

氏 名	まつ 松 岡 やす 泰 ひろ 弘
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	理 博 第 2929 号
学位授与の日付	平 成 17 年 3 月 23 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	理 学 研 究 科 生 物 科 学 専 攻
学位論文題目	コラーゲン特異的分子シャペロン HSP47 の機能解析

論文調査委員 (主 査) 教 授 永 田 和 宏 教 授 平 野 丈 夫 助 教 授 吉 田 秀 郎

論 文 内 容 の 要 旨

HSP47 は、小胞体内在性のコラーゲン特異的分子シャペロンである。申請者の所属する研究室では、HSP47 の欠失マウスが、I 型コラーゲンの成熟阻害と基底膜の形成異常がおこる事をすでに報告している (Nagai *et al.*, 2000)。そこで本研究では、HSP47 遺伝子のノックアウト ES 細胞から、基底膜形成モデルである胚様体 (embryoid body ; EB) を形成させる実験系を確立し、IV 型コラーゲンの分子成熟過程と基底膜形成に果たす HSP47 の役割について解析した。まず、EB の薄切切片に対し、免疫染色法により基底膜の主成分である IV 型コラーゲンの分布を調べたところ、野生型 ($HSP47^{+/+}$) では、EB を囲む臓側内胚葉 (visceral endoderm: VE) の直下が連続的に強く染色され、VE 細胞は基底膜様構造に沿って整った配向を示した。一方、 $HSP47$ ノックアウト ($HSP47^{-/-}$) では、VE 下の広い範囲が弱く染色され、VE 細胞の配向が乱れていた。これらの結果は、 $HSP47^{-/-}$ では、基底膜が正常に機能していない事を示唆しており、この基底膜の機能不全は IV 型コラーゲン分子に起因する事が予想された。そこで申請者は、IV 型コラーゲン分子に着目した詳細な解析を行い、パルスラベルした IV 型コラーゲンの分泌速度を調べると、 $HSP47^{-/-}$ の IV 型コラーゲン分泌速度は、 $HSP47^{+/+}$ に比べ 1/4 に低下している事が見出された。更に、 $HSP47^{-/-}$ から分泌された IV 型コラーゲンは、 $HSP47^{+/+}$ 由来のものに比べ遙かに高いプロテアーゼ感受性を示していた。この事は、HSP47 の欠失によって、IV 型コラーゲンが正しい三重らせん構造を形成していない事を示唆していた。以上の結果は、HSP47 が IV 型コラーゲンの分子成熟に必須の分子であり、 $HSP47^{-/-}$ では IV 型コラーゲンが正しい分子構造にフォールディングされないため、機能的な基底膜が形成されない事を示すものである。

そこで、HSP47 のコラーゲンフォールディング介助機構の詳細を解明するため、HSP47 がどのような部位でコラーゲンと結合し、コラーゲン三重らせん構造の形成/安定化を促進するのかについて、*in vitro* の実験から解析する事にした。コラーゲンとの結合に関わる HSP47 上のアミノ酸残基を探索するため、酵母ツーハイブリッド法によりコラーゲン結合能が低下する HSP47 変異体のスクリーニングを行なった。ツーハイブリッド法や、コラーゲンセファロースビーズを用いた pull-down 実験から、コラーゲン結合能を著しく低下させる 18 の HSP47 変異体を単離し、このうち 12 個の変異体が、側鎖に芳香環を持つチロシン (Tyr)、フェニルアラニン (Phe) である事を見出した。また、HSP47 が属するセリンプロテアーゼインヒビター (serin protease inhibitor : serpin) ファミリーの一員である $\alpha 1$ -アンチトリプシンとのホモロジーによる分子構造モデルに、これらのアミノ酸残基をマッピングすると、serpin の活性中心ループ近傍の疎水表面に集中していた。これらの知見は、HSP47 が Tyr や Phe 等からなる疎水的なクラスターを介してコラーゲンと結合している事を示唆すると共に、HSP47 はプロテアーゼインヒビターの活性は失ったものの、serpin ファミリー共通の活性部位を使ってシャペロン活性を発揮している事が示唆された。

論文審査の結果の要旨

HSP47は、小胞体内在性のコラーゲン特異的分子シャペロンであり、HSP47の欠失マウスが、I型コラーゲンの成熟阻害とIV型コラーゲンを主成分とする基底膜の形成異常がおこる事がすでに報告されている(Nagai *et al.*, 2000)。しかし、IV型コラーゲンの分子成熟に果たすHSP47の細胞内での役割については、未解明のままであった。そこで申請者は、本研究において、HSP47遺伝子のノックアウトES細胞から、基底膜形成モデルである胚様体(embryoid body ; EB)を形成し、IV型コラーゲンの分子成熟過程と基底膜形成に果たすHSP47の役割について解析した。また、HSP47のコラーゲンフォールディング介助機構の詳細を解明するため、酵母ツーハイブリッド法によるHSP47の基質認識部位の解析を行なった。本論文において、これらの解析結果を報告している。

申請者は、細胞生物学的な手法を駆使し、*HSP47*^{-/-}EBでは臓側内胚葉細胞の配向が乱れている事、そして*HSP47*^{-/-}細胞のIV型コラーゲン分泌速度は、*HSP47*^{+/+}に比べ1/4に低下しており、分泌されたIV型コラーゲンは*HSP47*^{+/+}由来のものに比べ遙かに高いプロテアーゼ感受性を示すことを見出した。この事は、HSP47の欠失によって、IV型コラーゲンが正しい三重らせん構造を形成していない事を示唆していた。以上の結果から、HSP47がIV型コラーゲンの分子成熟に必須の分子であり、*HSP47*^{-/-}細胞ではIV型コラーゲンが正しい分子構造にフォールディングされないため、機能的な基底膜が形成されない事が明らかとなった。また、申請者は、酵母ツーハイブリッド法やコラーゲンセファロースビーズを用いたpull-down実験から、コラーゲン結合能を著しく低下させる18のHSP47変異体を単離し、このうち12個の変異体が、側鎖に芳香環を持つ疎水的なアミノ酸残基である事を見出した。また、HSP47の分子構造モデルにこれらのアミノ酸残基をマッピングすると、serpinの活性中心ループ近傍の疎水表面に集中していた。以上の事から、HSP47は活性中心ループ近傍の疎水的なアミノ酸残基を介してコラーゲンと結合し、コラーゲン分子の安定化を促進する事が示唆された。

本研究は、in vitro レベルから生体レベルの解析を通して、HSP47がコラーゲン分子の成熟や機能的な組織の形成に不可欠の分子シャペロンである事を解明したものである。HSP47は、ATP加水分解やプロテアーゼの阻害といった特徴的な活性を持たないにも関わらず種を超えて保存され、コラーゲンのプロダクティブフォールディングを促進しているという事実は極めて興味深い。従って、本研究は、ATP加水分解のような特徴的な活性を持たないシャペロンタンパク質の作用機序を理解するという観点からも、重要な意義があると考えられる。

よって、本論文は博士(理学)の学位論文として価値あるものと認めた。また、論文内容とそれに関連した事項に関する試問を行なった結果から、申請者を合格であると認めた。