



# HOKKAIDO UNIVERSITY

|                     |                                                                                                                           |
|---------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title               | Hsp47タンパク質のコラーゲン認識機構に関する研究 [論文内容及び審査の要旨]                                                                                  |
| Author(s)           | 小野, 貴士                                                                                                                    |
| Degree Grantor      | 北海道大学                                                                                                                     |
| Degree Name         | 博士(生命科学)                                                                                                                  |
| Dissertation Number | 乙第6936号                                                                                                                   |
| Issue Date          | 2014-09-25                                                                                                                |
| Doc URL             | <a href="https://hdl.handle.net/2115/57312">https://hdl.handle.net/2115/57312</a>                                         |
| Rights(URL)         | <a href="https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/">https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/</a> |
| Type                | doctoral thesis                                                                                                           |
| File Information    | Takashi_Ono_abstract.pdf, 論文内容の要旨                                                                                         |



## 学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称 博士（生命科学） 氏 名 小 野 貴 士

## 学 位 論 文 題 名

### Hsp47 タンパク質のコラーゲン認識機構に関する研究

コラーゲンは、多細胞生物の組織構造の維持に必須である細胞外マトリックスを構成するタンパク質の一つである。その存在は、化粧品、食品分野への利用のみならず、近年は再生医療や創薬を目指した多能性幹細胞利用のための培養法への応用<sup>1)</sup>など、幅広い分野において大変注目されている。単なる構造物としての物理的機能のみならず、細胞の増殖や分化など、重要な生物学的機能を持つことも明らかになっている。特に、細胞の増殖や分化に関しては細胞周期の調節が重要であり、p21<sup>Cip1</sup>等のCDK阻害因子やTOK-1<sup>2)</sup>等の関連タンパク質が重要な役割を果たしているが、コラーゲン繊維はCDK阻害因子の発現を上昇させ細胞増殖を抑制する一方で、繊維を形成していないものは細胞増殖を促進する<sup>3)</sup>など、その形態により機能が異なる側面も持ち合わせている。コラーゲンの形態は、その極めて特徴的な分子構造から説明される。α鎖と呼ばれるコラーゲンのポリペプチドは、Gly-Xaa-Yaaの長い繰り返し配列を有し、長い三重らせん領域を形成する。そのN及びC両末端のプロペプチド領域を含めプロコラーゲンとして合成され、細胞外に分泌された後、プロペプチド領域がプロセッシングを受け、最終的にコラーゲン繊維を形成するが、コラーゲンが細胞外に正常に分泌されるためには、小胞体内において正しい三重らせん構造の形成維持、すなわちフォールディングが正常に行われる必要がある。Hsp47は熱ショックタンパク質のファミリーに属するコラーゲン特異的な分子シャペロンであり、この過程に必須のタンパク質として知られている<sup>4)</sup>。しかしながら、Hsp47がプロコラーゲンの生合成過程において「正しく形成された三重らせん構造に結合し安定化に寄与している」のか、それとも「一本鎖に結合し三重らせん構造を積極的に形成させている」のか、そのメカニズムの詳細は未解明であった<sup>5)</sup>。そこで、本研究においては、Hsp47タンパク質のコラーゲン認識機構を明らかにすることを目的とした。

これまでに生理的に近い状態でありながら簡便なHsp47とコラーゲンの*in vitro*結合評価系の報告はなく、このことがHsp47のコラーゲン認識機構の詳細な解析を妨げる原因の一つであった。そこで本研究では、コラーゲンモデルペプチドを用いて、Time Resolved-Fluorescence Resonance Energy Transfer (TR-FRET)を原理とした新規*in vitro*結合評価系を構築した。材料として、N末端側にGlutathione S-Transferase(GST)を融合した組換えヒトHsp47タンパク質を大腸菌にて作製した。コラーゲンモデルペプチドの基本構造としてはPOG(Oは4-hydroxy-Proの略)のトリプレットが9つ連続している配列を用い、Hsp47認識配列(GPTGPR)をその中に入れ込み、N末端側にビオチン修飾したものを用いた。これらに加え、DonorとしてEuropium-cryptateラベルされた抗GST抗体とAcceptorとしてストレプトアビジン融合XL665タンパク質を反応系に添加することにより、両者近接時に生じるTR-FRETを指標として結合を検出した。Hsp47認識配列の位置が異なる2種類のモデルペプチドを作製し比較した結果、Hsp47認識配列がビオチンと離れた位置にあるペプチド(Bio-CP2)において、顕著な結合シグナルが認められた。また、コラーゲンとの相互作用に重要なアミノ酸であるTyr366をAlaに変異させたHsp47 CAYA変異体では結合が認められなかったことや、Hsp47との結合に対してBio-CP2の濃度依存性が認められたことから、本結合評価系は両者の特異的な結合を定量可能であると結論づけた。一定の長さを持つコラーゲンモデルペプチドは、低温において自己集合により三量体となり、三重らせん構造を形成することが知られているが、実際にBio-CP2溶液に対しゲルろ過クロマトグラフィー(GFC)を

試みたところ、全てが三量体となっているわけではなく、三量体と単量体に分離されることがわかった。そこで、それぞれのフラクションを分取し、Hsp47 との結合を検討した。その結果、Hsp47 は単量体フラクションには全く結合せず、三量体フラクションにのみ結合することが明らかとなった。加えて、この三量体フラクションが、温度変化による可逆性を持つ、すなわち熱処理による三重らせん構造の変性と冷却処理による再形成を起こすことを見出し、この結合が三重らせん構造に起因する可能性が非常に高いと結論づけた。

次に、生細胞内における Hsp47 のコラーゲン認識機構を検討するために、Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) 法を原理とした細胞内 Hsp47-コラーゲンモデルペプチド相互作用の新規可視化法の構築を行った。BiFC 法の適用にあたり、monomeric Kusabira-Green (mKG) を二つに分割した N 及び C 末端側断片を使用した。これらの断片はいずれも単独では蛍光を発することができないが、両者が近接することにより再構成され、再び蛍光を発するため、これらの断片を融合した二つの目的タンパク質の相互作用を蛍光により検出することが可能となる。Hsp47 及び連続する PPG トリプレットを 9 つ連結させたコラーゲンモデルペプチドの N 末端側に mKG の各断片を融合させた動物細胞用発現ベクターを構築し、HeLa 細胞に一過性発現させることにより検討を行った。なお、Hsp47 とコラーゲンの相互作用は小胞体内で起こることから、全てのコンストラクトの N 末端側にヒト Hsp47 由来小胞体シグナル配列を融合させた。当初、コラーゲンモデルペプチド単独では、Hsp47 との相互作用は認められなかった。N 末端側に mKG 断片が融合されていることもあり、立体的な障害が大きいために三重らせん構造を形成していないものと推察された。そこで、三重らせん構造を安定化させるドメインとして、バクテリオファージ T4 由来 fibritin の C 末端ドメインである foldon<sup>6)</sup> をコラーゲンモデルペプチドの C 末端側に融合させ、Hsp47 との相互作用を検討した。その結果、小胞体において両者の相互作用が検出された。また、Hsp47 CAYA 変異体においては、その相互作用が認められなかった。従って、本方法により小胞体内における両者の特異的な相互作用を可視化できているものと結論づけた。加えて、連続する PPG トリプレットが短く三重らせん構造を形成することが出来ないペプチド(PPG ×3)と Gly を全て Ala に置換することにより三重らせん構造を形成し得ないペプチド(CP2GA ×9)については、Hsp47 との相互作用は認められなかった。従って、生細胞内においても Hsp47 はコラーゲンの三重らせん構造を認識していることが明らかとなった。

以上、本研究により Hsp47 のコラーゲン認識機構、すなわちプロコラーゲンの生合成過程において Hsp47 は一本鎖を認識できず正しく形成された三重らせん構造を特異的に認識することの、*in vitro* 及び生細胞内における直接的な証拠を初めて提示するに至った。これにより、Hsp47 の機能メカニズムとして、これまでの報告と併せ、小胞体において正しい三重らせん構造を持つプロコラーゲンと結合することで、そのフォールディングに寄与することが明確となった。

これらの知見は、コラーゲンの異常蓄積が引き起こす種々の線維化疾患等に対する、Hsp47 をターゲットとした治療薬の効率的なスクリーニングにも応用可能であり、それらの疾患の将来的な治療戦略においても重要な意味があるものと考えられる。

#### 参考文献

- 1) Ono *et.al.*, *PLoS One* 2014, **9**, e88346.
- 2) Ono *et.al.*, *J Biol Chem.* 2000, **275**, 31145-31154.
- 3) Wall *et.al.*, *J Biol Chem.* 2007, **282**, 24471-24476.
- 4) Nagata *et.al.*, *Semin. Cell Dev. Biol.* 2003, **14**, 275-282.
- 5) Ono *et.al.*, *J Biol Chem.* 2012, **287**, 6810-6818.
- 6) Frank *et.al.*, *J. Mol. Biol.* 2001, **308**, 1081-1089.