

## 第2章 細胞外マトリックス成分の構造と機能

### 2.1 コラーゲン

#### 2.1.1 コラーゲン及びその遺伝子の構造

##### 1) はじめに

コラーゲンは他の蛋白と同様に遺伝情報に従ってその構造、合成量などが規定されている。コラーゲンについての分子生物学、生化学の研究は最近著しく進歩し、その構造の詳細が解明されてきた。コラーゲンというキーワードで文献検索すると一年に1000を下らない論文が発表されている。コラーゲンの性質を一般的に概説するにはコラーゲンファミリーに属するタンパク質の構造および機能は多様すぎるようにも思われる。現在のところ、分子の種類で13以上、ポリペプチド鎖の種類で22以上が報告されている。コラーゲンの定義を分子内にコラーゲンらせん構を持つタンパク質とすれば、これらの外にも数種以上が存在する。例えば、アセチルコリンエ斯特ラーゼや補体のC1qがある。一般的にコラーゲンに共通する性質で他のタンパク質と異なることの中、最も顕著なことはコラーゲンタンパク質は単独で存在する一個の分子としての機能は無く、数多くの分子が会合をして高次構造体を形成してはじめて生体内でその役割を果たしている。そうすると、会合体の構造およびその機能が問題になってくる。いわばコラーゲンは細胞外の種々の“オルガネラ”を構築する主要な成分ともいえる。コラーゲン会合体の大きさは細胞内のオルガネラさらには細胞、細胞集団のオーダーにも相当することになるので、コラーゲンの化学構造の詳細だけ、例えば、原子の結合状態のみに注目していると“木を見て森を見ず”ということになる。ともかく木(分子)についてはその枝や一枚一枚の葉も見えてきている。これらの情報をもとに森林(会合体)を見るという作業をすべきであろう。細胞は森の中の動物というところか。

##### 2) コラーゲンタンパク質の化学的特徴

表1に球状タンパク質と比較した場合のコラーゲンタンパク質の特徴をまとめた。以下にその詳細を化学構造上の特徴との関連で述べる。

表1 球状タンパク質と比較したコラーゲンタンパク質の特徴

アミノ酸組成	疎水性アミノ酸含量が低い 平均アミノ酸残基分子量が小さい プロリンが多い グリシンが約1/3ある 塩基性アミノ酸含量が酸性アミノ酸含量より高く、等電点が塩基性側にある ヒドロキシプロリン、ヒドロキシリジンがある
溶解度	酸性溶液によく溶け、塩基性溶液に溶けにくい 37°Cまでは高温になるほど溶解度が低くなる 変性すると溶解度が増す グルコースなどポリオールの存在で溶解度が増す
分子の形状	極めて細長い棒状である 分子表面に疎水基が露出している
電気泳動	SDS電気泳動で分子量より遅れて移動する 尿素の存在でさらに一層遅れる
色素との相互作用	クーマジーブリリアントブルーG-250のスペクトルを変えない クーマジーブリリアントブルーR-250染色で赤く染まる

### (1) アミノ酸組成

コラーゲンのアミノ酸組成の特徴はグリシン（一文字アルファベット表記でG）が全体の約1/3を占めることである。残りの2/3のうちの約1/3すなわち全体の約2/9がプロリン(P)あるいはヒドロキシプロリン(Hyp, 対応する一文字アルファベット表記法はないので従来の三文字で表わす)からなっている。Hypはコラーゲン遺伝子の翻訳ペプチド上のPが分子状の酸素により4位の炭素が水素化されて生成される(図1)。イミノ酸(プロリンあるいはヒドロキシプロリン)含量は動物の種類、とくにその動物の棲息する体温の上限によって異なり<sup>3)</sup>、2/9というのは鳥類、ほ乳類など恒温動物の場合である。すなわち、コラーゲンの構造の熱安定性<sup>1,2)</sup>はイミノ酸含量に特に、Hypの量によって決まっている。変温動物例えば魚の場合、外界の温度に応じた変性温度およびイミノ酸含量の低下が見られる。他の球状タンパク質と異なり、コラーゲンは疎水性のアミノ酸残基の含量が著しく低い。

Hypはコラーゲン以外のタンパク質には殆どみられず(但し、エラスチンにはわずかに存在する)、また、ペプチド中に組み込まれたP(プロリン)のみが水酸化をうけてHypになることから、Hypの定量を行うことにより、コラーゲン量を測定できる。(Hyp含量が約10%であるので、Hypが100μgで、コラーゲンとしては約1mgとなる。) Hypの定

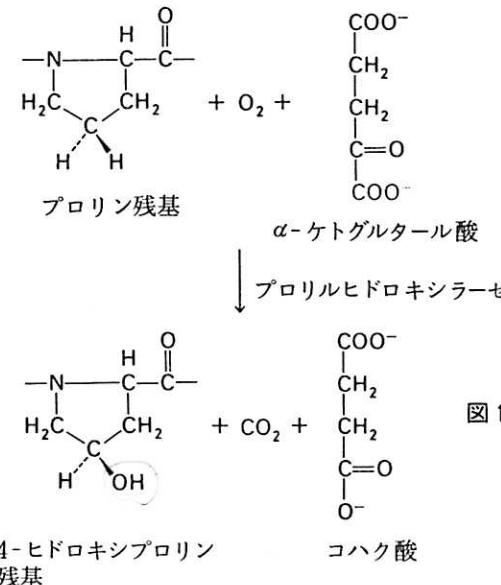


図1 プロリン残基の水酸化によるヒドロキシプロリンの生成。酵素プロリルヒドロキシラーゼが分子状の酸素の添加をする。

量は全コラーゲンタンパク質の合成量、分解量などの指標として用いられる。しかし、コラーゲン中のHyp含量の詳細なコラーゲンの型(遺伝子)のみならず、動物組織、細胞が合成するときの条件(環境条件)によって変動する。

グルタミン酸(E)やアスパラギン酸(D)の量に比して、リジン(K)、アルギニン(R)の量が高く、コラーゲンポリペプチド鎖全体の正味の電荷は中性pHにおいては正である。すなわち、等電点が塩基性側にある。グリシンが多く、疎水性のアミノ酸が少ないとから、分子比容が小さく(球状タンパク質の場合大体0.75であるが、コラーゲンは0.70くらい)、またアミノ酸の平均残基分子量が100以下(球状タンパク質では大体110)である。コラーゲン蛋白にはたくさんの種類(コラーゲンの型という)があるので、細かくは分子種によって異なるが、いわゆるコラーゲンらせんを形成しているペプチド部分には以下のようなおまかな傾向がある。

コラーゲンはこれらのアミノ酸組成の特徴のため、生化学的に他の蛋白と異なる性質を示す。第一は溶解度の特徴である<sup>6)</sup>。コラーゲンは一般に酸性溶液によく溶け、塩基性の水溶液に溶けにくい。一方、熱変性ゼラチンになると水に非常によく溶ける。多くの球状タンパク質と全く逆である。すなわち、球状タンパク質は通常、酸性溶液に不溶でアルカリ性溶液に可溶である。多くのタンパク質は熱変性あるいは変性剤による変性で不溶化する。生卵中のタンパク質には水溶液に溶け出してくれるものが多いが、ゆで卵は不溶性で

ある。コラーゲンタンパク質はグルコースなど他の低分子ポリオールがあると中性 pH で溶解度が増す<sup>10)</sup>。他のタンパクはどうちらかというと溶解度が減る。

第二は他の物質との相互作用である。アクリルアミドゲル電気泳動後の染色にしばしば用いられるクーマジープリリアントブルー染色では他の蛋白が青紫色になるのに比してコラーゲンポリペプチド鎖は赤味を帯びたバンドになる（色素を溶かすためのアルコールとしてメタノールを用いると特にはっきりする。イソプロパノールではそうでもない）。一方、色素結合法による蛋白定量法（いわゆるブラッドフォード法）はコラーゲンでは色調の変化も、吸光度の変化もなく、コラーゲンの定量には使用できない。また、SDS アクリルアミドゲル電気泳動における蛋白の移動距離がその分子量で期待されるほどは動かない。分子量の分かっている標準蛋白の移動度から推定するとコラーゲンポリペプチドは真の分子量より大きい値がえられる。おそらく、疎水性残基の量が少ないため SDS との結合親和性の低いことが移動度の低い原因の一つと考えられる。SDS 電気泳動中に尿素（4 M など）が存在すると、この傾向は一層助長される<sup>9)</sup>。

第三に、等電点が高いため、DEAE（ジエチルアミノエチル）セルロースに吸着せず、CM（カルボキシメチル）あるいはホスホセルロースなどには吸着する。コラーゲンは細胞内ではその前駆体として（プロコラーゲンとよばれる）合成され、コラーゲンらせん構造の両端に非コラーゲンらせんのペプチド（プロペプチドとよばれる）を有する。このプロペプチドは構造的にも、また種々の性状でもコラーゲンよりは通常の球状タンパク質のそれに類似している。中性 pH で DEAE に対する吸着能があるので、プロコラーゲン分子としても DEAE に吸着する。この性質の違いを利用してコラーゲンとプロコラーゲンとを分離できる<sup>7,8)</sup>。

図 2 は I, II, III, IV, V 型コラーゲンの生化学的特徴の比較を示す。図 3 はコラーゲンタンパク質の多様性を示す。

## (2) アミノ酸配列

全アミノ酸の 1/3 を占めるグリシンはアミノ酸配列上は 3 ヶ目毎に存在する。コラーゲン蛋白に特有のコラーゲン三本鎖らせんを形成するには必要条件である。すなわち、コラーゲンポリペプチド鎖は、 $GX_i X_j GX_i X_j G \dots \dots \dots$  の繰り返し構造 ( $GX_i X_j)_n$  をしている。但し、ここで、G はグリシンを  $X_i$  あるいは  $X_j$  は任意のアミノ酸を示す。ただし、これまでの結果では  $X_i$  または  $X_j$  の位置にトリプロファン (W) が存在する例は見つかっていない。

図 2 I ~ V 型コラーゲンの生化学的特徴

A. 化学分析的データ(平均値) 1,000 残基当り	$\alpha_1$ (I)	$\alpha_1$ (I)	$\alpha_1$ (II)	$\alpha_1$ (III)	$\alpha_1$ (IV)	$\alpha_1$ (IV)	$\alpha_1$ (V)	$\alpha_1$ (V)	$\alpha_1$ (V)
3-Hyp/4-Hyp	1/85, 0/85	2/92	0/127	7/102, 8/104	1/99,	1/107, 1/91			
Hyp/Pro+Hyp	86/221, 85/205	93/222	127/233	109/174, 122/173	100/225, 108/213,	92/191			
Hyl/Lys+Hyl	5/37, 11/32	14/37	7/32	37/47, 35/48	46/61,	23/36, 43/58			
Arg/Lys+Hyl	50/37, 57/32	51/37	44/32	27/47, 42/48	42/61,	52/36, 42/58			
Ala	120, 101	102	82	44, 47	41,	57, 49			
Leu+Ile+Tyr+Phe	46, 70	50	38	136, 131	78,	71, 88			
Cys	—	—	2	11, 13	1,	—, 1			
糖含量	~0.4%	~4%		~14%		4 ~ 8 %			
Man型糖		propeptide 中にある		+		+			
pI	89, 92	8.7	9.0	8.4, 8.9	8.3,	8.6,			
				(160K)	(80K)				
B. 遺伝情報、一次構造 沈着される分子の $\alpha$ 鎮 分子量	100K	100K	100K	100K -部Nプロペチ ドをつけたま ま	185, 175K		120 ~ 150K		
プロ体の分子量 プロセシングプロテアーゼ	A	~150K A と異なる Arg で阻害	A		185K, 175K プロ体のまま沈着		190 ~ 150K Arg で阻害		
動物のコラゲナーゼに 対する感受性 ペプシン感受性	+	+	+	—	—		—		
—	—	—	±	+	—		—		
C. 二次構造(ポリプロリン型) CD スペクトルの特徴	221nm に正のピーク								
SDS 電気泳動における 尿素の効果	[ $\theta$ ] <sub>221</sub> = 6,000 ~ 10,000				[ $\theta$ ] <sub>221</sub> ≈ 3,000		[ $\theta$ ] <sub>221</sub> ~ 6,000		
+ -	+	+	++	++	+	++	++	++	++
D. 超二次構造 (三重らせん、他)	40	40	40		34 ± 1 (Timpl ら) 48(林ら)		40		
Tm(°C)									
まき戻りやすさ	戻りにくい、 特に $\alpha_1$ (I) は	戻りにくい	戻る	非常に戻りやすい					
鎖同型、異型 分子内 Cys	異(トリマーは同) —	同	同	異(?)					
+	—	+	+	+					
E. ドメイン構造 三重らせんドメインの長さ 球状部分	300nm 10nm(C) 15nm(N)	300nm I と似ている	300nm 13nm(25 × 3K) 60nm 30nm(220K)		300nm, 330nm 13nm(25 × 3K) 60nm		300nm 90K?		
7S 部分 フレキシブルドメイン									
両端、コラゲナーゼ作用部位 はややフレキシブルか?									
F. 三次構造 (ドメインのつながりなど) 間質型、IV 型、その他									
間質型プロ体									
7S									
G. 会合体構造 架橋の位置	D-stagger Heat Gelation	D-stagger O-stagger も? 太い線維	I とも 架橋 細い線維 ゲル化し しにくい	7S ドメインで特異的に四 量体形成 NCI で二量体に 主として noncollagen 部分によって会合する side-by-side もあるいは			D-stagger		
Banding Pattern	67nm の周期 天然の(組織での) 会合状態モデル		67nm の周期 FLS 型 D-stagger, ミクロフィブリル	ネットワーク spider モデル 六角モデル					

I. 溶解度：組織中の存在状態と関連した多様性	B. 生合成経路中に生ずる多様性
A. 可溶性コラーゲン	1) 転写、翻訳中：スプライシング、翻訳ミス（プロリンプールの低いとき）
1) 中性塩可溶性コラーゲン	2) 翻訳後の修飾反応の進行度合：水酸化反応 (3-Hyp, 4-Hyp, Hyl の生成), 糖鎖の結合 (Asn 糖および Hyl-Gal-Glc), 脱アミノ化 (アリシンの生成)
2) 酸可溶性コラーゲン	3) プロセシング酵素：シグナルペプチドの処理、プロコラーゲンプロテアーゼ(少なくとも 2 種)
3) 緩和* 可溶性コラーゲン	C. 会合体の形状、性状
4) プロテアーゼ処理可溶性コラーゲン (アテロコラーゲン)	1) 3 本の $\alpha$ 鎮の組成
B. 不溶性コラーゲン	2) 会合体の形状：線維の太さや枝分れ
1) 热変化で可溶化されるコラーゲン (ゼラチン)	3) 他成分への結合
2) 不溶性コラーゲン	4) 部分的分解、切断
II. 生化学的視点からみた多様性	5) 架橋結合形成などによる会合体内での分子配置の固定
A. 遺伝子構造レベル	* pH, 温度などの変化により分子間相互作用を変化させて溶かし出す方法
1) 動物の種差 (ウシとヒトは異なるなど)	
2) 型	
a) 長鎮コラーゲン	
i) 線維状に会合する (I型, II型, III型, V型)	
ii) 細目状に会合する (IV型)	
iii) 短い線維状に会合する (VII型)	
b) 短鎮コラーゲン	
IX型, X型, VI型, VII型?	
c) 極短鎮のコラーゲンドメインをもつ蛋白	
C1q, アセチルコリンエステラーゼ, 肺洗浄液中の糖蛋白, ある種のレクチンなど	

図 3 コラーゲンの多様性

プロリンの場合,  $X_j$  の位置のものはしばしば水酸化され, ヒドロキシプロリンになっている。またリジンも  $X_j$  の位置のものは水酸化され, ヒドロキシリジンになることがある(特に IV型, V型コラーゲンでは頻度が高い)。

ラット, ウシ, ヒト, ニワトリなどの I 型コラーゲン分子を構成するポリペプチド鎖(これを  $\alpha$  鎮とよぶ)の一次構造が決定されている。I 型コラーゲン分子の三本の  $\alpha$  鎮のうち二本は  $\alpha 1(I)$  で残りの一本は  $\alpha 2(I)$  と呼ばれる。異なる  $\alpha$  鎮を CM セルロースなどにより分離し, CNBr などの特異的なペプチドに分解後, 各ペプチドを分離し, アミノ酸配列が決められてきた。しかし, 最近は他のタンパク質同様, コラーゲンについても m-RNA から作成された cDNA ライブラリーを用いて, 各コラーゲン鎖のものをとりだし, cDNA の塩基配列からアミノ酸配列が決定されるようになった。例えば,  $\alpha 1(IV)$  鎮,  $\alpha 2(IV)$  鎮の部分配列はペプチドの分離から決められつつあったが, 結局, 全アミノ酸配列はヌクレオチド配列の構造から決定された。タンパク質での分析から, らせん部分に  $GX_iX_j$  からの乱れがいくつかあると推定されていたが, 確かに, 全塩基配列からもとめたアミノ酸配列には 20 数ヶ所  $GX_iX_j$  からの逸脱が存在することが判明した。

細菌性コラゲナーゼは, GPX<sub>i</sub>GP などの配列のうち G の前(アミノ基側)を切断する<sup>11)</sup>。コラーゲンを除くとこのような配列がたくさんあるようなタンパク質は存在しないので細菌性のコラゲナーゼによる分解の受け方によって, そのタンパク質分子の中にコラーゲン性のアミノ酸配列があるかどうかがわかる。すなわち, コラーゲンタンパク質の同定, 定量が行われる。一方, 遺伝子の異なるコラーゲン鎖の同定にはコラーゲンポリペプチド鎖のサイズ及びペプシンに対する抵抗性部分のサイズさらにポリペプチド鎖の CNBr 切断後のペプチドマッピング(各ペプチドの SDS 電気泳動による移動度および/あるいは等電点)などが用いられる。

図 4 に最近報告されたヒト XI型コラーゲンのアミノ酸配列および塩基配列を示す。

### (3) 高次構造

コラーゲン分子は三本のポリペプチド鎖からなる。構成する各ポリペプチド鎖は左巻のらせんを巻き, 約 3.3 残基で一回転(1 基で約 110 度回転)する。このような二次構造はポリプロリン II 型と類似している。プロリンの続いた配列ではコラーゲン以外のタンパク質でもこのような二次構造がみられる。コラーゲン分子ではこのようなコラーゲンの左巻らせんが三本集まって三本鎖らせんを形成している。三本が集まるとき, グリシン残基が三本の中央に位置するように三本鎖の各鎖は三本鎖の中心軸に対して緩く右巻らせんを形成して絡まっている(coiled-coil)。三本鎖の軸に沿って, 各ポリペプチド鎖一残基あたり約 290 pm (=  $2.9 \times 10^{-10}$  m) のピッチとなっている。したがって, コラーゲンらせんが 1000 残基のアミノ酸からなるポリペプチド鎖三本でくまれていると, らせんの長さは全体で  $290 \text{ pm} \times 1000 = 290 \text{ nm}$  となる。ちなみに, 三本らせんの直徑は約 1.4 nm である。らせんでは一残基あたりのピッチは 150 pm, 一回転で 3.6 残基である(図 5)。

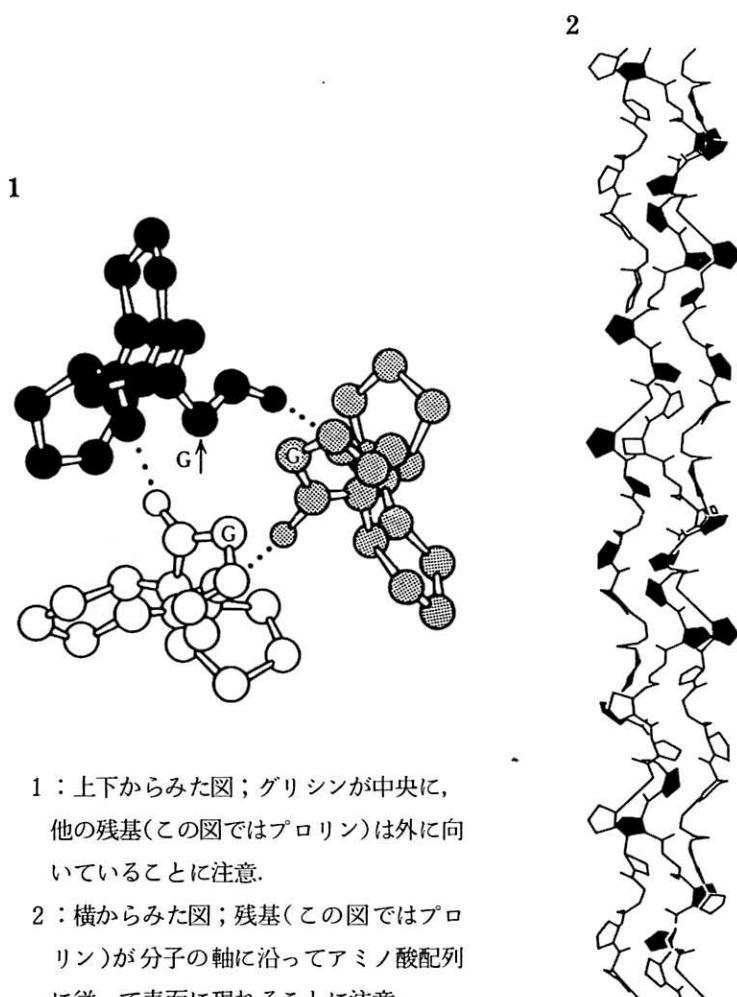
### (4) 分子構造と分子間相互作用

最も詳しく研究されているコラーゲン I 型の場合, 分子の 95% はコラーゲンらせん構造からなっている。コラーゲンの前駆体であるプロコラーゲンでは非コラーゲンらせんの部分(NC = Noncollagenous)が分子全体の 1/3 にもおよぶ。分子はこの部分とコラーゲンらせん構造(H)の部分の組合せ(各複数のこともある)でできている。コラーゲン分子種によって NC 部分及び H 部分の数, 大きさや位置が異なる。この結果, 分子全体の形状は異なってくる(図 6)。そのため分子間の相互作用にも差が生まれ, 会合体の構造も分子によって異なってくる。すなわち, コラーゲンの各型の分子間相互作用の特異性, 従って会

A	GGAGACCAAGGAGCTCCNGTGGGGGCCATCTGGGCCAAAGGTAGAGTGAGTGAT 13 G R P V G P V G S S G A K G E S G D	1117 1173	GGGAAACCTGGCCAAAGGCCACCTTCAGTGGATGGCCCTCTGGCCCTCAGTGA G K P G P K G T S G G D G P P G P P G E	
97	CCAGGTCTCAAGGCCCCCTCGAGGCCTCAGGTCCTGGCTGAGTCAGGAA P Q G P R G V Q G P P G P T G K P G	1177 393	AGGGTCCTCAAGGACTCTGGTCAGTGGCATGTTCTGGATTCCTGGACCAA AAGGCCCTCTGGGA	
133	AAAAGGCTCTCTCGAGGTCAGTGGAGAGGTGAGTCAGGAA (exon 10) 53 K R G R P G A D G G P G A K (exons 11,12)	1237 413	CCACCGAAGGATGATGGGGCTCCAGGACACCTGGCCACAGTGGAGACTGGATTCAA P G R H G C P G H P G Q R E T G F Q	
217	GGAGATCAGGGTTGATGAGACTTCCGGCTCCAGGTGAGTCAGGAA (exons 12,13) 73 G D R G F D G L P G L P G D K H P G R G E	1297 413	GECAAGACCEGGCTCTGGCCAGGGACTCTGGCAAGGAGAACCCGGTAG G K P G P P G V V G P Q G P T G E	
277	CGAGGTCTCAAGCTCAAGGTCCTCTGGATGATGGAGAGATA (exons 14,15) 93 R G P P Q G P P G P P G D G M R G E D G	1357 453	ATGGGTCATAGTGGGAGACCTGGTATATCTGTCTCTGGCTCTGGACANGT T G P I G E R G Y P G P P G E Q	
397	GGAACTCAGGGTCTCAAGGTCCTCTGGATGATGGAGAGATA (exons 13,14) 133 G T P G A P G Q P G M A G V D G P P G P	1417 493	CMTCCGCTGGCTCAGGAAAGGAACTGGATCCAGGTCTCAAGGATCTCA L P G A A G K E G A K G D P G P Q G I S	
457	AAAGGGACATGGCTCCAAGGGACCTGGCTCAAGTCACAAAGGAA 153 K G N M G P Q G E P G P P G Q Q G N P G	1477 473	GGGAAGAGTGGACCCAGGAGGATAGTGGATGGGAAAGAGGTCTCTGGACT G K D G P A G L R G F P P G E R G L P G A	
517	CCTAGGGCTCAAGGTCAGGGCAAGCTGGTATGGAGCTGAGTGG 173 P Q G L P G P Q G P I G P P G E K G P Q	1537 493	CAGGGTCAACCTGGACTGAGTCACAGGAAAGGGCCACCAAGGTCTGGGC Q G A P G L K Q G E D P G P Q G P G P V G	
577	GGAAACCTGGAGGACTTCAGGTGGCTCTGGACTCTGGCTCA 193 G K P P G L A G L P G A D G V R G L K G S K	1597 553	TGAGGAAACCTGGCTCTGGGAGATGGCTCAAGGTTAACCTGGGGCG Q G P A G R D G V Q G P I G L R G R P	
637	GANGGCACTCTGGAAAGGGGGCTCTGGTCACAGGTCTTATTA 213 E G Q S G E K G A L Q G P P G P I G P	1657 553	GGACCTCAGGGTCTGGCTCAAGGAGGATGGCTCAAGGAA 553 Q P Q G P P G P A G E X K A P G E K P G P	
697	TnnccGGGcccccccGGGGAGTGGAGATGGGCTCA 233 ? P G P R G V K G A D G V R G L K G S K	1717 553	1837 613	1837 613
757	GGTGAAGGGTGAGATGCTGGAAAGGGGGCTCTGGTCACAGGTCTA 253 G E K G E D G F P K G D M G L K G D	1897 573	1897 613	GGGAGAAAGGGAGAAGGGAA G S K G E N G P P G L Q G P
817	AGAGGAGAGTGGCTAAATGCCCAGGGNAGATGGCCTGAA 273 R G E V V G Q I G P R G ? D G P E G P K G	1777 633	TCACCGAGGAACCTGGCTCAGGAGTGGCTCAAGGAA S P G E R G S A G T A G T A G P I G L R G R P	
877	CGACGAGCCCAGCTGGAGACCAGGTCAGTCAGGAA 293 R A G P T G D P G P S G Q A G E K G X L	1957 653	1957 653	1957 653
937	GGAGTCAGGATTACAGGATTCAGGATTCAGGAA 313 G V P G L P G Y P G R Q G P K G S T G P	2017 673	673	673
997	CCTGGGTTCCAGGTGCAATGGAGAGAA 333 P G F P P G A N G E K G A R G V A G K P G	2077 693	2077 693	2077 693
1057	CCTGGGTTCCAGGTGCAATGGAGAGAA 353 P R G Q R G P P T G P R G S R G A R G P T	2137 713	2137 713	2137 713

C	2197 GGAGAGCAGAAACCAAGGGCTCTGGGAAGGAGTTAGGGT 733 G E A G N P G P P G E A G V G G P K G E	226C 286C	CCAGATGGTAAATATTGGATTGATCCTAACCAAGGTTGCTCAGGAGATTCC P D G E Y W I D P N Q G S G D S F K V
2557	AGGGAGAAAGGGAGCTGGTCAGTCAGGCTGCTGACCTCAGGCTCAGAGGG 753 R G E K G E A G P P P G A A G P P G A K G	96C	TACTGTAATTCTACATGGGGGGAGCTTACATTGCGAA Y C N F T S W P K E T G I V P D K K S E G
2377	CGGCCAGGTCTGGCCACCTGGCTCTGGGCCATGGTCTGGGACCTCT 773 P P G D D G P K G N P G P V G F P G D P	116C	GTAGAAATTCTACATGGCCAAAGGAA V R I S S W P K E N F S W P S E F K R
2497	GTCCTCTCTGGGACCTGGCTCTGGGCCATGGTCTGGGACCTCT 793 G P P G E L G P A G Q D G V G D K G E	406C	GGAAAACCTGCTTTCATACTAGATGTTGAGGA 116C G K L L S Y L D V E G N S I N M V H T
2557	GATGGAGATCTGGTCACCGGGTCTCTGGGCCATGGTCTGGGACCTCT 813 D G D P G Q P P G P S G E A G P P G	466C	TCCCTGAAACTCTGGCTCTGGCCAGGCTGAAATTCTGGCT 156C F L K L L T A S A R Q N F T V H Q S
2677	CCCTCGGAAAAGGGCTCTGGGCCATGGTCTGGGACCTCT 833 P P G K R G P P G A A G E G R Q R Q G E K 853 G A K G E A G C A E G P P G K T G P V G P	526C	GTACCTATGTTGATGTTGATCTGGGAGTTGACAAAGGCA 176C A A W Y D V S S G S Y D K A L R F L G S
2737	GGCTTAACCTGGTCACGGGACCTCTGGCTCAGGACATCTGGGT 913 G L P G L K G D P G S K G E K H P G L	586C	AAATGTGAGGAGATGCTCTGGCTCTGGCAATTA 196C N D E M S Y D N N P F I K T V H Q S
2797	ATTCGGCTGAGTGGTCCTCCAGGAGAACAGGGAAAAA 933 I G L I P G E Q G E K V G D R G L P G	646C	ACGTCAGAAAGGGCTGATGATACAGT 216C T S R K V E K T V I E I P T P K I D Q
2857	ACTCAAGGATCTGGAGCAAGGAGGAA 953 T Q G S P G A D A D D N I L D Y S D G M E	706C	GTACCTATGTTGATGTTGATCTGGGAGTTG 236C V P I V D V M I S D F G D Q N Q K F G F
2917	GGTCAGCTGTTCTCAAGGGTACCTGGCTCAGGATCTGG 973 G P P G P G L P G P Q K G N K G S	766C	GAAGCTGGCTCTGGTCTCTGGCTAGGATGAA 256C E V G P P V E F L G X
2977	ACNGGACCCGCTGGCCAAAGGGTAGCTGGGCTCAGTGG 993 T G P A G Q K G D S G L P G P P G P	893	GAAGATGTACTTGGCCACCA 933 I G L I P G E Q G E K V G D R G L P G
3037	CCACCGTCTCAAGGAGCTCTGGCTTACCA 1013 P P G E V I Q P L P I L S S K K T R R H	893	GTATGGAAACACGGCTGATGACCTGGCT 893
46C	ACTGAAGGCTGAGGAGCTGGGGGA 16C T E G H Q A D A D D N I L D Y S D G M E	953	CCAGCAATTCAAGGAGCTGGCT 893
2917	GGTCAGCTGTTCTCAAGGGTACCTGGCTCAGGATCTGG 973 G P P G P G L P G P Q K G N K G S	953	TTGGTCGTTCTGAGAACGAA 973 G P P G L P G P Q K G N K G S
2977	ACNGGACCCGCTGGCCAAAGGGTAGCTGGGCTCAGTGG 993 T G P A G Q K G D S G L P G P P G P	993	ACTCTGAGCTGGCT 993 T G P T N P A R T G L Q K D L Q L S H P D F
3037	CCACCGTCTCAAGGAGCTCTGGCTTACCA 1013 P P G E V I Q P L P I L S S K K T R R H	106C	GGTACTAGACCAATCAAGGCCGAACTCTGG 106C E I F G S L N S L K Q D I E H M K F P M
46C	ACTGAAGGCTGAGGAGCTGGGGGA 16C T E G H Q A D A D D N I L D Y S D G M E	106C	GGTACTAGACCAATCAAGGCCGAACTCTGG 106C E I F G S L N S L K Q D I E H M K F P M

図4 ヒトCOL11A1[α1(XI)]のアミノ酸配列と塩基配列。第一列の左側にあるのが、α塩の始まりからつけた塩基配列の番号で、第二列はアミノ酸配列の番号。Cプロペチドの番号は新たに番号のあとにCと書いてある(番号のあとにCと書いてある)。エキソンの番号を左側に示す。\*星位はα鍵の終り、↓はC-プロチーズが作用すると見られる部位。下線をひいてあるアミノ酸はスタイルの架橋とCプロペチド中の数鎖の結合しうる部位。



1：上下からみた図；グリシンが中央に、他の残基(この図ではプロリン)は外に向いていることに注意。  
2：横からみた図；残基(この図ではプロリン)が分子の軸に沿ってアミノ酸配列に従って表面に現れることに注意。  
注) 五角形にみえるのがプロリンのピロリジン環。Gはグリシン。

図5 コラーゲンの3本鎖らせん

合体の構造・機能は分子の構造によって規定される。

コラーゲンらせん部分ではグリシン残基のみが分子の内側に存在するので、分子として単独に存在するときは疎水性の残基も含め他の残基は分子表面に露出している。特に疎水性の残基は水の中では互いに凝集しようとする(疎水性の相互作用)，コラーゲンらせんの表面にどのように疎水性残基がならんでいるかはコラーゲン分子間相互作用の強さ、特異性すなわち会合体形成においてまた会合体の他の生体成分との相互作用の上で重要な貢献をする。未変性の三本鎖コラーゲンが単分子として水に分散しにくいのはこの分子表面の疎水性残基の並びによると考えられる。すなわち、コラーゲンは疎水性アミノ酸の含

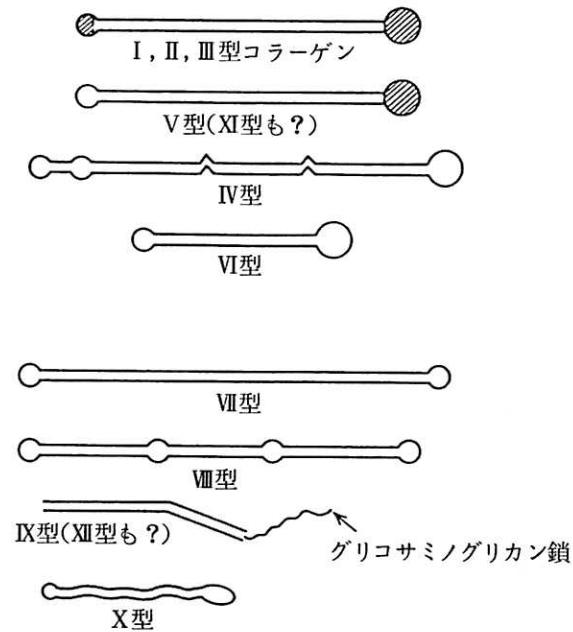


図6 コラーゲン分子の構造

量は他の蛋白に対して極めて低いのに、三次元構造をとっていると溶けにくく、変性してゼラチンになると水によく溶ける。疎水性残基と水との接触面少ない方が溶解度は高い。通常の球状タンパク質では未変性のとき、疎水基は分子内部に埋もれていて、外部の水とは接触しないコンフォーメーションをとっているが、変性すると疎水基が露出し、これが隣の分子の疎水基とからまって、沈澱を形成する(図7)。

荷電あるいは極性を持ったアミノ酸残基も分子表面に並んでいるので、分子間の相互作用において重要である。一般に荷電あるいは極性基は疎水性の基の相互作用に比べて水の中ではそれだけでは強い力にならないものの、疎水性の環境の中では極性基の相互作用は非常に強いものになり、かつ特異性(結合の方向性も含めて)が強い。コラーゲン分子間の相互作用においても単分子状態から会合体への形成の駆動力をなっているのは疎水性の相互作用であるが、一旦、会合体が形成された後の分子間相互作用の安定化は極性基・荷電基の寄与するところが大きく、特異的な原子間の位置づけが決まつてくる。それがさらに増強・強調された分子間相互作用が共有結合性の架橋と考えることができる。

##### (5) 生体組織中のコラーゲン会合体の構造

コラーゲン構造を有するタンパク質は単独の分子として生体内に存在することはなく、

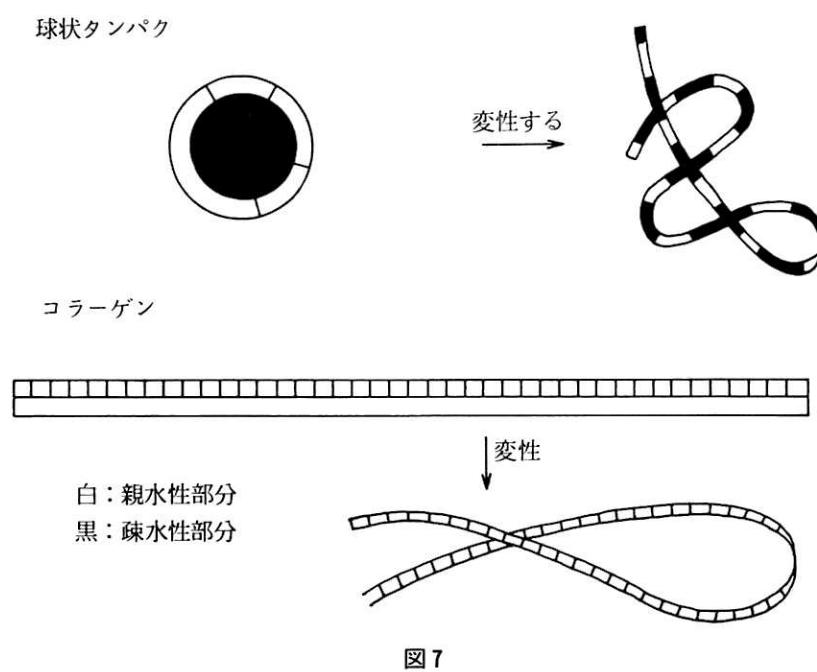


図7

分子は集合して会合体を形成している。一般に会合体の大きさ及び形状は分子の形状、分子間の対称性あるいは等価な位置づけ、分子間相互作用の親和性により決まる。コラーゲンタンパク質には線維を形成するもの（線維性コラーゲン）が量的には生体内で最も多い。これにはI型、II型、III型、V型、XI型の5種が知られている。I型コラーゲンの場合、分子のらせん部分が67 nmずれて side by side に結合するとき最もエネルギーが安定である。この結果、分子は線維状の会合体を形成する。恐らく、他の4種の線維性のコラーゲン分子でもそうなっている。IX型コラーゲンはそれ自身では線維を形成しない。しかし、分子内のコラーゲンらせんの内約半分は線維性コラーゲンのアミノ酸配列をしていてこの部分でII型コラーゲン線維と結合している<sup>12)</sup>。II型コラーゲンとIX型コラーゲンの間に共有結合性の架橋結合も見出されている。

生体内のコラーゲン線維の太さは臓器、組織によりまちまちである。太さの異なるものが適当にそれぞれの組織の機能にふさわしい形状、分布、配向をしている<sup>14)</sup>。線維の太さの分布は全くランダムでなく、正規分布を示さない。一般にコラーゲンは各臓器の結合組織と呼ばれる部分に存在する。光学顕微鏡レベルでは古くより、膠原線維と細網線維の二種が区別されている。前者は太く、後者は細い。両者ともコラーゲン細線維が集合した線維であるが、細線維の数が異なるために直径に差ができたものと考えられる。一方、コラ

ーゲン細線維を電子顕微鏡で見るとこれには太さの異なる二種がある。太い方は80~100 nmの直径で、細い方は30~50 nmの直径で両者ともコラーゲン特有の横縞を示す線維である。

細線維の太さはどのように調節されているのであろうか。in vitro のコラーゲン線維の再構成の実験から、いくつかの考えが提唱されている。これについてはあとで述べる。コラーゲン線維中の細線維の数はどのように制御されているかは現在のところ全く不明であるが、プロテオグリカンや糖タンパク質の存在によって変化することは容易に予想できる。

分子の形状が棒状でない場合は会合体の形状も線維状にはならない。例えば、IV型コラーゲンである。IV型コラーゲンは生体内では基底膜中に存在し、その骨格構造を形成している。基底膜は上皮細胞の直下や筋線維、脂肪細胞、血管内皮細胞、平滑筋細胞、シュワン細胞などの周りに存在する。基底膜を電子顕微鏡でみると、大きく二つの層に分けられる。細胞に密接した側は電子顕微鏡レベルでも無定形の構造をし、その下には非常に細いコラーゲン線維が存在する。前者を特に指すときはbasal lamina（基底板）と呼ぶことが多い。基底板は分子が隙間なく並んだ薄層の膜状ではなく、非常にメッシュの小さい網目である。したがって、基底膜は光学顕微鏡で見ると膜状にみえるので“膜”と呼ばれている（basement membrane）が、細胞膜というときの膜とは全く異なった骨格構造をしている。光学顕微鏡レベルでは基底板の下側にある細網線維部分も含まれているので、ここでは基底板（basal lamina）ということにする。基底板の骨格網目構造はIV型コラーゲンの会合体からできている。最近、安達らはIV型コラーゲン会合体の形状が図8aに示すようなものであることを急速凍結ディープエッチング回転シャドウ法により示した。これと似た会合体がEHS腫瘍から単離したIV型コラーゲンの再構成により得られている。また、羊膜の基底膜でも非常によく似た会合体の構造が報告されている。Yurchenko<sup>15,16)</sup>はこれらの観察をもとに基底膜骨格構造としてIV型コラーゲン会合体のポリゴナルモデルを提出している（図8b）。これによれば基底膜の網目構造の糸の太さは分子の直径の数倍である。このこと自身はすでに10年以上前に岡山大の太田らによって報告されていた。今回、安達らによって得られた電顕像はこれらと矛盾しないので、広く一般に基底膜の骨格構造はIV型コラーゲンの網目状の会合体からなっていると結論されよう。

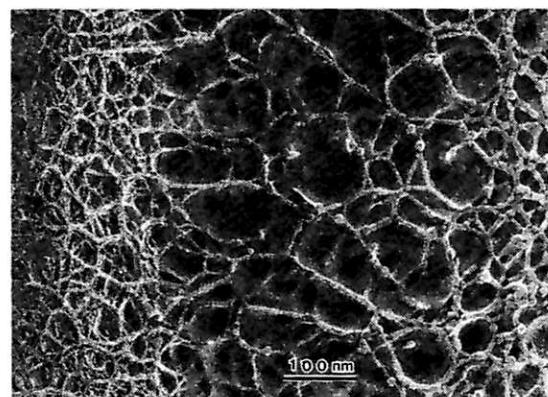


図 8 a 急速凍結ディープエッティング回転シャドウ法によるIV型コラーゲン会合体の電顕像。(安達ら, 未発表データ)ウシレンズカプセルより酢酸で抽出されたもの。

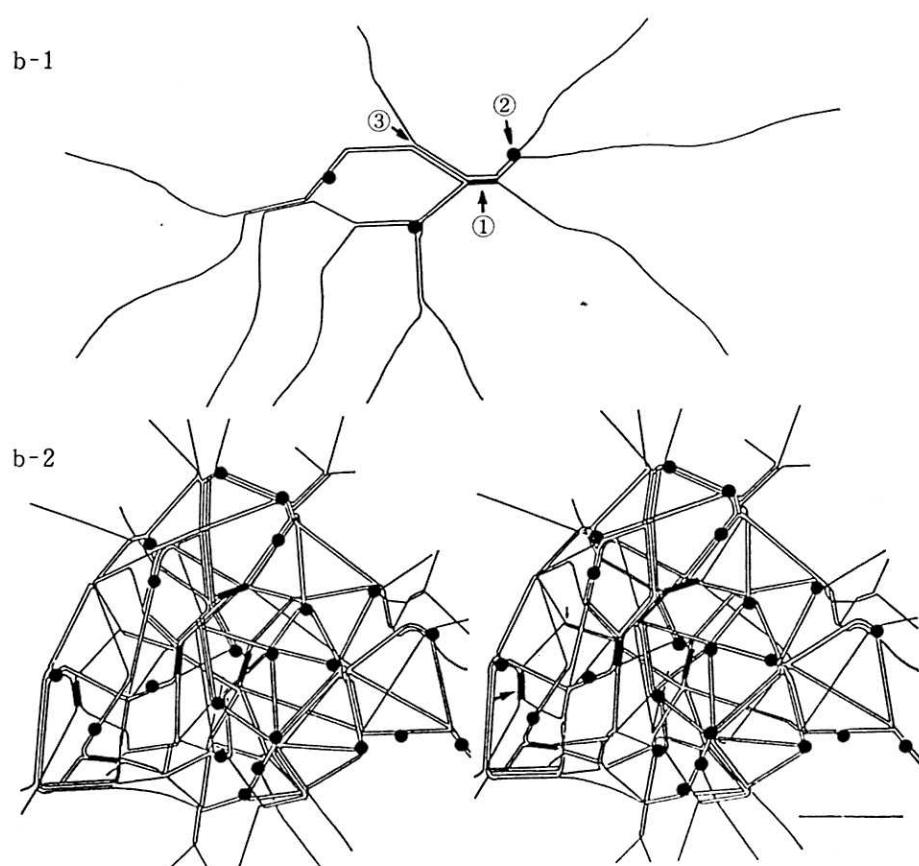


図 8 b IV型コラーゲン会合体のモデル

b-1: IV型コラーゲン分子のアミノ末端で四量体を形成(①の矢印)し, カルボキシ末端で二量体を形成し(②の矢印), 側面での結合で分枝を形成する(③の矢印)。アミノ末端四量体に分子側面の結合があるように示している①の矢印の相互作用は仮説である。

b-2: IV型コラーゲンがb-1のように多く会合した場合の三次元モデル。立体図になっている。棒は100 nm.

生体組織の細菌コラゲナーゼによる分解物から, 7S コラーゲン(超遠心沈降の沈降係数が7Sで, 化学的な分析からコラーゲンであることがわかったもの)を得た。その後のくわしい研究により, これがIV型コラーゲンの四量体の断片であることが判明し, これから, IV型コラーゲンの会合体としてスパイダーモデルが提唱された<sup>17)</sup>。生体内には種々の組織に基底膜構造があり, その構成成分にいくつかの組織特異性があることもわかってきた。しかし, どの基底膜にも必ずIV型コラーゲンが主成分として存在するので, その骨格構造はIV型コラーゲン会合体として共通の構造をしていると考えられる。丁度, コラーゲン線維はどれも67 nmの横紋構造をしているが, 組織によって線維の太さや配向が異なるようによつて存在する糖蛋白やプロテオグリカンには組織特異性があるように, 基底膜にもIV型コラーゲン会合体からなる共通の基本骨格に種々の高分子成分, 細胞などが結合し, 臓器や組織特異的な構造が形成されていると考えられる。筆者らは最近基底膜コラーゲン(IV型)にも組織特異性があり, 血管系の基底膜にのみ強く反応する抗IV型コラーゲン抗体があることを見いだした。この抗体と結合するポリペプチド鎖のアミノ酸組成はIV型コラーゲンのそれと同様である。ポリペプチド鎖の部分アミノ酸配列は既知の $\alpha 1$ (IV)あるいは $\alpha 2$ (IV)に見当らないので新しいIV型コラーゲンファミリー鎖と考えている(木野ら, 未発表)。またHudsonらの研究によると, IV型コラーゲンのNC1ドメインには $\alpha 1$ (IV),  $\alpha 2$ (IV),  $\alpha 3$ (IV),  $\alpha 4$ (IV)の少なくとも四種類のプロ $\alpha$ 鎖に由来するものがあり, 組織によりその含量が異なる<sup>18)</sup>。これらの事実からIV型コラーゲン分子にもいくつかの亜型が存在し, 基底板の組織特異性と関連している可能性が考えられる。

VII型コラーゲンの場合もその分子構造と会合体構造の関係が追求されている。VII型コラーゲンはミクロフィブリルを形成していると提唱されている<sup>19)</sup>。VII型コラーゲンでは分子が頭と頭で会合した二量体の, 対称性会合体を形成する。さらに組織上(免疫組織学を用いた)の局在から, 皮膚などの表皮-真皮境界に楔状に存在するアンカリングフィラメントであることが実証された<sup>20)</sup>。一方, IX型コラーゲンは分子のコラーゲン部分の約半分が線維性のコラーゲンと相同性を示し, その部分でII型コラーゲン線維上に規則的に結合していると考えられている(図9)。IX型コラーゲンは軟骨に特有であるが, ニワトリの角膜など, あるいは硝子体など非軟骨性の組織でも線維の主体がII型コラーゲンである組織ではIX型コラーゲンが存在する。しかし, 一般に非軟骨性の組織でI型コラーゲンが主体の(例えば, 腱)コラーゲン線維からなる組織ではXII型コラーゲンがIX型コラーゲンの代

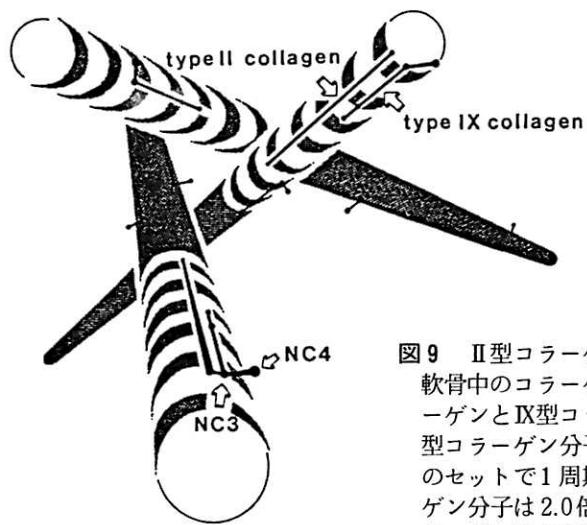


図9 II型コラーゲンとIX型コラーゲンの相互作用。軟骨中のコラーゲン線維(横紋構造)中のII型コラーゲンとIX型コラーゲンの相対的な位置関係。II型コラーゲン分子の長さは周期(灰色と白の帯とのセットで1周期とする)の4.5倍で、IX型コラーゲン分子は2.0倍。IX型コラーゲン分子には非コラーゲン性の領域(NC)がNC1～NC4まであり黒丸で示してある。

わりに存在するものと推測されている<sup>22)</sup>。

#### (6) コラーゲン分子と他の物質との相互作用

コラーゲン分子中のコラーゲンらせん部分は棒状の硬い構造をしている。この部分が互いに近づき得、かつ特に静電的な反発力が強くなければ、疎水性の相互作用があるので side by side に会合する。一般にコラーゲン分子は三本鎖らせん部分同志で結合し、力学的にも生化学的にも強度の高い会合体を形成する性質がある。会合体形成能以外にコラーゲン分子の機能には何があろうか。コラーゲン以外の物質との相互作用での特徴から考えてみよう。コラーゲンはタンパク質としては特異な構造をしているのであるが、コラーゲンと特異的な相互作用する物質に何か共通の生化学的性質があるかどうかなど知られていない。フィブロネクチンはコラーゲンⅢ型あるいはⅠ型に結合能を有するが、ゼラチンのほうがもっと結合は強い。ラミニンはⅣ型コラーゲンに結合するし、トロンボスponジンはⅤ型コラーゲンとの強い相互作用が知られている<sup>23)</sup>。コラーゲンの正味の電荷が正であるので、負を帯びた物質、グリコサミノグリカン、核酸とは静電的に結合しやすい。ヘパリンはⅠ～Ⅴ型コラーゲンの中ではⅤ型コラーゲンに最も親和性が高い。Ⅴ型コラーゲンによく似た軟骨特有のコラーゲンであるXI型コラーゲンは特にヘパリンとの親和性が高い。ヘパリンとは異なるが似たものにヘパラン硫酸がある。細胞表面にはヘパラン硫酸プロテオグリカン(HSPG)が存在する。フィブロネクチンやラミニンなどの細胞接着性糖

タンパク質とHSPGとは特異的な結合をするので、HSPGは細胞接着の制御に効いていると考えられている。コラーゲンと細胞の直接の相互作用にもHSPGが関与している可能性は高い(表2)。

表2 (I～V)型コラーゲンの相互作用

I型コラーゲン	フィブロネクチン(?)
III型コラーゲン	プロテオデルマタン硫酸、V型コラーゲン
II型コラーゲン	IX型コラーゲン
IV型コラーゲン	ヘパリン、プロテオヘパラン硫酸、ラミニン
V型コラーゲン	ヘパリン、トロンボスponジン

コラーゲンと他物質の相互作用として比較的研究例が多いのはコラーゲンとプロテアーゼの相互作用である。コラーゲンらせん部分は多くのプロテアーゼの作用を受けない。これはプロテアーゼがコラーゲンらせんという硬いコンホーメイションに対し親和性が低いからである。熱変性したコラーゲン、すなわちゼラチンは殆どどのプロテアーゼによっても切断され、このとき、未変性のコラーゲンの共存は反応速度に全く影響しないことから推察される。コラーゲン性の一次構造に特異的あるいは選択的に働く酵素(例えばプロリルヒドロキシラーゼやゼラチナーゼなど)の場合、グリシン、プロリンなどコラーゲンに多く存在する残基と酵素の相互作用は十分強いと考えられる。これらの残基がコラーゲンの三本鎖らせん構造の硬いコンフォーメーション内に存在すると、これらの残基に酵素が近付けなかったり、コンホーメーションが酵素の結合部位にフィットしないためと考えられる。逆に、酵素によってはコラーゲンらせんの高次構造があって、はじめて結合するものもある。例えば、プロコラーゲンのアミノ末端側の非コラーゲン性ペプチドを特異的に遊離するプロコラーゲン-N-プロテアーゼは三次構造がきちんとできたプロコラーゲン分子(その結果、プロセスされる部位のアミノ酸が三本のポリペプチド鎖できちんと並んだ構造)にのみ作用する<sup>25)</sup>。

多細胞生物の細胞を培養するには細胞を何か基質に接着させないと増殖しない。基質の中で最も有名な物質にフィブロネクチンがある。フィブロネクチンと細胞との相互作用の研究によるとフィブロネクチンにはその分子の一部に細胞接着部位があり、中でもその部位中のRGDの配列が細胞接着に効いている。細胞の接着を促すタンパク質がその後いくつ見いだされたが、そのどれにもこのようなRGDのアミノ酸配列が存在する。そしてRGD

はコラーゲンにも存在する。一方、細胞接着にはRGD以外の構造部位も関与していることも明らかになり、コラーゲンにはRGD以外の部位を認識する細胞接着受容体が存在する<sup>26)</sup>。古くより、血小板の凝集がコラーゲン線維上で起こることはよく知られている。血小板表面にもコラーゲンに特異的な結合蛋白がある<sup>27,55)</sup>。細胞が生体組織内で示す基質への接着、脱着は腫瘍細胞などの増殖・転移、あるいは正常発生に於ける細胞の移動（神経冠細胞など）、白血球の組織への浸潤などにおける多数の反応において重要なステップの一つである。コラーゲンは種々の細線接着に対して基質として役立っている。細胞接着における基質としてのコラーゲンの化学的・物質としての特徴はコラーゲンの生体内での機能の一つである。コラーゲン会合体が分子の規則的な集合体であることは細胞との相互作用において多数の規則的な結合部位を生ずることになる。このような結合部位の数および分布が種々の細胞機能に特異的な影響を与える。さらに間接的にもすなわち他の細胞機能調節因子の作用に対してもコラーゲンと細胞との結合状態が影響することは容易に推測できる。一方、細菌やウイルスの感染の際、コラーゲンがこれらの微生物と親和性の少ないことが感染に対する防壁をなしていることになるし、コラーゲン会合体、特に基底膜は立体障害として微生物細胞の感染、悪性腫瘍細胞の侵入に対し、防壁の機能を有する。

#### (7) 修飾アミノ酸残基

多くのタンパク質はDNAの塩基配列によってコードされたアミノ酸配列をしたポリペプチド鎖が三次元の立体構造を形成するとともにその機能例えは、ホルモン作用や酵素作用をもつ。しかし、高等動物の細胞膜に存在するタンパク質は特異的な糖鎖構造が付加されて初めて機能を発揮するものが多い。コラーゲンにもこのような糖鎖の結合がプロコラーゲンの非コラーゲンらせん性のペプチド部分に見られる。

しかし、コラーゲンの場合、もっと特徴的な修飾反応があり、しかもそれが必須である。すなわち、プロリン残基およびリジン残基の水酸化反応である（図10）。プロリン残基が水酸化されてヒドロキシプロリンになることはコラーゲン三本鎖らせんの温度安定性上必須である。また、リジンが水酸化されてヒドロキシリジンになることがコラーゲン分子間の安定な架橋結合形成を促進していると考えられる。また、ヒドロキシリジンはガラクトースあるいはグルコシルガラクトースの結合部位としても働いている。もっとも後者の構造が生理的にどのような意味をもつかは殆ど何もはっきりしていない。分子間の架橋形成の調節に働いている可能性はある。分子間の架橋の形成にはリジンあるいはヒドロキシリジ

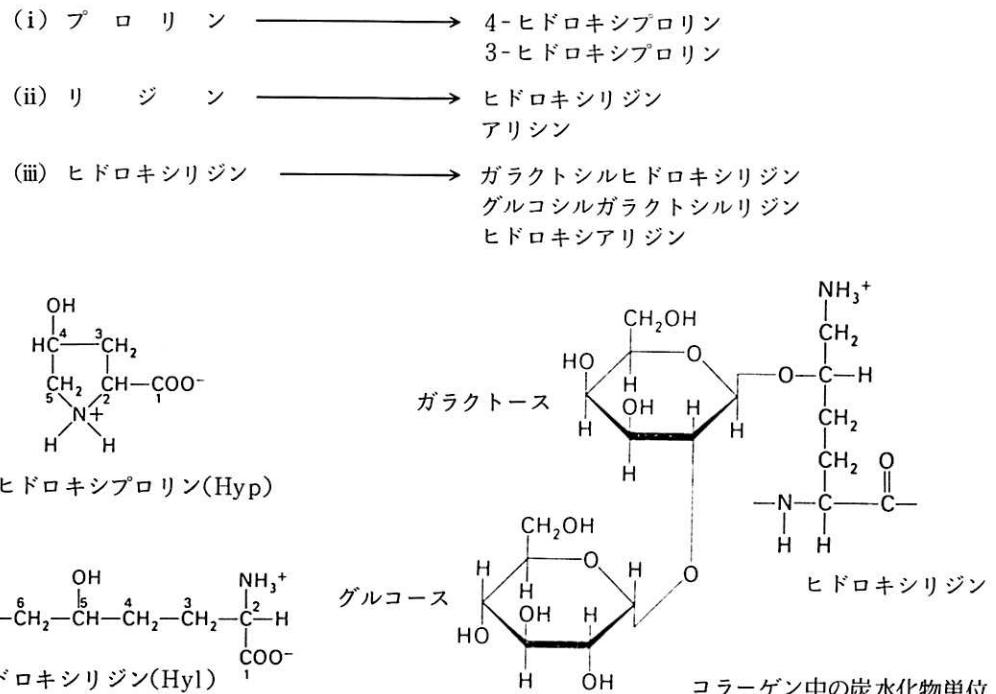


図10. コラーゲン中のアミノ酸の修飾反応

ンのアミノ基が脱アミノ反応を受けてアリシンあるいはヒドロキシアリジン（リジンあるいはヒドロキシリジンのアミノ基がアルデヒド基に変化したもの）になっていることが必須である<sup>13)</sup>。

生理的な修飾ではなく、恐らく病理的な修飾にアミノ基の glycation (いわゆる, Maillard 反応) がある<sup>28)</sup>（図11）。特に、糖尿病で血中のグルコース濃度が高い状態が長くつづくと徐々にタンパク質中のリジン残基とアルデヒドが反応し、糖が結合する。反応は極めてゆっくりとしているので研究室での通常の実験時間内ではとくに目だった反応の生成は見られなくとも、人のような長命の動物では老化とともに増加し、分解代謝が積極的に起きない部位では反応生成物が蓄積する。コラーゲン中のリジンの ε アミノ基がグルコースのアルデヒドと反応した後、多数の複雑な反応段階を経て蛍光を有する構造体が形成される。コラーゲン分子と隣の分子の間でこの反応が進むと架橋にもなる。ヒトのような長命の動物ではこのようにしてできる蛍光物質があるため、組織が自家蛍光を示す。一方、このような蛍光を有する物質に特異的に結合するタンパク質の存在も考えられるが、現在のところまだ単離されていない。マクロファージのように生体内の種々の廃棄物を分解す

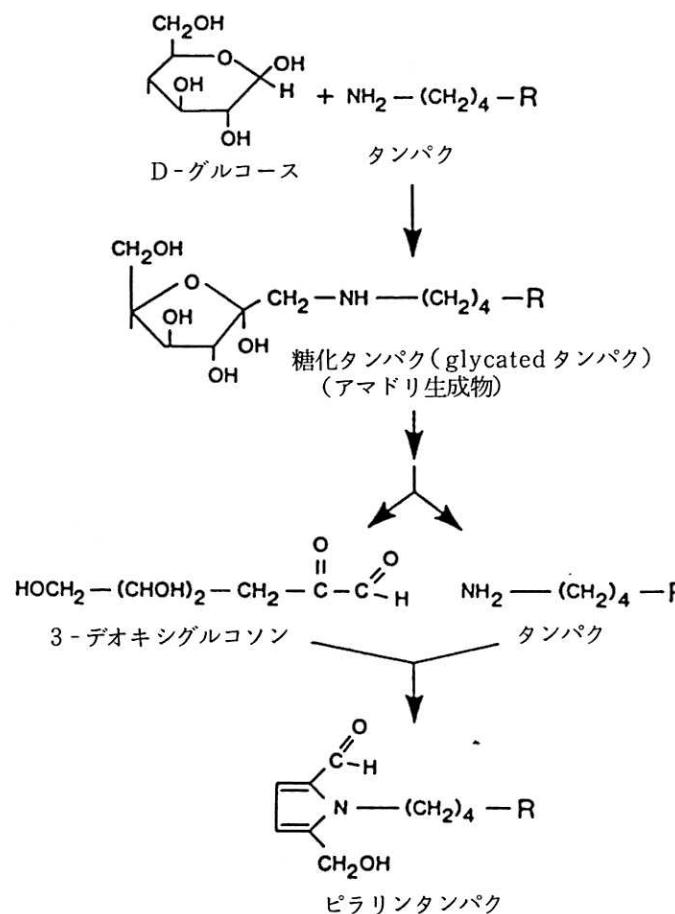


図11 タンパク結合性ピラリン生成機構の仮説

る酵素を有し、清掃をする役割を持つ細胞では特異的なりセプターがあることも考えられる。

いずれにしても、コラーゲンは量的にも多く、血液成分とふれる部位に主として存在し、分解もゆっくりしていることから glycation の起こるもっとも主要なタンパク質である。glycation を受けたコラーゲンの機能がどのように変化するか興味深いところである。生理的な分子間の相互作用が低下し、分解など生体外へと除去される機構との親和性が増すことは考えられよう。糖尿病などの血中のグルコース濃度が高い場合、ヘモグロビンの外にフィブロネクチンなど種々のタンパク質が修飾され、結合能、溶解度などの性質が変化することが知られている。

#### (8) コラーゲンの生合成・代謝における切断反応とコラーゲン構造品質管理

コラーゲンの合成過程にはもうひとつ別種の特異的な段階がある。コラーゲンは細胞内で前駆体であるプロコラーゲンとして生成され、細胞外へ分泌される。このあとプロコラーゲンは特異的な分解酵素二種、プロコラーゲン N-プロテアーゼ（アミノ末端側）およびプロコラーゲン C-プロテアーゼ（カルボキシ末端側）、によりプロセッシングをうけてコラーゲンとなる。コラーゲンに転換されるとともに会合体になる（図12）。アミノ末端プロペプチドのみ切断されて、カルボキシ末端側が切断されない（pCコラーゲンという）とコラーゲンは全く会合できない（カルボキシ末端のペプチドは大きすぎて side by side にならべないため）。一方、アミノ末端プロペプチドの存在は致命的な障害にはならない。カルボキシ末端プロペプチドのみが切断されアミノ末端側のプロペプチドがついたまま（pNコラーゲンという）でも、きわめて細い線維状の会合体へと会合する。pNコラーゲンは分子間の結合が弱いためか、線維の径は太くならない。一方、切り離されたプロペプチドが線維など会合体に結合したままになっていることもある。

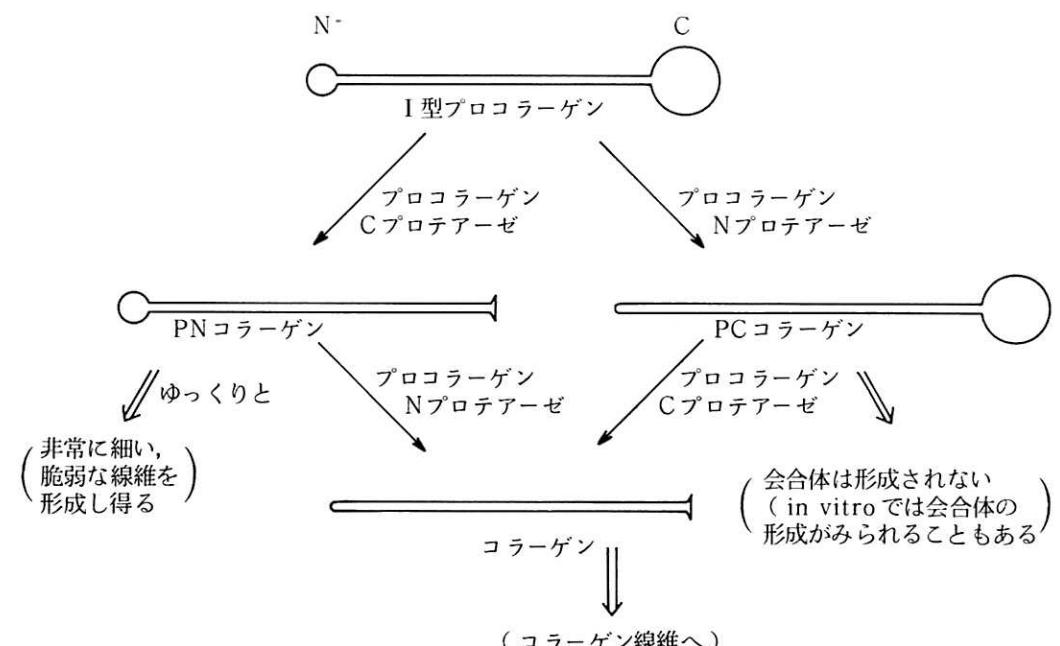


図12 I型プロコラーゲンのプロセッシング

生体物質はそれぞれの分子の合成、分解が微妙に調節され定常状態が保たれている。生命の恒常性は静的ではなく、動的に維持されている。各分子、各オルガネラ、各細胞に特

有の代謝回転があり、生物学的半減期が定義されている。しかし、コラーゲンタンパク質の場合は分子の代謝回転を一つの速度定数（半減期の逆数）で定義することはできない。半減期の長さにオーダーの異なるポピュレーションがあると思われる。コラーゲンの分解に関する酵素活性の量的な調節が臓器、組織、環境などによってあるいはコラーゲンの化学構造特に架橋結合の構造と位置などによって違ってくることも考慮する必要がある。

一般に生体高分子の生成には分子素子としての完成度のチェック機構がある。特に、DNAでは複製の正確さが最も大事であるので、そのチェックがなされている。RNAやタンパク質でも同様である。ある種の疾患や老化はこの正確さの減少や、チェックシステムの逸脱が原因とも考えられる。コラーゲンタンパク質の場合はどうであろうか。コラーゲンらせんの温度安定性はその動物の棲息温度の上限にある。mRNAから翻訳してきたポリペプチド鎖が立体的な構造をとって分子として完成する。機能すべき分子の立体構造を持つに至らない分子を系から除外していく機構が存在すると生体の維持には便利である。体温で安定であるような分子ができているかどうかがコラーゲン分子についてチェックされていると考えられる。というのは種々のプロテアーゼはコラーゲンらせん構造をしていないポリペプチドには作用するが、らせんのしっかりした分子には作用できないので、適当な部位にそのような酵素が存在し、作用するならば高次構造の不安定なコラーゲン分子が除かれ品質管理が行われる。

このような生体物質の品質管理はコラーゲン線維その他の会合体の安定性、機能の恒常性を維持する上での機構としても働いているとも考えられる。生理的でない構造の出現に対してクリアランスの機構がある。マクロファージによるスカベンジをはじめ、免疫系もその一つとも思われる。プロテアーゼの中にはそのような非生理的な構造体を認識して切断するものもあるかと推測される。

デルマタン硫酸プロテオグリカンは皮膚や腱でコラーゲン線維の周りに周期的に結合している<sup>30)</sup>。他のプロテオグリカンも線維などコラーゲン会合体の構造・機能の修飾・調節に働いている可能性がある。線維の物理化学的な性状（安定性、線維の径、その他）のみならず、線維の生物学的な目印となっていることも考えられる。すなわち、細胞表面および細胞外糖タンパク質やプロテアーゼなどの結合、認識が影響を受ける。

筋肉等の運動・力学的刺激の伝達がコラーゲン線維・会合体に切断、変形（収縮、伸張等による塑性変化）などを生む。生体内にはこれを処理・対応する機構があるに違いない。

どのような機構であるか今後の老化生物学の課題である。

#### (9) 単離したコラーゲンからの会合体形成と会合体形成調節

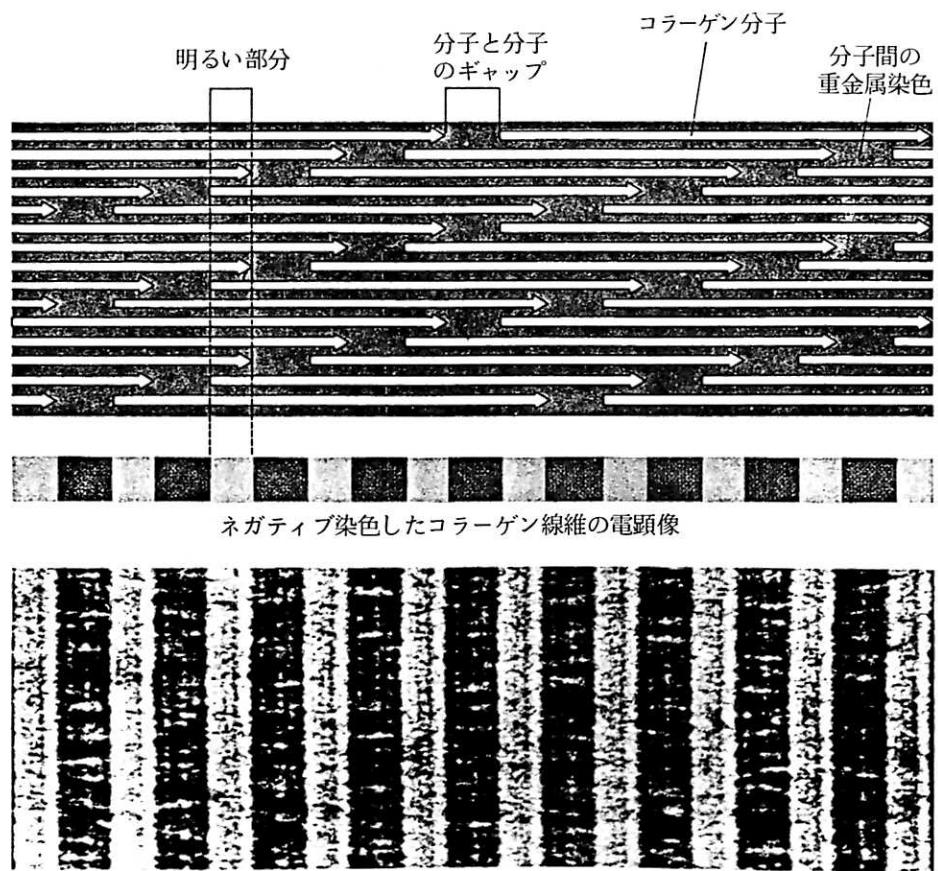
コラーゲンの生体内での構造がどうであるかを解明するにはいくつかの異なるアプローチがある。コラーゲンに対する特異的な抗体を作成し、その抗体が組織中のどのような構造体に結合するかを検討する免疫組織学的方法がその一つである。抗体に限らずコラーゲンに特異的なプローブであればよいのであるが（例えば細胞骨格のアクチンに対するファロイジンのような）、現在のところ抗体以外にはあまりよく使用されているものはない。シリウスレッドという色素が有力との報告がある<sup>31)</sup>。

生体内でのコラーゲンの構造を解明する上で、歴史的に最も古くから用いられたもう一つの方法は構造体のまま分離し、X線回折像、電子顕微鏡で構造の微細を分析し、一方、単離したコラーゲン分子の構造及び分子を適当な条件下において会合体を形成させた時に見られる構造との関係から推測していく方法がある。再構成法ということができる。

コラーゲンにその会合体再形成能があり、独特の横紋構造をした細線維が形成されること、また、pH、イオン種、他の物質の共存など、環境によって異なる会合体が形成されることは以前よりよく知られている<sup>32)</sup>。その意味でコラーゲンを主体とする構造体は遺伝子の外に環境などによって構造の詳細が規定されている（図13）。

生体組織から抽出したコラーゲンの溶液を適当な環境下におくと分子は会合して生体内的構造体と比較することが可能である。コラーゲンI型の場合、中性pHで生理的なイオン強度に保ち、さらに37℃に保つと67nmの周期的な横紋構造をした線維が形成される。分子の間の関係は分子の長さを4.4D (= 295 nm) とすると互いにDの長さ (D = 67 nm) づつずれて配置した関係になっている。このような分子の位置関係は分子内の荷電アミノ酸に電顕用染色剤が結合している染色パターンと非常によく一致する。また、生体内的コラーゲン線維の横紋構造ともよく一致する。試験管内のコラーゲン分子から再構成される会合体の構造は溶媒の条件、また共存物質、温度、pHなどに依存する。例えば、グリコサミノグリカンが存在するとコラーゲン分子は頭と尻尾の方向がランダムになるためセグメント内に対称性を有する線維（FLS線維という）ができる。また、イオンの種類によっては線維にまで成長しない小さい会合体の存在が多数見られる。

Woodは試験管内のコラーゲン線維再構成実験から、線維の太さは会合体形成の初期に形成される核の数によると提唱した。すなわち、無機のイオン結晶の大きさの決まるモ



(A) コラーゲン線維中のコラーゲン分子(矢印で示してある。長さは 300 nm)の位置。側面のとなりの分子とは 67 nm づつずれて存在する。前後の分子との間は 35 nm 間隔がある。側面に 5 ケの分子が並ぶと ( $67\text{nm} \times 5 = 335\text{nm}$ ) 分子の長さ (300 nm) と間隔の長さ (35 nm) の和と等しくなるので、1 番目の分子と 6 番目の分子は頭がそろう。

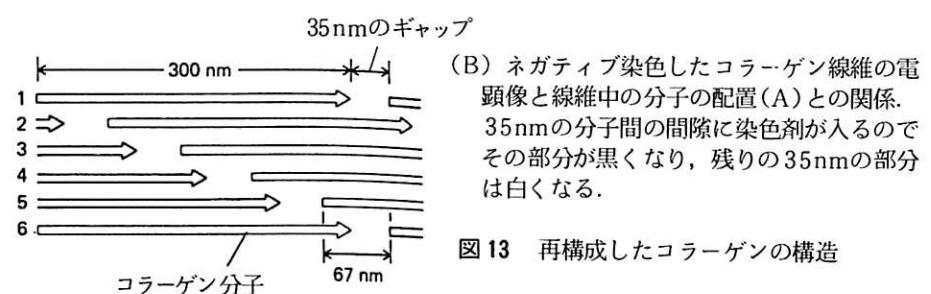


図 13 再構成したコラーゲンの構造

ルと同じ考え方で説明できるとした。しかし、その後の多くの研究結果は必ずしもコラーゲン線維の形成はそのように単純にわりきって、説明されえない。生体内でのコラーゲン線維の形成は試験管内でコラーゲン溶液をいきなり線維に会合する条件に移すようには行われていない。線維の形成速度・反応条件が線維の太さに影響し、コラーゲン分子の性質だ

けでコラーゲン線維の太さが決まるとは考えにくい。生体内ではコラーゲンはプロコラーゲンとして細胞外に分泌されたあと、N および C プロペプチドが特異的に切断、プロセスされてコラーゲンになる。コラーゲンに転換されたものだけが線維へと会合するので、プロコラーゲンからコラーゲンへの転換反応がコラーゲン濃度を調節することになる。C 側のプロペプチドが切れ易い状態では pN コラーゲンができる、これは非常に細い線維を形成する傾向がある。一方、N 側のプロペプチドが切断され易い条件下では、pC コラーゲンが蓄積する。pC コラーゲンはそれ自身は線維形成能がないが、C プロペプチドの切断とともに、コラーゲン分子が徐々に生成されコラーゲン分子が一つ一つ会合体へ付加していくには非常に太い線維 ( $\mu\text{m}$  にもおよぶことがある) が生成される。このようにコラーゲン分子の有効濃度が低く、しかし、最終的には多量のコラーゲン分子が存在すれば、線維の直径が大きなものができる。逆に有効濃度が高く、小量のコラーゲン分子が存在すれば細い線維になる。

コラーゲン線維の太さはこの外にもいくつかの因子によって調節され得る。図 14 にタンパク質などからできる会合体の大きさが一定なサイズになることの原理を示す。コラーゲンの線維の太さについても似たような考え方で原理的に考えられる。筆者らは I 型コラーゲンの線維の太さが V 型コラーゲンの存在によって制限されることを見い出した。V 型コラーゲンはそれ自身でも細い横紋構造を有する線維を形成しうる<sup>33)</sup>が、その構造は比較的脆弱で電顕操作中に壊れ易い。I 型コラーゲンと V 型コラーゲンとを共存させると V 型コラーゲンが 1/2 以上ある限り、I 型コラーゲン線維は単独の時のように太くなれない<sup>34)</sup>。すなわち、V 型コラーゲンはコラーゲン線維の太さを制限する作用をもつ。従って、生体内でも、V 型コラーゲンの濃度が高い場合は太い線維は形成されない。このことは生体組織中の V 型コラーゲンの分布との関係で興味深い。抗 V 型コラーゲン抗体は基底膜の直下などに強く染まるが、この部分には直径 50 nm 以下のコラーゲン細線維が存在する<sup>35)</sup>。

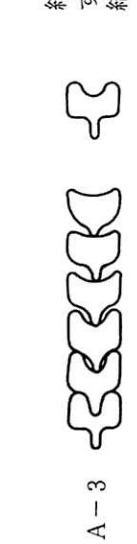
コラーゲン分子にはいくつもの遺伝的に異なる分子種があるので、これらの混合物から異なる形態の会合体ができる。表 4 に筆者らのハイブリッド会合体についての仮説を示す。生体内の構造の解明には原理的には何種類かの成分の組合せが、どのように、どのくらいの割合で、どういう順序で、どのくらいの量が、どこで起こるかということに依存することになり、化学反応式で書くとしたら、非常に多数の式になろう。それだけでなく各反応の速度式は非線形である上、反応の環境条件の小さな変化により異なってくる可能

A. 会合体の大きさ、とくに長さが一定になる原理

1. 物質の量に限度がある
  2. 副尺
  3. 会合体中の分子構造にひずみが積み重なる
  4. 長さ一定の高分子
- A - 1 全モノマー濃度 = N  
 会合体の数 = n  
 会合体当たりのモノマーの数 = m  
 もし n が一定であるとするとき、N に比例して m の数が決まり、会合体の大きさが決まる。



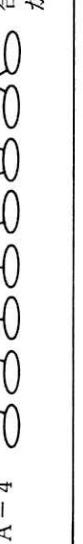
- 30 -



A - 3  
 A - 4  
 結合したものが少しずつ構造変化をし、結合定数が小さくなる。  
 線状の分子鎖との結合能によって会合体ができる。



A - 2  
 □ が 9 ケ、■ が 10 ケ並ぶと丁度端が揃う。



□ が 9 ケ、■ が 10 ケ並ぶと丁度端が揃う。

図 14

B. コラーゲン細線維の直径が一定になることの原理

1. 細胞表面上に一定の径の穴 "オルガネラ" がある、これから線維が伸びてくる
2. プロテオグリカンなど一定の長さのものが、"しみなわ" のように線維の周囲に巻きつく
3. らせん状に会合するコラーゲン分子のコンホメーションの "ひづみ" が大きくなる



- 31 -



輪の大きさは鎖の長さによる。

径が細胞表面の  
径で決まっている。

分子が線維の軸に対して傾斜してらせん状に結合してゆくすると、太いものほど外側にある分子はその角度が大きくなり、分子の棒状からの逸脱が大きくなる。その結果分子間相互作用が弱くなる。

表 3 コラーゲンの型の特徴

型	組成	らせん部分の長さ (nm)	会合体構造	分	布	染色体番号(ヒト)
I	$(\alpha_1(I)_2) \alpha_2(I)$	300	細線維	最も薄い、各臓器間質	$\alpha_1(I)$ 17 $\alpha_2(I)$ 7	
II	$(\alpha_1(II)_3$	300	細線維		12	
III	$(\alpha_1(III)_3$	300	細線維	多くの線維で I 型と共存 V 型と共存の場合もある 基底板	2	
IV	$(\alpha_1(VI)_2 \alpha_2(IV)$	390	ボリゴナル酸 網目		$\alpha_1(IV)$ 13 $\alpha_2(IV)$ 13	
V	$\alpha_1(V) \alpha_2(V) \alpha_3(V)$	300	細かい細線維 しばしば基底板直下	基底板直下の III や I とも共存	$\alpha_1(V)$ ? $\alpha_2(V)$ 2 $\alpha_3(V)$ ?	
VI	$\alpha_1(VI) \alpha_2(VI) \alpha_3(VI)$	105	シクルフィブリル	間質	?	
VII	$(\alpha_1(VII)_3$	450	2 棒状の短い線維	アンカリシン、フィブリル	?	
VIII	$(\alpha_1(VIII)_3$	?	?	内皮細胞の細胞外マトリックス、その他	?	
IX	$\alpha_1(IX) \alpha_2(IX) \alpha_3(IX)$	200	II 型コラーゲン組織の表面	軟骨の線維中	?	
X	$(\alpha_1(X))_3$	150	?	硝子の骨化する先端に	?	
XI	$\alpha_1(XI) \alpha_2(XI) \alpha_3(XI)$	300	細かい線維	の線維として	?	
XII	(IX) と分子構造は似ているので非					

- 31 -

性がある。さらに、問題を複雑にするのは、（しかし、生物学的には決して無視できないのは）コラーゲンの構造体形成に対する、細胞からの影響、働きかけがある。それには生化学的なものだけでなく、力学的な影響（収縮力、伸張力その他）、すなわち、細胞の運動など細胞骨格の構造および構造変換がコラーゲン線維の構造形成に関与する。

図15aに組織構築骨格とコラーゲンの型別会合体の関係についての筆者らのモデルを示す。表4で示した仮説との関連、および特異抗体による組織分布の結果に基づいて提唱

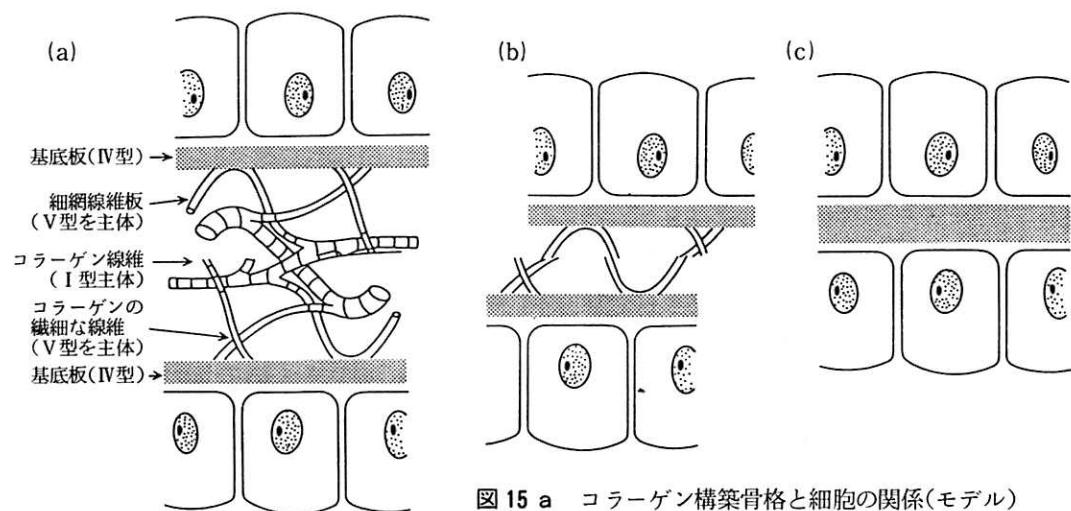


図15a コラーゲン構築骨格と細胞の関係(モデル)

- 1) 上皮細胞、内皮細胞、筋肉細胞ではその周辺に基底板が存在する。基底板はIV型コラーゲン1ないし数本の分子からなる極細線維の編目。
- 2) 基底板に細いV型コラーゲンを主体としたコラーゲン線維(直径30~40nm)が供給し細網線維板を構成している。この細い線維はもっと太いコラーゲン(I型コラーゲンを主体とする)へと結合している。
- 3) 太いコラーゲン線維のない部分では(b)のような関係になり、コラーゲン線維のない部分(たとえば腎球体基底)では(c)のような関係になっている。

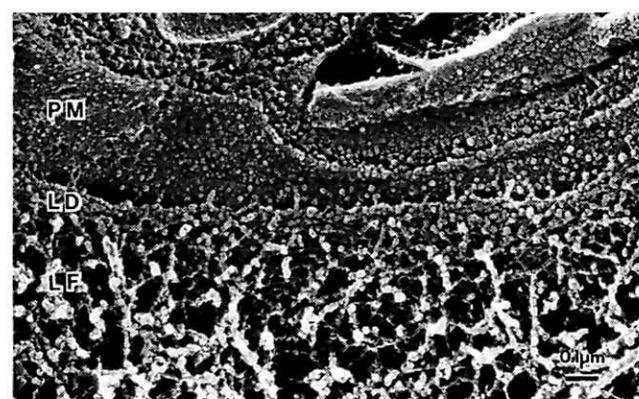


図15b マウス脾臓の急速凍結ディープエッティング回転シャドウ法による電顕像。（安達らによる未発表データより）

PM: 細胞膜  
LD: 紹密板(基底板)  
(lamina densa)  
LF: 細網線維板  
(lamina fibroreticularis)

表4 I, III, IV, V型コラーゲンおよびそれらのハイブリッド会合体についての仮説

IV型コラーゲン会合体	基底板
IV型コラーゲンとV型コラーゲンのハイブリッド会合体	脾臓、肝臓などの類洞をとりまく輪状線維
V型コラーゲン会合体	細いコラーゲン細線維
V型コラーゲンとIII型コラーゲンのハイブリッド会合体	細いコラーゲン細線維
III型コラーゲン会合体	コラーゲン細線維
III型コラーゲンとI型コラーゲンのハイブリッド会合体	コラーゲン細線維およびコラーゲン線維
I型コラーゲン会合体	コラーゲン細線維およびコラーゲン線維
V型コラーゲンとI型コラーゲンのハイブリッド会合体	細いコラーゲン細線維

している。二種以上の型のコラーゲンが会合体を形成すると(ハイブリッド会合体)これらの異なる会合体が連結することになる。各型のコラーゲンの相対的な存在量を面積で考えると図16のように表わせる。もちろん、臓器、組織、動物、年齢などによってこれらの量的な関係は大幅に異なるはずである。図15bは急速凍結法で得られた組織の電顕像であるが、細胞膜直下の基底板(ち密板=ラミナデンサ)，その下の細いコラーゲン線維(線維細網板=ラミナレティキュラリス)が連結しているようすがよくわかる。

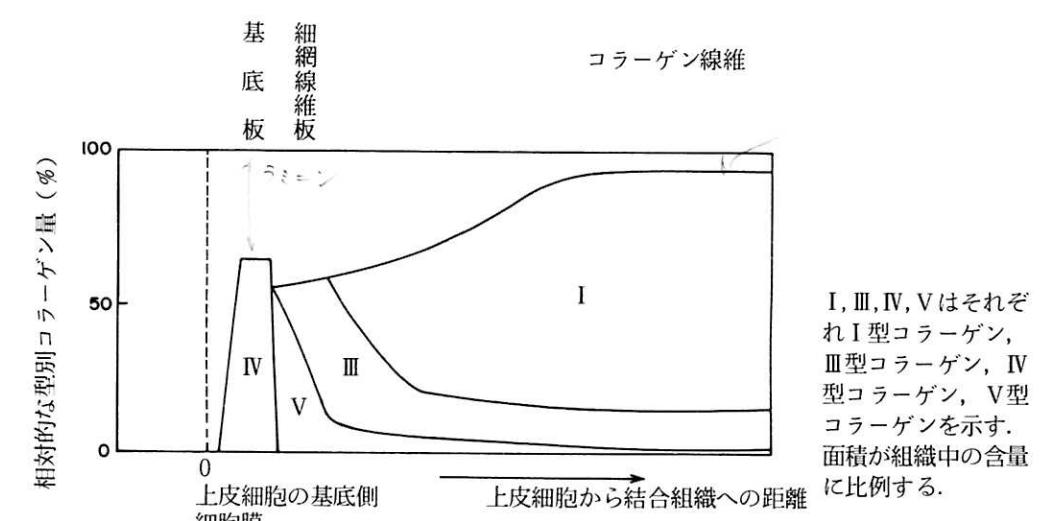


図16

### 3) コラーゲンの遺伝子

#### (1) 染色体上の座、ゲノムの数<sup>36,37)</sup>

ヘモグロビンの  $\alpha$ 鎖、 $\beta$ 鎖の遺伝子は異なる染色体上にある。コラーゲン分子I型分子は二種のポリペプチド鎖、 $\alpha_1(I)$ 、 $\alpha_2(I)$ 鎖からなるが、各遺伝子は染色体7番と17番に別々に存在する。線維性のコラーゲンの遺伝子は分散して存在しているようである。しかし、コラーゲンIV型の場合は、 $\alpha_1(IV)$ の遺伝子の頭と、 $\alpha_2(IV)$ 鎖の遺伝子の頭が向き合った状態で同じ染色体(13番)上に存在する。二つの遺伝子はそれぞれのプロモーターを非常に近いところに有している。各型のコラーゲン  $\alpha$ 鎖の染色体遺伝子座を表3に示す。

#### (2) 構造遺伝子の構造 イントロン、エキソン

コラーゲンは三本のポリペプチド鎖( $\alpha$ 鎖)からなる。 $\alpha$ 鎖の種類を1, 2, 3で表わし、各分子の型をローマ数字、I, II, III, IV, V……で表わす。例えばIX型コラーゲンの $\alpha_3$ であれば、 $\alpha_3(IX)$ と表わす。一方、そのポリペプチド鎖に対応する遺伝子の方はCOLとAの間に型の数字をいれ、Aのあとに $\alpha$ 鎖の種類を示す番号を入れて表わす。 $\alpha_3(IX)$ に対応する遺伝子はCOL<sup>9</sup>A3となる。線維性のプロコラーゲン $\alpha$ 鎖遺伝子(ゲノム)は51あるいは52のエキソンがイントロンによって分断されている(図17、図18)。エキソン5'側のnoncoding(アミノ酸に読まれない)部分が133塩基対(bp), シグナルペプチド(66 bp), N末プロペプチドのはじめの4 bpからなる。エキソン2から5はN末プロペプチド内のアミノ酸配列をコードする。エキソン6はN末プロペプチドの最後の4ヶのアミノ酸に対応する12 bp, N末テロペプチドに対応する36 bpおよびコラーゲンらせんのはじめの3ヶのアミノ酸に対応する9 bpからなる。コラーゲンらせん部分は1014ヶのアミノ酸からなるが、これは全部で44ヶのエキソンからなる。エキソン7から48までの42ヶのエキソンはらせん構造に対応するアミノ酸配列をコードするもののみからなる。エキソン49はらせん構造部分のほかにそれに続くC末テロペプチド(15のアミノ酸からなる)およびCプロペプチドのはじめの52ヶのアミノ酸にあたる部分からなる。Cプロペプチドの残りはエキソン50-52でコードされている。エキソン52はCプロペプチドのおわりの部分とnoncoding部分からなる。このnoncoding部分にはポリアデニル酸の付加するコンセンサス配列(AATAAA)が4ヶ以上存在する。

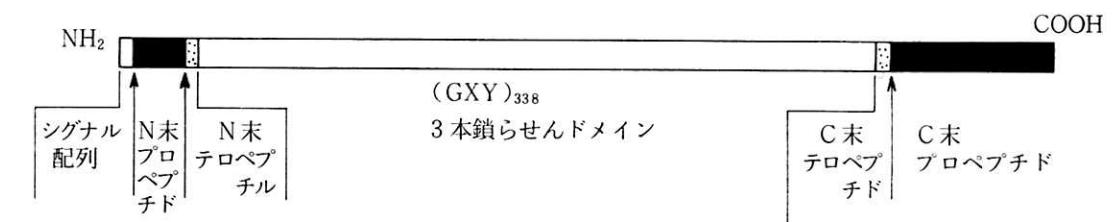
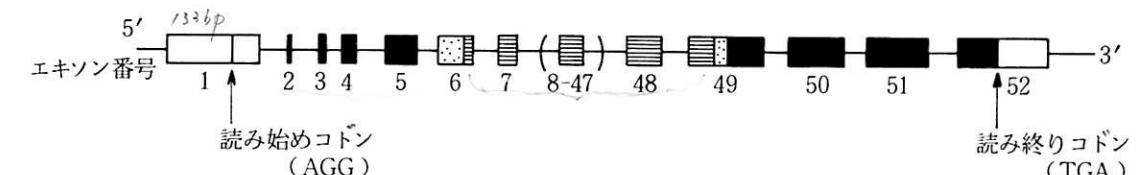


図17 ニワトリコラーゲン  $\alpha_2(I)$ 鎖の遺伝子(上)とポリペプチド(下)の構造

COL 1 A 1 ( $\alpha_1(I)$ )

- 黒く塗りつぶしてある部分がエキソン
- 横棒だけの部分がイントロン

COL 1 A 2 ( $\alpha_2(I)$ )

COL 2 A 1 ( $\alpha_1(II)$ )

COL 3 A 1 ( $\alpha_1(III)$ )

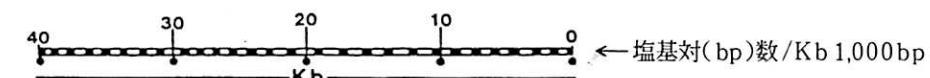


図18 線維性コラーゲン遺伝子のエキソン-イントロンの配置とサイズ

線維性コラーゲンのコラーゲンらせん部分に対応するエキソンの大きさは規則的である。すべて、9 bp の倍数になっている。54 bp のエキソンが 23 ケ、108 bp のが 8 ケ、45 bp が 5 ケ、99 bp が 5 ケ、162 bp が 1 ケある。108 bp と 162 bp のものは 54 bp のエキソンが融合してできたと考えられるので、54 bp がコラーゲンエキソンの元ではないかと考えられている。45 bp や 99 bp のものは組み替えの際に 9 bp がなくなったという考え方である。

C プロペプチドは線維性のコラーゲンの型によって殆どその構造に違いがない。エキソン 52 の大きさはまちまちであるが、アミノ酸に読まれる部分はどれも 144 bp であり、エキソン 51 はどれも 243 bp で、エキソン 50 は  $\alpha 1(I)$  と  $\alpha 1(II)$  で 3 bp 異なるだけである。それに比べると 5' 側の遺伝子は殆ど保存されていない。またイントロンの大きさも殆ど保存されていない。

これらの遺伝子上の共通点からコラーゲンの型は線維性とそうでないものとに大きく分けられる。その結果 I 型、II 型、III 型、V 型、XI 型の各コラーゲンが線維性である。とくにエキソン 9 からエキソン 15 (アミノ酸配列番号で 37-156) は 54 塩基対あるいは 45 塩基対を基本単位としてどれにも保存されている。3 塩基対で一つのアミノ酸をコードしているので、エキソン中の塩基対の数が 9 の倍数であることはアミノ酸でいうと GXY のトリプレットがセットで組み込まれていることになる。線維を形成するコラーゲンの  $\alpha$  鎖の種類による配列の違いを  $\alpha 1$  鎖と比較したのが表 6 である<sup>38)</sup>。これでみると、 $\alpha 1(XI)$  がアミノ酸配列でも塩基配列でも  $\alpha 1(I)$  鎖と最も異なっている。

コラーゲンを構成するアミノ酸は前にも述べたように G, P, A, 等が多い。アミノ酸組成から塩基組成を予想すると、はじめの二つの塩基組成は、グアニン、シトシン含量が多く、チミンが特に少ない。アミノ酸コードに対応する塩基の第三番目 (Wobble 塩基) は多くのアミノ酸ではどの塩基でもかまわないのであるがコラーゲンの遺伝子の場合は第一、第二の塩基の組成を補うかのようにグアニン、シトシンがくることが少ない。線維性のコラーゲンの  $\alpha$  鎖の間では  $\alpha 1(III)$ ,  $\alpha 1(V)$ ,  $\alpha 1(XI)$  では第三番目の塩基は T ついで A がよく使われ、 $\alpha 1(I)$ ,  $\alpha 2(I)$ ,  $\alpha 1(II)$  では T ついで C が使用される頻度が高い。このことから前三者および後三者がそれぞれ線維性のコラーゲンの中ではたがいにより近縁の遺伝子構造をしていると推察されている (表 5, 表 6)。

表 5 種々の線維性コラーゲンの COL 1A1 [ $\alpha 1(I)$ ] との差

	アミノ酸配列	塩基配列
COL 2A1	33	28
COL 1A2	39	35
COL 3A1	40	40
COL 5A2	48	42
COL 11A1	62	52

表 6 線維性コラーゲン遺伝子の 3 本鎖らせん構造領域に用いられているコドンの頻度

アミノ酸	第三番目 の塩基	COL- 1A1	COL- 2A1	COL- 1A2	COL- 3A1	COL- 5A2	COL- 11A1
グリシン	T	52	43	54	44	37	45
	C	27	28	20	12	16	13
	A	18	24	22	37	34	28
	G	3	5	4	7	13	14
プロリン	T	59	61	63	55	51	51
	C	38	28	21	13	9	7
	A	3	11	15	31	33	39
	G	0	0	1	1	7	3
アラニン	T	75	59	77	61	50	44
	C	20	29	15	14	6	11
	A	5	12	8	23	33	45
	G	0	0	0	2	11	0

線維性のコラーゲンであるかどうかのもう一つの経験的な目印は架橋結合部位としての Gly-X-Lys-Gly-His-Arg のアミノ酸配列である。Lys はポリペプチド鎖中で水酸化されてヒドロキシリジン (Hy 1) になっていて、しかもこの配列がエキソン 11 の末端にあり、アミノ酸配列では 85~90 になるように保存されている。

線維性でないコラーゲンの遺伝子では IX 型コラーゲンの分子内的一部分を除くとこのようない線維性コラーゲン遺伝子に共通の構造は見られない。基底板の骨格を構成する IV 型コラーゲンでは C 末側に NC-1 (noncollagenous) と呼ばれる非コラーゲン性の 229 ケのアミノ酸からなるドメインがある。三本鎖らせん部分は IV 型コラーゲンでは 1500 ケのアミ

ノ酸からなる。NC-1 は 2 ケの類似サブドメインからできており、それには 6 ケのシステムが存在する。IV 型コラーゲン遺伝子構造、 $\alpha 1$ (IV) および  $\alpha 2$ (IV)，をみると線維性のコラーゲン遺伝子とはいつかの点ではっきり異なる。第一はエキソンの大きさは 54 bp との対応はない。第二に GXY のトリプレット構造がしばしばずれていて(20 ケ所以上) 分子の形状が直線からずれている。トリプレットのみだれの大きさと位置は  $\alpha 1$ (IV) と  $\alpha 2$ (IV) とで一致している。第三にコラーゲンらせんをコードするアミノ酸コードの 2 番目の塩基対からエキソンが始まることが多い。多数のイントロンによって、エキソンが分断されているのは同様である。

### (3) 遺伝子発現調節

一般にタンパク質合成の発現はプロモーターさらにはエンハンサー、サイレンサーと呼ばれる DNA 上の特定の配列によって調節されている<sup>40, 41)</sup>。プロモーターには RNA ポリメラーゼの結合部位が含まれるので各型のコラーゲン遺伝子の発現が型によって異なるプロモーターが各型のコラーゲン遺伝子の上流にある。これまでの報告では I 型コラーゲン遺伝子の発現はプロモーターだけでは弱く、発現調節に関与する遺伝子が第一番目のイントロン内にある(エンハンサーもサイレンサーも)との報告がある。一方、イントロンの機能はよく分かっていないが、同じ種類の遺伝子、例えばコラーゲン  $\alpha 1$ (I)鎖の遺伝子、が動物によって大きく異なる部分は恐らくイントロンの塩基配列上には特別の機能がなく一定以上の長さに意味があるものと考えられる。そこで、構造遺伝子以外の塩基配列で動物種によって殆ど変わらず、むしろ保存されている場合はなんらかの生物学的機能があると予想される。機能の一つはコラーゲンに特異的なプロモーター、エンハンサーなどの遺伝子発現調節領域である。このようにして、また多くの他のタンパク質のプロモーター構造との類似性からコラーゲンの各型についてのプロモーターが見いだされあるいは推定されていている。TATA ボックスや CAAT ボックスが I 型コラーゲンや III 型コラーゲンのプロモーターに存在するとの報告がある。一方、 $\alpha 1$ (IV) コラーゲンの遺伝子上流には TATA ボックスは見当らない。相補 DNA 鎖の配列には 3 つの CAAT ボックスが存在する。基底膜の主要成分であるラミニンあるいはフィブロネクチンと同様サイクリック AMP で発現調節される DNA 領域が  $\alpha 1$ (IV) コラーゲン遺伝子の 5' 側にある<sup>39)</sup>(図 19)。

多数のエキソンからなる遺伝子の転写ではスプライシングされ mRNA ができる。フィブロネクチンでは臓器によって発現したり、しなかったりするエキソンが存在する。

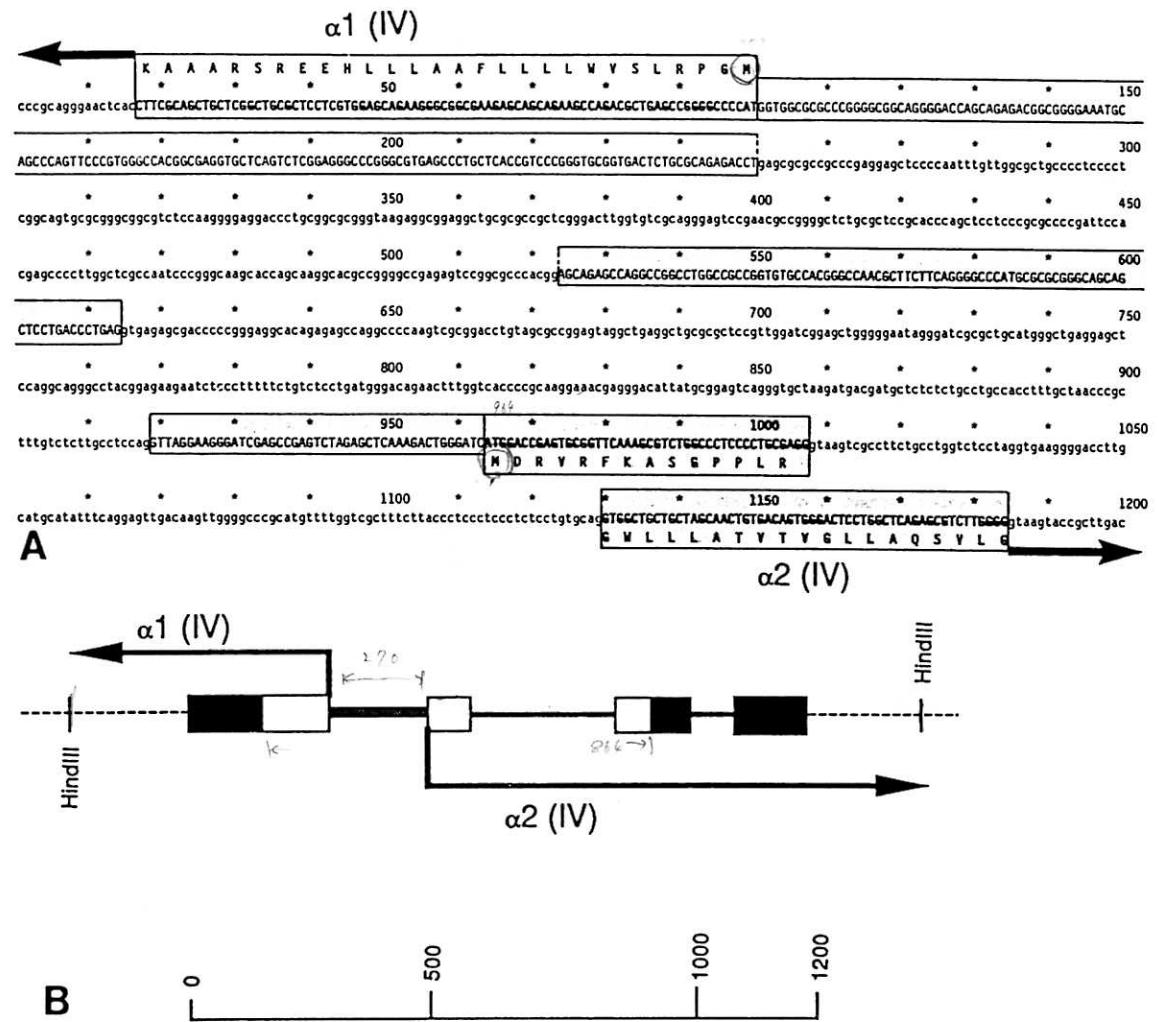


図 19 IV型コラーゲン遺伝子の  $\alpha 1$ (IV) および  $\alpha 2$ (IV) プロモーターの位置

A :  $\alpha 1$ (IV) と  $\alpha 2$ (IV) 遺伝子の 5' 側と 2 つの遺伝子にはさまれた領域のヌクレオチド配列。2 つの遺伝子は翻訳開始コードは 84 塩基、転写開始コードは 270 塩基しかはなれていない。CDNA との比較からエキソンの部分を決めたところは枠で囲ってある。矢印は 5' から 3' への(各遺伝子での)方向を示す。各遺伝子ともエキソン 1 の 5' 末端は決められない。用いた CDNA クローンの対応する部分は点線の枠で示してある。 $\alpha 1$ (IV) 遺伝子は相補塩基配列になっている。遺伝子コードに対応するアミノ酸配列は右から左へ書いてある。

B : マウスの  $\alpha 1$ (IV) および  $\alpha 2$ (IV) ゲムウの 5' 端部分の模式図。白い枠の部分は翻訳されない遺伝子部分で、黒く塗ってある部分は翻訳部分。太い線は  $\alpha 2$ (IV) 鎖遺伝子のイントロンで、斜線部は 2 つの遺伝子の間の部分。点線の部分は A の図にのっていない部分を示す。

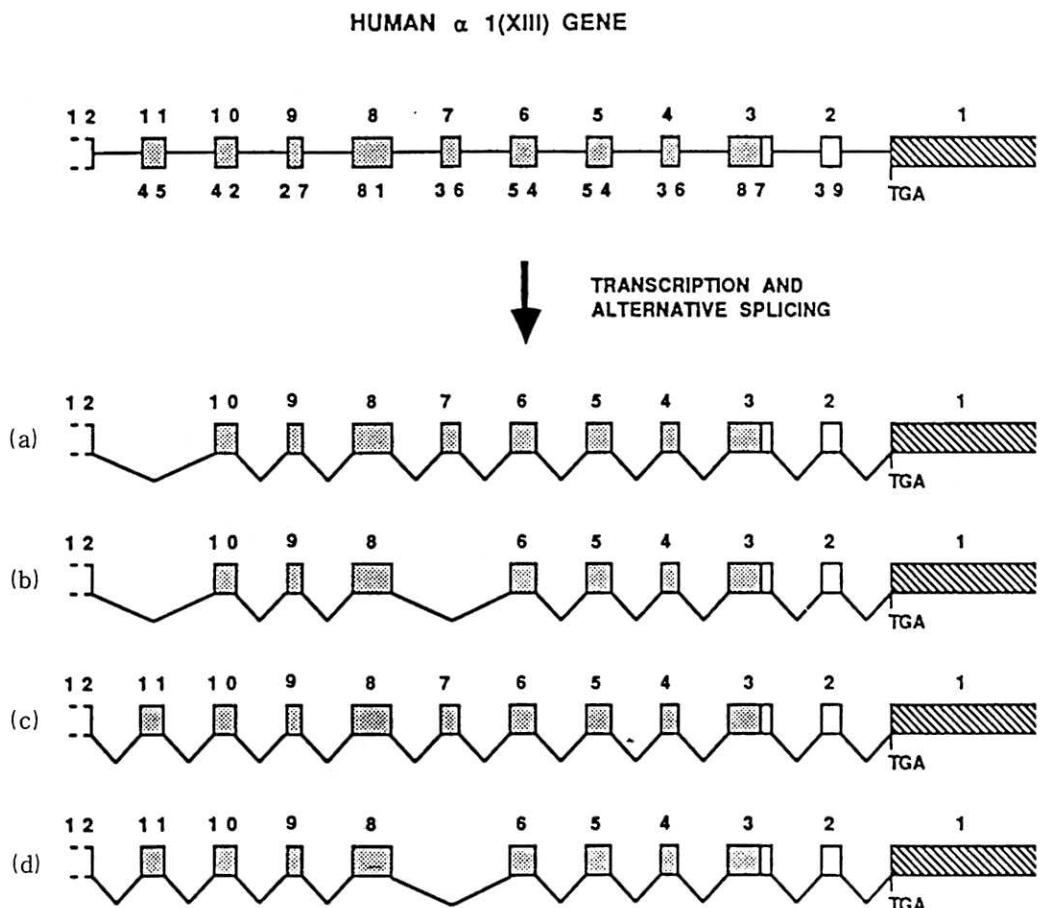


図 20 ヒト  $\alpha$  1(XIII) の遺伝子と alternative splicing.

コラーゲン性ドメインのエキソン 7 から 11 のうちのいくつかを用いて 4 種の異なる mRNA ができる (a) から (d) まで。四角で囲んであるのがエキソン部分で、イントロンは線で示してある。

これはプリ mRNA からのスプライシングが異なるためである。このように同一の遺伝子から異なった mRNA できることを alternative splicing (スプライシング多様性) という。最も新しく見い出された XIII 型コラーゲンではこのようなスプライシング多様性がある (図 20)。

#### 4) コラーゲンの機能

##### (1) コラーゲン会合体の機能

動物の体重が大きく、またその重量がかかる臓器、組織ほど、コラーゲン特に I 型コラーゲンの含有量が高い。このことから、コラーゲン線維の生体にとって最も重要な機能の

一つは力学的な強度の高い構造を形成することである、と結論できる。動物の発生、器官形成の初期では I 型コラーゲンが発現されなくとも本質的には何も致命的なことはない。形態が大きく成長しその大きさからくる重力あるいは動物の発生に於ける後期で筋肉など運動により力がかかってくるようになると I 型コラーゲンの欠損は致命的となる。器官・組織の形態形成特にその骨格構造の形成はコラーゲンの会合体形成そのものといってよからう。実質細胞が主体の臓器でも (例えば肝) 臓器が大きいほど、支持体構造がしっかりしていることが必要であり、そのための丈夫な骨格構造はコラーゲンの会合体となる。すなわち、細胞の住処の鉄骨、鉄筋として働いている。上皮細胞や内皮細胞では細胞のベイサル (基底) 側には基底膜構造があり、細胞の極性を決めていると同時に、上皮細胞あるいは内皮細胞と間充織あるいは結合織の細胞とが直接接觸しないようになっている。つまり、仕切りを形成し、物質の透過も調節している。この基底膜の骨格構造は IV 型コラーゲンの会合体であり、基底膜の力学的構築を形成している。

マウスの唾液腺は図に示すように枝分かれがフラクタル的にできてくる。この唾液腺の分枝の初期 (クレフト形成) のクレフト部分に III 型コラーゲンが蓄積している。クレフト形成は I 型コラーゲン発現が欠損しても起こる。I 型コラーゲン、III 型コラーゲンを特異的に分解する動物コラゲナーゼを唾液腺の分枝中に加えると分枝はそれ以上進まない (図 21)。このときコラゲナーゼに特異的な阻害物質を加えると分枝は進む。以上のことからマウス唾液腺のクレフト形成に III 型コラーゲン線維が特異的に関与している<sup>43)</sup>と推察される。なぜ、III 型コラーゲンでないといけないのか。筆者の空想を述べれば、III 型コラーゲン線維に特異的に結合し、III 型コラーゲンを引っ張るような線維芽細胞様の細胞が存在し、この細胞のコラーゲン III 型線維に対する作用の結果、物理的に唾液腺上皮細胞が増殖しない部分が生まれ、そこがクレフトとして存在するためではないかと思う。

##### (2) 細胞のコラーゲンへの接着と細胞骨格

前にも述べたが細胞は *in vivo* でも *in vitro* でも、何か基質に接着してのみ生存できる。*in vitro* で細胞が培養皿からはがれると死滅する。(腫瘍細胞では接着なしにも増殖するものがある。) そのような意味で一般に細胞接着を促進する基質は細胞増殖因子ともいえる。生体内で細胞が接着している基質は糖タンパク質であることが多い。コラーゲンは体の中に最も豊富に存在するタンパク質で細胞の基質になる。コラーゲンあるいは一般に細胞外マトリックス成分は天然の固相状の細胞機能調節因子と考えるべきであろう。他

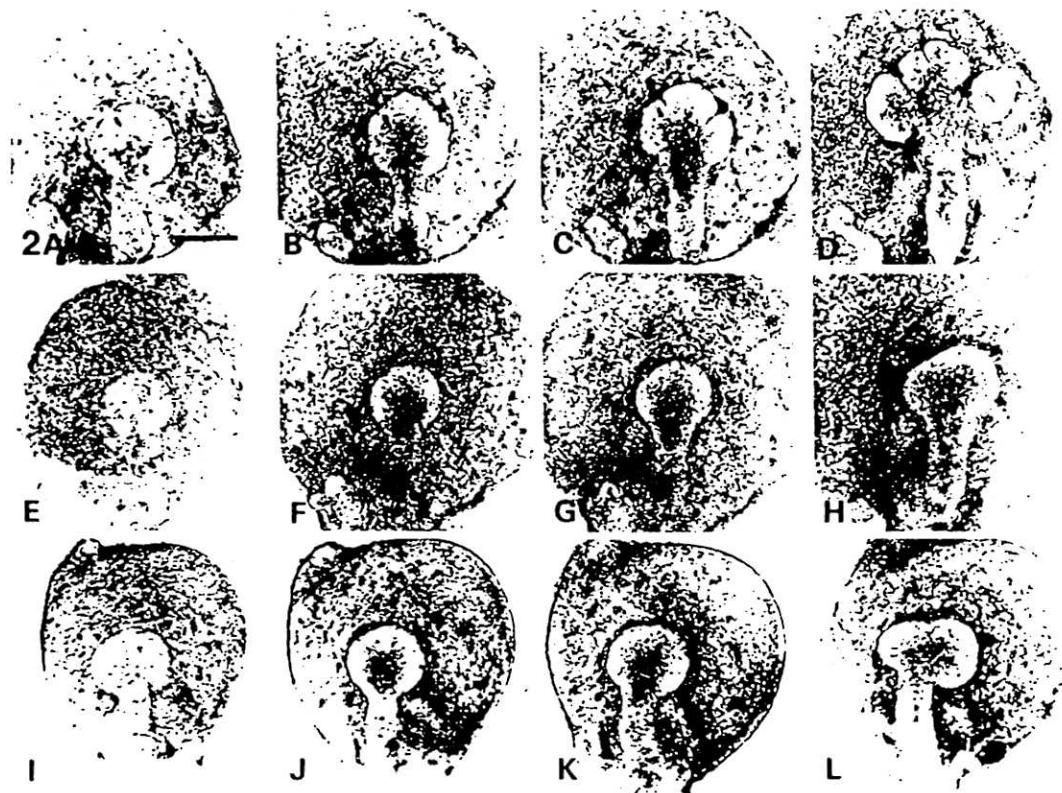


図21 マウス唾液腺クレフト形成とⅢコラーゲン

下頸腺の形態形成(クレフト形成). 12日目の腺の培養, A : 1 h後, B : 6 h後, C : 10 h後, D : 24 h後. バクテリアあるいはウシの歯臓のクレフト形成部分は抗Ⅲ型コラーゲン抗体下でよく染まる.

の細胞調節因子(成長因子, ホルモン, 細胞間伝達物質)が細胞に与える影響についてもコラーゲンの存在の有無, あるいはもっと細かくはコラーゲンの量, 質によって変化することは十分考えられる。細胞機能へのコラーゲンの影響については別の章で詳しくふれられる。

コラーゲンが細胞に影響を与えるとき, 細胞はまずコラーゲンに接着する。接着には細胞表面のコラーゲン受容体が関与し, さらに結合したというシグナルが細胞内の細胞骨格構築に影響を与えると考えられる。その結果, 細胞の形態, 増殖, 生合成, 分泌など種々の細胞機能が影響されるという模式で筆者らはとらえ, その詳細を検討している。これに関連して, 培養した正常線維芽細胞と線維肉腫細胞(HT1080細胞)のコラーゲンに対する応答反応の比較は興味深い。HT1080は正常な真皮由来の線維芽細胞と比べて細胞外マ

トリックス成分の合成(コラーゲンやフィブロネクチンなど)が著しく低い。線維芽細胞を再構成したコラーゲンゲル内で培養日数とともにゲル全体が縮んでくる<sup>45)</sup>。このゲル収縮現象は線維芽細胞あるいは平滑筋細胞に特異的なもので, その外の細胞では収縮が起るとしてもほんのわずかである。ところがHT1080細胞でもコラーゲンゲルの収縮ははっきり見られる<sup>49)</sup>。HT1080ではコラーゲンへの特異的な結合も見られ, コラーゲン受容体の存在も分離・同定されている。また, HT1080細胞の形もコラーゲン線維の存在により, 正常な線維芽細胞同様, 紡錐形よりさらに細長い形態になる<sup>45)</sup>。ところがコラーゲン線維による細胞増殖, タンパク合成などの抑制は受けない。細胞骨格のうちファロイジンで染まるアクチンフィラメントの会合状態は著しく異常になり, 分断されている。

正常な線維芽細胞のコラーゲン線維による形態変化の誘導がアクチンの会合体形成に影響するサイトカラシンDの添加により阻害されない。それどころかむしろ促進される。現在までのところ, 細胞に対するコラーゲンの影響のうち, 細胞増殖, 蛋白合成の抑制に関してはアクチンフィラメント構築が関与している可能性はあるのに対し, 線維芽細胞の形態に対するコラーゲンの影響においてはアクチンフィラメントが関与しているとは考えにくい。

### (3) コラーゲン結合性タンパク質とコラーゲン受容体

これについては別の章, あるいは章の終りにあげた総説を参照してほしい<sup>46)</sup>。コラーゲン結合性タンパク質とコラーゲン受容体の違いは後者は前者の性質を有するだけでなく, 細胞膜表面に存在し, かつ細胞の接着に関与していることが示された(例えば, 特異的な抗体により細胞接着が阻害される)ものというのが現在の定義である。

### (4) コラーゲン分解物の生理活性

細胞が結合すべく, 認識する化学構造が固相状態にあれば, 細胞接着の基質になり, 液相に溶けていれば, 走化性を示す物質になりうる。コラーゲン由来のペプチド断片が走化性をしめすと言う報告が見られる。コラーゲン線維中の架橋結合(ピリジノリンを含めた種々の蛍光物質), エラスチン中の架橋(デスマシン, イソデスマシンなど)は白血球(マクロファージを含む)あるいはその他の細胞に対し走化性活性をもつ。

### (5) コラーゲンの遺伝子病

一般にタンパク質の機能を考える上で, タンパク質分子の化学構造上に変異がある時, 生体がどのような影響をうけるかを調べる方法がある。コラーゲンの場合は特に人では遺

伝的に受け継がれた、あるいは特発性の変異を有するコラーゲンポリペプチド鎖が見られる個体がある<sup>47,48,49)</sup>。実際に研究を行われたのはそれとは逆の経過を経ている。すなわち、臨床的に明らかに結合組織に形態以上の異常<sup>異常</sup>の見られる患者の線維芽細胞あるいは白血球のDNAの構造の異常をコラーゲンポリペプチド鎖のDNAプローブでスクリーニングして見つけられている。臨床的な異常としては1) osteogenesis imperfecta (I型からIV型), 2) Ehlers -Danlos (I型からVII型), 3) Marfan, 4) その他がある。その中でもコラーゲン遺伝子異常が最も頻繁に見いだされるのは osteogenesis imperfecta (骨形成不全症)である。

これまでに報告のあった例を表7に示す。

表7 骨形成不全症患者のコラーゲンタンパク分子の異常の例

アミノ酸置換		
グリシン	$\xrightarrow{748^*, 988^*}$	システイン Tm↓
グリシン	$\xrightarrow{391^*, 664^*}$	アルギニン
グリシン	$\xrightarrow{907^*}$	アルパラギン酸 Tm↓
過剰修飾		
リジン酸基	Ep↓	
スプライシング異常(エキソン 10-12が欠損)		
プロ $\alpha$ 2(I)の欠損		
タンパク質成量の低下, 分泌の遅延		
電気泳動の移動度が低い Ep↓		
変性温度が低くなる Tm↓		
* 数字は $\alpha$ 1(I)鎖の残基番号を示す。		

#### (6) 遺伝子操作あるいは遺伝子注入法によるコラーゲンの機能の解析

Jaenisch らはマウスの胚発生の中、後半の器官の成長を調節する機構の解明のため、レトロウイルスを12日目に感染させタンパク質の発現を修飾した。レトロウイルスが胚の細胞に挿入されたものが13種得られた(Mov 1からMov 13まで)。そのうちMov 13はヘテロ接合体では特になにも異常が見られないのに、ホモ接合体では初期発生は進むのに後期のはじめで(12日目頃)死滅する。Mov 13のホモ接合体から取り出した臓器(肺、腎、その他)を組織培養すると、各臓器は順調に発生・成長する。このホモ接合体由来の細胞はコラーゲン $\alpha$ 1(I)鎖を全く合成しないことが判明した。このようなマウスを用いて、I型コラーゲンの機能が解明される。彼らはI型コラーゲンを発現しなくなった細胞

に発現しうるヒトのI型コラーゲンの遺伝子を組み込み、発現させることに成功しているので、I型コラーゲンの構造と機能の解明のみならず、発現調節機構(部位、タイミング、量、などの調節)によるI型コラーゲンの機能の解明する一つの重要な系を得たといえよう。今後の研究の発展が期待される。組み込むコラーゲン分子の特定のペプチド部位のアミノ酸のコードを置換した(site-directed mutagenesis; gly → cysあるいはgly → arg)DNAを作成し、それを受精卵に注入することにより、骨形成不全症をマウスにつくることも可能であることが最近示された<sup>50)</sup>(図22)。これによると高々10%の異常分子の生産が正常組織の発生を妨げる。一方、正常な分子が50%しか生産されなくても組織の発生は正常である。これらの二つの事実は異常なペプチド鎖が正常なペプチド鎖の構造形成経路(分泌、三本鎖の分子構造、会合体構造、他の分子との相互作用など)に悪影響を及ぼすためである。

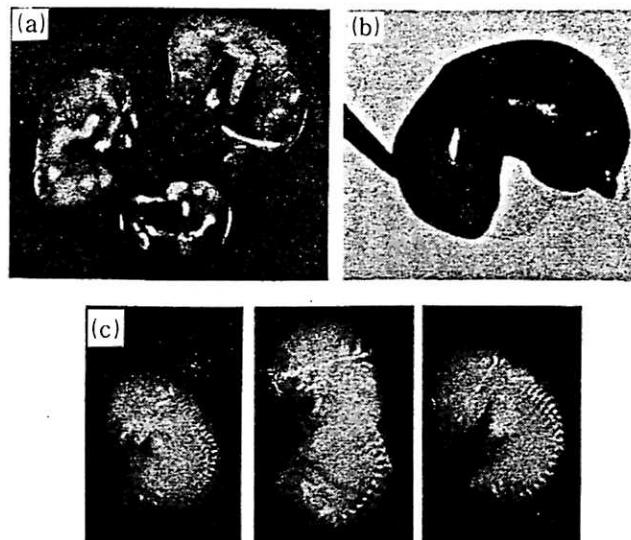


図22 アミノ酸コード置換したコラーゲン遺伝子( $\alpha$ 1(I))の注入によるマウス骨形成不全症の作成。トランスジェニックマイスの新生児の形態<sup>50)</sup>。

(a)の下と左がトランスジェニックマイス(胚25と胚28)で右側が正常胚(胚26)。(b)は胚25でピンセットで軽く頭を押すと頭蓋骨形成が欠損しているようがわかる。(c)は胚25(左)、胚26(中)、胚28(右)のX線写真。

同様にII型コラーゲンの発現欠損マウスを用いて、軟骨の発生・構造形成とII型コラーゲンの関係が追求されつつある。II型コラーゲン遺伝子を組み込むとその発現が軟骨組織のみに限られているなど興味深い研究成果が報告されている。ヒトのコラーゲン分子遺伝疾患ともあわせて、遺伝子解析、遺伝子操作、遺伝子挿入によるコラーゲンの構造、機能解析は分子生物学の方法論を駆使して解明されつつある。

## (7) コラーゲン病

膠原病 (collagen disease) という疾患群がある。コラーゲン病と訳せるがコラーゲン分子そのものの異常に由来すると言うことがわかっているわけではない。むしろ、コラーゲンの構造や代謝は直接関係無いと考えられるものがほとんどである。SLE (全身性エリスマトーデス)，強皮症，リュウマチなどは膠原病の代謝例であるが、これらに共通の特徴はない。リュウマチの場合、II型コラーゲンに特異的な自己免疫抗体ができている場合があり、動物実験等でその発症機構が検討されている。強皮症の場合はコラーゲン線維の異常な増加と考え、他の臓器線維性との類似性での研究例が多いもののコラーゲン量の増加というよりは筆者には質的な問題の方が重要に思える。いずれにしても根本的な疾患の病態像、診断、治療方針は不明である。一般に、線維症はコラーゲン成分の増加を伴うことが多いように見えるが、肺線維症のように量的な増加は殆ど認められず、質的な差、例えば、線維の配列の異常と考えられるものもある。筆者の私見では多くの臓器線維症でコラーゲンが多くなることが臓器機能低下の直接的な原因ではなく、コラーゲンの構築構造などの不良が細胞機能等に対して悪影響を及ぼすためとらえている。もちろん、異常なコラーゲン蓄積の増加は質的にも会合体機能の低下につながることはあろう。SLEの場合、自己免疫疾患ととらえて説明されていることもあるが、コラーゲンに対する抗体ではないようである。いずれにしても、コラーゲンとの関連は不明である。

膠原病と呼ばれている疾患のはほとんどすべてがコラーゲン構造あるいは機能の異常が直接的な原因となった患者ではないであろう。しかし、コラーゲンの構造、代謝上の異常との関係を完全に否定することも難しい。膠原病ではなくてコラーゲン病といいなおし、なんらかの意味でコラーゲンの構造あるいは代謝に異常がある疾患と考えたらどうであろうか。そうすると、間接的にはコラーゲンの構造・代謝の異常が細胞機能や他の生体物質の機能に影響を与えるという意味で、また、コラーゲンタンパク質が体の中に豊富に存在することも考え合わせると、コラーゲンの構造・代謝異常が疾患の進行、重篤度などの面で関与する疾患は非常に多いものと予想される。線維症のみならず、腫瘍の増殖速度・転移、糖尿病あるいはそれに合併しやすい疾患などである。各種臓器の線維症（例えば肝線維症）についても単にコラーゲンの相対的な蓄積があるとはいえる、それが原因であるというよりは、悪循環の結果であろう。一方、一見コラーゲンが全く関与してそうもない疾患でコラーゲン構造の正常からの subtle な逸脱がそのような疾患にかかり易くなるような背景を

与えるということもあろう。例えば、D. J. Prockop<sup>52)</sup> は osteoporosis (骨粗疕症) になりやすい体质とコラーゲン遺伝子の構造とは関係があると考えて研究している。このような疾患の原因、病態などの研究から、コラーゲンの生体における構造・機能に関する情報が得られることが期待される。

### 5) おわりに

コラーゲンの構造は 1) 分子構造と会合体構造の関係、2) 遺伝子による支配と遺伝子以外の翻訳後修飾反応などによる分子の品質管理、3) 他の生体物質の存在、環境による影響、4) 代謝調節、5) 細胞機能への影響、6) 動物の組織、臓器、個体の形態形成および維持における役割、など多細胞動物の生命活動の解明にいまや必須の情報となっている。生化学、分子生物学、細胞学、組織学、発生学、解剖学、病理学、生物工学、器官形成学、集合体の物質学、などなど学際的なアプローチ、情報交換をますます必要としている。現在はコラーゲンの構造解析および代謝がターゲットである。どのようにすればこれらの情報を生命現象の解明にむけて有効に活用できるであろうか、またどのような情報が必要でそれはどうやって手に入れられるであろうか。コラーゲンの機能の何をターゲットにおくか、コラーゲンの構造・機能相関に関する研究にも新しい局面が展開されつつある。コラーゲンに関する研究は他の生体物質についての発展を参考にしながら、又、一方では独自の道を切り開いて行く必要があるように思われる。

## 2.2 エラスチン

### 2.2.1 エラスチン及びその遺伝子の構造

エラスチンは無脊椎動物には存在しないが、無頸類や円口類を除く全ての脊椎動物に存在する。またエラスチンは弾性線維のコア蛋白質として、大動脈、頸靭帯、肺、皮膚などの弾性組織をはじめ、心臓（心膜）、肝臓、結腸、眼、子宮、耳、唾液腺などにも分布している。

1970 年代から 1980 年代前半にかけて、銅欠乏<sup>53)</sup> やラチリズムの動物から単離されたトロポエラスチン (tropoelastin, エラスチンの前駆物質) のアミノ酸配列は、蛋白質化学的手法によりその全体の 8 割程度明らかにされたが、最近の分子生物学的および遺伝子工学的手法の導入により、エラスチン遺伝子の構造、全アミノ酸配列、シグナルペプチドと分泌機構などエラスチンに関する全貌が急速に明らかにされつつある。

エラスチンの最も重要な機能は弾性である。その弾性機構の説明には今までいくつかのモ