

コラーゲン遺伝子改変と動物の疾患モデル

二宮喜文
岡山大学医学部分子医化学

はじめに

コラーゲンは生体に最も豊富に存在するタンパクである。からだの表面に存在し機械的な力や感染から体を防御したり、炎症の場を提供している一方、骨格系に存在して重力を保持するための機能を果たしたり、ある種の細胞の増殖を制御したりしていることが明らかになってきている。

本日は、コラーゲンが骨格系の機能に関係していることから、外見上その異常に気がつきやすいいくつかのコラーゲン遺伝子異常のなかで、その病因との関係が判明してきた動物の疾患モデル例を紹介してみたい。

1. コラーゲンスーパーファミリー

コラーゲン遺伝子は現在19種類明らかになっている(表1)⁽¹⁾。これらはコラーゲンタンパクとしての構造、代謝、高分子会合体様式等がわかっているだけでなく、これらのコラーゲンタンパクをコードする遺伝子の構造や発現様式も、いくつかの例外を除いて殆どわかっている。そのほかに、コラーゲン様構造をもっているがコラーゲンという範疇には入らないポリペプチドがたくさんわかっている。たとえば、C1q、マンノース結合タンパク、コングレルチニン、スカベンジャー受容体、サーファクタント、MARCOなど。

表1 コラーゲンの分類

1) フィブリル形成コラーゲン I型: COL1A1, COL1A2 II型: COL2A1 III型: COL3A1 V型: COL5A1, COL5A2, COL5A3 XI型: COL11A1, COL11A2 (COL11A3) *
2) ファシット (FACIT) コラーゲン IX型: COL9A1, COL9A2, COL9A3 XII型: COL12A1 XIV型: COL14A1 XVI型: COL16A1 XIX型: COL19A1
3) 基底膜型コラーゲン IV型: COL4A1, COL4A2, COL4A3, COL4A4, COL4A5, COL4A6
4) 短鎖コラーゲン X型: COL10A1 VIII型: COL8A1, COL8A2
5) マルチプレキシシンコラーゲン XV型: COL15A1 XVIII型: COL18A1
6) その他のコラーゲン VI型: COL6A1, COL6A2, COL6A3 VII型: COL7A1 XIII型: COL13A1 XVII型: COL17A1

*COL11A3の翻訳産物である $\alpha 3(X1)$ 鎖はCOL2A1の産物 $\alpha 1(II)$ 鎖の翻訳後の修飾の違いによるものである。

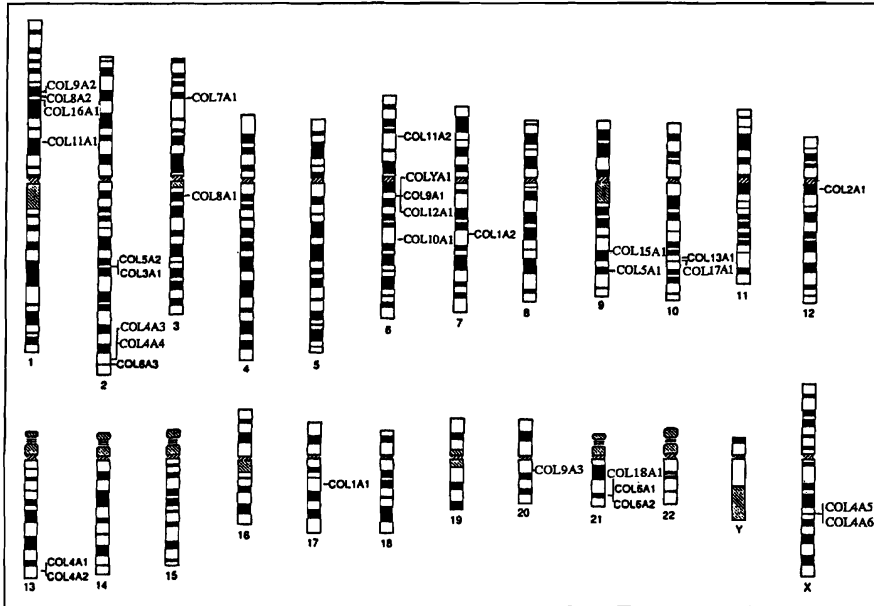


図1 コラーゲン遺伝子の染色体上の位置

ヒトコラーゲン遺伝子の染色体上の位置を示した。現在19型コラーゲンをコードする33遺伝子のうち、図に示すように31遺伝子について位置が確認されている。COL5A3とCOL14A1については確認されていない。興味あることに、いくつかの遺伝子が同じlocusに存在しているようである。例えば、染色体1番、2番、6番、21番などがそれである。お互いの詳細な位置関係はIV型コラーゲンの6遺伝子以外は未だ殆ど調べられていない。

2. コラーゲン遺伝子

コラーゲン遺伝子は、染色体上のさまざまな位置に散らばって存在している（図1）。面白いのは染色体上の位置が全く異なる二つの遺伝子産物が、常に2:1で転写生合成されている例（I型コラーゲンはその典型例）があったり、同じ遺伝子座に隣接して存在するコラーゲン遺伝子（例えば、COL4A1とCOL4A2は染色体13番に、COL4A3とCOL4A4は染色体2番に、COL4A5とCOL4A6は染色体Xにおいて共通のプロモーターを介して反対向きに並んでいる。）も存在するし、また他のコラーゲン以外の遺伝子とほんの500bpはなれて、縦列しているコラーゲン遺伝子もある（例：COL11A2遺伝子）。

3. コラーゲンの生合成

コラーゲン α 鎖はGly-X-Yの特異的なアミノ酸配列の繰り返し構造を有する。このコラーゲンポリペ

プチド鎖が3本よりあわさって三重ヘリックス構造を呈するコラーゲン分子を形成する。さらに細胞外で高分子会合体を形成して、他のマトリックス分子や細胞等と相互作用し生物学的機能を果たす。蛋白としてのコラーゲンの特徴の一つにコラーゲン生合成過程がある。コラーゲンもしくはコラーゲン様構造を有するポリペプチドは翻訳後の多くの修飾を受けることが主にI型を使った実験より実証されている。細胞内では3種類の水酸化酵素や2種類の糖転化酵素により修飾された α 鎖は三本鎖ヘリックスを巻いて分子を形成する。細胞外に分泌される時、フィブリル形成コラーゲンではN末端やC末端を特異的に切断するペプチターゼの働きによりプロコラーゲンから成熟したコラーゲン分子になる。さらに細胞外では架橋形成により安定なコラーゲンフィブリルを形成したり、また他の分子と高分子会合体を形成したりする。

表2 コラーゲン遺伝子異常によって生じた遺伝性結合織病

疾患	遺伝子	文献
骨形成不全症	COL1A1, COL1A2	Spotila他 ProNAS 88, 5423, 1991
VII型エーラスダンロス症	COL1A1, COL1A2	Vissing他 J. Biol. Chem. 264, 18265, 1989
骨そしょう症	COL1A1, COL1A2	Horton他 ProNAS 83, 4583, 1992
軟骨無形成症	COL1A2	AlaKokko他 ProNAS 87, 6565, 1990
軟骨低形成症	COL1A2	Lee他 Science 244, 978, 1989
先天性骨幹端異形成症	COL1A2	Ahmad他 Am. J. Hum. Genet 52, 39, 1993
ストラドウィック型(骨幹端異形成症)	COL1A2	Tromp他 J. Biol. Chem. 264, 19313, 1989
Kniest型異形成症	COL1A2	Tromp他 J. Biol. Chem. 264, 19313, 1989
スチックラー症候群	COL1A2	Kontusaari他 J. Clin. Invest. 86, 1465, 1990
変形性関節症	COL1A2	Winterpacht他 Nature Genet 3, 323, 1993
IV型エーラスダンロス症候群	COL3A1	Fessler他 ProNA 91, 5070, 1994
家族性大動脈瘤	COL3A1	Rosati他 Nature Genet 8, 129, 1994
アルポート症候群(常染色体劣性)	COL4A3, COL4A4	Mochizuki他 Nature Genet 8, 77, 1994
アルポート症候群(X染色体性)	COL4A5	Tryggvason他 Kidney Int. 43, 38, 1993
アルポート症候群+平滑筋症	COL4A5 + COL4A6	Zhou他 Science 261, 1167, 1993
先天性表皮水泡症(異榮養型)	COL7A1	Christiano他 Nature Genet 4, 62, 1993
多発性骨端骨異形成症	COL9A2	Muragaki他 Nature Genet 12, 103, 1996
シュミット型骨幹異形成症	COL10A1	Warman他 Nature Genet 5, 79, 1993
先天性表皮水泡症(結合型)	COL17A1	McGrath他 Am. J. Pathol. 148, 1787, 1996

(C57BL/6FrSe-Cho/+ × MEV) × (C57BL/6FrSe-Cho/+ × MEV)

Locus	cho	LOD	Genes	Locations of human homologues
D3Mit54		0.1		
D3Mit6		5.2		
D3Mit26		16.0		
Tshb	■	27.7	Hsb3b Gja5 Cd2, Atp1a1, Ampd1 Cd53 Ngfb, Nras, Tshb, Rap1a	1p11-p13 - 1p13, 1p13, 1p13 - 1p13, 1p13, 1p13, 1p12-p13
Emv27		27.5	Kcna2, Kcna3 Gnat2, Gnat3 Kcna1-rs3	- 1, 1p13 -
D3Mit17		2.9	Cstrn Amy1, Amy2, Col11a1 Cf3	1p13-21 1p21, 1p21, 1p21 1p22-p21

図2 Choマウスの連鎖解析結果⁽⁵⁾

F2交配によるマウス染色体3番上のChoマウスの連鎖解析

4. コラーゲン遺伝子異常によって生じる疾患

コラーゲン遺伝子異常によって生じる疾患として現在までに明らかにされているものをまとめた(表2)^(2,3)。その多くは表現系として骨格や軟骨形成異常を伴うものが多く明らかに先天異常として認識されるものが多い。そのほか、コラーゲン遺伝子が臓器や組織特異的に発現していることから、ある臓器の障害として認識されるコラーゲン遺伝子病も存

在する。例えばアルポート症候群は、COL4A3、COL4A4、COL4A5遺伝子異常によって、基底膜の構造異常を呈して、腎臓における血液成分から尿をつくる重要なフィルター機能障害に至る進行性糸球体腎炎の例として最近明らかになった。未だわかっていない遺伝性疾患のうちコラーゲン遺伝子異常であるものが将来多く見つかるであろう。

COLLAGEN COMPONENTS OF CARTILAGE FIBRILS

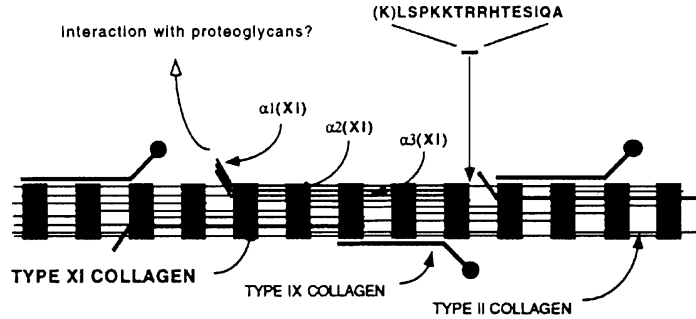


図3 軟骨フィブリルとXIコラーゲン⁽⁵⁾

軟骨フィブリルはフィブリル形成コラーゲンであるII型、XI型コラーゲンと、FACITコラーゲンであるIXコラーゲンから成る。IXコラーゲンはフィブリルの表面に位置するが、XI型コラーゲンは軟骨フィブリルの中に一部埋もれたように存在する。アミノ酸配列を示した部位は、特異的抗体の抗原として用いた部位である。

5. 動物の疾患モデルとして見つかったコラーゲン遺伝子異常の例

ユタ州ProvoのSeegmiller教授は、実験動物を観察していて、マウスの常染色体劣性の軟骨形成不全症を発見した⁽⁴⁾。これは*cho*と名付けられた。heterozygousで、四肢、肋骨、下顎骨、気管支に異常が来て生後間もなく死亡するものであった。*cho/cho*の新生マウスの四肢骨は骨幹部が正常マウスのそれより広いが、長さは半分程度であった。Seegmiller教授は軟骨に存在する多くのマトリックス遺伝子、例えばII型コラーゲン、アグリカン、IX型コラーゲン遺伝子など多くの遺伝子を調べたが、調べた遺伝子からは原因遺伝子らしい陽性の事実は見つからなかった。そこで正攻法で、ハーバード大学のOlson研究室と私共の研究室は*cho*遺伝子の連鎖解析を行なってみると、染色体3番にマップされそこに存在する $\alpha 1(XI)$ 遺伝子であるCOL11A1と同じ位置であった。(図2)⁽⁵⁾。*cho*マウスのCOL11A1遺伝子を検索すると、翻訳開始コドンから570ヌクレオチド下流のシチジン塩基の欠損が見つかり、このことがフレームシフトとなり、直ちに終止コドンを生んでしまうのである。このことによって、XI型コラーゲンは軟骨におけるコラーゲンフィブリルの形成には必須であることがわかった。つまり、軟骨のコラーゲンフィブリルはII型、IX型、XI型コラーゲンから成ることがわかってきた(図3の如く)が、XI型コラーゲンが、そのフィブリル形成に必須であることがはじめて明らかになったのである。正常の軟骨分化と組織形成には、XI型コラーゲンの存在、とくにそのコラーゲン三本鎖構造を形成するためにはC末端のNC1ドメイン、そのなかでもシステイン残基が重要であることが判明したのである。

6. コラーゲン遺伝子改変動物の応用

トランスジェニックマウスは1)コラーゲン遺伝子の変異により起きてくる疾患がどのようにして生じるかの機序の解明に貢献してきた。さらにコラーゲン分子もしくはその各ドメインの生物学的機能の解析に使用できる。2)さらに未だわかっていないコラーゲン遺伝子変異が引き起こす疾患の同定をするためには格好の道具であると思われる。3)また種々のヒト疾患のモデルとなりこれを用いた治療の開発に大きく貢献するであろう。

現在まで例として、コラーゲン遺伝子改変によってコラーゲンの機能を明らかにしようとした実験として：

Col1a1^{Mov13}マウス→完全に $\alpha 1(I)$ 遺伝子に発現が停止する。しかしマウス胎児は13日目まで生き延びるが、大血管の破裂によって死亡する⁽⁶⁾。

Col2a1変異体大量発現⁽⁷⁾→chondrodysplasia

Col5a2変異体大量発現⁽⁸⁾→脊椎、皮膚、眼に異常

Col9a1変異体大量発現⁽⁹⁾→osteoarthritis様

Col9a1ノックアウトマウス⁽¹⁰⁾→osteoarthritis様

Col10a1変異体大量発現⁽¹¹⁾→spondyloepiphyseal dysplasia

Col10a1ノックアウトマウス⁽¹²⁾→形質変化は特に認められていない。

Col14a3ノックアウトマウス^(13,14)→アルポート症候群が現在報告され解析が進められている。

このように、実験動物モデルは、各種疾患のモデルとして、その病因の解析に用いられるだけでなく、遺伝子の機能、タンパク分子の会合体の解析や機能の解析にも用いられる。特に細胞外マトリックス分子の場合には、その遺伝子異常は骨格系を中心に、外から形質の異常を発見することが比較的簡単であるので、ノックアウトマウスの実験など積極的に遺

伝子発現を破壊する実験には適している。多くのコラーゲン遺伝子のノックアウトマウスもしくは Dominant negative mutation を作成して、コラーゲン分子が作る正常の高分子会合体構築を攪乱したときにどのような形質変化が生じるかを観察することによって、コラーゲン遺伝子の機能を検索する試みが世界中の研究室でなされている。これらの遺伝子の生物学的機能がはっきりするのはそう遠いことではないであろう。

References

- 1) Olsen B.R. and Ninomiya Y. Collagens. *In*: Guide book to the extracellular matrix and adhesion proteins, (Thomas Kreis and Ron Vale, eds.), Boca Raton FL, CRC Press 1993:32-48
- 2) Francomano C.A. Key role for a minor collagen. *Nature Genet.* 9,6-8,1995.
- 3) Kivirikko K.I. Collagens and their abnormalities in a wide spectrum of diseases. *Ann.Med.* 25,113-126,1993.
- 4) Seegmiller R.E., Fraser F.C., and Sheldon H. A new chondrodystrophic mutant in mice. *J.Cell Biol.* 48,580-593,1971.
- 5) Li Y., Lacerda D.A., Warman M.L., Beier D.R., Yoshioka H., Ninomiya Y., Oxford J.T., Morris N.P., Andrikopoulos K., Ramirez F., Wardell B.B., Lifferth G.D., Teuscher C., Woodward S.R., Taylor B.A., Seegmiller R.E., and Olsen B.R. A fibrillar collagen gene, *Col11a1*, is essential for skeletal morphogenesis. *Cell* 80,423-430,1995.
- 6) Lohler J., Timpl R. and Jaenisch R. Embryonic lethal mutation in mouse collagen I gene causes rupture of blood vessels and is associated with erythropoietic and mesenchymal cell death. *Cell* 38:597-607,1984.
- 7) Savontaus M., Vuorio E. and Metsaranta M. Growth retardation in transgenic mice harboring a type II collagen mutation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 785:328-330,1996.
- 8) Andrikopoulos K., Liu X., Keene D.R., Jaenisch R. and Ramirez F. Targeted mutation in the *col5a2* gene reveals a regulatory role for type V Collagen during matrix assembly. *Nat. Genet.* 9:31-36,1995.
- 9) Nakata K., Ono K., Miyazaki J., Olsen B.R., Muragaki Y., Adachi E., Yamamura K. and Kimura T. Osteoarthritis associated with mild chondrodysplasia in transgenic mice expressing $\alpha 1(\text{IX})$ collagen chains with a central deletion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:2870-4,1993.
- 10) Fassler R., Schneegelsberg P.N., Dausman J., Shinya T., Muragaki Y., McCarthy M.T., Olsen B.R. and Jaenisch R. Mice lacking $\alpha 1(\text{IX})$ collagen develop noninflammatory degenerative joint disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:5070-4,1994.
- 11) Jacenko O., Lu Valle P. and Olsen B.R. Spondylometaphyseal dysplasia in mice carrying a dominant negative mutation in a matrix protein specific for cartilage-to bone transition. *Nature* 365:56-61,1993.
- 12) Rosati R., Horan G.S., Pinero G.J., S. Garofalo, D.R. Keene, W.A. Horton, E. Vuorio, B. de Crombrugge and R.R. Behringer. Normal long bone growth and development in type X collagen-null mice. *Nat. Genet.* 8:129-135,1994.
- 13) Miner J.H. and Sanes J.R. Molecular and functional defects in kidneys of mice lacking collagen $\alpha 3(\text{IV})$: Implications for Alport syndrome. *J. Cell Biol.* 135,1403-1413,1996.
- 14) Cosgrove D., Meehan D.T., Grunkemeyer, J.A., Kornak J.M., Sayers R., Hunter, W.J., and Samuelson, G.C. Collagen COL4A3 Knockout: A mouse model for autosomal Alport syndrome. *Genes and Development* 10,2981-2992,1996.