

氏名	あさ だ しん いち 浅 田 真 一
学位(専攻分野)	博士 (医学)
学位記番号	医博第2161号
学位授与の日付	平成11年9月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	医学研究科分子医学系専攻
学位論文題目	The effect of HSP 47 on prolyl-4-hydroxylation of collagen model peptides (コラーゲンモデルペプチドのプロリン4-水酸化に対するHSP 47の影響)

論文調査委員 (主査) 教授 上田國寛 教授 月田承一郎 教授 永田和宏

### 論文内容の要旨

コラーゲンの生合成においてプロリン残基の4-水酸化はコラーゲン3本らせんの安定化に重要な役割を果たしている。また、TypeIコラーゲン上のリジン残基に対する過剰な水酸化がコラーゲン繊維形成に異常を起こすことや、コラーゲン疾患であるOsteogenesis Imperfecta (OI)の患者でコラーゲン上のプロリン残基の水酸化が正常の場合に比べて多く、水酸化の量と疾患の度合いに相関のあることが報告されており、コラーゲンに対する水酸化がコラーゲン繊維形成に対しても、深く関与していると考えられている。プロリン残基4位水酸化は翻訳後修飾であり小胞体内のprolyl 4-hydroxylase (P4-H)によって行われる。同じく小胞体に局在するストレス蛋白質HSP 47はコラーゲン結合能を有し、その生合成に必須のコラーゲン特異的シャペロンである。

HSP 47とP4-Hは共にコラーゲンの3本螺旋を形成するX-Pro-Glyの繰り返し配列を認識し、コラーゲンモデルペプチド(Pro-Pro-Gly)<sub>n</sub>に結合することが明らかとなっている。本研究ではHSP 47のプロコラーゲンプロリン水酸化に対する影響を検討するため、HSP 47共存下、非共存下に於ける(Pro-Pro-Gly)<sub>8</sub>モデルペプチド基質のinvitroプロリン4-水酸化について調べた。水酸化反応はこれまで水酸化プロリンへの<sup>3</sup>Hの取り込み量や、反応副産物である<sup>14</sup>CラベルしたCO<sub>2</sub>の合成量を追跡する、といったRIを用いる方法があるが、これらの検出法では基質に対していくつもの水酸基が付加されたかが不明である。そこで、申請者は水酸化反応の追跡法として、逆相HPLCを用いた新規検出法を確立した。この検出法を用いることにより、コラーゲンモデルペプチドに対する多段階水酸化反応の各反応を個別に検出することが可能となった。

次に水酸化反応に対するHSP 47の影響を調べるために、基質と等モルのGST-HSP 47融合タンパク質共存下で反応を行った。その結果、反応時間90分では未反応基質の量がcontrolに比べて約4倍残っており、HSP 47は水酸化反応を抑制することが見いだされた。さらにこの反応をGST-HSP 47存在下で時間経過を追って観察し、速度論的解析を行ったところ、水酸化反応のいずれのステップにおいてもHSP 47がP4-Hの反応を抑制していることが明らかとなった。さらに申請者はこれらコラーゲン様ペプチドに対する結合能のない、His<sup>220</sup>をAlaに置換したGST-HSP 47を作成した。この変異体ではP4-Hの水酸化反応に対する抑制効果は見られなかったことより、この効果はHSP 47の基質結合性によるものであると結論づけた。

HSP 47がP4-Hに直接結合して水酸化反応を抑制しているのか、それとも基質を取り合う形で競合的に抑制しているのかを調べるためにP4-HとGST-HSP 47のinvitro結合実験を行った。その結果、GST-HSP 47を固定化したビーズ特異的に結合するP4-Hは検出されず、P4-HとGST-HSP 47の間には直接の相互作用は見いだされなかった。また、P4-Hの基質として水酸化は受けるが、HSP 47には結合しないペプチド基質である(Ala-Pro-Gly)<sub>8</sub>を用い、このペプチドへの水酸化反応に対するHSP 47の影響を調べたところ、HSP 47によるプロリン水酸化に対する特異的な抑制効果は見られなかった。以上の実験結果より、HSP 47はP4-Hの基質と競合することによってプロリン水酸化を遅らせることが明らかに

なった。既に申請者らは HSP 47 のコラーゲンへの結合は水酸化によって調節されていることを報告している。コラーゲン繊維形成時における適切な水酸化が重要で、水酸化が過剰な場合や少ない場合にはコラーゲン繊維に異常を生じることが知られている。つまり、コラーゲンに対する水酸化反応は微妙なバランスを保つ必要がある。今回の結果は、コラーゲンの生合成における適切な水酸化過程に対して HSP 47 が直接関与していることを示唆するものである。

HSP 47 のプロリン水酸化に対する抑制は強い効果ではない。P4-H はコラーゲン様ペプチドが 1 本鎖の状態をより好んで水酸化するのに対して、HSP 47 は 3 本らせん構造のコラーゲン様ペプチドをより好んで結合することが報告されている。HSP 47 がコラーゲン様ペプチドのとりうる 1 本鎖と 3 本鎖の平衡状態を 3 本鎖側にずらすことにより、P4-H の水酸化に対して抑制的に働いていると申請者は考えている。

### 論文審査の結果の要旨

小胞体に局在するストレス蛋白質 HSP 47 はコラーゲン結合能を有する分子シャペロンである。

プロコラーゲンは小胞体内の prolyl 4-hydroxylase (P4-H) によって、プロリン残基の 4-水酸化を受ける。コラーゲンに対する過剰な水酸化がコラーゲン繊維形成に異常を起こすことや、コラーゲン疾患である Osteogenesis Imperfecta の患者では水酸化の量と疾患の度合いに相関があり、コラーゲンに対する水酸化がコラーゲン繊維形成に深く関与していると考えられている。

本研究では HSP 47 のプロコラーゲンのプロリン水酸化に対する影響を検討するため、HSP 47 が P4-H によるコラーゲンモデルペプチド基質の *in vitro* プロリン 4-水酸化に対しどのような影響を与えるかについて調べた。

P4-H の水酸化反応に HSP 47 を加えたところ、HSP 47 は水酸化反応を抑制することが見いだされた。速度論的解析から、多段階水酸化反応のいずれのステップにおいても HSP 47 が P4-H の反応を抑制していることが明らかとなった。HSP 47 と P4-H との直接的な結合は見いだされず、HSP 47 は P4-H と基質を競合することによってプロリン水酸化を遅らせることが明らかになった。今回の結果は、コラーゲンの生合成における適切な水酸化過程に対して HSP 47 が直接関与していることを示唆している。

以上の研究は、HSP 47 がコラーゲンの水酸化に対して重要な役割を果たしていることを分子レベルで明らかにしたものであり、水酸化異常に起因するコラーゲン疾患の原因解明および治療に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成 11 年 8 月 5 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。