



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
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.r6936
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/57313
Type	doctoral thesis
File Information	Takashi_Ono.pdf



博士学位論文

Hsp47 タンパク質のコラーゲン認識機構に関する研究

北海道大学大学院生命科学院

小 野 貴 士

目次

略語表.....	2
序章.....	4
第 1 章 Hsp47 とコラーゲンモデルペプチドの新規 <i>in vitro</i> 結合評価系の構築	
1-1. 緒言.....	7
1-2. 結果.....	9
1-3. 考察.....	12
第 2 章 Hsp47 とコラーゲンモデルペプチドの結合様式の解析	
2-1. 緒言.....	14
2-2. 結果.....	15
2-3. 考察.....	25
第 3 章 生細胞内における Hsp47 とコラーゲンモデルペプチドの相互作用の可視化	
3-1. 緒言.....	28
3-2. 結果.....	29
3-3. 考察.....	38
総括.....	40
実験材料及び方法.....	41
参考文献.....	52
謝辞.....	57

略語表

BiFC	bimolecular fluorescence complementation
Bio-CP	biotinylated collagen model peptide
BSA	bovine serum albumin
CBB	coomassie brilliant blue
CD	circular dichroism
CDK	cyclin-dependent kinase
cDNA	complementary DNA
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	dimethylsulfoxide
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTP	deoxyribonucleoside 5'-triphosphate
DTT	1,4-dithio-DL-threitol
ECM	extracellular matrix
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
ER	endoplasmic reticulum
Eu-K	europium-cryptate
GFC	gel filtration chromatography
GST	glutathione-S-transferase
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HRP	horse radish peroxidase
Hsp47	heat shock protein 47
Hyp	4-hydroxy-L-proline
IPTG	isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside
kDa	kilodalton
KO	knock out
mKG	monomeric Kusabira-Green
NP-40	Nonidet P-40
P4H	prolyl 4-hydroxylase

PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	phosphate-buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PDI	protein disulfide isomerase
PMSF	phenylmethanesulfonyl fluoride
PVDF	polyvinylidene difluoride
RNA	ribonucleic acid
rpm	revolutions per minute
RT	room temperature
SA	streptavidin
SD	standard deviation
SDS	sodium dodecylsulfate
siRNA	small interfering RNA
SPR	surface plasmon resonance
TR-FRET	time resolved-fluorescence resonance energy transfer
Tris	tris (hydroxymethyl) aminomethane
tRNA	transfer RNA
wt	wild type

序章

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り、その中で最も多量に存在するタンパク質である。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研究のための未分化維持培養法への応用など (Ono et al., 2014)、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、血液凝固や創傷の治癒促進など、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、それには分子としてサイクリンやサイクリン依存性キナーゼ (CDK) に加え、p15^{INK4B}、p21^{Cip1}、p27^{Kip1} 等の CDK 阻害因子や、p21^{Cip1} の結合タンパク質として知られる TOK-1 等の関連タンパク質が重要な役割を果たしているが (Ono et al., 2000)、コラーゲン繊維はこれら 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 (Koyama et al., 1996; Wall et al., 2007)。

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、約 1,000 残基のアミノ酸による Gly-Xaa-Yaa の長い繰り返し配列を有する。Xaa 及び Yaa にはプロリンが高頻度に現れ、かつ細胞内においてはプロリン水酸化酵素により水酸化されていることが多い。この繰り返し配列により、3 アミノ酸毎に配置されるグリシンを核として三本一組の長い三重らせん構造を形成する。細胞内におけるプロリンの水酸化は三重らせん構造の安定化に重要である (Bulleid et al., 1996)。プロリン水酸化酵素によるプロリンの水酸化には、補酵素としてビタミン C (アスコルビン酸) が必要であるため、ヒトにおいて長期間ビタミン C が欠乏するとコラーゲン中の水酸化プロリン (Hyp) の割合が少なくなり、コラーゲンの安定性が低下することで壊血病が生じることが知られている。コラーゲンをを用いた研究においては、コラーゲン全長はタンパク質が巨大であることに加え、水に溶けにくく容易にゲル化してしまうことや、上述のように高頻度

に現れるプロリンが水酸化され、それが構造や安定性に大きく寄与するために大腸菌等を宿主とした組換えタンパク質の調製が困難であるなどの理由から、コラーゲンの構造を非常に良く模倣した (Gly-Pro-Hyp)_n を基本構造とするコラーゲンモデルペプチドが有用なツールとして用いられている。

ヒトでは I 型から XXIX 型までの 29 のコラーゲンがこれまでに同定されている (Gordon and Hahn, 2010; Soderhall et al., 2007)。その中で繊維形成型コラーゲンである I 型が全体の約 9 割を占めるとされている。繊維形成型コラーゲンは、細胞内において中央の長い三重らせん領域とその N 及び C 両末端のプロペプチド領域で構成されたプロコラーゲンとして合成される。細胞外に分泌された後、プロペプチド領域が特異的なプロテアーゼによりプロセッシングを受け、三重らせん構造がさらに束ねられ、最終的にコラーゲン繊維を形成する。しかしながら、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。このフォールディングが正しく行われなければ、細胞外マトリックスの形成異常へと繋がり、最終的に骨形成不全等の疾患を引き起こすことが報告されている (Prockop and Kivirikko, 1995; Byers, 2001; Marini et al., 2007)。

コラーゲンのフォールディングには、小胞体内に存在する様々な分子シャペロンが関与していると考えられている。これらの分子シャペロンとしては、glucose-regulated protein 78 (Grp78/Bip) や glucose-regulated protein 94 (Grp94)、ジスルフィド結合の形成を触媒する酵素である protein disulfide isomerase (PDI)、前述のプロリン水酸化酵素である prolyl 3-hydroxylase (P3H) 及び prolyl 4-hydroxylase (P4H)、そして Heat shock protein 47 (Hsp47) 等が知られている (Chessler and Byers, 1993; Ferreira et al., 1994; Wilson et al., 1998; Saga et al., 1987; Walmsley et al., 1999; Nagata, 2003)。中でも 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結合タンパク質として同定され (Nagata et al., 1986)、その後の解析により、コラーゲン特異的な分子シャペロンとして、このフォールディングの過程に必須のタンパク質であることが報告されている (Nagai et al., 2000; Tasab et al., 2000)。実際に、Hsp47 KO マウスはコラーゲン生合成異常に起因する組織形

成不全により胎生 11.5 日で致死となることや (Nagai et al., 2000; Marutani et al., 2004; Matsuoka et al., 2004)、Hsp47 KO 細胞を用いた解析により Hsp47 が小胞体内で三重らせん構造のフォールディングを介助し、異常コラーゲンによる凝集体形成を阻害する機能を持つことがこれまでに報告されている (Matsuoka et al., 2004; Ishida et al., 2006)。また、コラーゲンモデルペプチドを用いた解析により、Hsp47 は一本鎖よりも三重らせん構造を認識していることを示唆する報告がある (Koide et al., 2002; Tasab et al., 2002; Thomson et al., 2003; Koide et al., 2006a; Koide et al., 2006b)。しかしながら、*in vitro* もしくは生細胞内において、その直接的な証拠がこれまでに報告されていないことから、Hsp47 は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、その機能メカニズムの詳細は未解明であった (Ono et al., 2012)。

Hsp47 とコラーゲンの発現は、正常組織のみならず、コラーゲンの異常蓄積が引き起こす肝硬変や肺線維症など種々の線維化疾患組織においても相関があることが知られている。加えて、これらの疾患において Hsp47 の発現を制御することにより、線維化が抑制できる可能性が示されている。例えば、ラット肝線維症モデルにおいて、ビタミン A 結合型リポソームにより被包化した Hsp47 に対する低分子干渉 RNA (siRNA) を投与することで、肝星細胞における Hsp47 の発現を特異的に抑制することにより、線維化に対する抑制効果を示すことが報告されている (Sato et al., 2008)。従って、Hsp47 の機能メカニズムひいてはコラーゲン認識機構を解明することは、これらの疾患の更なる治療戦略、具体的には低分子化合物や細胞内透過ペプチドによる治療法の開発を企てる上でも非常に重要となる。本研究では、コラーゲンモデルペプチドを用いて *in vitro* 及び生細胞内における Hsp47 との新規結合評価法を確立し、Hsp47 が一本鎖コラーゲンは認識せず、三重らせん構造のみを認識している直接的な証拠を示すに至った。本知見は、Hsp47 の機能メカニズムを説明する上で非常に重要な知見であり、ひいてはコラーゲンの異常な蓄積を特徴とする線維化疾患の治療戦略すなわち医薬品創製への展開においても重要な意味を持つものと考えられる。

第 1 章 Hsp47 とコラーゲンモデルペプチドの新規 *in vitro* 結合評価系の構築

1-1. 緒言

これまでに Hsp47 とコラーゲンの *in vitro* 結合評価系については、免疫沈降法やブルダウ
ン法、そして表面プラズモン共鳴 (SPR) を用いた方法など、いくつかの報告がある (Nakai et al.,
1992; Koide et al., 1999; Natsume et al., 1994)。しかしながら、いずれの方法に関しても、一方を抗
体やレジン、もしくは金薄膜に固定しなければならず、加えて洗浄操作を必要とするなど、生理的な
条件下とは必ずしも近い状態であるとは言えない。また、いずれの方法も実験操作が煩雑であり、タ
イムリーに多検体を処理するのは難しいことが欠点として挙げられる。このように、両者が溶液中に
おいて自由な状態で、かつ洗浄操作を必要とせずに単純に混ぜて測ることが可能な、すなわち生
理的に近い状態でありながら簡便で多検体の処理が可能な結合評価系の報告はこれまでになく、
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、上述の条件を満たす方法として、コラーゲンモデルペプチドを用いて、
Time Resolved-Fluorescence Resonance Energy Transfer (TR-FRET, 時間分解型蛍光共鳴エネルギー
ギー転移) を原理とした新規 *in vitro* 結合評価系の構築を試みた。

TR-FRET は、時間分解蛍光 (TRF) と FRET の二つの技術要素から構成されている。TR
F とは、Donor となる蛍光寿命の長いユーロピウム (Eu) 等の蛍光性ランタノイド錯体にエネルギー
を与えた後、一定時間経過してから蛍光を測定する方法を指す。これにより不必要な短寿命蛍
光が消光した後、特異的な長寿命蛍光のみを測定することが可能となる。短寿命な自家蛍光を有
する低分子化合物による評価系への影響を極力排除することが可能となるため、低分子化合物の
医薬品スクリーニングには多用される方法である。FRET は、Donor 及び Acceptor となる蛍光物

質が、互いに 100 Å 以下の至近距離に存在し、Acceptor の励起スペクトルと Donor の蛍光スペクトルがオーバーラップする条件下で Donor を励起することにより、Donor の蛍光エネルギーが Acceptor に転移する現象である。Donor と Acceptor に目的の二つタンパク質をそれぞれ結合させることにより、それらの近接度合いを Acceptor の蛍光強度を Donor の蛍光強度で除した値の上昇度を指標として定量的に検出することが可能となる。本評価系においては、Donor として Europium-cryptate (Eu-K) ラベルされた抗 Glutathione S-Transferase (GST) 抗体、Acceptor としてストレプトアビジン融合 XL665 タンパク質 (SA-XL665) を反応系に添加することにより、N 末端側に GST を融合した組換え Hsp47 タンパク質とビオチン修飾したコラーゲンモデルペプチドの結合を検出可能な設計とした(図 1)。Hsp47 とコラーゲンモデルペプチド結合時には TR-FRET を生じるが、非結合時には TR-FRET は生じないため、反応溶液に波長 337 nm の励起光を当て、Eu-K の蛍光 (波長 620 nm) と XL665 タンパク質の蛍光 (波長 665 nm) をそれぞれ測定することにより、その比率を指標として結合を定量することが可能となる仕組みである(図 1)。

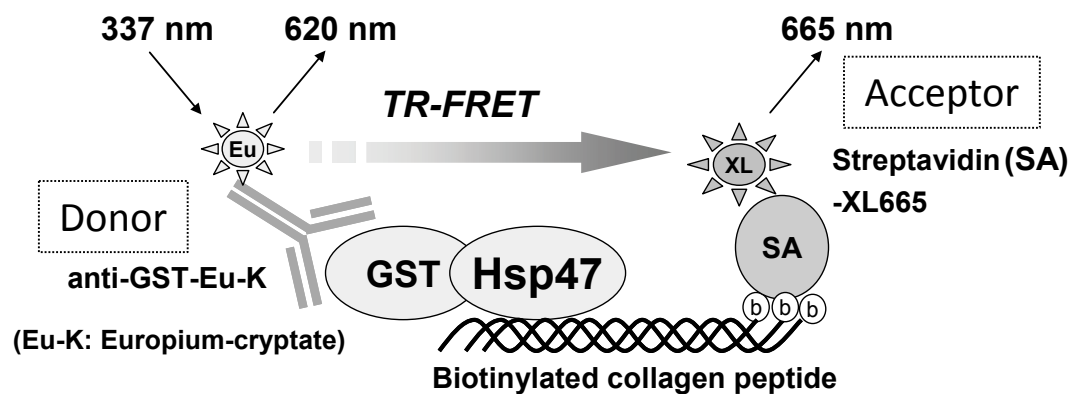


図 1 TR-FRET を原理とした新規 *in vitro* 結合評価系の概略図

1-2. 結果

材料として、N 末端側に GST を融合した組換えヒト Hsp47 wild-type (wt) タンパク質を大腸菌にて作製した(図 2)。その際、タンパク質の溶解性を下げる効果がある Cys139 とコラーゲンとの相互作用に重要なアミノ酸である Tyr366 をいずれも Ala に変異させた、コラーゲンと結合することができないヒト Hsp47 CAYA 変異体もネガティブコントロールとして同時に作製した(図 2)。加えて、ニワトリ Hsp47 はヒト Hsp47 に比べタンパク質としての安定性が非常に高いことが知られているため、ニワトリ Hsp47 wt をポジティブコントロールとして作製した(図 2)。Hsp47 は、小胞体局在するタンパク質であるため N 末端に小胞体シグナル配列を有しているが、細胞内の Hsp47 はこの配列が切断された状態であるため、組換えタンパク質は当該配列を除去した成熟型として作製した。

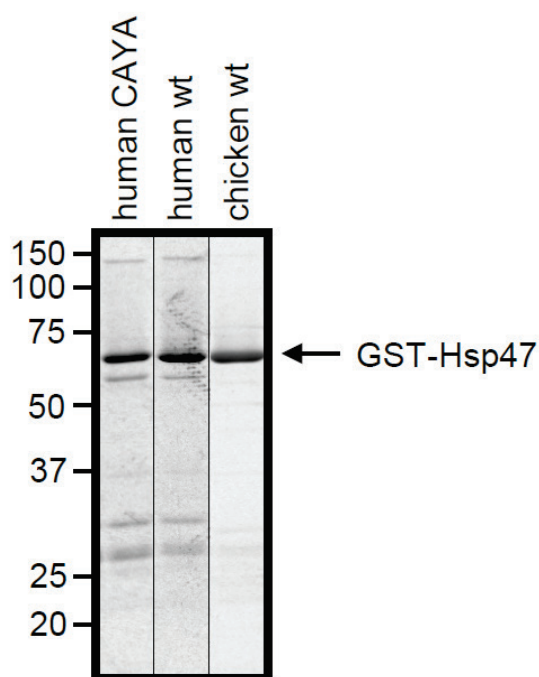


図 2 大腸菌組換え GST 融合 Hsp47 タンパク質の調製

精製した各タンパク質を SDS-PAGE で分離後、CBB 染色により精製度を確認した。数字は分子量 (kDa) を示す。

コラーゲンモデルペプチドは、TR-FRET に適用させるためにビオチン修飾したものをを用いた。コラーゲンは C 末端側から三重らせん構造を形成することが知られているため、ビオチンは N 末端側に修飾した。コラーゲン側の Hsp47 認識配列として、Gly-Pro-Thr-Gly-Pro-Arg が報告されている (Koide et al., 2002; Koide et al., 2006b)。コラーゲンモデルペプチドの基本構造としては Pro-Hyp-Gly のトリプレットが 9 つ連続している配列を用い、Hsp47 認識配列をその中に入れ込むこととした。N 末端側にビオチン修飾を施すにあたり、Hsp47 認識配列の位置が異なる 2 種類のモデルペプチドを用意し、Hsp47 との結合の程度を比較した(図 3A)。

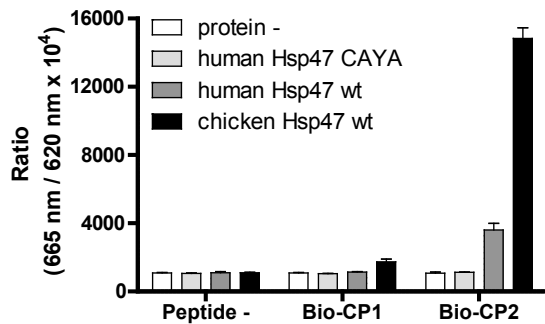
その結果、Hsp47 認識配列が N 末端側に位置するコラーゲンモデルペプチド (Bio-CP1) をを用いた場合、ヒト及びニワトリ Hsp47 wt に対し非常に低い結合シグナルしか得られなかった一方で、Hsp47 認識配列が C 末端側に位置するコラーゲンモデルペプチド (Bio-CP2) においては、いずれも顕著な結合シグナルが認められた(図 3B)。従って、以降の検討は Bio-CP2 を用いることとした。また、ヒト Hsp47 CAYA 変異体においては、Bio-CP1 及び Bio-CP2 のいずれに対しても結合は認められなかった。加えて、ヒト Hsp47 wt とニワトリ Hsp47 wt のコラーゲンモデルペプチドに対する結合を比較すると、Bio-CP1 及び Bio-CP2 のいずれに対してもニワトリ Hsp47 wt の方が顕著な結合が認められた(図 3B)。

次に、Hsp47 との結合に対する Bio-CP2 の濃度依存性を検討した。その結果、ヒト及びニワトリ Hsp47 wt において、Bio-CP2 濃度依存的な結合が認められた(図 3C)。

A

Bio-CP1 Biotin-POGPOGPT**T**GP**R**GPOGPOGPOGPOGPOG-amide
 Bio-CP2 Biotin-POGPOGPOGPOGPOGPT**T**GP**R**GPOGPOG-amide

B



C

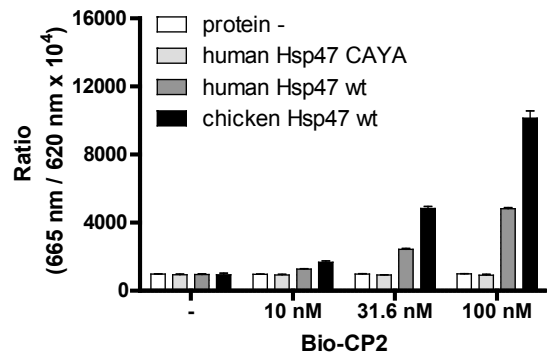


図3 Hsp47 とコラーゲンモデルペプチドの *in vitro* 結合活性

(A) 使用した 2 種類のコラーゲンモデルペプチドの構造

アミノ酸一文字表記の O は 4-hydroxy-L-proline (Hyp) を表す。Hsp47 との結合に重要な Arg 及び Thr を太字で示した。

(B) Hsp47 との結合に対するコラーゲンモデルペプチド Bio-CP1 と Bio-CP2 の比較

10 nM GST-Hsp47、300 nM Bio-CP1 もしくは Bio-CP2、83.4 nM SA-XL665 及び 0.37 nM anti-GST-Eu-K antibody を含む反応溶液を室温で 2 時間反応させた。n=3 で実験を行い、算出した平均値±SD をグラフに示した。

(C) Hsp47 との結合に対する Bio-CP2 の濃度依存性の検討

10 nM GST-Hsp47、10, 31.6, 100 nM Bio-CP2、83.4 nM SA-XL665 及び 0.37 nM anti-GST-Eu-K antibody を含む反応溶液を室温で 2 時間反応させた。n=3 で実験を行い、算出した平均値±SD をグラフに示した。

以上の結果より、構築した *in vitro* 結合評価系は Hsp47 タンパク質とコラーゲンモデルペプチドの特異的な結合を定量的に検出可能な評価系であると結論づけた。

1-3. 考察

TR-FRET を原理とした新規 *in vitro* 結合評価系を構築するにあたり、Donor として Eu-K ラベルされた抗 GST 抗体、Acceptor として SA-XL665 を反応系に添加することにより、N 末端側に GST を融合した組換え Hsp47 タンパク質と N 末端側にビオチン修飾したコラーゲンモデルペプチドの結合を定量的に検出可能となるよう設計した(図 1)。Hsp47 認識配列の位置が異なる 2 種類のコラーゲンモデルペプチドを比較した結果、Bio-CP1 においてはヒト及びニワトリ Hsp47 wt に対し非常に低い結合シグナルしか得られなかった一方で、Bio-CP2 においては顕著な結合シグナルが認められた(図 3B)。用いたコラーゲンモデルペプチドの違いによって結合シグナルに差が生じたのは、ビオチンに結合する SA-XL665 が分子量約 165 kDa とペプチドに対して非常に大きく、ビオチンと Hsp47 認識配列が近い位置にある Bio-CP1 においては立体的な障害となり、Hsp47 が近づき難くなっている可能性が考えられた。また、ヒト Hsp47 CAYA 変異体においては、Bio-CP1 及び Bio-CP2 どちらのコラーゲンモデルペプチドに対しても結合シグナルが認められなかった(図 3B, C)。従って、本結合評価系は Hsp47 とコラーゲンモデルペプチドの特異的な結合を検出可能であることが証明されたと言える。ヒト Hsp47 CAYA 変異体は、Tyr366 に加え、タンパク質の溶解性を下げる効果がある Cys139 も Ala に置換されているが、Cys139 のみを Ala に置換したヒト Hsp47 CA 変異体においては、wt と同様に結合が認められており (data not shown)、結合が認められなかったのは Tyr366 を Ala に置換した効果であると考えられる。加えて、ヒト Hsp47 wt とニワトリ Hsp47 wt を比較すると、Bio-CP1 及び Bio-CP2 どちらのコラーゲンモデルペプチドにおいてもニワトリ Hsp47 wt の方が顕著な結合が認められた(図 3B, C)。ニワトリ Hsp47 wt の方がヒト Hsp47 wt に比べ精製タンパク質としての純度が高く(図 2)、タンパク質としての安定性も高いと推察されるため単純な比較はできないものの、コラーゲンモデルペプチドに対するアフィニティがヒト Hsp47 wt に比べ高い可能性がある。さらに、ヒト及びニワトリ Hsp47 wt 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(図 3C)、本研究において構築した

TR-FRET を原理とした新規 *in vitro* 結合評価系は、Hsp47 タンパク質とコラーゲンモデルペプチドの特異的な結合を定量的に検出可能な評価系であると結論づけた。

構築した *in vitro* 結合評価系は、両者が溶液中において自由な状態でかつ洗浄操作なしに単純に混ぜて測ることが可能な、すなわち生理的に近い状態でありながら簡便で多検体の処理が可能な評価系である。従って、これまでに報告されている Hsp47 とコラーゲンの *in vitro* 結合評価系に加え、本結合評価系を用いることで、Hsp47 のコラーゲン認識機構の詳細な解析が更に進展するものと考えられる。加えて、TR-FRET を原理とするため、Donor として用いた Eu-K の蛍光寿命の長さに加え、励起スペクトルと蛍光スペクトルのピーク波長間の差、いわゆるストークシフトが 280 nm 前後と非常に大きく、短寿命の自家蛍光や励起波長付近の吸収を有する低分子化合物による評価系への影響を極力排除することが可能であり、Hsp47 とコラーゲンの結合を阻害する低分子化合物のスクリーニングにも最適な評価系と考えられる。例えば、Hsp47 を含むコラーゲン結合タンパク質の機能を阻害する化合物のスクリーニングとして、コラーゲンの繊維形成により生じる波長 313 nm の吸収を指標とした評価法が報告されている (Okano-Kosugi et al., 2009)。これは非常に興味深い評価方法ではあるが、医薬品を指向した低分子化合物には波長 313 nm 近辺を吸収するものが高確率で存在するものと考えられるため、それらが測定系に影響を及ぼし正確な評価が不能となる可能性が否定出来ない。評価指標としてはコラーゲンの繊維形成とコラーゲンに対する結合と異なるものの、本研究において構築した結合評価系とうまく組み合わせることにより、より確度の高いスクリーニングが可能となると考えられる。このように、低分子化合物のスクリーニングにおいては目的に応じて各々の評価系を使い分けることが重要であり、本研究において構築した結合評価系はその有用性の高い選択肢を提供するものと考えられる。

第 2 章 Hsp47 とコラーゲンモデルペプチドの結合様式の解析

2-1. 緒言

第 1 章において、Hsp47 とコラーゲンモデルペプチドが溶液中において自由な状態でかつ洗浄操作なしに単純に混ぜて測ることが可能な、すなわち生理的に近い状態でありながら簡便で多検体の処理が可能な新規 *in vitro* 結合評価系を構築した。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 (Doi et al., 2003)。実際に、4°C で保存していた 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 (図 4)。そこで、本研究では、GFC により分離した三量体及び単量体フラクションを分取し、構築した *in vitro* 結合評価系を用いて Hsp47 とコラーゲンモデルペプチドの結合様式を検討した。Hsp47 はコラーゲンの正しく形成された三重らせん構造に結合しているのか、それとも三重らせん構造ではなく一本鎖に結合しているのか、未解明であったこのような疑問に対し、直接的な証拠を得ることにより結論づけることを目的とした。また、三量体フラクションが三重らせん構造を形成しているか否かを確認するために、温度変化による可逆性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検討した。

2-2. 結果

まず、Bio-CP2 溶液の性状を解析するために、4℃で保存していた 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。その結果、三量体の分子量 (8.0 kDa) と単量体の分子量 (2.7 kDa) の位置にペプチドのピークがそれぞれ現れた (図 4)。従って、Bio-CP2 溶液中のペプチドは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。その際、溶出量 8 ml と 10 ml の間に現れたピークは、溶液中に含まれていた NP-40 由来のものである。

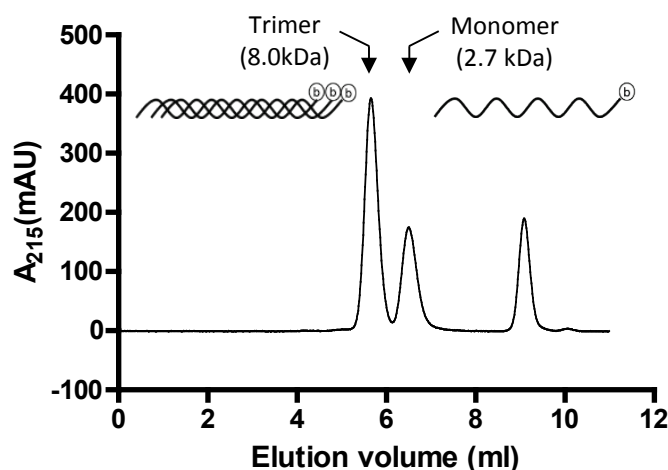


図 4 GFC による Bio-CP2 溶液の分離

ゲルろ過カラムとしては、Superdex Peptide PE 7.5/300 (GE Healthcare) を用い、ランニングバッファーとして PBS を用いて、室温で分離を行った。25 μ M Bio-CP2 溶液 100 μ l をカラムにアプライし、流速 0.28 ml/min で分離を行った。分離後のフラクションを 0.2 ml ずつ回収した。分離後の溶液に関しては、OD₂₁₅ 値をリアルタイムにモニターしており、各フラクションのペプチド濃度は、その値を基に算出した。溶出量 5 ml と 6 ml の間に現れたピークは三量体 (分子量 8.0 kDa) を、6 ml と 7 ml の間に現れたピークは単量体 (分子量 2.7 kDa) を示しているものと考えられ、回収したペプチド濃度は、単量体換算でそれぞれ 5.4 μ M 及び 3.2 μ M であった。溶出量 8 ml と 10 ml の間に現れたピークは、溶液中に含まれていた NP-40 由来のものである。

そこで、GFC により分離した Bio-CP2 溶液の三量体と単量体に相当するそれぞれのフラクションを分取し、構築した *in vitro* 結合評価系を用いて 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とは全く結合せず、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(図 5A, B)。

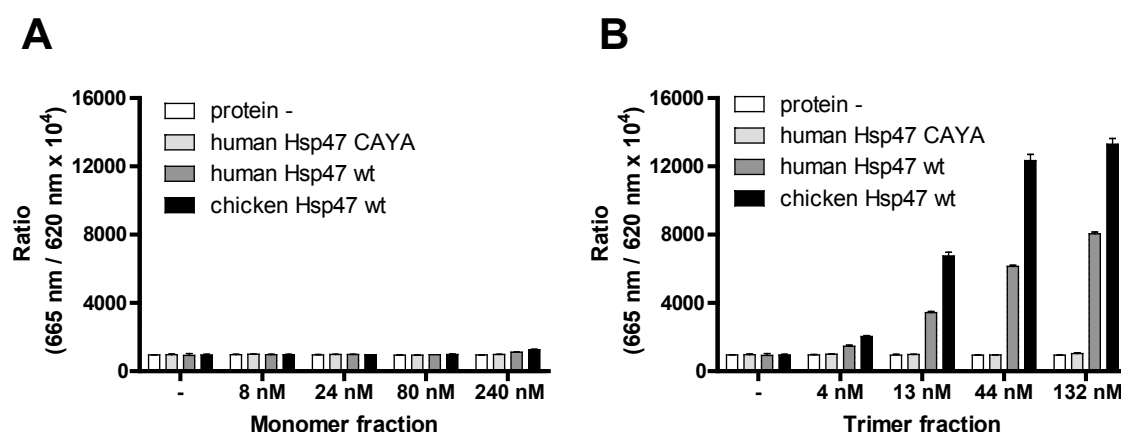


図 5 Hsp47 と GFC により分離した Bio-CP2 各フラクションとの結合活性

(A) 単量体フラクションを用いた検討

(B) 三量体フラクションを用いた検討

10 nM GST-Hsp47、図中に示した濃度の各フラクション、83.4 nM SA-XL665 及び 0.37 nM anti-GST-Eu-K antibody を含む反応溶液を室温で 2 時間反応させた。n=3 で実験を行い、算出した平均値±SD をグラフに示した。

この三量体フラクションが三重らせん構造を形成したペプチドによるものであれば、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が起こると想定される。そこで、GFC による分離前の 3 μ M Bio-CP2 溶液に対して 37 $^{\circ}$ C 2 時間の熱処理を行った後、Hsp47 との結合を検討した。その結果、Hsp47 との結合が認められなくなった(図 6A)。従って、熱処理により三重らせん構造が変性しているものと推察された。次に、熱処理後

の 3 μ M Bio-CP2 溶液を 4 $^{\circ}$ C で 4 日間冷却処理し、Hsp47 との結合を検討した。その結果、コントロールである熱処理に供していない Bio-CP2 溶液を用いた結果と同様に(図 6B)、冷却処理した Bio-CP2 溶液において Hsp47 との結合が再度認められた(図 6C)。従って、三重らせん構造が再形成されているものと推察された。

次に、GFC により分離した Bio-CP2 溶液の三量体フラクションを用いて検討を行った。三量体フラクションに対して 37 $^{\circ}$ C 2 時間の熱処理を行った後、GFC に供したところ、そのほとんどが単量体にシフトしていた(図 6D)。そこで、熱処理後の三量体フラクションを 4 $^{\circ}$ C で 4 日間冷却処理し、Hsp47 との結合を検討した。その結果、コントロールである熱処理に供していない三量体フラクションを用いた結果と同様に(図 6E)、冷却処理した三量体フラクションと Hsp47 との結合が認められた(図 6G)。冷却処理後の三量体フラクションを再度 GFC に供したところ、再び三量体が形成されていることが明らかとなった(図 6H)。

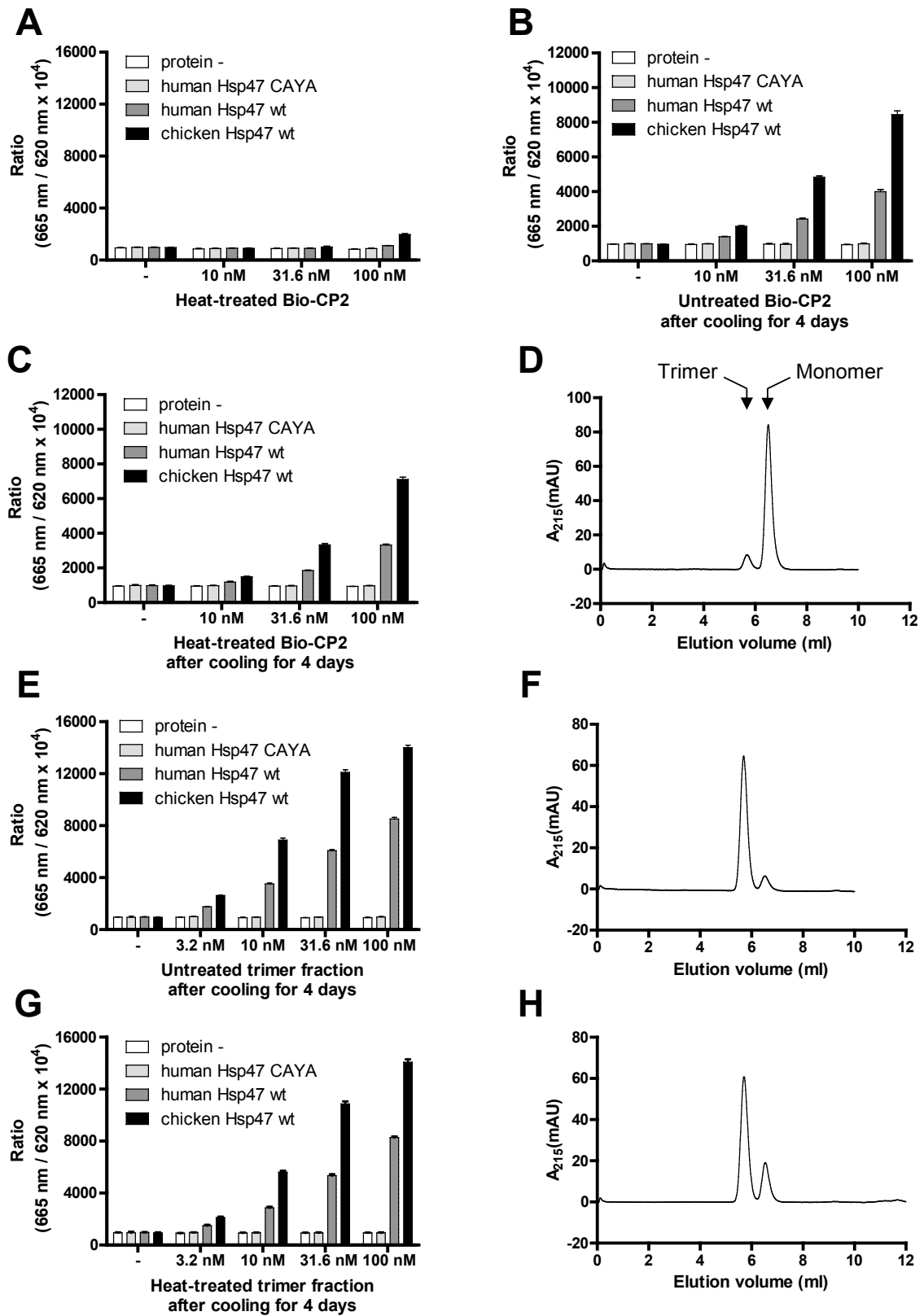


図 6 温度変化によるコラーゲンモデルペプチドの三重らせん構造の可逆性

(A) GFC 分離前の Bio-CP2 溶液の熱処理後における Hsp47 との結合

GFC 分離前の 3 μ M Bio-CP2 溶液を 37 $^{\circ}$ C 2 時間の熱処理後、10 nM GST-Hsp47、図中に示した濃度の Bio-CP2、83.4 nM SA-XL665 及び 0.37 nM anti-GST-Eu-K antibody を含む反応溶液を 37 $^{\circ}$ C で 2 時間反応させた。n=3 で実験を行い、算出した平均値 $\pm$ SD をグラフに示した。

(B, C) 冷却処理後の Bio-CP2 溶液の Hsp47 との結合

熱処理に供していない Bio-CP2 溶液 (B) 及び熱処理後の Bio-CP2 溶液 (C) をそれぞれ 4 $^{\circ}$ C で 4 日間冷却処理し、Hsp47 との結合を検討した。

10 nM GST-Hsp47、図中に示した濃度の各フラクション、83.4 nM SA-XL665 及び 0.37 nM anti-GST-Eu-K antibody を含む反応溶液を室温で 2 時間反応させた。n=3 で実験を行い、算出した平均値 $\pm$ SD をグラフに示した。

(D) 熱処理後の三量体フラクションの GFC による分離

Bio-CP2 溶液の三量体フラクションを 37 $^{\circ}$ C 2 時間の熱処理後、GFC に供した。

(E-H) 冷却処理後の三量体フラクションの GFC による分離と Hsp47 との結合

熱処理に供していない三量体フラクション (E, F) 及び熱処理後の三量体フラクション (G, H) をそれぞれ 4 $^{\circ}$ C で 4 日間冷却処理し、Hsp47 との結合を検討し (E, G)、かつ GFC に供した (F, H)。結合実験は図 6 B, C と同様の条件で行った。GFC による分離は図 4 と同様の条件で行った。GFC に供したペプチド濃度は、いずれも単量体換算で 9.8 μ M であった (D, F, H)。

次に、GFC により分離した Bio-CP2 溶液の単量体フラクションを用いて同様の検討を行った。

単量体フラクションにおいては、37 $^{\circ}$ C 2 時間の熱処理をするしないに関わらず、Hsp47 との結合は認められなかった (図 7A, C)。そこで、熱処理後の単量体フラクションを 4 $^{\circ}$ C で 4 日間冷却処理し、Hsp47 との結合を検討した。その結果、コントロールである熱処理に供していない単量体フラクションを用いた結果と同様に (図 7E)、Hsp47 との結合は認められなかった (図 7G)。冷却処理後の単量体フラクションを再度 GFC に供したところ、コントロールである熱処理に供していない単量体フラクションと同様に (図 7F)、三量体は形成されていないことがわかった (図 7H)。使用した単量体フラクションの濃度は 4.9 μ M であったが、三量体形成にクリティカルなペプチド濃度が存在し、その濃度を超えていない可能性が考えられた。

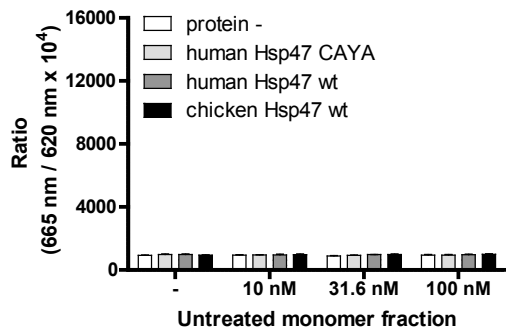
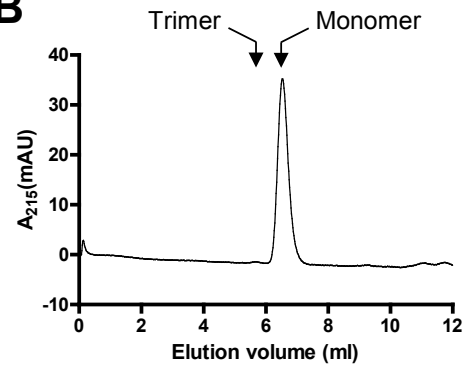
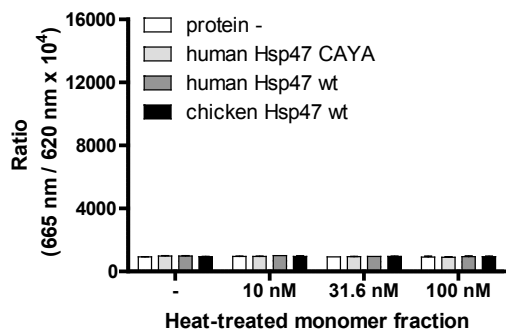
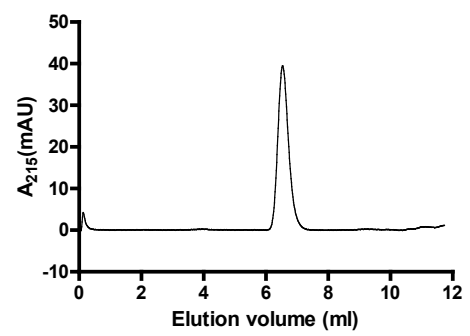
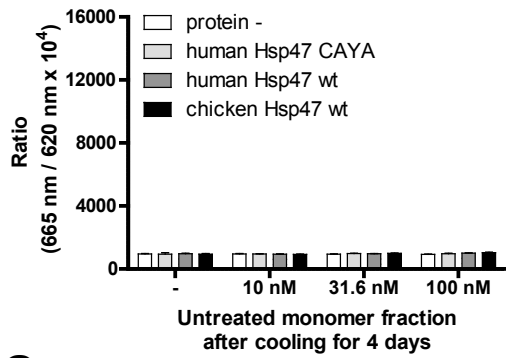
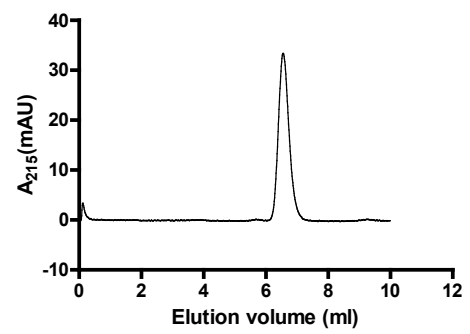
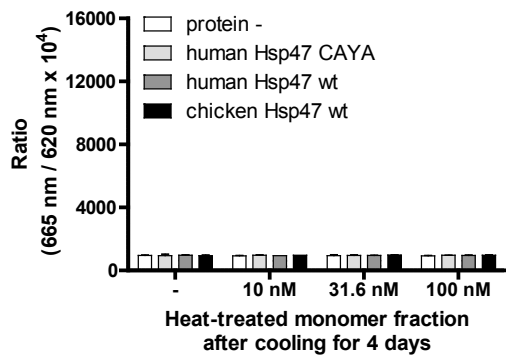
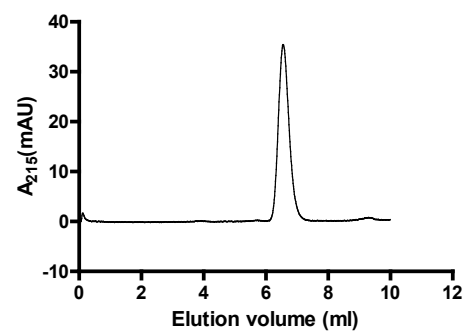
A**B****C****D****E****F****G****H**

図 7 Bio-CP2 溶液の単量体フラクションの温度変化による可逆性

(A-D) 熱処理後の単量体フラクションの GFC による分離と Hsp47 との結合

熱処理に供していない単量体フラクション (A, B) 及び 37 °C 2 時間の熱処理後の単量体フラクション (C, D) に対し、それぞれ Hsp47 との結合を検討し (A, C)、かつ GFC に供した (B, D)。

(E-H) 冷却処理後の単量体フラクションの GFC による分離と Hsp47 との結合

熱処理に供していない単量体フラクション (E, F) 及び熱処理後の単量体フラクション (G, H) をそれぞれ 4 °C で 4 日間冷却処理し、Hsp47 との結合を検討し (E, G)、かつ GFC に供した (F, H)。

結合実験は図 6 B, C と同様の条件で行った。GFC による分離は図 4 と同様の条件で行った。

GFC に供したペプチド濃度は、いずれも単量体換算で 4.9 μ M であった (B, D, F, H)。

そこで、Bio-CP2 原末を各濃度になるように PBS により溶解し、三量体化の濃度依存性を検討した。その結果、濃度依存的に三量体形成率は高くなったものの (図 8F)、三量体に戻らなかった単量体フラクションの濃度以下においても、三量体が形成されていることがわかった (図 8A-E)。

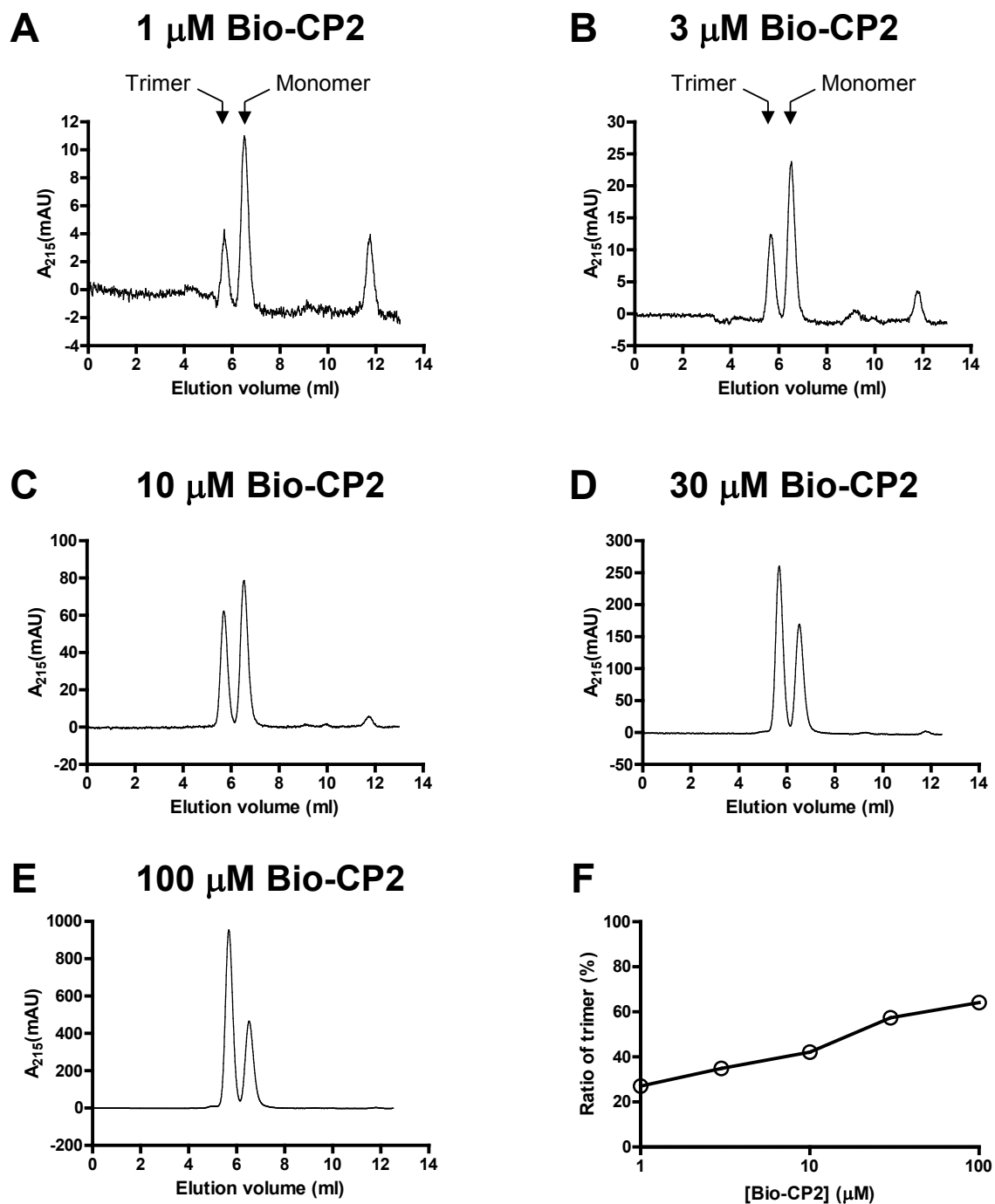


図 8 Bio-CP2 原末の三量体化における濃度依存性

(A-E) PBS で溶解した Bio-CP2 原末の三量体化における濃度依存性

GFC による分離は図 4 と同様の条件で行った。

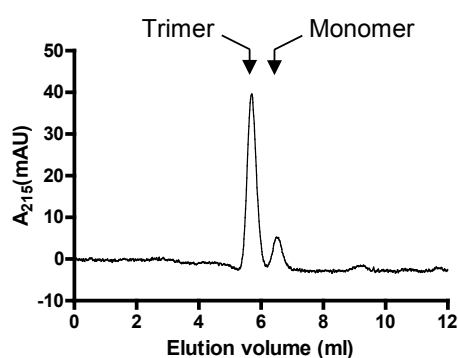
(F) 三量体形成率

三量体形成率は以下の計算式により算出した。Ratio = Area of absorbance at 215 nm in trimer

fraction / [(Area of absorbance at 215 nm in trimer fraction) + (Area of absorbance at 215 nm in monomer fraction)]

また、長期保存溶液における性状を解析するために、4 °Cで 4 ヶ月保存した Bio-CP2 溶液の三量体及び単量体フラクションを再度 GFC に供した。その結果、三量体フラクションでは三量体が維持されていることが明らかとなったが(図 9A)、単量体フラクションでは三量体形成は認められなかった(図 9B)。

A Trimer fraction



B Monomer fraction

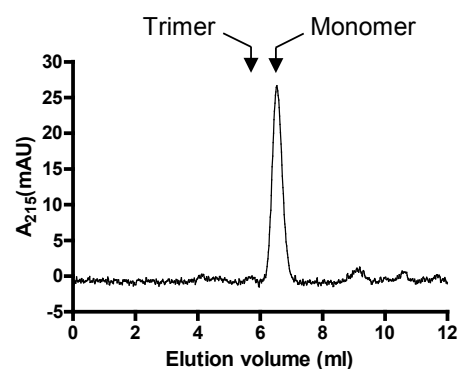


図 9 長期保存した三量体及び単量体フラクションの GFC による分離

4 °Cで 4 ヶ月保存した Bio-CP2 溶液の三量体フラクション (A) 及び単量体フラクション (B) を再度 GFC に供した。GFC による分離は図 4 と同様の条件で行った。GFC に供したペプチド濃度は、単量体換算で 5.4 μM (A) 及び 3.2 μM (B) であった。

従って、単量体フラクションにおいては、三量体を形成し得ない、すなわち可逆性のないペプチドの単量体が溶液中に存在し分離されたか、もしくは、三量体形成には核となる三量体が必要で

ある可能性が示唆された。いずれにしても、GFC により分離した三量体においては、熱処理による変性と冷却処理による再形成が認められることから、温度変化による三重らせん構造の可逆性を持つことが示唆された。

以上の結果より、Hsp47 とコラーゲンモデルペプチドの結合は、コラーゲンモデルペプチドの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。

2-3. 考察

これまでに、いくつかの状況証拠から Hsp47 は小胞体内において一本鎖よりも三重らせん構造を認識していることが示唆されていたが、その直接的な証拠は得られていなかった (Koide et al., 2002; Tasab et al., 2002; Thomson et al., 2003; Koide et al., 2006a; Koide et al., 2006b)。本研究においては、コラーゲンモデルペプチド Bio-CP2 溶液が GFC により三量体と単量体に分離されることを利用し、構築した新規 *in vitro* 結合評価系を用いて、Hsp47 はコラーゲンモデルペプチドの単量体とは結合せず、三量体にのみ特異的に結合することを明らかにした。さらに、この三量体が単に会合した三量体であるのか、それとも三重らせん構造を形成しているのか、どちらか不明であったため、三重らせん構造に特有である温度変化による可逆性を検討した。その結果、熱処理による変性と冷却処理による再形成を起こす、すなわち温度変化により三重らせん構造の可逆性を持つことを示し、この三量体は三重らせん構造を形成している可能性が非常に高いこと、そして Hsp47 と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ことを明らかにした (図 10)。

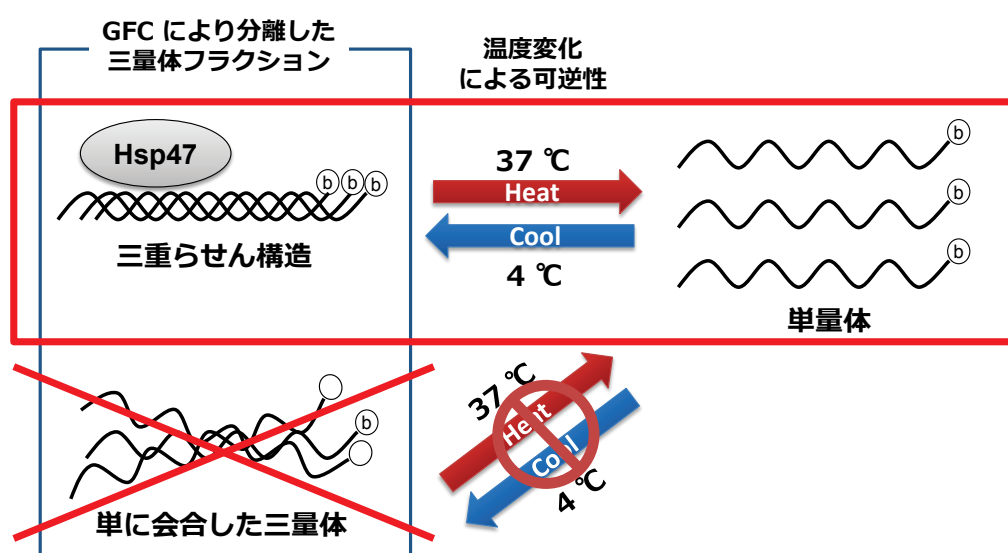


図 10 GFC により分離した三量体フラクションは三重らせん構造を形成している

Gly-Pro-Pro ないしは Gly-Pro-Hyp 配列の繰り返しが 9 つを超えるコラーゲンモデルペプチドは、25 °Cにおいて三重らせん構造を形成することが円偏光二色性 (CD) スペクトルの測定により明らかとなっている (Koide et al., 2006b; Nishikawa et al., 2010)。Bio-CP2 とは、ビオチン修飾がされていないこともあり構造が若干異なるものの、本研究により得られた結果すなわち温度変化による三重らせん構造の可逆性に関しては、これらの報告と矛盾はないものと考えられる。

興味深いことに、GFC により分離した Bio-CP2 溶液の単量体フラクションは、当初の予想に反し冷却処理による三量体の再形成が認められなかった(図 7H)。本実験に使用した単量体フラクションの濃度は 4.9 μM であった一方で、温度変化による可逆性が認められた三量体フラクションにおいては、単量体換算濃度が 9.8 μM であった(図 6 D, F, H)。三量体を再形成するためには、ある一定濃度以上のペプチド濃度が必要であり、その濃度をを超えていないために再形成されなかった可能性があると考えられた。そこで、Bio-CP2 原末を使用し三量体化の濃度依存性を検討したが、4.9 μM 以下の濃度においても三量体は形成されていたため(図 8A, B)、その可能性は否定されたとと言える。Bio-CP2 原末は固相合成法により合成されたものを用いているため、何らかの要因で三量体を形成し得ない、すなわち可逆性のないペプチドの単量体が原末中に含まれ、それが単量体フラクションとして分離された可能性は否定できない。または、三量体形成には核となる少量の三量体が必要である可能性も原因として考えられるが、その詳細については不明である。これらの可能性を追求するためには、三量体形成をし得る単量体フラクションと三量体形成をし得ない単量体フラクションの構造の違いを何らかの方法で明らかにする、ないしは三量体形成をし得ない単量体フラクションに三量体を少量加えた際の三量体形成の促進を確認するなど、詳細な追加検討が必要であると考えられる。

いずれにしても、GFC により分離した三量体においては、温度変化による三重らせん構造の可逆性を持つことから、Hsp47 とコラーゲンモデルペプチドの結合は、コラーゲンモデルペプチドの三重らせん構造に起因する可能性が非常に高いものと結論づけた。従って、本研究において得られた結果は、Hsp47 がプロコラーゲンの生合成過程において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わけではなく、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という仮説を支持する知見であり、*in vitro* におけるその直接的な証拠を提示するものであると言える。ネイティブなプロコラーゲン 1 分子に対して、Hsp47 が何分子結合しているのか、分子量論的な結論はまだ明確になってはいないが、プロコラーゲンのアミノ酸一次配列を基に Hsp47 結合部位数を予測すると、例えばヒト I 型コラーゲンは 2 本の $\alpha 1$ 鎖 (COL1A1) と 1 本の $\alpha 2$ 鎖 (COL1A2) から構成されるが、これらの Hsp47 結合部位数はそれぞれ 27 及び 32 と予測されている (Koide et al., 2006b)。従って、実際には正しく形成された三重らせん構造が解けないように多数の Hsp47 がプロコラーゲン 1 分子に結合し、そのフォールディングに寄与しているものと想像される。

第 3 章 生細胞内における Hsp47 とコラーゲンモデルペプチドの相互作用の可視化

3-1. 緒言

第 2 章において、*in vitro* における検討により、Hsp47 とコラーゲンモデルペプチドの結合はコラーゲンモデルペプチドの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。しかしながら、生細胞内における Hsp47 とコラーゲンの相互作用に関しては、それを可視化した報告はこれまでになく、細胞内においての Hsp47 のコラーゲン認識機構は不明であった。そこで、本研究では、Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC, 二分子蛍光補完) 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試み、生細胞内における Hsp47 のコラーゲン認識機構を検討した。

BiFC 法の適用にあたり、蛍光タンパク質として monomeric Kusabira-Green (mKG) を採用し、それを二つに分割した N 末端側断片 (mKG_N) と C 末端側断片 (mKG_C) 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、再び蛍光を発することが報告されている (Ueyama et al., 2008)。従って、二つの目的タンパク質にそれぞれの断片を融合させて用いることで、細胞が生きた状態での目的タンパク質間の相互作用を蛍光により検出することが可能である。

3-2. 結果

ヒト Hsp47 wt 及び基本配列として連続する Pro-Pro-Gly トリプレットを 9 つ連結させ、かつ Bio-CP2 と同じ位置に Hsp47 認識配列を組み込んだコラーゲンモデルペプチド (CP2×9) 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た (図 11)。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ることにより、小胞体への局在を促した (図 11)。従って、細胞内に発現させたこれらのタンパク質の相互作用が小胞体内において認められれば、mKG が再構成され、その蛍光として相互作用が検出される (図 11)。

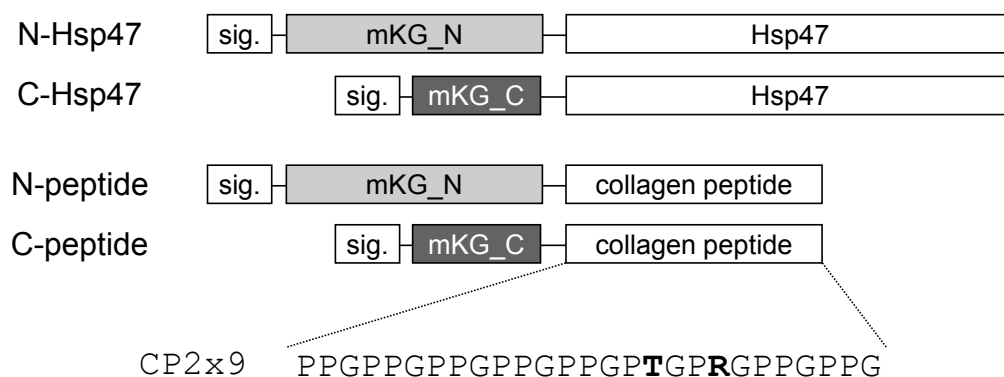


図 11 HeLa 細胞に発現させたタンパク質の概略図

小胞体シグナル配列 (sig.) として、ヒト HSP47 (アミノ酸 1-17) 由来の配列 (MRSLLLLSAFCLLEAAL) を用いた。Hsp47 との結合に重要な Arg 及び Thr を太字で示した。

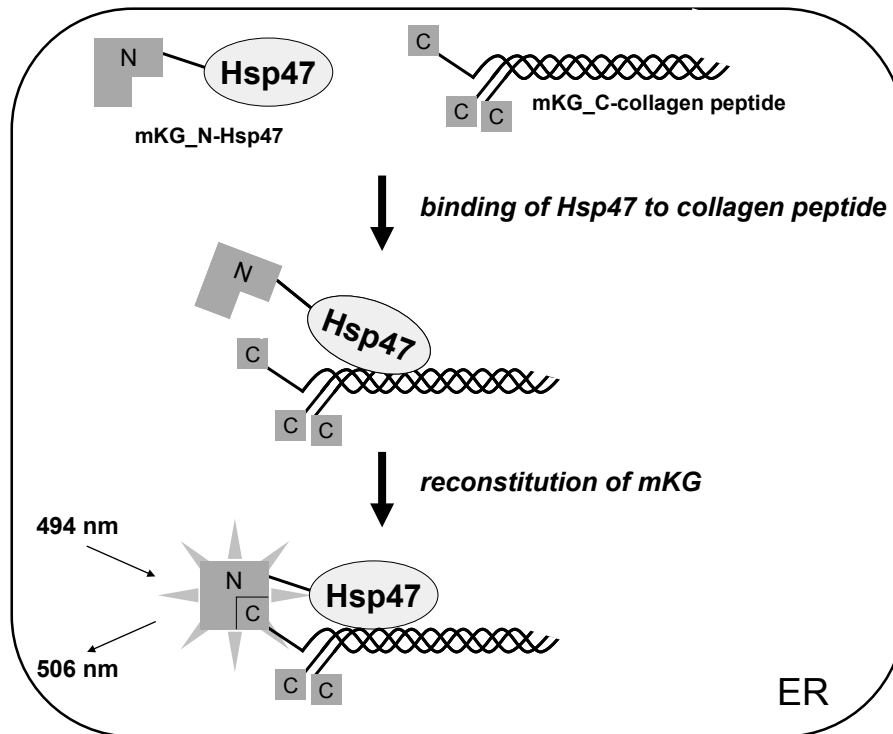


図 12 BiFC 法を原理とした細胞内相互作用可視化法の概略図

Hsp47 とコラーゲンモデルペプチドが近接することにより mKG が再構成され、蛍光を発する。従って、細胞が生きた状態での目的タンパク質間の相互作用を mKG の蛍光により検出することが可能である。N, mKG_N fragment; C, mKG_C fragment.

HeLa 細胞に構築した mKG_N-Hsp47 wt 及び mKG_C-CP2×9 発現ベクターを一過性導入し、3 日後の mKG の蛍光を観察することにより検討を行った。しかしながら、コラーゲンモデルペプチドと Hsp47 との相互作用は認められなかった(図 13)。N 末端側に mKG 断片が融合されていることもあり、何らかの要因の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。

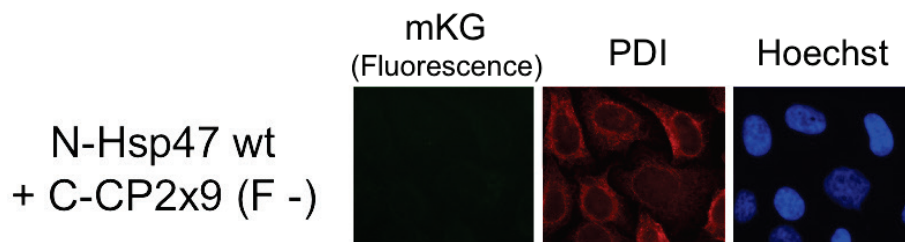


図 13 コラーゲンモデルペプチド と Hsp47 との細胞内相互作用の検討

HeLa 細胞に構築した各発現ベクターを一過性に導入し、3 日後の mKG の蛍光を観察することにより検討を行った。しかしながら、コラーゲンモデルペプチドと Hsp47 との相互作用は認められなかった。N, mKG_N fragment; C, mKG_C fragment; F -, without foldon

コラーゲンモデルペプチドの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 fibrin の C 末端ドメインである foldon が知られている (Frank et al., 2001; Stetefeld et al., 2003; Meier et al., 2004; Du et al., 2008)。そこで、foldon をコラーゲンモデルペプチドの C 末端側に融合させたコンストラクトを作製し(図 14)、Hsp47 との相互作用を再検討した。

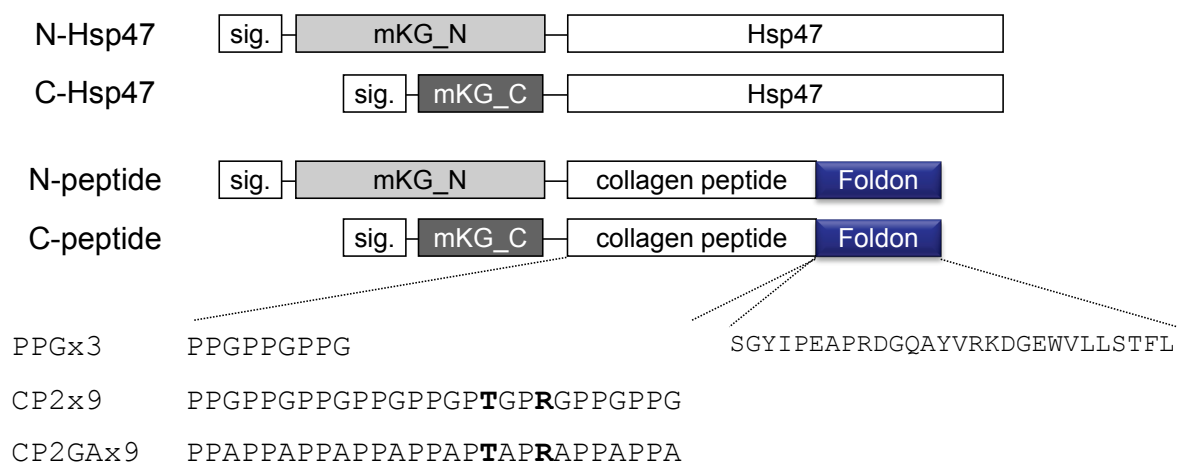


図 14 HeLa 細胞に発現させたタンパク質の概略図 (foldon の利用)

foldon をコラーゲンモデルペプチドの C 末端側に融合させたコンストラクトを作製した。ネガティブ

コントロールとして、連続する Pro-Pro-Gly トリプレットが 3 つと短く、三重らせん構造を形成することができないペプチド (PPG×3) と、CP2×9 の 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) を作製した。Hsp47 との結合に重要な Arg 及び Thr を太字で示した。小胞体シグナル配列 (sig.) として、ヒト HSP47 (アミノ酸 1-17) 由来の配列 (MRSLLLLSAFCLLEAAL) を用いた。

発現させた Hsp47 と foldon を融合したコラーゲンモデルペプチドの局在を確認するために、mKG_C-Hsp47 wt と mKG_C-CP2×9 foldon をそれぞれ HeLa 細胞に一過的に発現させ、抗 mKG_C 抗体により免疫染色を行った。その結果、いずれも小胞体マーカーである PDI との共局在が観察された(図 15)。従って、両者とも小胞体に発現していることが確認された。

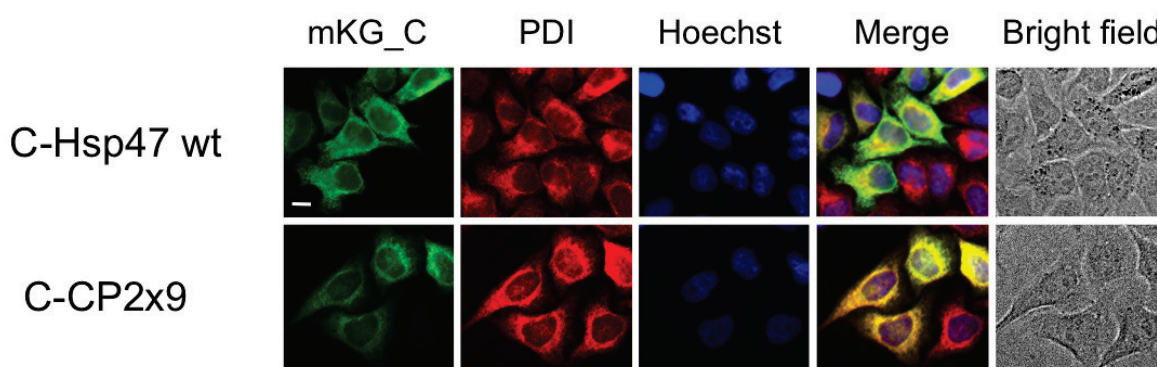


図 15 HeLa 細胞に発現させた Hsp47 wt と CP2×9 foldon の局在の確認

HeLa 細胞に mKG_C-Hsp47 wt と mKG_C-CP2×9 foldon の発現ベクターをトランスフェクトし、3 日後細胞を固定した。マウスモノクローナル抗 mKG_C 抗体 (MBL) とラビットポリクローナル抗 PDI 抗体 (Stressgen) により共染色した。核染色は 1 µg/ml Hoechst 33342 (Invitrogen) により行った。蛍光画像は、IN Cell Analyzer 1000 (GE Healthcare) により取得した。Scale bar = 10 µm.

次に、mKG_C-Hsp47 wt と mKG_N-CP2×9、及び mKG_N-Hsp47 wt と mKG_C-CP2×9 の組み合わせで HeLa 細胞に一過的に共発現させ、それらの相互作用を検討した。その結果、いずれの組み合わせにおいても、単独では mKG の蛍光は検出されなかったが、共発現させた場合にのみ両者の相互作用が再構成された mKG の蛍光として検出され、かつ小胞体マーカーである PDI と共局在した(図 16)。

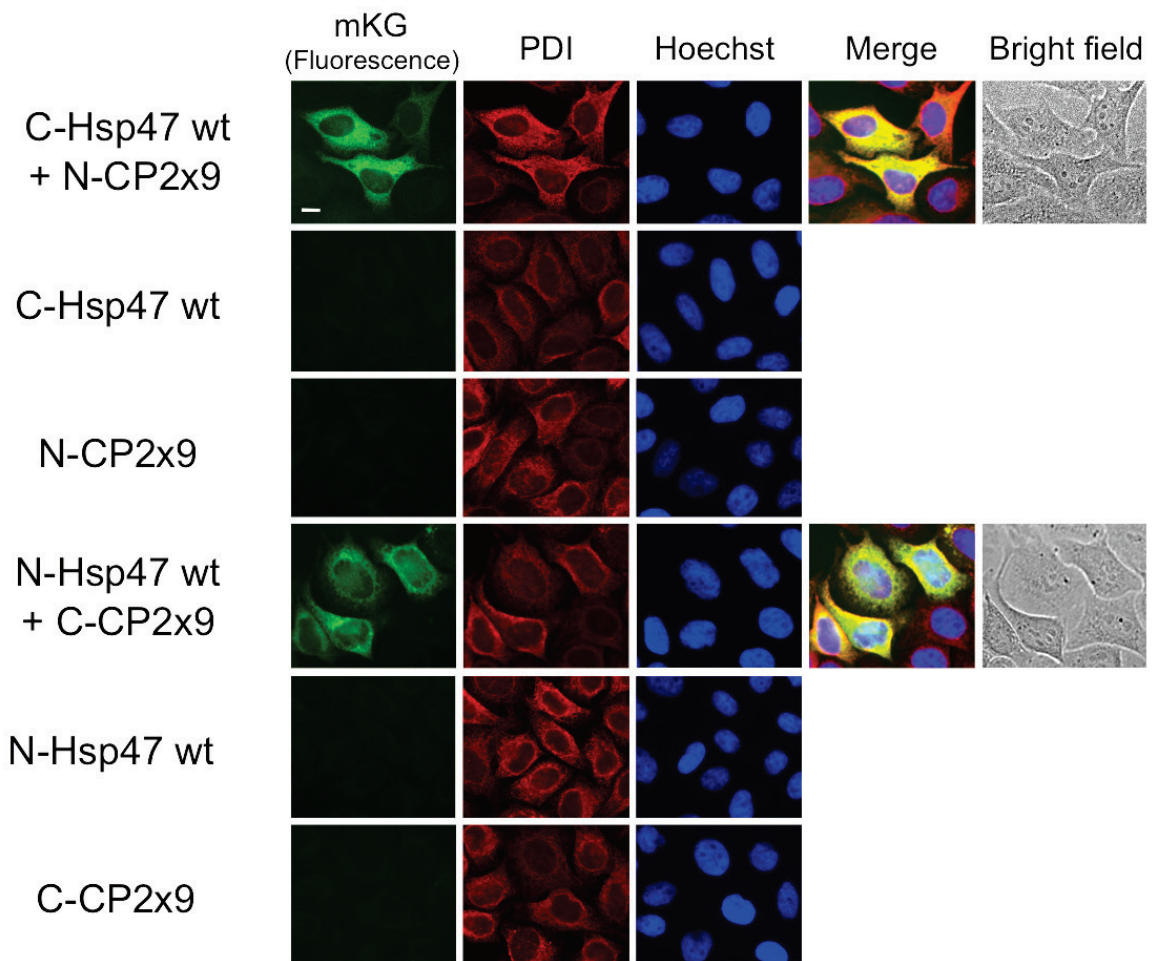


図 16 Hsp47 wt と CP2×9 foldon の細胞内相互作用の検討

HeLa 細胞に mKG_C-Hsp47 wt と mKG_N-CP2×9 foldon、もしくは mKG_N-Hsp47 wt と mKG_C-CP2×9 foldon 発現ベクターをそれぞれコトランスフェクトし、3 日後細胞を固定した。両者の相互作用が再構成された mKG の蛍光として観察された。ラビットポリクローナル抗 PDI 抗体 (Stressgen) により染色した結果、共局在することから小胞体での相互作用であることが明らかとなった。核染色は 1 µg/ml Hoechst 33342 (Invitrogen) により行った。蛍光画像は、IN Cell Analyzer 1000 (GE Healthcare) により取得した。Scale bar = 10 µm.

ネガティブコントロールとして、連続する Pro-Pro-Gly トリプレットが 3 つと短く、三重らせん構造を形成することができないペプチド (PPG×3) と、CP2×9 の 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) (図 14)、及び Hsp47 CAYA 変異体を含むコンストラクトを作製し、相互作用の検討を行った。その結果、PPG×3 及び CP2GA×9 においては、Hsp47 wt との相互作用は認められなかった(図 17A)。同様にネガティブコントロールとして用いた Hsp47 CAYA 変異体においても、CP2×9 との相互作用は認められなかった(図 17A)。これらの組み合わせに関して、各タンパク質の発現をウェスタンブロットにより確認したところ、いずれのタンパク質についても発現が確認された(図 17B, C)。

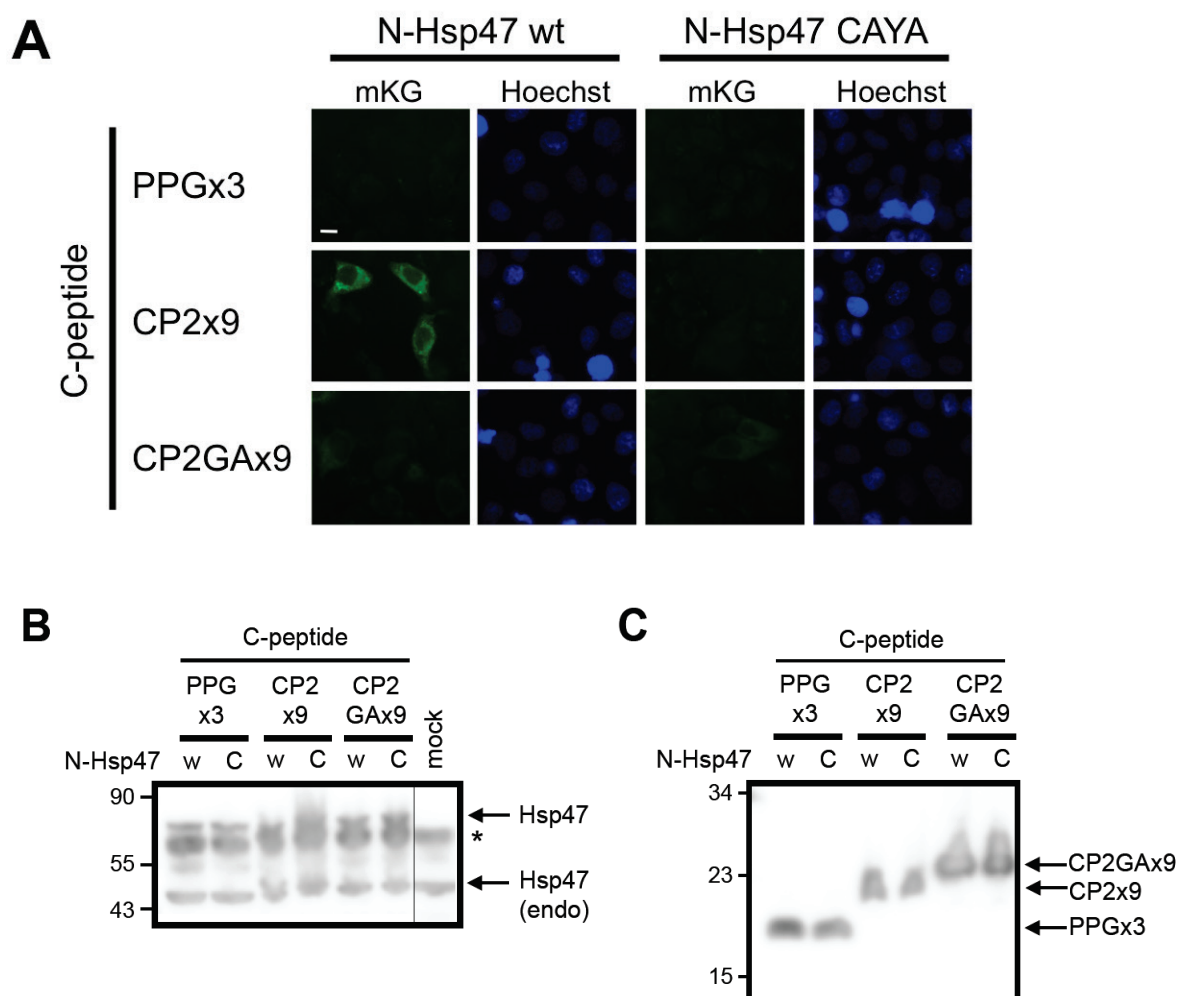


図 17 各種 Hsp47 とコラーゲンモデルペプチドの細胞内相互作用の検討

(A) mKG の再構成による各種 Hsp47 とコラーゲンモデルペプチドの細胞内相互作用の検討

HeLa 細胞に mKG_N-Hsp47 wt 及び mKG_N-Hsp47 CAYA と、mKG_C-PPG×3 foldon、mKG_C-CP2×9 foldon 及び mKG_C-CP2GA×9 foldon 発現ベクターをそれぞれコトランスフェクトし、3 日後細胞を固定した。核染色は 1 µg/ml Hoechst 33342 (Invitrogen) により行った。蛍光画像は、IN Cell Analyzer 1000 (GE Healthcare) により取得した。Scale bar = 10 µm.

(B, C) ウェスタンブロットによる各種タンパク質の発現確認

図中の組み合わせにおける一過性発現細胞の細胞抽出液を調製し、マウスモノクローナル抗 Hsp47 抗体 (Stressgen) を用いて (B)、もしくはマウスモノクローナル抗 mKG_C 抗体 (MBL) を用いて (C)、ウェスタンブロットを行った。アスタリスクは非特異的なバンドを示す。数字は分子量 (kDa) を示す。w, wild-type; C, CAYA mutant; Hsp47(endogenous), endogenous Hsp47.

以上の結果から、構築した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が可視化され、かつ、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ものと結論づけた。

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ることにより小胞体への局在を促しているが、局在における小胞体シグナル配列の影響を確認するために、小胞体シグナル配列を除いたコンストラクトにおいても検討を行った。その結果、小胞体シグナル配列を除いた Hsp47 及び CP2×9 の組み合わせにおいても、細胞質で弱い相互作用が認められた (図 18A, B)。加えて、両者のうち片方のみ小胞体シグナル配列を除いた Hsp47 及び CP2×9 の組み合わせにおいては、相互作用は認められなかった (図 18A)。これらの組み合わせに関して、各タンパク質の発現をウェスタンブロットにより確認したところ、各種 Hsp47 及び小胞体シグナル配列を付加した CP2×9 については発現が検出されたが、小胞体シグナル配列を除いたコラーゲンモデルペプチドのみ、発現が検出されなかった (図 18C, D)。正確な原因は不明であるが、小胞体シグナル配列を除いたコラーゲンモデルペプチドは、本来の局在ではないために、タンパク質が不安定となっている可能性が考えられる。

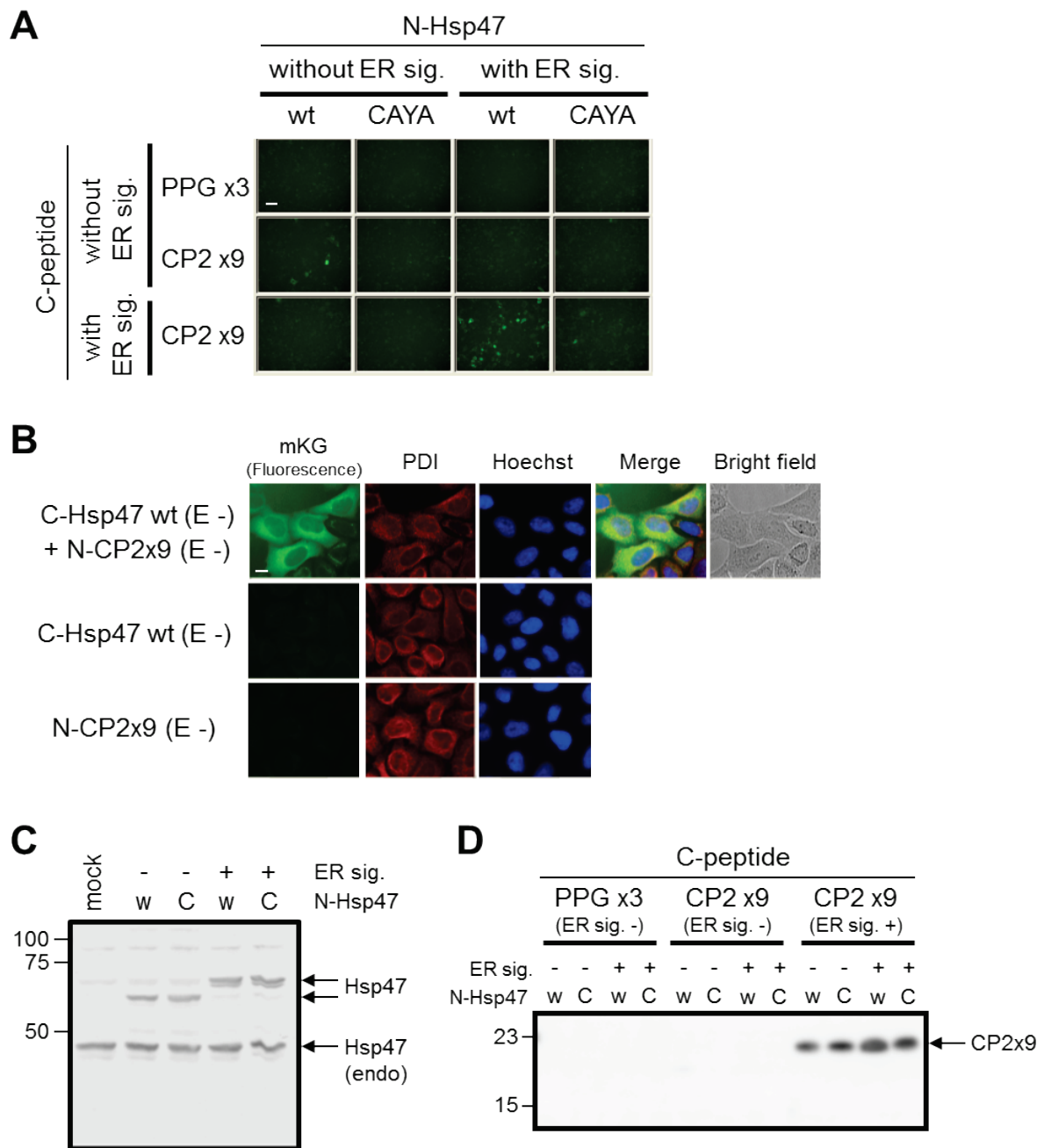


図 18 局在における小胞体シグナル配列の影響に関する検討

(A) mKG の再構成による小胞体シグナル配列を除いた各種 Hsp47 とコラーゲンモデルペプチドの細胞内相互作用の検討

HeLa 細胞に小胞体シグナル配列が付加されたもしくは除去された mKG_N-Hsp47 wt 及び mKG_N-Hsp47 CAYA と、mKG_C-PPG×3 foldon 及び mKG_C-CP2×9 foldon 発現ベクターをそれぞれコトランスフェクトし、3 日後細胞を固定した。蛍光画像は、IN Cell Analyzer 1000 (GE Healthcare) により取得した。Scale bar = 100 µm.

(B) 小胞体シグナル配列を除いた Hsp47 とコラーゲンモデルペプチドの相互作用の局在の確認
HeLa 細胞に小胞体シグナル配列を除いた mKG_C-Hsp47 wt と mKG_N-CP2×9 foldon 発現ベクターをそれぞれコトランスフェクトし、3 日後細胞を固定した。両者の相互作用が再構成された mKG の蛍光として観察された。ラビットポリクローナル抗 PDI 抗体 (Stressgen) により染色した結果、共局在しないことから細胞質での相互作用であることが示唆された。核染色は 1 µg/ml Hoechst 33342 (Invitrogen) により行った。蛍光画像は、IN Cell Analyzer 1000 (GE Healthcare) により取得した。Scale bar = 10 µm.

(C, D) ウェスタンブロットによる各種タンパク質の発現確認

図中の組み合わせにおける一過性発現細胞の細胞抽出液を調製し、マウスモノクローナル抗 Hsp47 抗体 (Stressgen) を用いて (C)、もしくはマウスモノクローナル抗 mKG_C 抗体 (MBL) を用いて (D)、ウェスタンブロットを行った。数字は分子量 (KDa) を示す。w, wild-type; C, CAYA mutant; Hsp47(endo), endogenous Hsp47.

以上の結果から、Hsp47 とコラーゲンモデルペプチドの両者に小胞体シグナル配列を融合させることで、小胞体内におけるより生理的な相互作用を検出しているものと推察された。

3-3. 考察

本研究において、BiFC 法を原理とした方法により、生細胞の小胞体内における Hsp47 とコラーゲンモデルペプチドの相互作用を可視化することに成功した。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(図 13)。細胞内に発現させたコラーゲンモデルペプチドの N 末端側に mKG 断片が融合されていることもあり、それが立体的な障害となって三重らせん構造を形成し難くなっている可能性が考えられた。また、細胞内への遺伝子導入によるコラーゲンモデルペプチドの強制発現においては、Pro-Hyp-Gly トリプレットとして発現させることが技術的に困難であるため、細胞内における P4H の水酸化を期待し Pro-Pro-Gly トリプレットとして発現させた。実際に細胞内においてどのように水酸化を受けているか不明であるが、mKG を融合することにより P4H による基質認識ができなくなり、水酸化が受けられないがために三重らせん構造が不安定になっている可能性も考えられた。そこで、コラーゲンモデルペプチドの三重らせん構造の安定化を期待し、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 (Frank et al., 2001; Stetefeld et al., 2003; Meier et al., 2004; Du et al., 2008) をコラーゲンモデルペプチド CP2×9 の C 末端側に融合させ再検討を実施した結果、小胞体内において両者の相互作用が mKG の蛍光として検出された(図 16)。また、ネガティブコントロールとして用いた Hsp47 CAYA 変異体においては、CP2×9 との相互作用は認められなかった(図 16A)。foldon により CP2×9 の三重らせん構造が促進されたために、特異的な相互作用が認められるようになったものと考えられ、foldon を融合していない CP2×9 において Hsp47 との相互作用が認められなかったのは、三重らせん構造が形成されていない、もしくは不安定であると考察した前述の仮説を支持する結果となった。小胞体シグナル配列を付加した Hsp47 及び CP2×9 の組み合わせにおいては、小胞体で顕著な相互作用が認められたが、小胞体シグナル配列を除いた両者においても、細胞質で弱い相互作用が認められた(図 18A, B)。しかしながら、片方のみ小胞体シグナル配列を除いた Hsp47 及び CP2×9 の組み合わせにおいては、相互作用は認められなかったことから(図 18A)、

Hsp47 とコラーゲンモデルペプチドの両者に小胞体シグナル配列を融合させることで、本来の局在である小胞体内において両者の特異的な相互作用を mKG の蛍光として可視化できているものと結論づけた。

加えて、ネガティブコントロールとして用いた、連続する Pro-Pro-Gly トリプレットが 3 つと短く、三重らせん構造を形成することができないペプチド (PPG×3) と、CP2×9 の 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) においては、Hsp47 との相互作用は認められなかった(図 17A)。in vitro の実験により、Pro-Pro-Gly トリプレットが 6 つ以下のコラーゲンモデルペプチドは Hsp47 と結合できないことを示した報告があり (Koide et al., 1999)、PPG×3 の結果はそれとは矛盾しない。これらのネガティブコントロールの結果と、相互作用の検出におけるコラーゲンモデルペプチドの foldon 必要性から、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ものと結論づけた。

総括

本研究により、以下のことを明らかにした。

第 1 章では、組換えヒト Hsp47 タンパク質とコラーゲンモデルペプチドを用いて、TR-FRET を原理とした新規 *in vitro* 結合評価系の構築を行い、両者の特異的な結合を定量的に検出可能な評価系であることを明らかにした。第 2 章では、Hsp47 はコラーゲンモデルペプチドの単量体とは結合せず、三量体にのみ特異的に結合することを *in vitro* での検討により明らかにした。加えて、この三量体が熱処理による変性と冷却処理による再形成を起こす、すなわち温度変化による三重らせん構造の可逆性を持つことを示し、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ことを明らかにした。第 3 章では、生細胞の小胞体内において、BiFC を原理とした方法により Hsp47 とコラーゲンモデルペプチドの相互作用を可視化することに成功し、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を明らかにした。

本研究は、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、一本鎖は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* 及び生細胞内においての直接的な証拠を初めて提示するものである。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一過的に結合することで、そのフォールディングに寄与することが明確となった。

加えて、本研究において得られた知見は、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。

実験材料及び方法

1. 試薬

コラーゲンモデルペプチド Bio-CP1 及び Bio-CP2 は東レリサーチセンターに合成を依頼した。Streptavidin-XL665 (SA-XL665) 及び anti-GST-europium-cryptate (anti-GST-Eu-K) は Cisbio international より購入した。その他の試薬は特記したものを除き、市販の特級品を使用した。

2. オリゴヌクレオチド

オリゴヌクレオチドは、北海道システム・サイエンス社もしくは Invitrogen 社に合成を依頼した。以下、各オリゴヌクレオチドの名称とその配列(いずれも 5'→3')を示した。また、配列内の主な制限酵素サイトを下線で示した。

Name	Sequence
hHSP47-ATG	GCATATGGCCGCCGAGGTGAAGAAACC
hHSP47-stop	GGTCGACCTATAACTCGTCTCGCATC
cHSP47-ATG	GCATATGGTGCCCTCGGAGGACAGG
cHSP47-stop	GGTCGACCTACAACCTCATCACGCATC
ER-F	CCAAGCTAGCAAGCTTACCATGCGCTCCCTCCTGCTTCTCAGCG- CCTTCTGCCTCCTGGAGGCGGCCCTGGCTAGCAACC
ER-R	GGTTGCTAGCCAGGGCCGCCTCCAGGAGGCAGAAGGCGCTGAG- AAGCAGGAGGGAGCGCATGGTAAGCTTGCTAGCTTGG
CP2-F	CCGGTACCCCTCCAGGTCCTCCAGGTCCTCCAGGTCCTCCAGGT- CCTCCAGGTCCTACAGGTCCAAGAGGTCCTCCAGGTCCTCCAGG- TTAACTCGAGCC
CP2-R	GGCTCGAGTTAACCTGGAGGACCTGGAGGACCTCTTGGACCTGT- AGGACCTGGAGGACCTGGAGGACCTGGAGGACCTGGAGGACCT-

	GGAGGGGTACCGG
hHSP47-ATG2	CGGTACCGCCGCCGAGGTGAAGAAACC
Foldon-F	CCACTCGAGATTCCTGAAGCTCCAAGAGATGGGCAAGCCTACG- TTCGTAAAGATGGCGAATGGGTATTGCTTTCTACCTTTTTATGA- GCGGCCGCACC
Foldon-R	GGTGCGGCCGCTCATAAAAAGGTAGAAAGCAATACCCATTTCG- CCATCTTTACGAACGTAGGCTTGCCCATCTCTTGGAGCTTCAG- GAATCTCGAGTGG
SGY-qF1	GGTCCTCCAGGTTCAAGGCTACATTCCTGAAGCTCC
SGY-qR1	GGAGCTTCAGGAATGTAGCCTGAACCTGGAGGACC
CP2-GA-F	CCGGTACCCCTCCAGCACCTCCAGCACCTCCAGCACCTCCAGCAC- CTCCAGCACCTACAGCACCAAGAGCACCTCCAGCTCCTCCAGCTT- AACTCGAGCC
CP2-GA-R	GGCTCGAGTTAAGCTGGAGGAGCTGGAGGTGCTCTTGGTGCTGTA- GGTGCTGGAGGTGCTGGAGGTGCTGGAGGTGCTGGAGGTGCTGG- AGGGGTACCGG
SGY-qF2	GCTCCTCCAGCTTCAGGCTACATTCCTGAAGCTCC
SGY-qR2	GGAGCTTCAGGAATGTAGCCTGAAGCTGGAGGAGC

3. PCR

KOD -Plus- (TOYOBO) 及び添付のバッファーを用いて以下の反応液を調製し、Peltier Thermal Cycler PTC-200 (MJ Reseach) により 94 °C で 2 分を 1 サイクル後、94 °C で 15 秒、55 °C で 30 秒、68 °C で目的の DNA 1,000 塩基当たり 1 分の反復反応を 35 サイクル行い、68 °C で 5 分を 1 サイクルさせた後、4 °C に保持することで反応を終了させた。

<PCR 反応液>

cDNA 溶液 (10-100 ng)	1 µL
10× PCR Buffer	5 µL
25 mM MgCl ₂	2 µL (終濃度 1 mM)
10 µM Forward primer	1.5 µL (終濃度 300 nM)

10 μ M Reverse primer	1.5 μ L (終濃度 300 nM)
2 mM dNTPs	5 μ L (終濃度 200 μ M)
DMSO	2.5 μ L
滅菌蒸留水	30.5 μ L
<u>KOD - Plus -</u>	<u>1 μL</u>
Total	50 μ L

4. プラスミドの構築

human HSP47 wt、human HSP47 CA mutant、human HSP47 CAYA mutant、及び chicken HSP47 wt cDNA は京都大学再生医科学研究所・永田研究室より供与されたものを用いた。これらの cDNA を用いて、PCR を行い pCR-Blunt II-TOPO ベクター (Invitrogen) にサブクローニングした。Hsp47 は、小胞体に局在するタンパク質のため N 末端に小胞体シグナル配列を有しているが、細胞内の Hsp47 mature form は小胞体シグナル配列が切断された状態である。従って、大腸菌用発現ベクターに組換える各種 Hsp47 cDNA は、小胞体シグナル配列を除去した mature form を使用することとした。いずれも Forward primer は小胞体シグナル配列の直後から (human Hsp47 は開始 Met から数えて 18 番目の Ala から、chicken Hsp47 は 16 番目の Val から) アニールするよう設計し、その直前に *Nde* I サイトを付加した。Reverse primer はいずれも stop コドンの直下に *Sal* I サイトを付加した。用いたプライマーの組み合わせを以下に示す。

<u>目的 cDNA</u>	<u>Forward primer</u>	<u>Reverse primer</u>
human HSP47 wt	hHSP47-ATG	hHSP47-stop
human HSP47 CA	hHSP47-ATG	hHSP47-stop
human HSP47 CAYA	hHSP47-ATG	hHSP47-stop
chicken HSP47 wt	cHSP47-ATG	cHSP47-stop

大腸菌発現用ベクターについては、pET-32a (Novagen) をベースとして、目的タンパク質の N 末に、His tag 及び Glutathione S-transferase (GST) と PreScission protease (GE Healthcare) 認識

配列が融合するよう改変したベクター (pDHGP11, 田辺三菱製薬株式会社・山田和徳博士より供与) を用いた。pCR-Blunt II-TOPO ベクターにサブクローニングした各 cDNA を、それぞれ *Nde* I, *Sal* I により消化し、pDHGP11 に組み込むことにより、大腸菌発現用ベクター pDHGP11-hHSP47 wt, pDHGP11-hHSP47 CA, pDHGP11-hHSP47 CAYA, pDHGP11-cHSP47 wt を構築した。

mKG_N 及び mKG_C を融合させた目的のタンパク質を動物細胞の小胞体に発現させるために、*CoralHue* Fluo-chase Kit (Amalgaam) 付属の動物細胞用 mKG_N 発現ベクター phmKGN-MC 及び mKG_C 発現ベクター phmKGC-MC を改変した。Kozak's sequence 及び human HSP47 (アミノ酸 1-17) 由来の小胞体シグナル配列 (MRSLLLLSAFCLLEAAL) をコードした合成 DNA 両鎖 (ER-F 及び ER-R をアニールした断片) を *Nhe* I により消化し、同じく *Nhe* I により消化した phmKGN-MC 及び phmKGC-MC に組み込むことにより、動物細胞用 mKG_N 小胞体発現ベクター pER-mKGN 及び mKG_C 小胞体発現ベクター pER-mKGC を構築した。

mKG_N 及び mKG_C を融合させるコラーゲンモデルペプチドとしては、Bio-CP2 と同じ配列 (POG POG POG POG POG PTG PRG POG POG) を用いることとした。しかしながら、細胞内においては遺伝子導入により、配列中の Hyp を発現させることができない。そこで、細胞内の P4H により修飾されることを期待し、コラーゲンモデルペプチドとしては、Hyp 部分を全て Pro に置き換えた配列 (CP2×9, PPG PPG PPG PPG PPG PTG PRG PPG PPG) を用いた。

pER-mKGN 及び pER-mKGC と、コラーゲンモデルペプチド CP2×9 をコードする cDNA (合成 DNA 両鎖、CP2-F と CP2-R をアニールした断片) を *Asp* 718 と *Xho* I によりそれぞれ消化し、消化した各ベクターに CP2×9 cDNA 断片を組み込むことにより、pER-mKGN-CP2×9 及び pER-mKGC-CP2×9 を構築した。

目的の制限酵素サイトを付加するため、human HSP47 wt 及び human HSP47 CAYA mutant cDNA を用いて PCR を行い pCR-Blunt II-TOPO ベクターにサブクローニングした。PCR に用

いた N 末 mKG 融合用断片の Forward primer である hHSP47-ATG2 は、小胞体シグナル配列の直後である Ala18 からアニールするよう設計し、その直前に *Asp*718 サイトを付加した。Reverse primer である hHSP47-stop は、stop コドンの直下に *Sal* I サイトを付加した。pCR-Blunt II-TOPO ベクターにサブクローニングした各 cDNA を、それぞれ *Asp*718 と *Sal* I により消化し、*Asp* 718 と *Xho* I により消化した pER-mKGN 及び pER-mKGC にそれぞれ組み込むことにより、pER-mKGN-h47wt、the pER-mKGN-h47CAYA、pER-mKGC-h47wt、the pER-mKGC-h47CAYA を構築した。

Foldon をコラーゲンモデルペプチド CP2×9 の C 末端側に融合させるために、以下の改変を行った。pER-mKGN-CP2×9 及び pER-mKGC-CP2×9 と、Foldon をコードする cDNA (合成 DNA 両鎖、Foldon-F と Foldon-R をアニールした断片、ただし N 末の 3 アミノ酸 Ser-Gly-Tyr が欠損) を *Xho* I と *Not* I によりそれぞれ消化し、消化した各ベクターに Foldon cDNA 断片を組み込むことにより、pER-mKGN-CP2×9F mt 及び pER-mKGC-CP2×9F mt を構築した。これらのプラスミドには、CP2×9 cDNA 配列の直下に stop コドンと *Xho* I サイトが残されたままであるため、SGY-qF1 及び SGY-qR1 を用いた site-directed mutagenesis により、stop コドンと *Xho* I サイトが Ser-Gly-Tyr をコードする配列になるよう、以下のように変異を導入した。

taa ctc gag (stop + <i>Xho</i> I) → tCa GGc TaC (Ser-Gly-Tyr, 大文字が導入した変異)

構築したプラスミドは、pER-mKGN-CP2×9F 及び pER-mKGC-CP2×9F と名付けた。その際、PCR エラーにより連続する Pro-Pro-Gly トリプレットが 3 つと短く、三重らせん構造を形成することができないペプチド PPG×3 (PPG PPG PPG) をコードするプラスミド pER-mKGC-PPG×3F が取得できたため、ネガティブコントロールとして使用した。さらに、ネガティブコントロールとして、CP2×9 の 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, PPA PPA PPA PPA PPA PTA PRA PPA PPA) をコードするプラスミドを構築するために、pER-mKGC-CP2×9F mt と、CP2GA×9 をコードする cDNA (合成 DNA 両鎖、CP2-GA-F と CP2-GA-R をアニールした断片) を *Asp* 718 と *Xho* I によりそれぞれ消化し、消化した

pER-mKGC-CP2×9F mt に CP2GA×9 cDNA 断片を組み込むことにより、pER-mKGC-CP2GA×9F mt を構築した。このプラスミドは、CP2GA×9 cDNA 配列の直下に stop コドンと *Xho* I サイトが残ったままである。そこで、SGY-qF2 及び SGY-qR2 を用いた site-directed mutagenesis により、stop コドンと *Xho* I サイトが Ser-Gly-Tyr をコードする配列になるよう、以下のように変異を導入した。構築したプラスミドは、pER-mKGC-CP2GA×9F と名付けた。

taa ctc gag (stop + <i>Xho</i> I) → tCa GGc TaC (Ser-Gly-Tyr, 大文字が導入した変異)

また、小胞体シグナル配列を除去するために、目的のプラスミドを *Nhe* I により消化し、セルフラーゲーションを行った。構築した小胞体シグナル配列除去後のプラスミドは以下の通りである。

消化前のプラスミド	小胞体シグナル除去後のプラスミド
pER-mKGN-h47wt	pmKGN-h47wt
pER-mKGN-h47CAYA	pmKGN-h47CAYA
pER-mKGC-h47wt	pmKGC-h47wt
pER-mKGC-h47CAYA	pmKGC-h47CAYA
pER-mKGC-PPG×3F	pmKGC-PPG×3F
pER-mKGC-CP2×9F	pmKGC-CP2×9F

構築した全てのプラスミドについて、ABI prism 3130xl DNA sequencer (Applied Biosystems) を用いて塩基配列が正しいことを確認した。

5. 組換え Hsp47 タンパク質の調製

組換えタンパク質を発現させるために用いた大腸菌の宿主には、BL21 (DE3) に、アルギニン をコードするが大腸菌内においてはレアな AGA コドンを認識する tRNA を発現するプラスミド pKArgU3 を組み込んだ、BL21(DE3, pKArgU3) を用いた (Saxena and Walker, 1992)。また、形質転換体の選択のために LB 寒天培地には 100 µg/ml Carbenicillin 及び 30 µg/ml Kanamycin を

加えた。

宿主に発現ベクターを形質転換して得られたシングルコロニーを 1 個選択し、スモールスケールでの発現確認を行った後、精製に必要な菌量の培養を行った。発現確認は、基本的に以下のように行った(培養量、培養条件等は状況に応じて変更した)。

15 ml Tube に 2 ml の ZB 液体培地 (1% NZ amine type A (Wako), 0.5% NaCl; 100 µg/ml Carbenicillin 及び 30 µg/ml Kanamycin を含む) を分注し、そこに滅菌爪楊枝にて拾った少量の菌体を植菌し、30 °C で一晩培養をした。なお植菌の際、レプリカプレートを作製し、発現確認後、タンパク質調製のための培養はレプリカプレートより行った。翌日、培養液を 4 °C、3,000 rpm、5 分間遠心し、沈殿した菌体に、培養液の OD₆₀₀ が約 0.2 になるように、適量の ZB 液体培地を加え、OD₆₀₀ が約 0.4 になるまで 30 °C で 160 rpm にて震盪培養した後、終濃度が 0.1 mM になるように IPTG を添加し、さらに 20 °C で 4 時間以上、同様に震盪培養した。培養液の一部を 2×10^6 cells / µl となるように 6×SDS loading buffer (30 mM Tris-HCl pH 6.8, 6 % SDS, 12 % β-Mercaptoethanol, 20 % Glycerol, 0.1 % Bromophenol blue) を PBS にて 6 倍希釈した溶液 (1×SDS loading buffer) を適量加え、発現を確認するための SDS-PAGE サンプルとした (1 OD₆₀₀ = 5×10^5 cells/µl として計算した)。このサンプルを SDS-PAGE で分離後、CBB 染色により目的タンパク質の発現を確認した。発現を確認した菌体を、レプリカプレートより上記同様に培養し、IPTG による発現誘導後、培養液を 4 °C、5,000 rpm、10 分間遠心し、沈殿を適量の 0.5% NP-40 / PBS (1 mM PMSF 及び 200 倍希釈した Protease Inhibitor Cocktail (Cat.No. P8849, SIGMA) を含む) に懸濁した。さらに、10 mg/ml の Lysozyme 溶液 (Wako) を 1 / 20 量加え、10 分間氷上にて放置した。液体窒素にて凍結後、-80 °C にて一旦保存した。保存した Lysate を融解し、sonication により細胞を破碎した。破碎条件は出力 105W、duty cycle 40%、20 sec、on ice の破碎を 30 秒のインターバルを置いて 3, 4 回繰り返した。破碎後に 4 °C、10,000 rpm、30 分間遠心した。以降の操作はバッチ法により行った。上清にあらかじめ 0.5% NP-40 / PBS (1 mM PMSF を含む) にて平衡化しておいたレジン (Glutathione Sepharose 4B; GE Healthcare) を加え、4 °C、2 時間混和し、

GST 融合タンパク質を吸着させた。GST 融合タンパク質の回収は、オープンカラム法により行った。レジンの 約 40 倍量の 0.5% NP-40 / PBS (1 mM PMSF を含む) 及び Cleavage buffer (150 mM NaCl, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 0.01% NP-40, 50 mM Tris-HCl, pH 7.0) にて洗浄後、適量の溶出バッファー(10 mM glutathione, 50 mM Tris-HCl, pH 8.8) にて溶出させることにより、GST 融合タンパク質を回収した。精製したタンパク質は、SDS-PAGE で分離後、CBB 染色及び Western blotting により精製度を確認した。また、Coomassie Plus Protein Assay Reagent Kit (PIERCE) により、キット付属の BSA をスタンダードに用いて、総タンパク質濃度を計算した。

6. 抗体

以下の抗体を、ウェスタンブロットもしくは免疫蛍光染色に用いた。

<1 次抗体>

マウスモノクローナル抗 Hsp47 抗体 (Stressgen)

マウスモノクローナル抗 mKG_C 抗体 (MBL)

ラビットポリクローナル抗 PDI 抗体 (Stressgen)

<2 次抗体>

HRP 標識抗マウス IgG 抗体 (Santa Cruz Biotechnology)

HRP 標識抗マウス IgG 抗体 (Jackson Immuno Research)

HRP 標識抗ラビット IgG 抗体 (Santa Cruz Biotechnology)

Alexa Fluor 555 標識抗マウス IgG 抗体 (Invitrogen)

Alexa Fluor 488 標識抗ラビット IgG 抗体 (Invitrogen)

7. ウェスタンブロット

1×SDS loading buffer に目的の試料を溶解し、SDS-PAGE により分離した。泳動後のタンパク質は、セミドライ法により PVDF メンブレン (Immobilon Transfer Membrane; MILLIPORE) に転写し、2.5% スキムミルクを含む PBS 溶液でブロッキングを行った後、目的タンパク質に特異的な抗体

を用いて、抗体反応を行った。洗浄後、それぞれに特異的な HRP 標識 2 次抗体を用いて、抗体反応を行った。洗浄後、ECL plus Western Blotting Detection System (Amersham biosciences) を用いて反応させ、LAS 3000 (富士フイルム) にて適当な時間露出することにより検出した。

8. ゲルろ過クロマトグラフィー

生体分子精製用液体クロマトグラフィーシステムとして、Äkta explorer 10S system (GE Healthcare) を用いて、室温で行った。方法はマニュアルに従った。ゲルろ過カラムとしては、Superdex Peptide PE 7.5/300 (GE Healthcare) を用いた。ランニングバッファーとして、PBS を用いた。適当な濃度のコラーゲンモデルペプチド溶液 100 μ l をカラムにアプライし、流速 0.28 ml / min で分離を行った。分離後のフラクションを 0.2 ml ずつ回収し、以降の実験に適宜用いた。なお、分離後の溶液に関しては、OD₂₁₅ 値をリアルタイムにモニターしており、各フラクションのペプチド濃度は、その値を基に算出した。

9. TR-FRET を原理とした *in vitro* 結合評価

各溶液を結合バッファー (150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.01% Nonidet P-40, 0.1% BSA, 100 mM potassium fluoride, 50 mM HEPES-NaOH, pH 7.9) により適当な濃度になるよう希釈し、384-well Small Volume LoBase PS white plate (Cat. No. 788075, Greiner) に以下の組成となるように各溶液を順次加え、室温で 2 時間反応させた。

<反応溶液>

40 nM recombinant GST-Hsp47 protein	5 μ L	(終濃度 10 nM)
4X nM Bio-CP1 or Bio-CP2	5 μ L	(終濃度 X nM)
334 nM SA-XL665	5 μ L	(終濃度 83.4 nM)
1.48 nM anti-GST-Eu-K	5 μ L	(終濃度 0.37 nM)
Total	20 μ L	

その後、Analyst GT multimode plate reader (Molecular Devices) を用いて、波長 337 nm の励起光を当てた後、50 μ s 後に波長 620 nm 及び 665 nm の蛍光を測定した。結合の指標としての Ratio 値は、以下の計算式により算出した。

$$\text{Ratio} = [(\text{emission at 665 nm} / \text{emission at 620 nm}) \times 10^4]$$

10. 細胞培養

HeLa 細胞は、10% 非働化ウシ胎児血清 (CCT) 及び 1% Penicillin-Streptomycin (Invitrogen) を含むダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM; Invitrogen) を用いて、37 °C、5% CO₂ 存在下で培養した。継代は、0.05% Trypsin-0.02% EDTA 溶液により処理することで接着面より剥離させた細胞に、適当量の培地を加えた後、適当な倍率で希釈することで行った。

11. トランスフェクション

トランスフェクションは、Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いて行った。方法は試薬添付のプロトコールに準じて行った。90-100% confluent になるよう 12 well-plate に播種した HeLa 細胞を用いた。37 °Cに加温しておいた OPTI-MEM I Reduced Serum Medium (Invitrogen) 300 μ l 中に Lipofectamine 2000 を 4 μ l 加え、室温で 5 分間静置した後、目的のプラスミド DNA を総量 1 μ g となるよう加え、室温で 20 分間静置した。その間に、トランスフェクトする細胞を播種したウェル中の培地を吸引し、37 °Cで加温した 14.3% FBS を含む DMEM を 700 μ l に培地を交換した。プラスミド DNA を含む Lipofectamine 2000 溶液を穏やかに添加し、37 °C、5% CO₂ 存在下で目的の時間まで培養した。

12. 免疫蛍光染色

免疫染色を行う細胞を、PBS 溶液で 1 回洗浄後、37 °Cで温めた 4% パラホルムアルデヒド溶液に 37 °C 20 分間浸すことにより固定した。PBS 溶液で 3 回洗浄後、0.1% Triton X-100 溶液にて 5 分間細胞膜浸透処理を行った。非特異的な結合を防ぐために、2% BSA を含む PBS 溶液にて室温で 30 分間ブロッキング処理を行った。その後、染色を行う 1 次抗体、続いて 2 次抗体にて抗体反応を行った。核染色は 1 µg/ml Hoechst 33342 (Invitrogen) により行った。蛍光画像は、IN Cell Analyzer 1000 (GE Healthcare) により取得した。

13. BiFC 法を原理とした細胞内相互作用の検出

HeLa 細胞に目的の発現ベクターをトランスフェクトした 24 時間後、Optilux 96-well microplate (Cat. No. 353948, BD Falcon) に適当な細胞数で播種した。その 1 日もしくは 2 日後、培地を吸引し PBS 溶液で 1 回洗浄した後、終濃度 1 µg/ml の Hoechst 33342 を含む OPTI-MEM I reduced serum medium (Invitrogen) を添加した。その後、Hoechst 33342 により染色された核及び再構成された mKG の蛍光像を IN Cell Analyzer 1000 により取得した。

参考文献

Bulleid, N.J., Wilson, R., Lees, J.F. (1996). Type-III procollagen assembly in semi-intact cells: chain association, nucleation and triple-helix folding do not require formation of inter-chain disulphide bonds but triple-helix nucleation does require hydroxylation. *Biochem. J.* **317**: 195-202.

Byers, P.H. (2001). Folding defects in fibrillar collagens. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **356**: 151-157.

Chessler, S.D., Byers, P.H. (1993). BiP binds type I procollagen pro alpha chains with mutations in the carboxyl-terminal propeptide synthesized by cells from patients with osteogenesis imperfecta. *J. Biol. Chem.* **268**: 18226-18233.

Doi, M., Nishi, Y., Uchiyama, S., Nishiuchi, Y., Nakazawa, T., Ohkubo, T., Kobayashi, Y. (2003). Characterization of collagen model peptides containing 4-fluoroproline; (4(S)-fluoroproline-pro-gly)₁₀ forms a triple helix, but (4(R)-fluoroproline-pro-gly)₁₀ does not. *J. Am. Chem. Soc.* **125**: 9922-9923.

Du, C., Wang, M., Liu, J., Pan, M., Cai, Y., Yao, J. (2008). Improvement of thermostability of recombinant collagen-like protein by incorporating a foldon sequence. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **79**: 195-202.

Ferreira, L.R., Norris, K., Smith, T., Hebert, C., Sauk, J.J. (1994). Association of Hsp47, Grp78, and Grp94 with procollagen supports the successive or coupled action of molecular chaperones. *J. Cell. Biochem.* **56**: 518-526.

Frank, S., Kammerer, R.A., Mechling, D., Schulthess, T., Landwehr, R., Bann, J., Guo, Y., Lustig, A., Bachinger, H.P., Engel, J. (2001). Stabilization of short collagen-like triple helices by protein engineering. *J. Mol. Biol.* **308**: 1081-1089.

Gordon, M.K., Hahn, R.A. (2010). Collagens. *Cell. Tissue. Res.* **339**: 247-257.

Ishida, Y., Kubota, H., Yamamoto, A., Kitamura, A., Bachinger, H.P., Nagata, K. (2006). Type I collagen in Hsp47-null cells is aggregated in endoplasmic reticulum and deficient in N-propeptide processing and fibrillogenesis. *Mol. Biol. Cell.* **17**: 2346-2355.

Koide, T., Asada, S., Nagata, K. (1999). Substrate recognition of collagen-specific molecular chaperone HSP47. Structural requirements and binding regulation. *J. Biol. Chem.* **274**: 34523-34526.

Koide, T., Takahara, Y., Asada, S., Nagata, K. (2002). Xaa-Arg-Gly triplets in the collagen triple helix are dominant binding sites for the molecular chaperone HSP47. *J. Biol. Chem.* **277**: 6178-6182.

Koide, T., Asada, S., Takahara, Y., Nishikawa, Y., Nagata, K., Kitagawa, K. (2006). Specific recognition of the collagen triple helix by chaperone HSP47: minimal structural requirement and spatial molecular orientation. *J. Biol. Chem.* **281**: 3432-3438.

Koide, T., Nishikawa, Y., Asada, S., Yamazaki, C.M., Takahara, Y., Homma, D.L., Otaka, A., Ohtani, K., Wakamiya, N., Nagata, K., *et al.* (2006). Specific recognition of the collagen triple helix by chaperone HSP47. II. The HSP47-binding structural motif in collagens and related proteins. *J. Biol. Chem.* **281**: 11177-11185.

Koyama, H., Raines, E.W., Bornfeldt, K.E., Roberts, J.M., Ross, R. (1996). Fibrillar collagen inhibits arterial smooth muscle proliferation through regulation of Cdk2 inhibitors. *Cell.* **87**: 1069-1078.

Marini, J.C., Forlino, A., Cabral, W.A., Barnes, A.M., San, Antonio J.D., Milgrom, S., Hyland, J.C., Korkko, J., Prockop, D.J., De, Paepe A., *et al.* (2007). Consortium for osteogenesis imperfecta mutations in the helical domain of type I collagen: regions rich in lethal mutations align with collagen binding sites for integrins and proteoglycans. *Hum. Mutat.* **28**: 209-221.

Marutani, T., Yamamoto, A., Nagai, N., Kubota, H., Nagata, K. (2004). Accumulation of type IV collagen in dilated ER leads to apoptosis in Hsp47-knockout mouse embryos via induction of CHOP. *J. Cell. Sci.* **117**: 5913-5922.

Matsuoka, Y., Kubota, H., Adachi, E., Nagai, N., Marutani, T., Hosokawa, N., Nagata, K. (2004). Insufficient folding of type IV collagen and formation of abnormal basement membrane-like structure in embryoid bodies derived from Hsp47-null embryonic stem cells. *Mol. Biol. Cell.* **15**: 4467-4475.

Meier, S., Guthe, S., Kiefhaber, T., Grzesiek, S. (2004). Foldon, the natural trimerization domain of T4 fibrin, dissociates into a monomeric A-state form containing a stable beta-hairpin: atomic details of trimer dissociation and local beta-hairpin stability from residual dipolar couplings. *J. Mol. Biol.* **344**: 1051-1069.

Nagai, N., Hosokawa, M., Itohara, S., Adachi, E., Matsushita, T., Hosokawa, N., Nagata, K. (2000). Embryonic lethality of molecular chaperone hsp47 knockout mice is associated with defects in collagen biosynthesis. *J. Cell. Biol.* **150**: 1499-1506.

Nagata, K., Saga, S., Yamada, K.M. (1986). A major collagen-binding protein of chick embryo fibroblasts is a novel heat shock protein. *J. Cell. Biol.* **103**: 223-229.

Nagata, K. (2003). HSP47 as a collagen-specific molecular chaperone: function and expression in normal mouse development. *Semin. Cell. Dev. Biol.* **14**: 275-282.

Nakai, A., Satoh, M., Hirayoshi, K., Nagata, K. (1992). Involvement of the stress protein HSP47 in procollagen processing in the endoplasmic reticulum. *J. Cell. Biol.* **117**: 903-914.

Natsume, T., Koide, T., Yokota, S., Hirayoshi, K., Nagata, K. (1994). Interactions between collagen-binding stress protein HSP47 and collagen. Analysis of kinetic parameters by surface plasmon resonance biosensor. *J. Biol. Chem.* **269**: 31224-31228.

Nishikawa, Y., Takahara, Y., Asada, S., Shigenaga, A., Otaka, A., Kitagawa, K., Koide, T. (2010). A structure-activity relationship study elucidating the mechanism of sequence-specific collagen recognition by the chaperone HSP47. *Bioorg. Med. Chem.* **18**: 3767-3775.

- Okano-Kosugi, H., Matsushita, O., Asada, S., Herr, A.B., Kitagawa, K., Koide, T. (2009). Development of a high-throughput screening system for the compounds that inhibit collagen-protein interactions. *Anal. Biochem.* **394**: 125-131.
- Ono, T., Kitaura, H., Ugai, H., Murata, T., Yokoyama, K.K., Iguchi-Ariga, S.M., Ariga, H. (2000). TOK-1, a novel p21Cip1-binding protein that cooperatively enhances p21-dependent inhibitory activity toward CDK2 kinase. *J. Biol. Chem.* **275**: 31145-31154.
- Ono, T., Miyazaki, T., Ishida, Y., Uehata, M., Nagata, K. (2012). Direct in vitro and in vivo evidence for interaction between Hsp47 protein and collagen triple helix. *J. Biol. Chem.* **287**: 6810-6818.
- Ono, T., Suzuki, Y., Kato, Y., Fujita, R., Araki, T., Yamashita, T., Kato, H., Torii, R., Sato, N. (2014). A single-cell and feeder-free culture system for monkey embryonic stem cells. *PLoS. One.* **9**: e88346.
- Prockop, D.J., Kivirikko, K.I. (1995). Collagens: molecular biology, diseases, and potentials for therapy. *Annu. Rev. Biochem.* **64**: 403-434.
- Saga, S., Nagata, K., Chen, W.T., Yamada, K.M. (1987). pH-dependent function, purification, and intracellular location of a major collagen-binding glycoprotein. *J. Cell. Biol.* **105**: 517-527.
- Sato, Y., Murase, K., Kato, J., Kobune, M., Sato, T., Kawano, Y., Takimoto, R., Takada, K., Miyanishi, K., Matsunaga, T., *et al.* (2008). Resolution of liver cirrhosis using vitamin A-coupled liposomes to deliver siRNA against a collagen-specific chaperone. *Nat. Biotechnol.* **26**: 431-442.
- Saxena, P., Walker, J.R. (1992). Expression of argU, the Escherichia coli gene coding for a rare arginine tRNA. *J. Bacteriol.* **174**: 1956-1964.
- Soderhall, C., Marenholz, I., Kerscher, T., Ruschendorf, F., Esparza-Gordillo, J., Worm, M., Gruber, C., Mayr, G., Albrecht, M., Rohde, K., *et al.* (2007). Variants in a novel epidermal collagen gene (COL29A1) are associated with atopic dermatitis. *PLoS. Biol.* **5**: e242.

Stetefeld, J., Frank, S., Jenny, M., Schulthess, T., Kammerer, R.A., Boudko, S., Landwehr, R., Okuyama, K., Engel, J. (2003). Collagen stabilization at atomic level: crystal structure of designed (GlyProPro)₁₀foldon. *Structure*. **11**: 339-346.

Tasab, M., Batten, M.R., Bulleid, N.J. (2000). Hsp47: a molecular chaperone that interacts with and stabilizes correctly-folded procollagen. *EMBO. J.* **19**: 2204-2211.

Tasab, M., Jenkinson, L., Bulleid, N.J. (2002). Sequence-specific recognition of collagen triple helices by the collagen-specific molecular chaperone HSP47. *J. Biol. Chem.* **277**: 35007-35012.

Thomson, C.A., Tenni, R., Ananthanarayanan, V.S. (2003). Mapping Hsp47 binding site(s) using CNBr peptides derived from type I and type II collagen. *Protein. Sci.* **12**: 1792-1800.

Ueyama, T., Kusakabe, T., Karasawa, S., Kawasaki, T., Shimizu, A., Son, J., Leto, T.L., Miyawaki, A., Saito, N. (2008). Sequential binding of cytosolic Phox complex to phagosomes through regulated adaptor proteins: evaluation using the novel monomeric Kusabira-Green System and live imaging of phagocytosis. *J. Immunol.* **181**: 629-640.

Wall, S.J., Zhong, Z.D., DeClerck, Y.A. (2007). The cyclin-dependent kinase inhibitors p15INK4B and p21CIP1 are critical regulators of fibrillar collagen-induced tumor cell cycle arrest. *J. Biol. Chem.* **282**: 24471-24476.

Walmsley, A.R., Batten, M.R., Lad, U., Bulleid, N.J. (1999). Intracellular retention of procollagen within the endoplasmic reticulum is mediated by prolyl 4-hydroxylase. *J. Biol. Chem.* **274**: 14884-14892.

Wilson, R., Lees, J.F., Bulleid, N.J. (1998). Protein disulfide isomerase acts as a molecular chaperone during the assembly of procollagen. *J. Biol. Chem.* **273**: 9637-9643.

謝辞

本論文の発表ならびに作成にあたり、終始多大なるご指導、ご高配を賜りました、北海道大学大学院生命研究院 有賀 寛芳 特任教授に深く感謝の意を表し、厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり、終始多大なる御指導御鞭撻を賜りました、京都大学 再生医科学研究所(現 京都産業大学 総合生命科学部) 永田 和宏 教授に謹んで感謝申し上げます。

また、本論文を審査して頂き、的確なご助言を賜りました北海道大学大学院生命研究院 木原章雄 教授、佐々 貴之 講師、米田 宏 講師に謹んで感謝申し上げます。

本研究の機会を与えてくださり、貴重なご助言とご支援を頂くとともに学位取得に向けてご激励を頂きました、田辺三菱製薬株式会社 研究本部 探索スクリーニングセンター 上畑 雅義 博士、佐藤 直也 博士、湯浅 聡 博士、杉田 尚久 博士、松本 健 博士、大菊 鋼 博士に心より深く御礼申し上げます。

本研究の遂行ならびに本論文の発表にあたり、終始有益なご助言、ご討論を頂きました、京都大学 再生医科学研究所 (現 塩野義製薬株式会社) 石田 義人 博士、埼玉医科大学 ゲノム医学研究センター 加藤 英政 講師、滋賀医科大学 動物生命科学研究センター 鳥居 隆三 教授、田辺三菱製薬株式会社 研究本部 探索スクリーニングセンター 鈴木 豊 博士、加藤 洋輔 氏、藤田 梨紗子 氏、荒木 利博 氏、山下 智子 氏、北海道大学大学院生命研究院 北浦 廣剛 助教に深く感謝致します。

本研究の遂行にあたり、実験にご協力いただきました田辺三菱製薬株式会社 CMC 本部 プロセス研究所 宮崎 貴広 氏、田辺三菱製薬株式会社 研究本部 探索スクリーニングセンター 礒辺 里奈 氏、大藏 広子 氏に感謝申し上げます。

本研究の遂行にあたり、プラスミドを供与頂きました、田辺三菱製薬株式会社 研究本部 探索スクリーニングセンター 山田 和徳 博士に感謝申し上げます。

最後に、本研究の遂行ならびに本論文の作成にあたり、ご協力頂きました全ての皆様に心より感謝申し上げます。

2014 年 8 月