができる。ホストの組織の形成維持に関わる細胞外マトリックスの主成分であるコラーゲンは通常のプロテアーゼでは分解されない。ホスト内のコラーゲンは特徴的な 3 重らせんのコラーゲン分子が階層的に会合した不溶性の線維構造を持っており、通常のプロテアーゼのターゲットにはならない。

バクテリアが分泌するコラゲナーゼはコラーゲン特異的な亜鉛イオン依存性プロテアーゼで、ホストのコラーゲンを分解することができる。最も研究が進んでいる *Clostridium histolyticum* のコラゲナーゼは動物性コラゲナーゼ(マトリックスメタロプロテアーゼ(MMPs))よりもはるかに効率よくコラーゲン線維を分解することができる。この特異性と高活性を理由に、クロストリジウムのコラゲナーゼは幅広く応用利用されている(病巣除去、線維増殖性疾患治療、食肉の軟化加工、皮革製品の染色の前処理、組織培養に係る細胞の分離)。

これまでに、細菌性コラゲナーゼと動物性コラゲナーゼとの生化学的、構造学的違いが明らかにされている。両者ともコラーゲン分子(3重螺旋の紐状単量体)のあらゆる部位に結合することができ、クロストリジウムのコラゲナーゼはコラーゲン上多数箇所を切断することができるが、MMPs は 1 か所しか切断できない。コラーゲン分子の切断メカニズムも両者で異なっていて、クロストリジウムのコラゲナーゼはコラーゲン単量体を構成する 3 本の鎖を一度に切断することができる。これは、クロストリジウムのコラゲナーゼの触媒モジュールが 3 本鎖を取り囲むことができるからである。一方で MMPs の触媒部位は十分な空間がなくて、切断部位周辺で 1 本ずつ巻き戻して切断する。

このように、コラーゲン単量体に対するコラゲナーゼの触媒メカニズムはかなり明らかになってきている。しかし、生体内ではほとんどのコラーゲンがコラーゲン線維として存在するにもかかわらず、クロストリジウムのコラゲナーゼがこの不溶性の高次構造のコラーゲン線維を分解するメカニズムは明らかになっていない。

クロストリジウムのコラゲナーゼの可溶性コラーゲン単量体分解メカニズムと不溶性コラーゲン線維分解メカニズムは、次の 3 つの理由から異なると考えられる。第一に、クロストリジウムのコラゲナーゼのコラーゲン結合ドメイン(CBDs)は可溶性コラーゲン分解には必ずしも必要ないが、不溶性コラーゲンの分解には必須で、ドメイ

ンの要求性が異なることである。第二に、コラーゲン単量体が会合してコラーゲン線維を形成すると、3 重螺旋構造は安定化され、一方、CBD は 3 重螺旋の巻き戻しがある部位に結合に結合するので、コラーゲン線維形成はコラゲナーゼの結合に影響しそうだからである。第三に、もう一つのタイプのコラゲナーゼである MMPs の活性は実際にコラーゲン線維形成によって抑制されるので、細菌性コラゲナーゼも同様に影響されそうだからである。コラーゲン線維では MMP-1 が切断する部位が隣り合うコラーゲン単量体の C 末端テロペプチドによって保護されており、あらかじめ MMP-1 自身もしくは他の酵素で除去する必要がある。蛍光一分子観察で、MMP-1 はコラーゲン線維上を両方向にステップ上に運動することが明らかにされており、ステップ運動のほとんどがコラーゲン切断触媒反応とは共役していないことが知られている。

2. 研究の目的

本研究では、コラーゲン線維上におけるコラゲナーゼの挙動と酵素反応の関係(化学力学共役メカニズム)を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究の目的を達成するために、コラーゲン分解酵素の挙動とコラーゲン線維構造を同時に観察することが極めて重要である。そこで、ある一定のナノスペースの構造と動き(動態)をビデオ録画することのできる高速原子間力顕微鏡(高速 AFM)を用いた。試料チャンバー内にコラーゲンを投入してコラーゲン線維を試料ステージ上に形成させた後、試料チャンバー内にコラゲナーゼを入れ、コラゲナーゼの挙動とコラーゲン分解反応を観察した(図 1)。*Clostridium histolyticum* class I collagenase (Col G)を組換えタンパク質として調製したものを使用した。

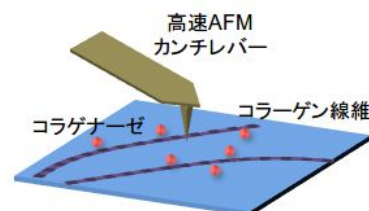


図 1. コラゲナーゼによるコラーゲン線維分解の高速 AFM 観察のスキーム

4. 研究成果

【マイカ上でのコラーゲン分子の自己集積と高次構造形成】

I 型コラーゲンは中性 pH、塩化カリウム 200

mM 以上の存在下で、マイカ上にコラーゲン線維特有の D バンドと呼ばれる構造を持つ薄いシート(コラーゲンマイクロリボン)を形成することが知られている(Jiang et al. *J Struct Biol.* 2014)。本研究では、コラーゲンが有するこの性質を利用することを試みた。酸性可溶化したラット I 型コラーゲンを 50 mM Tris-HCl, 200 mM KCl, pH7.5 に希釈し(コラーゲン終濃度 9 または 19 $\mu\text{g/mL}$)、高速 AFM 試料チャンバーに投入したところ、コラーゲン分子がマイカに付着して他のコラーゲン分子と会合しながら、長さ、幅ともに成長していく様子を観察することができた(図 2a)。この形成過程はこれまでの報告と一致する。コラーゲンマイクロリボン中のコラーゲン分子の方向は試料ステージ表面における溶液の流動方向によって決まるが、本研究では制御していない。

マイクロリボン内の微細構造を分析すると、マイクロリボンは幅 10 nm の線維が横方向に会合して(図 2b, c)、個々の線維が D バンド構造を持っていた(図 2a 内拡大写真)。この個々の線維は最小単位のコラーゲンフィブリルで、2 本のマイクロフィブリル(1 本のマイクロフィブリルは 5 本のコラーゲン三重らせん分子から成る)ことが報告されている。このことからマイクロリボン単位面積当たりのコラーゲン分子(3 重らせん構造でコラーゲンの単量体(トロポコラーゲン))の数を見積もることができた。D バンド内のギャップは長さ 36.18 nm、分子の長さが 300 nm、最小のコラーゲンフィブリルは幅 10 nm で 5 本 \times 2 のコラーゲン分子なので、10 本で 3361.8 nm^2 の面積を占有していることになり、1 μm^2 当たり \sim 2975 本のコラーゲン分子と見積もられた(図 2d)。

コラーゲナーゼによる反応を観察するために、コラーゲンマイクロリボン調製後、コラーゲナーゼ反応に適切な緩衝液(50 mM Tris-HCl, 150 mM KCl, 10 mM CaCl_2 ,)に置換した。コラーゲンが作る階層構造は電解質の種類、濃度に影響を受けるが、この緩衝液中ではコラーゲンマイクロリボンの構造に変化は見られなかった。

【コラーゲナーゼによるコラーゲン分解過程の観察】

コラーゲンマイクロリボン形成後、ColG(高速 AFM 像では小さな粒状に見える)を投入すると、20 \sim 30 分程度でコラーゲンマイクロリボンが消失した(図 3)。コラーゲンの消失過程は複数の段階(コラーゲナーゼによるコラーゲン分子の切断、断片の剥離、コラーゲン分子の巻き戻し等)を含んでいると考えられる。

次に、マイクロリボンからコラーゲン分子を消失せるときの ColG のターンオーバー速度を求

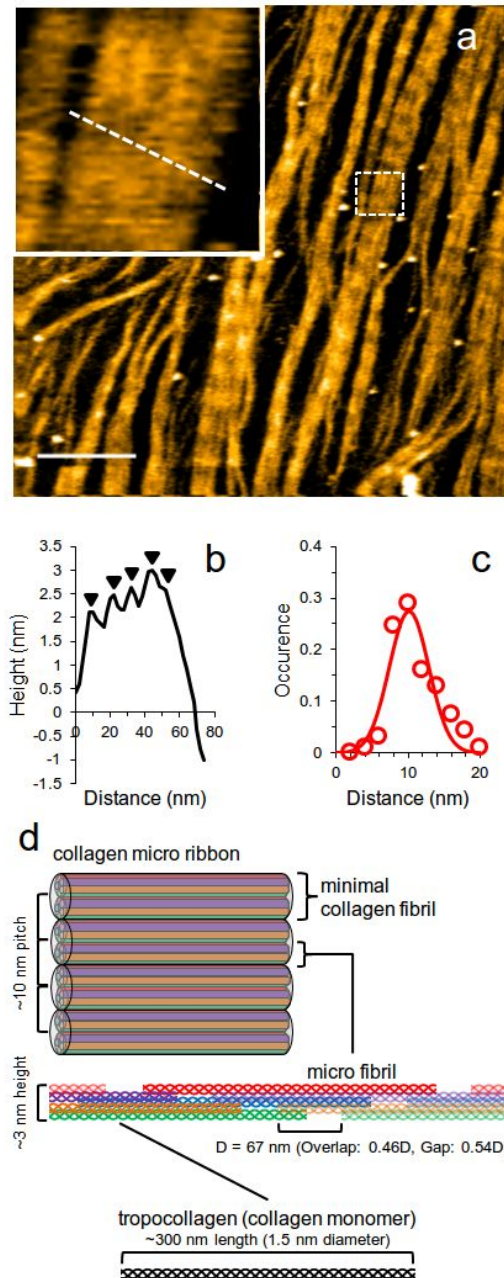


図 2. 高速 AFM 試料ステージ上に形成したコラーゲンマイクロリボンの構造。(a)ラットの尾の I 型コラーゲンから成るコラーゲンマイクロリボンの高速 AFM 像(走査速度 10 秒、走査範囲 1 μm 四方(500 ピクセル四方))。破線で囲んだ領域を拡大して左上に示している。スケールバーは 200 nm、Z スケールは 5 nm。(b)図 a 中の破線部分の高さプロファイル。矢頭はピークを指している。(c)マイクロリボン中のコラーゲンフィブリルの幅(図 b 中の各ピーク間の距離)の分布。(d)コラーゲンマイクロリボンにおけるコラーゲンの階層構造の模式図。1 平方マイクロメートルあたり \sim 2975 のコラーゲン単量体を含むと見積もれる。

めた。図 3b に示すように、観察視野内のコラーゲン分子数は経過時間にほぼ比例して減少し、一方、同じ視野内でコラーゲンマイクロリボンに結合している ColG の分子数はおよそ一定であった。このことは、コラーゲン上の ColG がコラーゲンマイクロリボンの分解に関連していることを

示しており、コラーゲン分子の平均減少速度と ColG の分子数の平均値からターンオーバー速度を算出した。図 2b でコラーゲン減少速度は 1 平方マイクロメートル当たり毎分 32.7 分子(青線)、83.3 分子(緑線)、コラーゲン上の ColG 分子数は 64(青線)、122(緑線)なので、ターンオーバー速度は 0.0085/s(青線)、0.0114/s(緑線)となった。

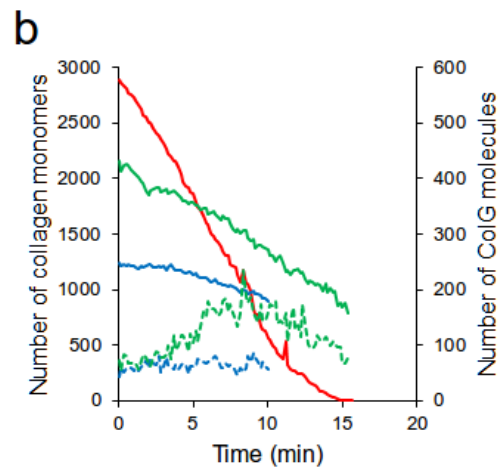
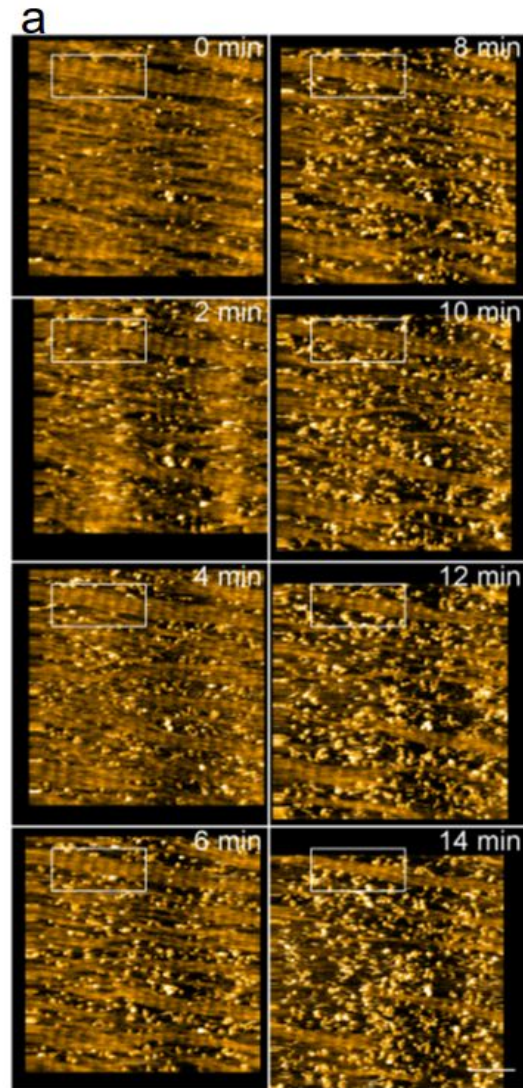
次に、ColG によってコラーゲンマイクロリボンがどのように分解されるか着目した。図 2c, d に示すように、ColG はコラーゲンマイクロリボンの内部からではなく、外縁から消化した。このことはコラーゲンの高次構造が ColG の活性を抑制している可能性を示唆しており、これを検証するため、高速 AFM カンチレバーのタッピング力を一時的に強くすることでコラーゲンマイクロリボンの一定領域内のコラーゲンの配向を乱し、ColG を投入して当該領域内外で消化速度に差があるか観察した。図 4 に示すように、コラーゲンの配向を乱した領域は D バンド部位よりも効率よく消化されたことから、コラーゲンの階層構造は ColG の活性と密接に関連していることが明らかになった。

【コラーゲン線維上での ColG の挙動】

コラーゲン線維を分解しているときの個々の ColG 分子の挙動を特定するために、より高速でビデオ録画した。図 5a は個々の ColG が結合して解離するまでの軌跡を当該領域のコラーゲンの高速 AFM 像上に記したものである。ColG はコラーゲンマイクロリボンの辺縁部に結合し、しばしばコラーゲン線維の長軸方向に沿って移動したことを示している。また、複数の ColG 分子が同じコラーゲンフィブリルに結合して運動したことから、ColG が一度作用すると次の ColG の結合・触媒効率が増大することを示唆している。図 5b は代表的な ColG 分子の結合から解離までの連続写真で、この ColG は結合後しばらくその場に滞在して、その後、フィブリルの軸に沿って一方向に運動したことを示している。

次に、ColG の運動方向を調べるために、まず、ColG が運動した個々のコラーゲンフィブリルの方向を求めた。コラーゲンフィブリルの長軸方向に沿った高さプロファイルは D バンドのオーバーラップ領域の部分で非対称なピーク(カルボキシル末端側よりもアミノ末端側にピークが偏っている)が現れることが知られている(Cisneros et al. *J Struct Biol.* 2006)。本研究の高速 AFM 像からも同様の高さプロファイルが得られたので(図 5c, d)、コラーゲンフィブリルの方向を特定することができた。運動距離が短い ColG 分子、ColG は D バンドが緩んでいる部位に結合しや

すいこともあって、多くの分子の運動方向を決めることができなかったが、それでも 285 分子中 69 分子の運動方向を特定することができた。その結果、ほとんどの ColG 分子(~80%)はコラーゲン線維のカルボキシル末端からアミノ末端の方向へ運動することが明らかになった(図 5e)。



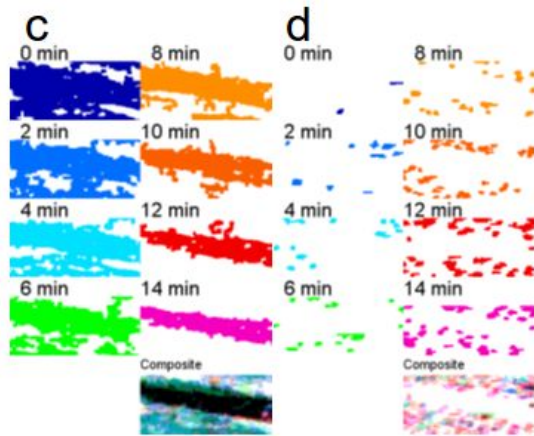


図 3. ColG がコラーゲンフィブリルを消化する様子の高速 AFM 観察。(a)ColG (6 $\mu\text{g}/\text{mL}$)を投入してコラーゲンマイクロリボンを消化したときのコマ落としの高速 AFM 動画(走査速度 10 秒、走査範囲 1 μm 四方(500 ピクセル四方)).スケールバーは 200 nm、Z スケールは 5 nm。(b)1 μm 四方あたりのコラーゲン分子数(実線)とコラーゲン上の ColG 分子数(破線)のタイムコース。同じ色は同じ動画から得られたデータであることを示す(青色は 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ColG、緑色は 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ColG)。(c)a 中の四角で囲った領域について、コラーゲン(c)または ColG(d)のみを時間別に変えて 2 値化した像とフレームを重ねた合成像(composite)。c の composite に示すように、コラーゲンマイクロリボンの中央部はコラーゲナーゼ投入後 14 分経ても残存した。一方、ColG はコラーゲンマイクロリボンの中央部へ結合しにくかった。

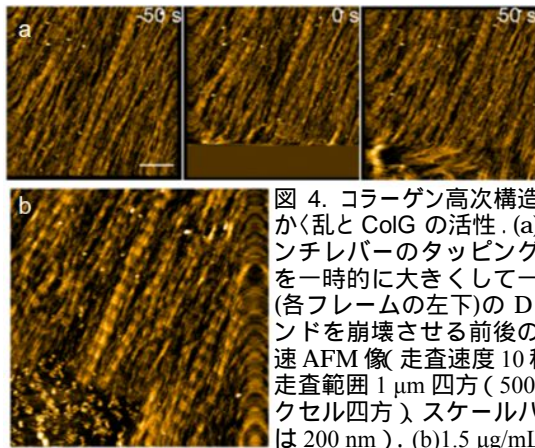


図 4. コラーゲン高次構造のかく乱と ColG の活性。(a)カンチレバーのタッピングを一時的に大きくして一部(各フレームの左下)の D バンドを崩壊させる前後の高速 AFM 像(走査速度 10 秒、走査範囲 1 μm 四方(500 ピクセル四方)、スケールバーは 200 nm)。(b)1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ColG を投入して 50 分後の a と同じ領域の高速 AFM 像。かく乱した領域のコラーゲンは周囲よりも速く分解された(左下)。

さらに、ColG の挙動を定量化するために、コラーゲンフィブリルの長軸に平行な方向を x 、垂直方向を y として、ColG 分子の位置を座標に取った(ColG 分子の運動はほとんどフィブリルの長軸に平行な方向だけれども)。図 5f に示すように、ColG 分子は一定の速度ではないが、コラーゲンフィブリルの長軸に沿って一方向に運動する傾向をグラフで示すことができた。たくさんの ColG 分子のタイムコース其々から、コラーゲンに結合している間の時間と結合から解離までの正味の移動距離を調べ、結合時間と移動距離の頻度

分布を調べた(図 5g, h)。両方の分布とも指数分布となり、ColG の結合と解離が無作為に起きていることを示している。これらの分布に対して指数関数で回帰分析し、見かけの結合速度定数は $0.26 \pm 0.00 \text{ s}^{-1}$ (平均結合時間はこの逆数で 3.79 s)、平均運動距離は $14.5 \pm 1.5 \text{ nm}$ と求められた。この解析で求められた平均結合時間と平均移動距離は上記の ColG がコラーゲンマイクロリボンからコラーゲン分子を剥離するターンオーバー速度と良く一致する。ターンオーバー速度は $\sim 0.01/\text{s}$ なので、コラーゲン分子の長さ($\sim 300 \text{ nm}$)で換算すると $\sim 3 \text{ nm}/\text{s}$ となり、結合時間が 3.79 秒なので、ColG が一回の結合の間に $\sim 11.3 \text{ nm}$ のコラーゲン分子の剥離に寄与していると見積もることができ、この値は ColG が一回の結合の間に移動する距離 $\sim 14.5 \text{ nm}$ とかなり近い値である。このことは ColG の運動とコラーゲン分子の剥離反応過程との共役効率が高いことを示している。

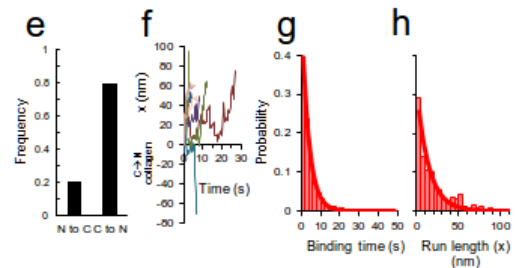
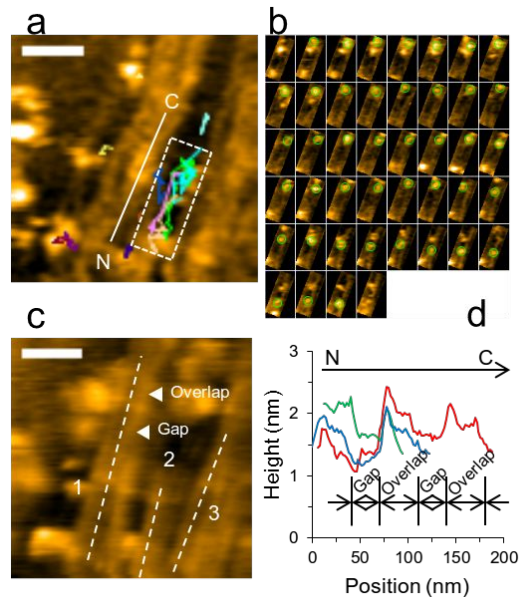


図 5. コラーゲンフィブリル上での ColG の挙動。(a)コラーゲン線維上での ColG の運動の軌跡(色線)。スケールバーは 50 nm。(b)図 a 内の破線四角で囲んだ部分における代表的な ColG 分子(緑色の円)の運動の連続写真。(c)図 a と同じ領域の連続 30 フレームの平均像。スケールバーは 50 nm。走査速度毎フレーム 0.3 秒。走査範囲 0.2 μm 四方(100 ピクセル四方)。(d)図 c 中の破線 1, 2, 3 の領域の高さプロファイル(破線 1, 2, 3 はそれぞれ赤線、緑線、青線に対応)。コラーゲンフィブリルの D バンドのオーバーラップ領

域で、高さプロファイルは非対称なピークを示し、アミノ末端側の方にピークの位置が偏る。(e)ColG が結合して解離するまでの間の正味の運動方向の割合。(f)コラーゲンフィブリルの長軸に平行な方向(x 方向)へのColGの運動のタイムコース(正方向はコラーゲンのカルボキシル末端からアミノ末端への方向)。(g, h)ColG がコラーゲンに結合している時間(g)とその間に運動する正味の距離(h)の頻度分布(棒グラフ)と各分布を指数関数で回帰分析したときの曲線(赤線)。回帰分析の結果、見かけの結合速度定数 $0.26 \pm 0.00 \text{ s}^{-1}$ 、平均運動距離 $14.5 \pm 1.5 \text{ nm}$ が求められた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1件)

Watanabe-Nakayama T, Itami M, Kodera N, Ando T, Konno H. High-speed atomic force microscopy reveals strongly polarized movement of clostridial collagenase along collagen fibrils. *Sci Rep*. Jul. 4, 2016.

[学会発表] (計 3件)

中山隆宏、古寺哲幸、紺野宏記、
安藤敏夫、「コラーゲン線維分解におけるコラゲナーゼの動態のナノスペースビデオイメージング“Nano-space video imaging of collagen degradation with collagenases”」日本顕微鏡学会(2016年6月14日、仙台市)

中山隆宏、古寺哲幸、紺野宏記、
安藤敏夫、「Real time imaging of collagenase behavior by high speed atomic force microscopy”日本生物物理学会(2014年9月25日、札幌市)

中山隆宏、古寺哲幸、紺野宏記、
安藤敏夫、「High-speed AFM observation of collagenolysis by collagenases”日本分子生物学会(2013年12月3日、神戸市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

中山 隆宏(NAKAYAMA, Takahiro)
金沢大学・バイオ AFM 先端研究センター・助教
研究者番号:00532821