



線維芽細胞産生コラーゲンマイクロフィブリルの 広角・小角 X 線散乱による構造研究

Structural Study of Collagen Micro-fibril Produced by Fibroblasts using Wide- and Small-angle X-ray Scattering

本郷 千鶴¹, 坂 貞徳², 田中 浩², 足立 浩章²

Chizuru Hongo, Sadanori Ban, Hiroshi Tanaka, Hiroaki Adachi

- 1) 神戸大学 自然科学系先端融合研究環, 2) 日本メナード化粧品株式会社
1) Organization of Advanced Science and Technology, Kobe University,
2) Nippon Menard Cosmetics Co., LTD

1. 測定実施日

2014 年 10 月 23 日 10 時 - 18 時 30 分 (2 シフト), BL8S3

2014 年 11 月 27 日 10 時 - 18 時 30 分 (2 シフト), BL8S3

2014 年 12 月 26 日 10 時 - 18 時 30 分 (2 シフト), BL8S3

2. 概要

コラーゲン産生量の豊富な正常ヒト皮膚線維芽細胞 (NB1RGB) を培養し、産生されるコラーゲンマイクロフィブリルの X 線散乱を測定することを目的とし、培養条件、測定条件の最適化を試みた。広角 X 線散乱プロファイルから培養細胞ではコラーゲン三重らせん間のパッキング構造に由来すると考えられる散乱が観測できた。ラット尾由来のコラーゲン線維およびコラーゲン水溶液からのキャストフィルムの散乱と比較した結果、培養細胞では三重らせん由来の回折が観測できず、らせん間距離が短くなっていることから、らせん構造に乱れが生じていることが示唆された。

3. 背景と研究目的

コラーゲンは、動物の生体内に最も多く存在するタンパク質であり、皮膚や骨、腱などの主要線維成分として、臓器の構造を支える天然線維である。構造

タンパク質としてののみならず細胞の足場となり分化や増殖を促進し，組織界面の接着マトリクスとして機能している。このため近年では，細胞接着性や細胞への分化誘導能を有する生体足場材料など高付加価値を付与した機能性再生医療材料として注目されており，環境・食品・化粧品・医療分野など幅広い応用展開を視野に入れた研究開発が行われている。

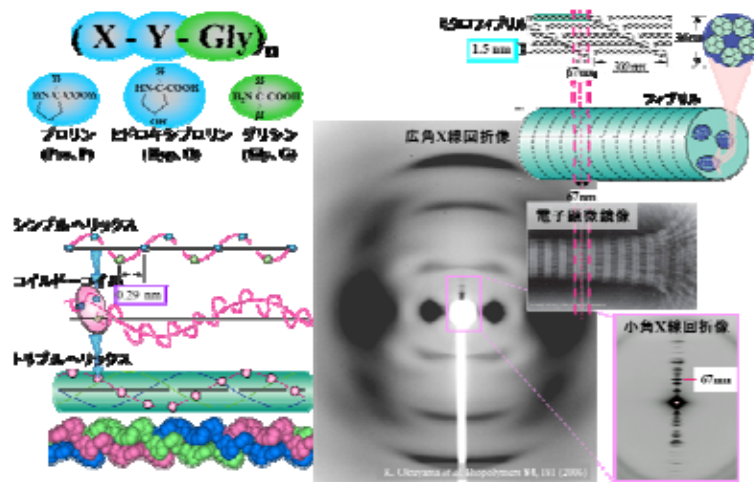


Fig. 1 コラーゲンの階層構造

生体内に最も多い **TypeI** コラーゲンは特徴的な三重らせん構造をとる(分子長:約 300 nm, 直径:1.5 nm)。この三重らせんが分子長の約 1/4(約 67 nm)だけ分子軸方向にずれて会合し，マイクロフィブリルを形成する。このずれは非常に精密であり，電子顕微鏡や原子間力顕微鏡における縞模様，X線小角回折における 30~40 次におよぶブラッグ回折として知られている(Fig.1)[1]。生体内ではマイクロフィブリルがさらに会合して階層構造を高め，組織構築している。しかしながら，なぜ，このような精密な長周期構造を形成するのかについては明らかになっていない。

コラーゲン産生量の多い線維芽細胞を培養し，核と **TypeI** コラーゲンを免疫染色すると，線維芽細胞(細胞サイズ:数十~百マイクロン)の周囲にコラーゲン線維が堆積していることが確認できる。しかしながらこの手法ではコラーゲンのらせん構造や長周期構造に関する情報を得ることは難しい。X線によって細胞が産生したコラーゲンからの散乱を観測出来れば，正常な線維が形成されているかを解析することが可能になる。この測定技術を確立できれば，培養手法の開発やコラーゲン生成を促進する有用物質の探索，逆に阻害剤の探索を細胞レベルで効率的に行うことが可能になる。

そこで本研究では **NB1RGB** を培養し，線維芽細胞が産生するコラーゲンマイクロフィブリル由来の X線散乱を測定することを目的とし，培養条件，測定条件の最適化を試みた。

4. 実験内容

NB1RGB をカプトンフィルム，ポリエーテルエーテルケトン(PEEK)フィルムに播種し，培養したもの，また，トリプシン-EDTA を用いてフィルム状に剥がしたものを試料とした。比較試料としてラット尾由来のコラーゲン線維およびコラーゲン水溶液からのキャストフィルムを用いた。

X 線散乱測定は BL8S3 ビームラインにて行った。X 線波長は 0.092 nm (13.5 keV)，二次元検出器にはリガク製イメージングプレート R-AXIS (カメラ長：469 mm) および Pilatus100K (カメラ長：251 mm) を用いた。サンプル-検出器間は空気散乱を低減するため真空パスを設置した。測定データの一次元化には Fit2D[2]を用いた。

三重らせんのらせん周期に起因する $d=0.29$ nm 付近の子午線回折，らせん軸に直行する方向のらせん間のパッキング距離に起因する $d=1.5$ nm 付近の赤道回折について解析を行い，らせん構造およびパッキング構造について解析を行った。

5. 結果および考察

Fig.2 には(a)R-AXIS および(b)Pilatus を用いて測定したラット尾由来コラーゲン線維の X 線散乱像を示した。配向したピークを示し，Pilatus では三重らせんの周期に起因する $d=0.29$ nm の子午線回折が明瞭に観測された。赤道回折から，らせん間のパッキング距離は 1.1 nm であることが分かる。

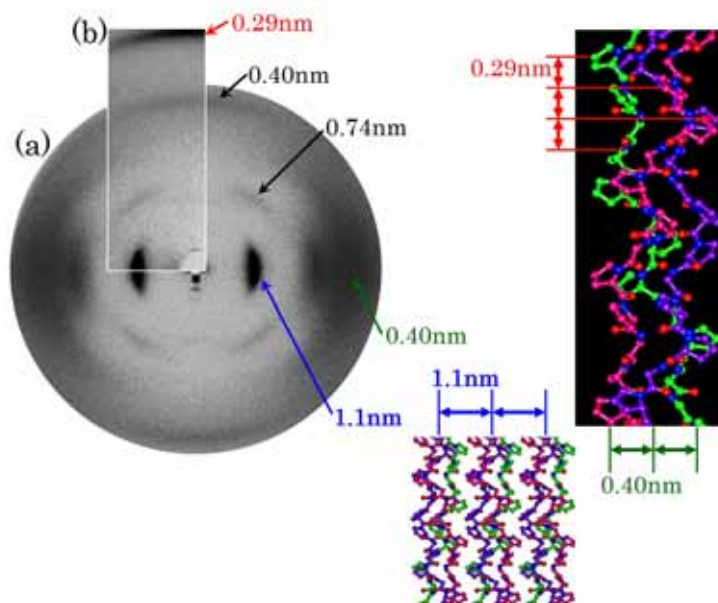


Fig.2 ラット尾由来コラーゲン線維の X 線散乱像 ((a)R-AXIS, (b)Pilatus)と分子モデル図

カプトンフィルム，PEEK 上に培養した細胞では基板フィルム由来の散乱の影響で S/N 比の悪い散乱像が得られた。これに対し，トリプシン-EDTA を用いて基板から剥がすことで細胞やコラーゲン以外のタンパク質を除くことにより S/N 比が向上し，比較的明瞭な散乱像が得られた。

Fig.3 には Pilatus を用いて測定したコラーゲン線維，キャストフィルムと基

板から剥がした NB1RGB フィルムの X 線散乱像を円環平均した一次元プロファイルを示した。コラーゲン線維、キャストフィルムは類似したプロファイルを示したのに対し、NB1RGB フィルムではらせん周期を示す $q=22 \text{ nm}^{-1}$ ($d=0.29 \text{ nm}$) のピークは観察されなかった。さらに、らせん間のパッキング距離を示す $q=5.6 \text{ nm}^{-1}$ ($d=1.1$

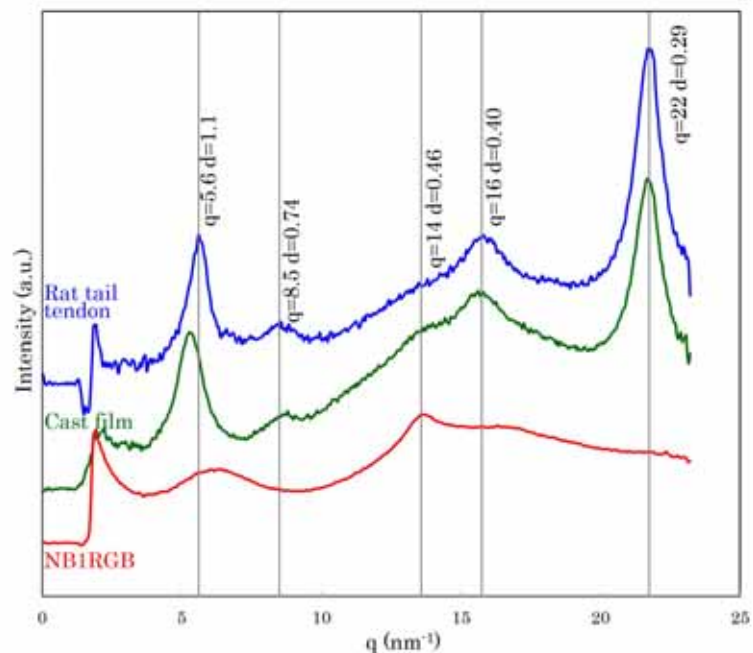


Fig.3 コラーゲン線維，キャストフィルム，培養細胞フィルムの X 線散乱プロファイル

nm) のピークはブロードになり、広角側にシフトし、 $q=6.3 \text{ nm}^{-1}$ ($d=1.0 \text{ nm}$) とパッキング距離がわずかに短くなっていた。

さらに小角領域を観察すると、ラット尾由来コラーゲンでは長周期由来の回折が子午線方向に観察できた(Fig.2(b))。しかしながら、キャストフィルムおよび培養細胞フィルムで小角領域の回折は観測されなかった。

これらのことから、培養細胞から産生されるコラーゲンは三重らせん構造に乱れが生じており、ミクロフィブリル構造は未発達であることが示唆された。

6.今後の課題

本手法において観測された散乱からコラーゲン構造を議論することができた。コラーゲンフィブリルの形成を促進する培養条件の検討を行うとともに、サンプル部を真空にすることにより空気散乱を低減することで更なる S/N 比の向上を図れば、三重らせん構造や長周期構造に関する詳細な議論が可能になるものと期待できる。更に、コラーゲン線維の形成メカニズム解明につながる学術的に意義深い知見が得られるものと期待できる。

7.参考文献

- [1] K. Okuyama et al., *Biopolymer*, **84**, 181 (2006)
- [2] A P Hammersley, *ESRF Internal Report*, ESRF97HA02T, (1997)