

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	ナマコのキャッチ結合組織を軟化させるタンパク質の研究
Title(English)	
著者(和文)	竹花康弘
Author(English)	Yasuhiro Takehana
出典(和文)	学位:博士(理学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第9403号, 授与年月日:2014年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:本川 達雄,濱口 幸久,本郷 裕一,田中 幹子,鈴木 崇之
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第9403号, Conferred date:2014/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

博士論文

「ナマコのキャッチ結合組織を軟化させる
タンパク質の探究」

12D22021

竹花 康弘

目次

要旨	2
第1章 序論	5
第2章 材料と方法	10
1: 実験動物及びトリトン処理組織片の作製	10
2: 動的力学試験	11
3: 軟化因子及び硬化タンパク質の精製	12
4: ニセクロナマコ真皮からのコラーゲン繊維単離	15
5: 凝集検定	16
第3章 結果	18
1: ニセクロナマコの軟化因子	18
2: シカクナマコの軟化因子	18
3: 動的力学試験	20
4: 単離コラーゲン繊維を用いた凝集検定	23
第4章 議論	25
1: ソフニンの命名	25
2: トリトンモデルは標準状態に、TFT モデルは軟らかい状態に対応する	25
3: ソフニンの分子機構	28
4: ソフニンは消化酵素か?	30
第5章 結論と今後の展望	32
参考文献	35
謝辞	40
表	42
図	43

要旨

ナマコの体壁真皮は代表的なキャッチ結合組織である。キャッチ結合組織は硬さを素早く変化させることが出来る結合組織で、結合組織の細胞外成分の硬さが変わる。硬さには、軟らかい状態・標準状態・硬い状態の3つの状態がある。硬さの変化は、神経支配下で分泌細胞が刺激され、そこから硬さ調節因子が分泌され、それが細胞外成分に直接働きかけて硬さ変化が起こると考えられている。過去の研究において組織の硬さを変化させるいくつかの化学的因子が報告されてきたが、細胞外成分に直接働きかけることが実験的に示された因子は無く、硬さ変化機構には未だ不明な点が多い。細胞外成分に直接働きかけて硬さを変化させる因子を発見することは、硬さ変化の分子機構を明らかにするために不可欠である。本研究では、細胞外成分に働いてナマコ真皮を軟化させる因子を、ナマコから抽出することを試みた。

軟化因子の抽出にはシカクナマコ *Stichopus chloronotus* の体壁真皮を用いた。緩衝液中に浸した真皮をステンレス棒で刺激して溶かし、この抽出液をカラムクロマトグラフィーで精製していくことで軟化因子を追った。抽出液及び精製した画分の軟化活性は、動的力学試験により確かめた。この試験に用いたナマコ真皮はシカクナマコとニセクロナマコ *Holothuria leucospilota* のものであり、前者は界面活性剤 Triton X-100 処理によって細胞を破壊した真皮「トリトンモデル」を、後者はトリトンモデルだけでなく、トリトンモデルを凍結融解処理して細胞外成分間の相互作用を解除した真皮「トリトン凍結融解モデル Triton-Freeze-Thaw-model」(TFT モデル)、そして細胞破壊処理を行っ

ていない生きた真皮の 3 種類の試料を用いた。これらの真皮に±5%の引張圧縮歪みを繰り返し加え、その時に真皮が示す応力を測定した。引張歪みが+5%の時に真皮が最大の応力を発揮したため、これを 1 周期中の硬さの指標とした。抽出液及び精製物を真皮に与えた時の硬さの変化から軟化活性の有無を判別した。

シカクナマコの真皮抽出液には、シカクナマコのトリトンモデルを軟化させる活性があった。抽出液中には細胞外成分に直接働きかける軟化因子が含まれていると考え、陰イオン交換クロマトグラフィーと 2 種類のゲルろ過クロマトグラフィーを利用して軟化活性を持つ画分の精製を進めた。3 段階のカラムクロマトグラフィーで精製された画分を SDS-PAGE で泳動したところ、見かけの分子量が 20 kDa の単一のバンドが得られ、このタンパク質を軟化因子だと見なした。これは糖鎖検出試薬で染まる糖タンパク質である。軟化因子の N 末端アミノ酸配列を解析し、SEXVPPSTSYTPVXITK という 17 残基分の配列を得た。3 残基目は修飾があって決定出来ず、14 残基目はプロリンまたはフェニルアラニンのどちらかである。BLAST を用いて相同性解析を行ったが、この配列と高い相同性を持ち、軟化の作用を説明し得るような既知タンパク質は見つからなかった。そのため、このタンパク質は新発見のものであると考え、キャッチ結合組織を軟化させるという働きからソフニン(softenin)と命名した。トリトンモデルは、シカクナマコとニセクロナマコどちらのものでもソフニンを与えると軟化した。この結果は、ソフニン及びその相同タンパク質がナマコに広く分布する、共通の軟化因子であることを示唆している。ソフニンはトリトンモデルだけでなくニセクロナマコの生きた真皮も軟化させたことから、細胞が生きているかどうかはその活性に関係がない。

TFT モデルはトリトンモデルよりも軟らかく、ソフニンを与えても軟化しなかったが、硬化タンパク質テンシリン(tensilin)を与えることで硬化した。テンシリンはニセクロナマコの単離コラーゲン繊維を凝集させる作用があることから細胞外成分に直接働きかけている可能性を指摘されていたが、この結果はソフニンと同じくテンシリンが細胞外成分に働きかけていることの初めての実験的証拠である。ソフニンはテンシリンを与える前の TFT モデルを軟化させることはなかったが、テンシリンを与えて硬化させた後の TFT モデルを、テンシリンを与える直前と同程度の硬さにまで軟化させた。これらの結果は、トリトンモデルは標準状態、TFT モデルは軟らかい状態の生きた真皮の力学的状態に対応し、ソフニンはテンシリンを与えることによって起こった軟らかい状態から標準状態への硬化を打ち消すことを示唆している。

ニセクロナマコの体壁真皮から単離したコラーゲン繊維を用いた凝集検定を行った。コラーゲン懸濁液に対しテンシリンを与えたところ凝集が起き、単一の大きく密な凝集塊が出来た。この凝集塊を含む溶液に対しソフニンを与えると、この大きな凝集塊は沢山の小さな低密度の凝集塊に分散した。また、繰り返し凍結融解処理を施すことによって同様な分散が見られた。これらの結果は、テンシリンを与えることによって促され、凍結融解処理によって破壊されるようなコラーゲン繊維間の架橋生成を、ソフニンが妨害することで真皮の硬さを減少させていることを強く示唆している。ソフニンは細胞外成分間の架橋に働きかけることが示された初めての軟化因子である。

第 1 章 序論：

棘皮動物はキャッチ結合組織と呼ばれる、特徴的な結合組織を持つ。この結合組織は神経支配下で、数分のうちに弾性や粘性といった機械的な性質を可逆的に変化させる(Motokawa, 1984; Motokawa, 1988; Wilkie, 2002)。この組織は大量の細胞外成分を含んでおり、その主成分はコラーゲン繊維、プロテオグリカンそして弾性繊維フィブリリン(fibrillin)と考えられているマイクロフィブリルである(Trotter and Koob, 1989; Trotter et al., 1994; Thurmond and Trotter, 1996; Thurmond et al., 1997; Szulgit, 2007)。脊椎動物の成体が持つコラーゲン性組織と異なり、キャッチ結合組織からは容易にコラーゲン繊維を単離することが出来る(Matsumura, 1974; Trotter and Koob, 1989; Trotter et al., 1994; Tamori et al., 2006; Szulgit, 2007)。このことは、コラーゲン繊維間や、コラーゲン繊維とその周りにある細胞外マトリックスとの間に恒久的な強い結合が存在しないことを示しており、機械的な性質を可逆的に変化させることが出来るという特徴は、これに起因するのかもしれない。硬さが変化している時には、コラーゲン繊維とその他の細胞外構成要素との間に、架橋の形成または破壊が起こっていると想像されているが、硬さ変化の分子機構は未だ不明な点が多い。

ナマコの体壁真皮は代表的なキャッチ結合組織であり、種々の刺激に対し、素早い、可逆的な機械的性質の変化を示す。そして、大きな真皮片を切り出すことが出来るため、生化学的な仕事に愛用され(Koob et al., 1999, Birenheide et al., 1999)、また正確なサイズの試料片を作製出来るため、力学試験にも愛用されてきた(Motokawa and Tsuchi, 2003)。クリイロナマコ *Actinopyga mauritiana* の体壁真皮の動的機械特性に対する研究に

より体壁真皮の機械的性質は 3 つの状態をとることが示された (Motokawa and Tsuchi, 2003)。硬い状態、標準状態、そして軟らかい状態である(図 1)。この 3 種類の機械的性質は、真皮の弾性と粘性、そして歪み軟化現象によって区別できる。ナマコの体壁真皮は、標準的なイオン組成を持つ人工海水中に置くと標準状態となり、高濃度にカリウムを含んだ人工海水またはアセチルコリンで刺激すると硬い状態となり、カルシウム欠除人工海水中では軟らかい状態となる。

ナマコ真皮の硬さに関連した化学的因子として硬化因子、軟化因子、そして神経修飾因子という 3 種類のものがナマコ体壁より単離されている。

硬化因子は現在までに 3 種類見つかっている。1 つは NGIWY アミドと呼ばれるペンタペプチドである (Birenheide et al., 1998)。NGIWY アミド抗体に対する免疫反応は放射神経と体壁真皮中の神経に見られるため、このペプチドが神経ペプチドであり、NGIWY アミド作動性神経の支配下にある、神経もしくはその他の細胞に作用し、間接的に細胞外成分の硬さに影響していると考えられている (Inoue et al., 1999)。他の 2 つの硬化因子は NGIWY アミドよりもはるかに大きいタンパク質で、それぞれテンシリリン、NSF(New Stiffening Factor)と呼ばれている。テンシリリン(*C*-テンシリリン)は樹手目のナマコ、*Cucumaria frondosa* の体壁真皮から初めて単離された 33kDa のタンパク質である (Koob et al., 1999)。この硬化因子は、カルシウム欠除人工海水中に置かれて軟らかい状態にある真皮を硬化させる (Tipper et al., 2003)。本研究室では楯手目のナマコ、ニセクロナマコ *Holothuria leucospilota* の真皮から類似のタンパク質 *H*-テンシリリンを単離した (Tamori et al., 2006)。テンシリリンは軟らかい状態にある真皮に対しては硬化因子として働くことが出来るが、標準状態にある真皮を硬化さ

せることは出来ない(Tamori et al., 2006) (図 1)。これに対して NSF は標準状態の真皮を硬化させる硬化因子である。これはおよそ 2.4 kDa の分子量を持つタンパク質であり、ニセクロナマコの体壁から発見、部分精製された(Yamada et al., 2010)。

軟化因子の研究は、硬化因子に比べ遅れている。複数の軟化因子がナマコの体腔液(Smith and Greenberg, 1973; Motokawa, 1982)及び体壁抽出物(Koob et al., 1999)中に存在することが示唆されてきた。軟化活性を持つ分子の中で唯一同定されているものが、マナマコ *Apostichopus japonicus* の体壁から単離されたホロキニン(holokinin)と呼ばれるヘptaペプチドである(Birenheide et al., 1998)が、その作用機序は不明である。

神経修飾因子スティコピン(stichopin)がマナマコの体壁から単離された(Birenheide et al., 1998)。ナマコの真皮はアセチルコリンで刺激されると硬化するが、stichopin はこの応答を阻害する。stichopin 抗体に対する免疫反応は神経繊維と、神経に隣接した細胞で見られた。この結果は stichopin が神経ペプチドかつ神経分泌ペプチドとして作用し、コリン作動性神経の働きを修飾することを示唆している(Tamori et al., 2007)。

現在、キャッチ結合組織の硬さ変化機構に関する仮説は以下の通りである(Wilkie, 2005)。神経支配の下にある分泌細胞から、細胞外高分子間の相互作用に影響を与える化学的因子が分泌される。この仮説に基づくと、上述の化学的因子は 2 つのカテゴリーに分けることが出来る。1 つは神経または分泌細胞に影響を与えることで硬さ調節に関わり、もう 1 つは細胞外成分に直接働きかけてその硬さを変化させるものである。神経ペプチドである NGIWY アミドと stichopin は前者に分類される。後者に分類される化学的因子を研究することは硬さ変化の分子機構を理解するために不

可欠だが、上述した化学的因子のうち後者に分類されるものに関しては、わずかな情報しかない。その原因は化学的因子の効果を調べる際に用いられた真皮には、神経細胞や分泌細胞が含まれているため、化学的因子がこれらの細胞に働きかけているのか、それとも細胞外成分に直接働きかけているのかの判別が困難だからである。テンシリンは、ナマコ体壁真皮から単離されたコラーゲン繊維に与えると凝集を引き起こすことから、細胞外成分に直接働きかけていると思われる(Tipper et al., 2003, Tamori et al., 2006)。しかしながら、この凝集は体壁の硬さ変化とは無関係かもしれない、テンシリンが細胞を介して硬さ変化に関与しているという可能性は依然残っている。ここまでに紹介した硬さ調節因子のうち、固有の名称が付けられているものと、ナマコの3状態の関係を図に示す(図 1)。

本研究での狙いはナマコ真皮の細胞外成分に直接働きかける軟化因子を発見することである。この目的のために、細胞を破壊したナマコ真皮「トリトンモデル」を用いた。2種類の異なるトリトンモデルを作成することに成功し、動的力学試験での挙動から、一方は標準状態、もう一方は軟らかい状態の真皮に対応することが分かった。

最初は *H*-テンシリンの抽出と同様、ニセクロナマコから軟化因子の抽出・精製を試みた。一度は強い活性を持つ軟化因子の抽出に成功したものの、再現性が悪く、それ以降は非常に活性の弱い軟化因子しか得られなかった。そこで同じ楯手目のナマコではあるがシカクナマコ *Stichopus chloronotus* に変更した。このナマコは強い物理刺激や化学刺激を受けることで、まるで溶けるようにドロドロになるまで軟化してしまうという激しい軟化応答を示す(Motokawa, 1981)。このナマコからなら、強い活性を持つ軟化因子を大量に抽出できるのではないかと期待した。

シカクナマコの体壁から軟化活性を持つ因子を抽出することに成功し、カラムクロマトグラフィーで単離精製した。この軟化因子は糖タンパク質であり、トリトンモデルを軟化させたことから、細胞外成分に直接働きかけていることが分かった。これは細胞外成分に直接働きかけることが実験的に証明された初めての軟化因子であり、ソフニン(softenin)と名付け、機能や性質を調べた。

第 2 章 材料と方法

1：実験動物及びトリトン処理組織片の作製

本研究に用いられた動物はシカクナマコ *Stichopus chloronotus* Brandt (図 2A)とニセクロナマコ *Holothuria leucospilota* Brandt (図 2B) である。両種は沖縄県の金武湾で採取したものを東工大大岡山キャンパスの水槽室に移送し、循環水槽内で 20-23°C の条件で飼育した。軟化因子の抽出にはナマコの体壁真皮を用い、動的力学試験には体壁真皮のうち、背側の間歩帯部分を用いた。

動的力学試験のための組織切片は界面活性剤 Triton X-100 によって処理することで細胞を破壊し、トリトンモデルを作製した。トリトン処理の方法は Motokawa (1994)の方法にいくつかの変更を加えて実施した。カミソリを用いて約 2×3×10 mm に切り出した真皮切片(切片の長軸方向はナマコの長軸方向に一致)を 1%(w/v)の Triton X-100 を含む正常人工海水中に浸し、この処理をニセクロナマコの真皮切片に対しては一晩、シカクナマコの真皮切片に対しては 2 時間行った。シカクナマコ真皮の処理時間が短いのは、ニセクロナマコ真皮に比べて細胞外マトリックスの密度が低く、Triton X-100 の浸透が素早く行われるためである。人工海水の組成は 0.50 M NaCl, 50 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 10 mM CaCl₂ and 20 mM Tris-HCl, pH 8.0 である。トリトン処理した真皮切片は人工海水で 2 時間洗浄後、-20°C で保存した。保存した切片を動的力学試験に用いる際には、凍った状態の切片をカミソリで規定のサイズに切り出し、その後解凍した。トリトン処理により細胞活動が壊されたかどうかは、高濃度のカリウムを含んだ人工海水(K 人工海水)に対して硬化するかどうかで判断した。K 人工海水の組成は 0.4 mol l⁻¹ NaCl, 110 mM KCl, 50 mM MgCl₂, 10 mM

CaCl₂ and 20 mM Tris-HCl, pH 8.0 である。K 人工海水は生きている真皮を硬化させるが、トリトンモデルを硬化させることはなく、K 人工海水の硬化は細胞活動を介して起こることが分かっている(Motokawa, 1994)。今回のトリトンモデルにおいても K 人工海水で硬化は見られなかったため、細胞機能が破壊されたものと判断した。いくつかのニセクロナマコ真皮切片は、トリトン処理の後に、-20℃で冷凍そして室温で解凍するという凍結融解処理を、少なくとも 10 回以上繰り返し、これを「トリトン凍結融解モデル Triton-Freeze-Thaw-model」(TFT モデル)とした。議論の章で示すが、トリトンモデルは標準状態、TFT モデルは軟らかい状態の真皮に対応する可能性が非常に高い。本研究で探求したトリトンモデルを軟化させる因子は、標準状態の真皮を軟化させる因子である。

トリトン処理を行わないニセクロナマコの生きた真皮切片も動的力学試験に用いた。シカクナマコの生きた真皮切片は用いなかった。なぜならこのナマコの場合、解剖や切り出し、そして動的力学試験装置に取り付ける作業による刺激で、溶けてしまうため、使用できなかったからである。

2：動的力学試験

動的力学試験は Tamori ら(2006)の方法に、いくつかの変更を加えて実施した。試験装置を図に示す(図 3)。試験には、カミソリを用いて柱状(0.5×1×5 mm)に切り出した真皮切片を用いた。切片の一端を測定槽の底面にシアノアクリレート系の接着剤で接着し、もう一端はロードセルと接続された可動ホルダーに接着した。引っ張り圧縮歪みは切片の長軸方向に対して与えた。可動ホルダーとロードセルが一体化した部品は微小振動発生機に固定し、0.3 Hz の三角波で駆動した。可動ホルダーは上昇するこ

とで真皮切片を引っ張り、自然長に対して+ 5%歪ませた後、上昇時と同じ速度で下降することで真皮切片を圧縮し、－ 5%歪ませた。

張力はロードセルによって計測した。単一の引っ張り・圧縮周期における真皮切片の発生する最大の応力は、最大の引張歪み時に見られた。この時の応力をその周期での硬さとした。硬さは応力の絶対値(kPa)もしくは相対値で表した。相対値は特別な言及がない場合には、試験液投入直前の硬さを 100%としたものである。

真皮試料を測定槽に固定後、そこに 50 μ l の人工海水を注ぎ、10 分後に測定を開始した。軟化因子、又は *H*-テンシリンを含んだ試験溶液は結果の章で定義される定常相に達してから与えた。与える際には、測定槽に入っていた人工海水を測定槽から排水し、同一のイオン組成に調整した試験溶液で置き換えた。試験溶液中の精製した軟化因子の濃度は 60 μ g ml⁻¹に調整した。力学試験は室温(20-24℃)で実施し、試験を行っている間に 1℃以上温度が変化しないようにした。

3：軟化因子及び硬化タンパク質の精製

・ 3-1 ニセクロナマコ真皮からの軟化因子精製

抽出及び精製作業は全て 4℃で行った。精製の手順は以下の通りである(図 4)。まず、約 2.0 g のニセクロナマコ真皮を 2 倍容の K 人工海水に 10 分間浸し、細胞を刺激した。次に、2 倍容の 3 M KCl、20 mM Tris-HCl (pH 8.0)中に移し、ハサミを用いて細かく分断することでタンパク質を抽出した。28,000 × g で 40 分間遠心した後、上清を 0.5 M NaCl、20 mM Tris-HCl (8.0)に対して透析し、透析内液を粗抽出液として力学試験に用いた。

・3-2 ニセクロナマコ真皮からの硬化タンパク質 *H*-テンシリンの精製

抽出及び精製作業は全て 4℃で行った。その手順は以下の通りである(図 5)。ニセクロナマコ真皮からの *H*-テンシリン抽出は、Tamori ら(2006)の方法を参考に実施した。まず、ニセクロナマコ真皮を 2 倍容の 2 M NaCl, 10 mM EGTA, 20 mM Tris-HCl (pH 8.0)中に浸し、- 80℃で 3 時間かけて凍らせた後、氷上で解凍した。その後ハサミを用いて細かく分断し、さらにホモジナイザーを用いてホモジナイズした。ホモジネートをもう一度凍結融解した後 28000 × g で 30 分間遠心し、上清に 60%の飽和硫酸を加え、28000 × g で 30 分間遠心することで生じた沈殿を 0.5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 8.0)中に溶かし、同じ組成の緩衝液に対して透析を行った。その後 300,000 × g で 30 分間遠心し、上清を粗抽出液とした。粗抽出液は同じ組成の緩衝液で平衡化した陰イオン交換クロマトグラフィーカラム Mono-Q (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA)に注入した。溶出は緩衝液の NaCl 濃度を変化させることで行い、0.65 M から 1.0 M の段階状溶出によって得られた画分を *H*-テンシリンの精製に用いた。この画分を 0.5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 8.0)によって平衡化したゲルろ過クロマトグラフィーカラム Superose 6HR 10/30 (Pharmacia Biotech)に注入し、同緩衝液によって溶出することで精製 *H*-テンシリンを得た。*H*-テンシリンの濃度は BSA を標準物質とした Qubit protein assay kit(Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)を用いて定量した。

・3-3 シカクナマコ真皮からの軟化因子精製

抽出及び精製作業は全て 4℃で行った。その手順は以下の通りである(図

6)。20 g のシカクナマコ真皮切片を 1 倍容の 5M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 8.0)中に置き、ステンレスの棒を用いて 2 時間の間、かき混ぜては押しつぶすという強い物理刺激を与えた。強い物理刺激によりシカクナマコの体壁が溶ける現象は、過去の研究において報告されている(Motokawa, 1981)。ステンレス棒による強い機械刺激により、シカクナマコ体壁は溶けてホモジナイザーを用いることなく十分に均質化した(図 7)。これを $28,000 \times g$ で 40 分間遠心し、上清を 10 mM Tris-HCl (pH 8.0)に対し透析した。この段階では試料中に粘性物質が多量に残っており、液体クロマトグラフィーカラムに注入することが不可能なため、透析内液を精密ろ過デバイス Vivaspin 2 (Molecular weight cut off=1,000,000; Sartorius AG, Göttingen, Germany)に通し、粘性物質を取り除いたものを粗抽出液とし、これを同じ組成の緩衝液で平衡化した Mono-Q カラムに注入した。溶出は緩衝液の NaCl 濃度を変化させることによって行い、0 M から 0.1 M の段階状溶出、0.1 M から 1.0 M までの勾配状溶出の 2 段階に分けた。段階状溶出した画分を分取した後、同じ組成の緩衝液で平衡化して直列に 2 本連結したゲルろ過クロマトグラフィーカラム Superose 12 10/300 GL (Pharmacia Biotech)に注入し、分画した。軟化活性を持つ画分を集めて混合し、限外ろ過デバイス Vivaspin 500 (Molecular weight cut off=3,000; Sartorius AG)を用いて濃縮した。濃縮した試料は Superose 12 と同じ組成の緩衝液で平衡化したゲルろ過クロマトグラフィーカラム Superdex peptide 10/300 GL (Pharmacia Biotech)で分画することで精製軟化因子を得た。軟化因子の濃度は BSA を標準物質とした Qubit protein assay kit を用いて定量した。

SDS-PAGE は Schagger と von Jagow (1987)の方法に従って実施した。

11%のアクリルアミドゲルを用いて還元条件で泳動し、精製後の軟化因子の純度と分子量を確かめた。泳動後のゲルは Coomassie Brilliant Blue R-250 で染色した。

軟化因子の糖鎖検出のため、泳動後のゲルから PVDF 膜へ軟化因子を転写し、高感度の糖鎖検出試薬 G. P. Sensor stain kit (Cosmo Bio, Tokyo, Japan)を用いて膜を染色した。

軟化因子の N 末端アミノ酸配列解析では、同じようにゲルから PVDF 膜へ軟化因子を転写してエドマン分解した後、得られた断片をプロテインシーケンサー Procise cLC (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) によって決定した。得られた配列は BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov)を用いて既知のタンパク質の配列と比較した。

4：ニセクロナマコ真皮からのコラーゲン繊維単離

ニセクロナマコ真皮からのコラーゲン繊維単離は、田守ら(2006)の方法を参考に行った。その手順は以下の通りである(図 8)。上記 3-2 においてニセクロナマコ真皮のホモジネートを遠心した際に生じる沈殿から以下のようにしてコラーゲン繊維を単離した。沈殿を約 10 g 集め、20 ml の 3M NaCl 中に懸濁した。懸濁液を $27,000 \times g$ で 10 分間遠心し、もう一度 20 ml の 3 M NaCl 中に懸濁した。遠心および再懸濁を 4 回以上繰り返した後、沈殿を 20 ml の超純水中に懸濁した。遠心および超純水への再懸濁を 4 回以上繰り返した後、沈殿を 40 ml の 3 M グアニジン塩酸塩中に懸濁した。遠心および 15 ml の 20 mM Tris-HCl (pH 8.0)への再懸濁を 3 回繰り返してグアニジン塩酸塩を取り除いた後、懸濁液に最終濃度が $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ になるようにトリプシンを加え、 25°C で 12 時間静置した。遠心及び

15 ml の 0.5 M NaCl, 2 mM EGTA, 20 mM Tris-HCl (pH 8.0)への再懸濁を 3 回繰り返してトリプシンを取り除き、これを単離コラーゲン繊維懸濁液として 4°C で保存した。凝集検定の際は使用するだけの量を別のチューブに移してから遠心し、沈殿を移した量と同量の 0.5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 8.0)へ再懸濁することを 3 回繰り返し、EGTA を取り除いてから実験に用いた。トリプシン処理以外の工程は全て 4°C で行った。

5：凝集検定

ニセクロナマコの真皮から単離したコラーゲン繊維を用い、凝集検定を行った。Tamori ら (2006) の手法を参考にし、4°C の条件下でカルシウムイオンを含まない緩衝液(0.5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 8.0)中で実施した。20 μ l のコラーゲン繊維懸濁液に対しカルシウムイオンを含まない緩衝液を加えた後、硬さ調節因子を含んだ試験溶液を加えて全量を 40 μ l に調製し、この時、軟化因子と *H*-テンシリンの最終濃度はそれぞれ 11.8 μ g ml⁻¹ と 20 μ g ml⁻¹ になるようにした。この濃度は、これら 2 種の物質の分子数が懸濁液中で同数になるように設定した。調製後の懸濁液を、20-200 μ l 用のチップをつけ、吸引量を 20 μ l に設定したピペットマンを用いて非常にゆっくりと吸引・吐出を繰り返すことで懸濁液を混ぜ合わせた。その後、懸濁液を全量吸引してスライドグラス上に移し、カバーグラスで封をしてから光学顕微鏡でコラーゲン繊維を観察・撮影した。

テンシリンはコラーゲン繊維の凝集を引き起こした(結果にて示す)。テンシリンによって凝集したコラーゲン繊維に対する軟化因子の効果を調べるために、あらかじめテンシリンを与えて凝集を引き起こしたコラーゲン繊維の懸濁液に対し、軟化因子を与えて全量を 40 μ l にした。コントロ

ールの試料ではカルシウムイオンを含まない緩衝液を軟化因子の代わりに与えた。

テンシリンによって凝集したコラーゲン繊維に対する凍結融解の効果を調べた。凝集塊を含む溶液を -20°C で凍らせ、その後室温で解凍するという操作を3回繰り返した。コントロールの試料では、試験試料で凍結融解を行っている間(およそ 24 時間)、凝集塊を含む溶液を、凍結融解せずに 4°C で保存した。

第 3 章 結果

1：ニセクロナマコの軟化因子

ニセクロナマコ真皮の粗抽出液をニセクロナマコのトリトンモデルに対して与えたところ、強い軟化活性が見られた例があった(図 9A)。ただし、再現性が悪く、同じ方法で抽出を繰り返しても、非常に弱い活性がみられることはあったが、強い軟化活性を持つ抽出液は二度と得られなかった。このため、軟化因子の追及はシカクナマコ真皮を用いることにした。

2：シカクナマコの軟化因子

● 精製

シカクナマコ真皮の粗抽出液には強い軟化活性が見られた(図 9B)。粗抽出液を与えてから 10 分後の相対硬さは、投与直前の硬さの 54.0 % となった(1 試行)。

Mono-Q カラムでは、軟化活性は、NaCl 濃度を 0 M から 0.1 M まで変化させた段階状溶出の区間で見つかった(図 10)。

Superose 12 カラムでは、最も保持時間が長くて 280 nm の吸光が最も大きいピークに軟化活性が見られた(図 11)。

Superdex peptide カラムでは、最初に現れた大きく、するどいピークに軟化活性が見られた(図 12)。活性のあった画分を SDS-PAGE で解析してみると、約 20kDa の分子量を持つ単一のバンドが検出された(図 13A)。これが軟化因子の正体であると考え、その後の実験には、こうして 3 段階のカラムクロマトグラフィーで精製した画分を精製軟化因子として用いた。軟化因子の収量は、20 g の真皮から約 85 μ g だった。

カラムクロマトグラフィーで分取した全ての画分について、動的力学試

験でシカクナマコのトリトンモデルに対する効果を確認したが、硬化活性を持つ画分は見つからなかった。

- 糖鎖

精製軟化因子は G.P. Sensor を用いた染色により非常に濃く染まった。このことから、糖タンパク質であると考えられる(図 13B)。

- アミノ酸配列

軟化因子の N 末端アミノ酸配列を 17 残基目まで解析したところ、SEXVPPSTSYTPVXITK という結果が得られた。3 番目の残基は修飾により決定出来なかったもので、14 番目の残基はプロリンまたはフェニルアラニンのどちらかである。

この配列を BLAST で既知のタンパク質のアミノ酸配列と比較した。棘皮動物のタンパク質では、上位 5 番以内のビットスコアを持つタンパク質は、高いものから順に ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase like protein (24.4 bits)、minichromosome maintenance 3-associated protein、HES family transcription factor、tumor necrosis factor receptor、そして 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase であった。HES family transcription factor のみヒト由来のものであったが、それ以外の 4 つは全ゲノムを解読されているアメリカムラサキウニ *Strongylocentrotus purpuratus* 由来のものであった。全生物を対象とした検索をかけた場合、上位 5 番以内のビットスコアを持つタンパク質は高いものから順に *Carnobacterium* の GntR family transcriptional regulator (31.2 bits)、nuclear hormone receptors-153、mitochondrial 2-oxoglutarate/malate carrier protein、そして 2 つの amyloid-like protein であり、これら 5 つのビットスコアは棘皮動物の既知タンパク質よりも高かった。全生物や棘

皮動物で最もビットスコアが高かった既知タンパク質のアミノ酸配列を、それぞれ軟化因子と並べて比較した(図 14)。*Carnobacterium* のアミノ酸配列は 56.3%、アメリカムラサキウニのアミノ配列は 47.1%が、軟化因子の N 末端アミノ酸配列と一致した。

3：動的力学試験

3-1：シカクナマコのトリトンモデルに対する軟化因子の効果

全ての試行において、振動を与えただけでトリトンモデルの硬化が観察された。硬化は試験開始後 5 秒から 15 秒の間(2 回目から 4 回目の引張圧縮周期に相当)に起こり始め、試験開始後 10 分から 50 分(180 回目から 900 回目の引張圧縮周期)で硬さはピークに達し、その硬さは試験開始直後と比べて数倍の値を示した(表 1)。ピークに達した後、硬さはゆっくりと減少していった(図 15)。このことから、トリトンモデルの硬さは、試験開始直後に素早く増加する初期増加相と、それに続いて比較的変動が落ち着く後期定常相という 2 つの相に分けられることが分かった。トリトンモデルが定常相にある間は、硬さの急変は観察されなかった。

60 $\mu\text{g ml}^{-1}$ の軟化因子を定常相で与えると、トリトンモデルが急激に軟化した。図 16A はその典型的な結果で、軟化因子を加えてからおよそ 20 秒後に軟化が起こり始め、ほとんどの試行で 10 分以内に与える直前の 1/5 以下へと硬さが減少した。軟化因子が存在する間、硬さは減少し続けた。軟化因子を与えてから 10 分後の相対硬さは与える直前の硬さの $17.9 \pm 10.5\%$ (平均値 $\pm$ 標準偏差、 $n=7$)であった。軟化因子を含まない人工海水を与えたコントロールでは、人工海水を与えてから 10 分後の相対硬さは与える直前の硬さの $93.2 \pm 3.9\%$ ($n=5$)であり、これら 2 つの中央値は、

U-test で有意差があった($P<0.01$)。軟化因子を人工海水で洗い流すと、1 分以内にわずかな硬さの回復が起こった(図 16B)。

軟化因子の濃度を $20\ \mu\text{g ml}^{-1}$ まで下げても軟化活性が見られた。与えてから 10 分後の相対硬さは与える直前の硬さの 34.7%だった(1 試行)。

軟化因子は 80°C 、20 分間の熱処理を加えてもトリトンモデルを軟化させた(図 17)。与えてから 10 分後の相対硬さは与える直前の硬さの 60.5%だった(1 試行)。

3・2：ニセクロナマコ真皮に対するシカクナマコ軟化因子の効果
軟化因子が抽出元のシカクナマコだけでなく、別種のニセクロナマコ真皮に対しても効果があるかどうか確かめてみた。

- ニセクロナマコのトリトンモデル

ニセクロナマコのトリトンモデルもシカクナマコのものと同様に、動力学試験において、初期増加相と後期定常相の 2 つの相を持ち、定常相においてピークの値は 1 時間以上ほとんど変動しないまま保たれた(図 18)。

定常相でシカクナマコ軟化因子を与えることで、シカクナマコと同様に軟化が起こった(図 19A)。軟化因子を与えてから 10 分後の相対硬さは与える直前の硬さの $74.42\pm10.9\%$ ($n=4$)だった。軟化因子を人工海水で洗い流すと、シカクナマコと同様に、わずかに硬さの回復が起こった(図 19B)。しかし、回復が始まるのはシカクナマコよりも遅く、洗い流してから 10 分程度経過した後だった。

- ニセクロナマコの生きた真皮

Tamori ら(2006)の結果と同様、生きた真皮においても初期増加相の後、定常相に達するという 2 相性が見られた。定常相に到達した後に軟化因子

を与えたところ、軟化が起こった(図 20)。与えてから 10 分後の相対硬さは与える直前の硬さの $68.0 \pm 8.7\%$ ($n=3$) だった。この値とトリトンモデルでの軟化因子投与後の相対硬さの間には、統計的に有意な差は見られなかった(t -test $P>0.05$)。

● TFT モデル

トリトン凍結融解モデル(TFT モデル)はトリトンモデルや生きた真皮と比べ、力学試験によって与えられた振動に対する挙動も、軟化因子に対する応答も異なっていた。トリトンモデルや生きた真皮ではみられる、力学試験開始直後の硬化が、TFT モデルでは起こらずに、硬さは逆に試験開始から終了まで継続的に少しずつ減少していき(図 22B)、このため何も与えなかった場合でも、硬さは非常に低い値に保たれていた(図 21, 表 1)。TFT モデルに対して軟化因子を与えても、更なる軟化は観察されなかった(図 23)。

図 21 と表 1 は本研究で使用した種々の真皮試料の硬さの絶対値を比較したものである。試験開始時の硬さは全ての試料が似た値を示し、おおよそ 9 kPa であった。しかし、振動開始から 15 分後の硬さは全く異なっていた。TFT モデルではわずかに硬さが減少して平均 8 kPa だったが、他の 3 種類の真皮は 50-80 kPa まで大幅に増加した。Steel-Dwass の多重比較により 4 種類の真皮試料における振動開始 15 分後の硬さを有意水準 5% で比較したところ、TFT モデルは、他の 3 種類の真皮に対して統計的に有意な差が見られ、TFT モデル以外の 3 種類間では統計的に有意な差は見られなかった。

3-3 : TFT モデルにおける硬化因子テンシリンと軟化因子の組み合わせ

実験

H-テンシリンはニセクロナマコの体壁から単離されたタンパク質である。3 $\mu\text{g ml}^{-1}$ のテンシリンは人工海水中の生きた真皮(標準状態の真皮)を硬化させないが、カルシウム欠除人工海水中に置いてあらかじめ軟化させた生きた真皮(軟らかい状態の真皮)を硬化させる(Tamori et al., 2006)。本研究において、同濃度のテンシリンはニセクロナマコのトリトンモデルを硬化させなかった(図 22A)。しかし、TFT モデルにおいては同濃度(図 22B)またはそれよりも高い濃度(3-10 $\mu\text{g ml}^{-1}$)のテンシリンは明らかな硬化を引き起こした。テンシリンを人工海水で洗い流すと、増加した硬さは変わらずにほぼ一定値に留まるか、もしくはゆっくりと減少していった。図 23 に軟化因子(60 $\mu\text{g ml}^{-1}$)とテンシリン(10 $\mu\text{g ml}^{-1}$)を連続して与えた組み合わせ実験の結果を示す。まず、軟化因子が TFT モデルを軟化させないことを見た後に、人工海水で洗浄し、それからテンシリンを与えてこれを硬化させた。洗浄後、硬化した TFT モデルに対し軟化因子を与えたところ、テンシリンを加える前と同程度の硬さにまで急激に軟化が起こった。軟化因子を洗い流してからもう一度テンシリンを与えると、最初にテンシリンを与えた時と同程度まで再び硬化した。このように、テンシリンとソフニンの効果を、同一試料で何度も繰り返し示すことが可能だった。

4：単離コラーゲン繊維を用いた凝集検定

H-テンシリンは過去の報告(Tamori et al., 2006)と同じく、単離コラーゲン繊維の凝集を引き起こした。すなわち、*H*-テンシリンを与えたコラーゲン繊維懸濁液では、一つの大きくて密な塊が顕微鏡下で観察された(図 24A)。軟化因子はコラーゲン繊維懸濁液の凝集を引き起こさなかった。

軟化因子を *H*-テンシリンにより凝集したコラーゲン繊維を含む溶液に与えると、大きく密な塊は分散し、沢山の小さくて密度の低い凝集塊になった(図 24B)。コントロールとして、軟化因子を含まない緩衝液を同じように与えても、凝集したコラーゲン繊維が分散することはなかった。

テンシリンを与えて凝集させたコラーゲン繊維を含んだ溶液を、3 回凍結融解したところ、軟化因子を加えた時と同様に、大きくて密な塊は、沢山の小さくて密度の低い凝集塊へと分散した(図 24D)。

第 4 章 議論

1：ソフニンの命名

シカクナマコの体壁から真皮を軟化させる効果のあるタンパク質を単離精製し、N 末端アミノ酸配列を決定することが出来た。このアミノ酸配列を既知のタンパク質と比較した。その結果、キャッチ結合組織に対する軟化の作用を説明し得る機能を持ち、なおかつ高い相同性を持つものとして、強いて挙げるとすれば、アメリカムラサキウニのゲノムから発見された加水分解酵素であろう。このタンパク質は加水分解作用により、キャッチ結合組織を軟化させる可能性がある。しかし、後述するが、本研究での結果は、軟化タンパク質の作用が単純な分解作用ではないことを示している。そのため、今回単離した軟化タンパク質は新発見のものと見なし、その機能から「ソフニン(softenin)」と命名した。ソフニンは抽出元のシカクナマコ真皮だけでなく、別種のニセクロナマコ真皮に対しても軟化作用を持つことから、ソフニン及びその相同タンパク質はナマコに広く分布する、共通の軟化因子の可能性はある。

2：トリトンモデルは標準状態に、TFT モデルは軟らかい状態に対応する

本研究では、細胞外成分に働きかけてキャッチ結合組織の機械的性質を変化させる化学物質を探し出すために、界面活性剤 Triton X-100 により細胞を破壊した真皮、トリトンモデルを動的力学試験に用いた。トリトンモデルの硬さの絶対値は、生きた真皮の標準状態と似ており、これはトリトンモデルが標準状態の真皮と対応する可能性が高いことを示している。硬い状態の真皮の硬さの絶対値はずっと大きいことから(Tamori et al., 2006)、トリトンモデルが硬い状態に対応するとは考えられず、後述のよ

うに、軟らかい状態に対応するとも考えられない。硬さの絶対値からだけではなく、次に論じるように、テンシリンやソフニンに対する挙動などからも、この考えは支持される。

ソフニンはトリトンモデルだけでなく生きた真皮も軟化させたことから、ソフニンの作用には組織中の細胞が生きているか死んでいるかは関係が無いことが示唆された。ソフニンは無機イオン(Motokawa, 1994)以外で細胞外成分の硬さを直接変化させることが示された、初めての化学物質である。

上述のようにトリトンモデルは標準状態の真皮に対応した硬さを持っていたが、それとは別に、軟らかい状態に対応した真皮モデルの作成を試みた。トリトンモデルに対し凍結融解を繰り返し行うことで、細胞外高分子間の機械的相互作用が解除され、トリトンモデルをより軟らかくするのではないかと期待した。こうして出来た **TFT** モデルは、期待通りに低い硬さの値を示した。**TFT** モデルはただ軟らかいというだけでなく、繰り返し歪ませることによりさらに軟化することからも、かつソフニンを投与しても軟化が起こらないことから、軟らかい状態の真皮に対応していると推測できる(図 23, 表 1)。この推測を後押しする事実として、**TFT** モデルはテンシリンを与えると硬化するという点が挙げられる(図 22B)。これらの点について以下に詳しく論じることにする。

生きた真皮では、過去の研究の結果と同様、力学試験開始時に硬さの増加が見られ(Shibayama et al., 1994, Tamori et al., 2006)、またトリトンモデルでも同様の現象が観察されたが、**TFT** モデルでは見られなかった。ナマコ真皮の中でコラーゲン繊維は 3 次元的な配列を作っている。このような繊維性成分に単一軸の歪みを繰り返し加えると、歪みの方向に沿って

繊維の配向が起こり、その方向に対する硬化を引き起こす(Quinn and Winkelstein, 2011)。このような繰り返し加えられた歪みによって起こる硬化(歪み硬化)は力学試験開始時において、生きた真皮とトリトンモデルで見られた硬化に、ある程度寄与している可能性がある。繊維の配向は TFT モデルにおいても起こっているはずだが、このモデルは硬化ではなく軟化している。繰り返して加えられた歪みによって軟化が起こる現象(歪み軟化)は、軟らかい状態にある生きた真皮が示す特徴の一つである(Motokawa and Tsuchi, 2003)。TFT モデルが力学試験開始時に起こす軟化は、配向による歪み硬化を圧倒するほどの歪み軟化が起こっていることを示唆しており、TFT モデルが軟らかい状態の真皮に対応するという見解を支持している。

この見解はテンシリンを与えた時の結果によってさらに支持された。テンシリンはナマコ由来のタンパク質で、軟らかい状態の真皮を硬化させるが、標準状態の真皮を硬化させることは出来ない(Tamori et al., 2006)。本研究の結果ではテンシリンは TFT モデルに対し効果があったが(図 22B)、トリトンモデルに対しては効果が無かった(図 22A)。この結果は TFT モデルが軟らかい状態、トリトンモデルが標準状態にあることを示唆している。以上、硬さの絶対値、繰り返し歪みに対する挙動の違い、テンシリンとソフニンに対する反応の違いから、トリトンモデルは標準状態の真皮に、TFT モデルは軟らかい状態の真皮に対応していると考えて良いと結論付けた。

また、テンシリンが TFT モデルを硬化させたという事実は、テンシリンに単離したコラーゲン繊維を凝集させる作用が発見されて以来(Tipper et al., 2003)推測されていた、細胞外成分に直接働きかけているという仮

説を支持する決定的な証拠となる。過去の研究では生きた真皮しか用いられていなかったため、硬さ調節因子が直接細胞外成分に作用しているのか、細胞を介して間接的に細胞外の硬さをコントロールしているのか、決定することが出来なかった。このような区別は分子機構と細胞支配機構を理解するために極めて重要なものである。本研究で、標準状態と軟らかい状態、2つの状態に対応する真皮モデルを作成出来たことは今後のキャッチ結合組織の研究に大きく貢献すると考えている。

3：ソフニンの分子機構

ソフニンは **TFT** モデルに効果が無かったが、これはソフニンが標準状態の真皮に対する軟化因子であり、すでに軟らかい状態にある真皮に対しては効果を及ぼさないものだとすれば妥当な結果である。テンシリンを与えてあらかじめ硬化させた **TFT** モデルにソフニンを与えると、テンシリンを与える前と同程度の硬さにまで軟化したことから、ソフニンはテンシリンによる硬化をキャンセルしている可能性がある(図 23)。また、コラーゲン繊維を用いた凝集検定において、ソフニンはテンシリンによって引き起こされた凝集を分散させた(図 24B)。これらの結果はテンシリンとソフニンは、コラーゲン繊維間の同一の機械的相互作用に対し、拮抗的に働きかけている可能性を強く示唆している。軟らかい状態から標準状態への硬さ変化に関連しているこの機械的相互作用が、繰り返し凍結融解することで弱まることは、**TFT** モデルが、トリトンモデルよりも軟らかいということからも支持される。この、相互作用が凍結融解処理の影響を受けるという結果は、コラーゲン繊維懸濁液においても同様に観察され、テンシリンを与えることによって作られた単一の大きく密なコラーゲン凝集塊は、

凍結融解処理により沢山の小さく密度の低い凝集塊となって分散した(図 24D)。

凍結融解により物理的相互作用が解除される機構として、次のようなものが考えられる。①コラーゲン繊維を凍らせた時、相互作用しているコラーゲン繊維の間に氷が形成されることで繊維同士が内部から押され、機械的相互作用に張力がかかり、この力が機械的相互作用を直接破壊するか、引き伸ばすことにより軟らかい状態の真皮の特徴である歪み軟化を引き起こす(Motokawa and Tsuchi, 2003)。②過去の研究において高いイオン濃度が生きた真皮を軟化させたことから(Hayashi and Motokawa, 1986)、氷が形成されていく過程で繊維間の凍っていない空間でのイオン濃度上昇が起こり、これが繊維間の結合を解除する。③凍結融解処理により、システイン残基が酸化されることで繊維間の機械的相互作用に影響を与え、コラーゲン繊維の凝集を引き起こす(Slatte et al., 2012)。しかしこれが起これば硬化することになり、本研究の結果とは逆になるはずであり、この可能性は低い。ただし、凍結融解がこれ以外の化学的变化を引き起こしてコラーゲン繊維やテンシリンに影響を与え、軟化が起きた可能性は残っている。

本研究での結果はソフニンと凍結融解処理が、共にテンシリンによって形成された繊維間の機械的相互作用を解除するという分子機構を通して軟化を引き起こすことを強く示唆している。それに基づく標準状態から軟らかい状態への硬さ変化の単純な分子機構の想像図を示す(図 25)。H-テンシリンはコラーゲン繊維間に架橋を作って繊維を太く束ねることで、真皮を軟らかい状態から標準状態へと硬化させる。ソフニンは H-テンシリンと同じ結合領域をコラーゲン繊維上で奪い合うことにより架橋を解除し、

太く束ねられた繊維をほぐすことで標準状態から軟らかい状態へと軟化させる(図 25)。標準状態から硬い状態への変化においては、テンシリンにより太く束ねられた繊維同士が、テンシリンのものとは異なる NSF による架橋で結合し、さらに太い繊維束を作っている。

4：ソフニンは消化酵素か？

ある種のナマコでは、様々な化学的、機械的な刺激に反応して、体がドロドロに溶けてしまうほどの激しい軟化を起こすことが知られている(Hill and Reinschmidt 1976, Junqueira et al., 1980, Motokawa, 1981)。このような激しい軟化の原因として消化酵素(Junqueira et al., 1980)や、マナマコの体壁で発見されコラーゲンを消化する作用のあるマトリックスメタロプロテイナーゼ(MMP)の関与が想像されてきた(Wu et al., 2013)。しかしながらソフニンの作用は、単純にコラーゲンをはじめとした細胞外成分を消化する作用とは異なると考えられる。ソフニンの軟化作用は与えてから 1 分以内に起こり、ソフニンを洗い流すことによる部分的な硬さの回復もまた 1 分以内に起こる。コラーゲン繊維の分解反応は数時間かかるため、このような素早く可逆的な硬さ変化を説明するのは難しい(Wu et al., 2013)。また、コラーゲン繊維の再合成にも時間がかかる上に、再合成には線維芽細胞のような生きた細胞が必要だが、本研究で用いた真皮モデルにはこのような細胞は含まれていない。Ribeiro ら(2012)は MMP による硬さの調節仮説を提唱した。その仮説では、MMP はコラーゲン繊維それ自体を分解するわけではないが、コラーゲン繊維間の架橋を分解し、その分解作用は tissue inhibitor of MMP (TIMP)によってコントロールされると仮定されている。この仮説はテンシリンのアミノ酸配列が哺乳類の

TIMP と 21-36%一致しているという結果に基づいているが、テンシリンに TIMP としての活性があることは未だ示されておらず、また *H*-テンシリンには TIMP の働きに必要なジスルフィド結合がないことが報告されている(Tamori et al., 2006)。この仮説では MMP は架橋を分解して真皮を軟らかくするが、軟らかい状態から標準状態へと硬さを回復する際には、組織内の細胞から TIMP 及び架橋する分子の提供を受ける必要があり、このような硬さの回復は本研究の真皮モデルでは不可能である。本研究によりソフニンとテンシリンの間に拮抗的な作用が示唆されたが、それはソフニンが MMP のような分解酵素だという意見を支持するものではない。しかし、MMP がナマコの自切や分裂といった、激しい軟化を伴う不可逆的な現象に関わる可能性は残っている。

第 5 章 結論と今後の展望

本研究ではシクロナマコ体壁真皮から、真皮を軟化させる活性を持つタンパク質、ソフニンの単離精製に成功した。ソフニンは動的力学試験において、界面活性剤で細胞を破壊した真皮モデル(トリトンモデル)に対して軟化活性を持つため、真皮の細胞外成分に直接働きかけて軟化を引き起こす軟化因子である。過去の研究においてキャッチ結合組織の硬さ変化を調節する因子は複数見つかっているが、細胞外成分に直接働く可能性が高いとされていたのは、軟らかい状態の真皮を標準状態へと硬化させるタンパク質、テンシリンのみであり、軟化因子に関しては候補すらも上がっていない状況だった。実験的な証拠と共に細胞外成分に直接働きかける軟化因子の存在を示すことが出来たことは、キャッチ結合組織の硬さ調節機構の研究に大きく貢献する業績である。

ニセクロナマコのトリトンモデルを更に凍結融解処理し、軟らかい状態の力学的状態に対応する真皮モデル(TFT モデル)の作製に成功した。テンシリンは TFT モデルを硬化させることが分かった。これにより、ソフニンに続いてテンシリンについても細胞外成分に直接働くという実験的証拠を得ることが出来た。ソフニンは TFT モデルに対して、テンシリンであらかじめ硬化させた時にのみ軟化活性を示し、しかもテンシリンを与える前とほぼ同程度の硬さまで軟化させた。ソフニンはテンシリンと拮抗的に働くことで、軟らかい状態から標準状態へと硬さを変える細胞外成分間の相互作用を解除する可能性が強く示唆された。

ニセクロナマコ真皮から単離したコラーゲン繊維を用いた凝集検定においてもソフニンとテンシリンの間に拮抗的な作用が観察された。また、

真皮モデルにおいても、コラーゲン懸濁液においても、凍結融解処理はソフニンと同様の効果を示した。これらの結果は、ソフニンが解除する細胞外成分間の相互作用と、凍結融解処理が破壊する相互作用は同一のものであり、テンシリンによってコラーゲン繊維間に形成されている相互作用こそが、標準状態の硬さを担っているものであることを強く示唆している。

このように、本研究では新たな軟化因子の存在を示すだけでなく、それが働きかける相互作用が細胞外成分のどこに生じているかをも示すことが出来た。また、トリトンモデルと TFT モデルという 2 つの細胞破壊真皮モデルにより、細胞の存在無しに 2 つ力学的状態を再現出来たことは画期的であり、キャッチ結合組織の硬さ変化において、力学的状態と細胞外成分の構造との関連性を調べる上で今後の研究上、役立つと期待している。

最近得られたばかりのデータでは、九州栄養福祉大学の大澤得二教授との共同研究により、キャッチ結合組織の硬さ変化とコラーゲン繊維の形態に関連性があることが分かってきた。試料はニセクロナマコの真皮を用い、カルシウム欠如人工海水、人工海水、K 人工海水に浸すことでそれぞれ軟らかい状態、標準状態、硬い状態にして、この真皮横断面を透過型電子顕微鏡で観察した。軟らかい状態では細いコラーゲン繊維が多く、太い繊維がまばらに観察された。標準状態では太いコラーゲン繊維が多くなり、細い繊維はまばらになった。そして、硬い状態では大半を太いコラーゲン繊維が占めており、なおかつ太いコラーゲン繊維間に架橋が形成されている様子が観察された。テンシリンが細いコラーゲン繊維同士をまとめて太い繊維を作り、更に別の架橋が形成されることで太い繊維同士が結び付けられると考えた場合、本研究での成果とも良く対応がつく結果であり、本研究の成果を支持するだけでなく、ソフニンとテンシリンだけでは説明し

きれなかった硬い状態を含め、キャッチ結合組織の力学的状態と細胞外高分子の構造の間の関連性を説明し得る結果を得られるのではないかと考えている。

今後の実験では、ソフニンのアミノ酸配列の全解析を進めていこうと思っている。予定としては、ソフニンをトリプシン処理した断片から更なるアミノ酸配列情報を得た後、それをもとにプライマーを作成し、同時にシカクナマコ体壁真皮から mRNA を抽出することで、それらを用いた RT-PCR により目的とする cDNA 断片を獲得したいと考えている。cDNA の全塩基配列を解析することでソフニンをコードする DNA をクローニング出来ると期待している。

別の戦略として、ソフニンのトリプシン断片から配列情報を得た後に、アメリカムラサキウニのゲノム中にソフニンに似たタンパク質があるかどうかを検索する。キャッチ結合組織はウニにも存在するため、そのゲノム中にはソフニンに似たタンパク質の配列が存在すると期待している。本研究で得られた 17 残基の N 末端アミノ酸配列を用いた相同性検索では高い相同性スコアを持つ既知タンパク質を検出できなかったが、より詳細な配列情報を用いて再度検索をかけることにより、アメリカムラサキウニのゲノムからウニにおけるソフニンを選出出来る可能性がある。

参考文献

1. Birenheide R, Tamori M, Motokawa T, Ohtani M, Iwakoshi E, Muneoka Y, Fujita T, Minakata H, Komoto K (1998) Peptides controlling stiffness of connective tissue in sea cucumber. *Biol Bull* 194: 253-259.
2. Hayashi Y and Motokawa T (1986) Effects of ionic environment on viscosity of catch connective tissue in holothurian body wall. *J Exp Biol* 125: 71-84.
3. Hill RB and Reinschmidt D (1976) Relative importance of the antioxidant and anesthetic properties of propylene phenoxetol in its action as a 'preservative' for living holothurians. *J Invert Pathol* 28: 131-135.
4. Inoue M, Birenheide R, Koizumi O, Kobayakawa Y, Muneoka Y, Motokawa T (1999) Localization of the neuro peptide NGIWIamide in the holothurian nervous system and its effects on muscular contraction. *Proc R Soc Lond B* 266: 993-1000.
5. Koob TJ, Koob-Emunds MM, Trotter JA (1999) Cell-derived stiffening and plasticizing factors in sea cucumber (*Cucumaria frondosa*) dermis. *J Exp Biol* 202: 2291-2301.
6. Junqueira LCU, Montes GS, Mourão PAS, Carneiro J, Salles LMM, Bonetti SS (1980) Collagen-proteoglycans interaction during autotomy in the sea cucumber, *Stichopus badionotus*. *Rev Can Biol* 39: 157-164.
7. Matsumura T (1974) Collagen fibrils of the sea cucumber,

- Stichopus japonicus*: purification and morphological study. Connect Tissue Res 2: 117-125.
8. Motokawa T (1981) The stiffness change of the holothurian dermis caused by chemical and electrical stimulation. Comp Biochem Physiol 70C: 41-48.
 9. Motokawa T (1982) Factors regulating the mechanical properties of holothurian dermis. J Exp Biol 99: 29–41.
 10. Motokawa T (1984) Connective tissue catch in echinoderms. Biol Rev 59: 255-270.
 11. Motokawa T (1988) Catch connective tissue: a key character for echinoderms' success. In: Burke RD, Mladenov PV, Lambert P, Parsley RL, editors. Echinoderm Biology. Rotterdam, Brookfield: A. A. Balkema. pp. 39-54.
 12. Motokawa T (1994) Effects of ionic environment on viscosity of Triton-extracted catch connective tissue of a sea cucumber body wall. Comp Biochem Physiol 109B: 613-622.
 13. Motokawa T and Tsuchi A (2003) Dynamic mechanical properties of body-wall dermis in various mechanical states and their implications for the behavior of sea cucumber. Biol Bull 205: 261-275.
 14. Quinn KP and Winkelstein BA (2011) Preconditioning is correlated with altered collagen fiber alignment in ligament. J Biomech Eng 133(6): 064506. doi:10.1115/1.4004205.
 15. Ribeiro AR, Barbaglio A, Oliveira MJ, Ribeiro CC, Wilkie IC,

- Candia Carnevali MD, Bardosa MA (2012) Matrix metalloproteinases in a sea urchin ligament with adaptable mechanical properties. PLoS ONE 7(11): e49016. doi:10.1371/journal.pone.0049016
16. Schagger H and von Jagow G (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. Anal Biochem 166: 368-379.
 17. Shibayama R, Kobayashi T, Wada H, Ushitani H, Inoue J, Kawakami T, Sugi H (1994) Stiffness changes of holothurian dermis induced by mechanical vibration. Zool Sci 11: 511-515.
 18. Slatter DA, Bihan DG, Jarvis GE, Stone R, Pugh N, Giddu S, Farndale RW (2012) The properties conferred upon triple-helical collagen-mimetic peptides by the presence of cysteine residues. Peptides 36: 86-93.
 19. Smith GN Jr and Greenberg MJ (1973) Chemical control of the evisceration process in *Thyone briareus*. Biol Bull 144: 421-436.
 20. Szulgit G (2007) The echinoderm collagen fibril: a hero in the connective tissue research of the 1990s. BioEssays 29: 645-653.
 21. Tamori M, Yamada A, Nishida N, Motobayashi Y, Oiwa K, Motokawa T (2006) Tensilin-like stiffening protein from *Holothuria leucospilota* does not induce the stiffest state of catch connective tissue. J Exp Biol 209: 1594-1602.
 22. Tamori, M, Saha AK, Matsuno A, Noskor SC, Koizumi O,

- Kobayakawa Y, Nakajima Y, Motokawa T (2007) Stichopin-containing nerves and secretory cells specific to connective tissues of the sea cucumber. *Proc Biol Sci* 274: 2279-2285.
23. Thurmond FA and Trotter JA (1996) Morphology and biomechanics of the microfibrillar network of sea cucumber dermis. *J Exp Biol* 199: 1817-1828.
24. Thurmond FA, Koob TJ, Bowness JM, Trotter JA (1997) Partial biochemical and immunologic characterization of fibrillin microfibrils from sea cucumber dermis. *Connect Tissue Res* 36: 211-222.
25. Tipper JP, Lyons-Levy G, Atkinson MAL, Trotter JA (2003) Purification, characterization and cloning of tensilin, the collagen-fibril binding and tissue stiffening factor from *Cucumaria frondosa* dermis. *Matrix Biol* 21: 625-635.
26. Trotter JA and Koob TJ (1989) Collagen and proteoglycan in a sea urchin ligament with mutable mechanical properties. *Cell Tissue Res* 258: 527-539.
27. Trotter JA, Thurmond FA, Koob TJ (1994) Molecular structure and functional morphology of echinoderm collagen fibrils. *Cell Tissue Res.* 275: 451-458.
28. Wilkie IC (2002) Is muscle involved in the mechanical adaptability of echinoderm mutable collagenous tissue? *J Exp Biol* 205: 159-165.
29. Wilkie IC (2005) Mutable collagenous tissue: overview and

- biotechnological perspective. *Prog Mol Subcell Biol* 21: 221-250.
30. Wu H, Hu Y, Shen J, Cai Q, Liu G, Su W, Cao M (2013) Identification of a novel gelatinolytic metalloproteinase (GMP) in the body wall of sea cucumber (*Stichopus japonicus*) and its involvement in collagen degradation. *Process Biochemistry* 48: 871-877.
31. Yamada A, Tamori M, Iketani T, Oiwa K, Motokawa T (2010) A novel stiffening factor inducing the stiffest state of holothurian catch connective tissue. *J Exp Biol* 213: 3416-3422.

謝辞

本研究の実施および論文作成にあたり、ご指導を頂きました本川達雄教授に最大の感謝の意を表します。他大学から入学し、初めての棘皮動物研究で分からないことだらけだった私に、厳しくも温かいご指導をして頂きました。実験や、論文での論理展開など、数多くの場面でアドバイスを頂き、様々な刺激を受けました。

田守正樹助教には、過去の研究から得られた実験のノウハウを教えて頂き、また、新たに始める実験に関しても相談にのって頂く等、様々な場面でお世話になりました。情報通信研究機構の山田章博士には、博士一貫教育プログラムにおける派遣プロジェクトの出向先として、3か月もの期間にわたり、忙しい仕事の合間を縫って、実験手法のご教授や既存の実験方法の改善案などの面でお世話になりました。論文を作成する際も、原稿を読んで頂くことで、間違いの指摘や改訂の提案などのアドバイスを頂きました。

米国、ボルドウィン大学のオラフ・エラズ博士には、論文作成の際に原稿を読んで頂き、英文の訂正や説明不足な点の指摘等のご協力をして頂きました。

琉球大学の小渕正美氏と水山克氏にはニセクロナマコとシカクナマコの入手に関して多大なご協力を頂きました。

大岡山地区の生命理工学研究科所属の先生方、浜口幸久教授、本郷裕一准教授、石島純夫助教、そして佐藤節子技術補佐員に感謝の意を表します。日頃お会いした時に色々なお話をさせて頂き、研究の相談や学生実習など、様々な面でお世話になりました。

本川研究室のメンバーには大変お世話になりました。旧メンバーである

吉村和也博士、池谷知昭氏には、豊富な実験経験から様々なアドバイスを頂きました。現メンバーの菊池窯平技術補佐員、渕上芳朗氏、釣巻創氏、笹岡陽介氏、山田訓平氏には研究以外にもいつもお世話になり、楽しい研究生生活を送ることが出来ました。

最後に博士課程進学を承諾し、協力をして頂いた母に感謝の意を表します。

表 1：種々の真皮試料の硬さ(kPa)[†]

時間 [§]	ニセクロナマコ			シカクナマコ
	TFT モデル	トリトンモデル	生きた真皮	トリトンモデル
0 分	9.05±1.67 (5)	8.68±5.02 (9)	8.60±5.57 (7)	8.3±3.5 (10)
15 分	8.16±1.55 (5)	69.89±51.99* (9)	48.14±7.38* (7)	79.0±41.39* (10)

[†]平均値±標準偏差(試行数)

[§]動的力学試験開始からの経過時間

*TFT モデルの値と有意差あり(P<0.05)

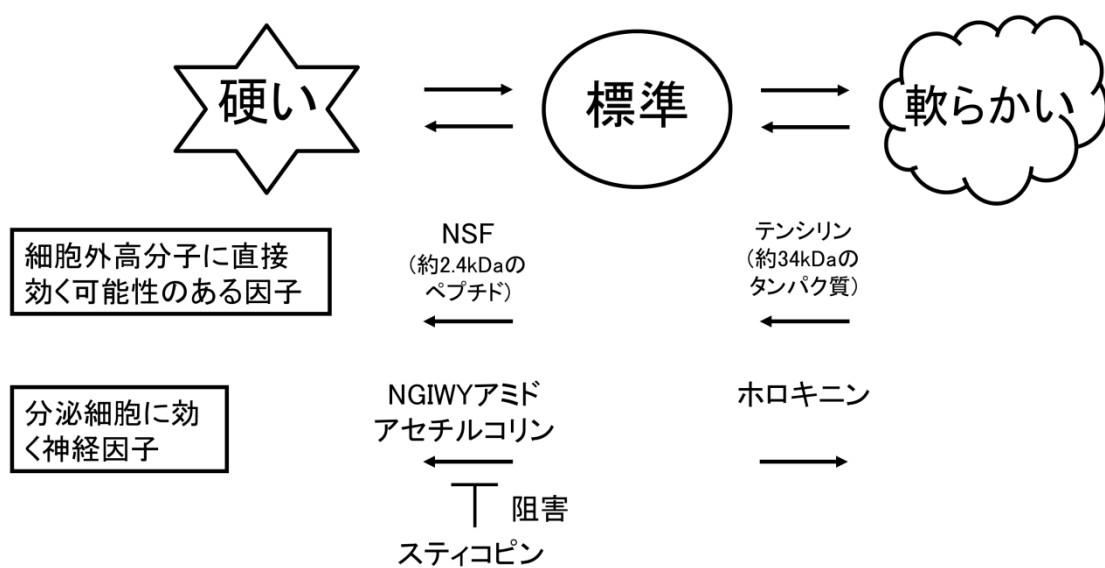


図1: ナマコの3状態と既知の硬さ調節因子

A



1 cm

B



1 cm

図2:実験動物

(A):ニセクロナマコ *Holothuria leucospilota* Brandt

(B):シカクナマコ *Stichopus chloronotus* Brandt

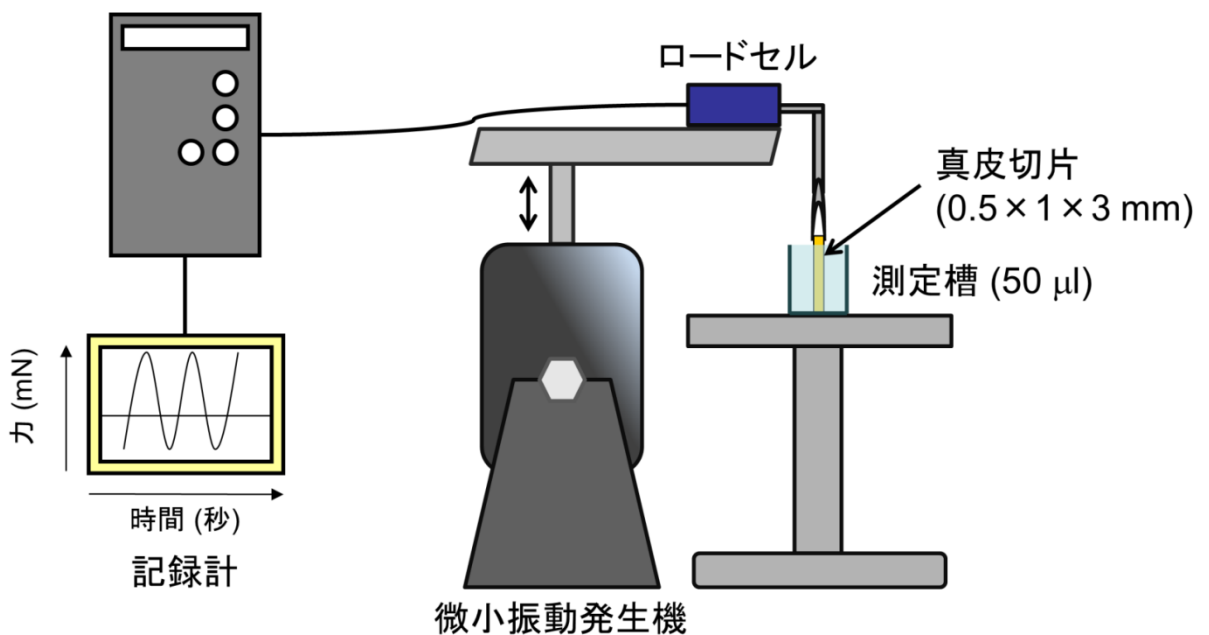


図3: 動的力学試験装置

微小振動発生機を用いてシカクナマコの真皮切片に $\pm 5\%$ の引っ張り圧縮歪みを0.3Hzで繰り返し与え、1周期中の歪みが $+5\%$ の時の応力を、その周期での硬さの指標とした。

ニセクロナマコの体壁から真皮を切り出す
↓
2倍容のK人工海水中に浸す
↓
2倍容の3M KCl, 20mM Tris-HCl (pH 8.0)中に移す
↓
ハサミで分断してタンパク質を抽出
↓
28,000 × gで40分間遠心
↓
上清を0.5 M NaCl, 20mM Tris-HCl (pH 8.0)に対して透析
↓
透析内液を粗抽出液として動的力学試験に使用

図4 :ニセクロナマコ真皮からの軟化因子抽出手順

ニセクロナマコの体壁から真皮を切り出す
↓
2倍容の2 M NaCl, 10mM EGTA, 20mM Tris-HCl (pH 8.0)中に浸す
↓
-80°Cで3時間かけて凍らせ、氷上解凍
↓
ハサミで分断した後、ホモジナイザーでホモジナイズ
↓
ホモジネートをもう一度凍結融解
↓
28,000 × gで30分間遠心
↓
上清に60%飽和硫酸を加える
↓
28,000 × gで30分間遠心
↓
沈殿を0.5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 8.0)中に溶かす
↓
同じ組成の緩衝液に対して透析
↓
300,000 × gで30分間遠心
↓
Mono Qカラムを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー
↓
Superose 6カラムを用いたゲルろ過クロマトグラフィー
↓
硬化活性のあるフラクションを精製H-テンシリンとし、その後の試験に使用

図5 :ニセクロナマコ体壁真皮からのH-テンシリン精製手順

シカクナマコの体壁から真皮を切り出す
↓
1倍容の5 M NaCl, 20mM Tris-HCl (pH 8.0)中に浸す
↓
ステンレス棒で2時間かき混ぜては、押し潰すという物理刺激を与え続ける
↓
28,000 × gで40分間遠心
↓
上清にを10 mM Tris-HCl (pH 8.0)に対して透析
↓
透析内液を精密ろ過デバイスに通して粘性物質を除去
↓
Mono Qカラムを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー
↓
Superose 12カラムを2本直列に繋いだ条件でゲルろ過クロマトグラフィー
↓
軟化活性のある画分を限外ろ過デバイスで濃縮
↓
Superdex peptideを用いたゲルろ過クロマトグラフィー
↓
軟化活性のある画分を精製軟化因子とし、その後の実験に使用

図6 :シカクナマコ体壁真皮からの軟化因子精製手順

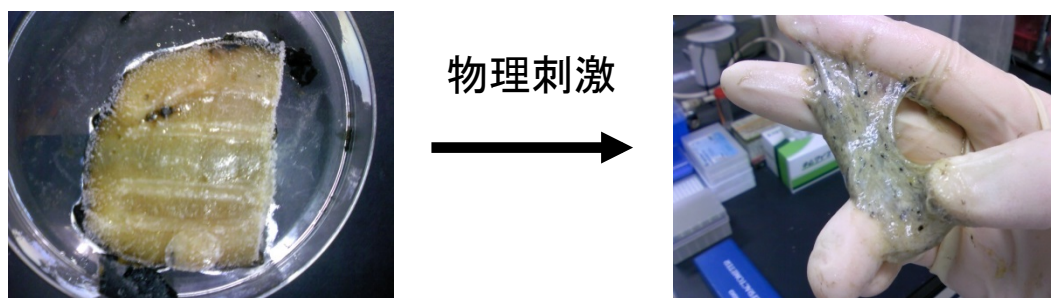


図7 :シカクナマコ体壁の軟化現象

切り出したシカクナマコ体壁(左)に強い物理刺激を与えると、ドロドロに溶ける(右)。

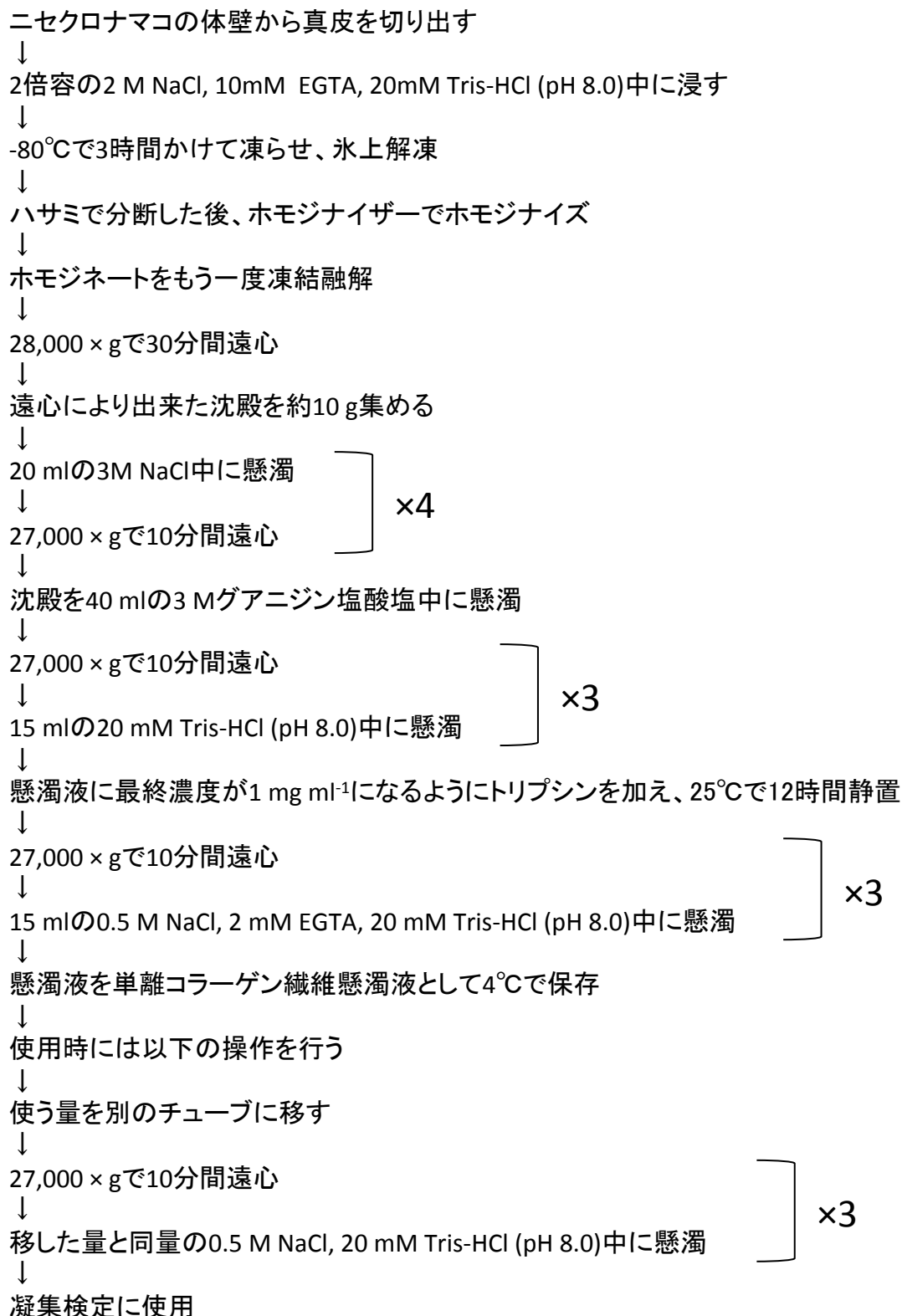


図8 : ニセクロナマコ体壁真皮からのコラーゲン繊維単離手順

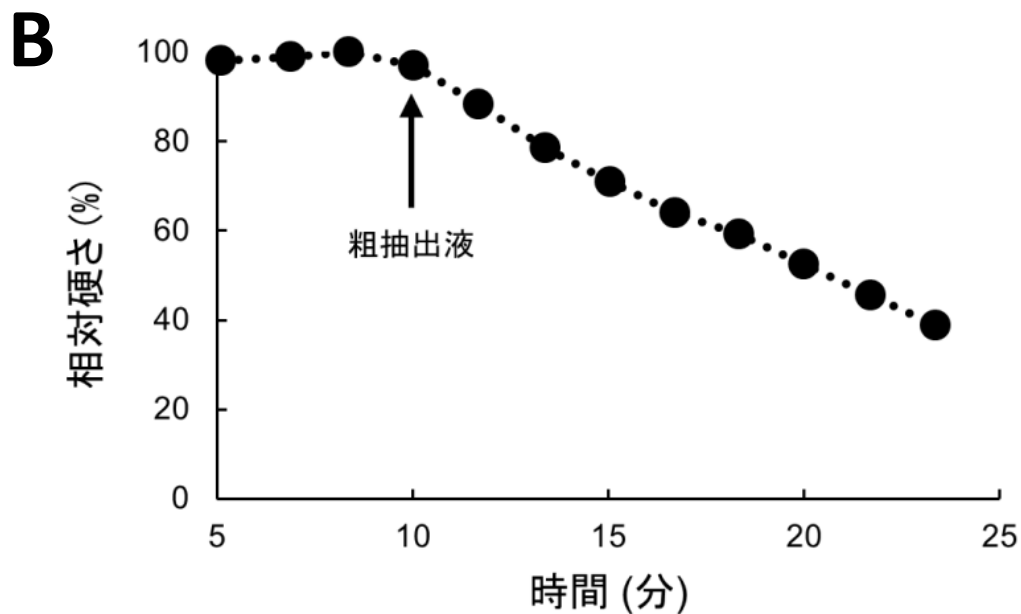
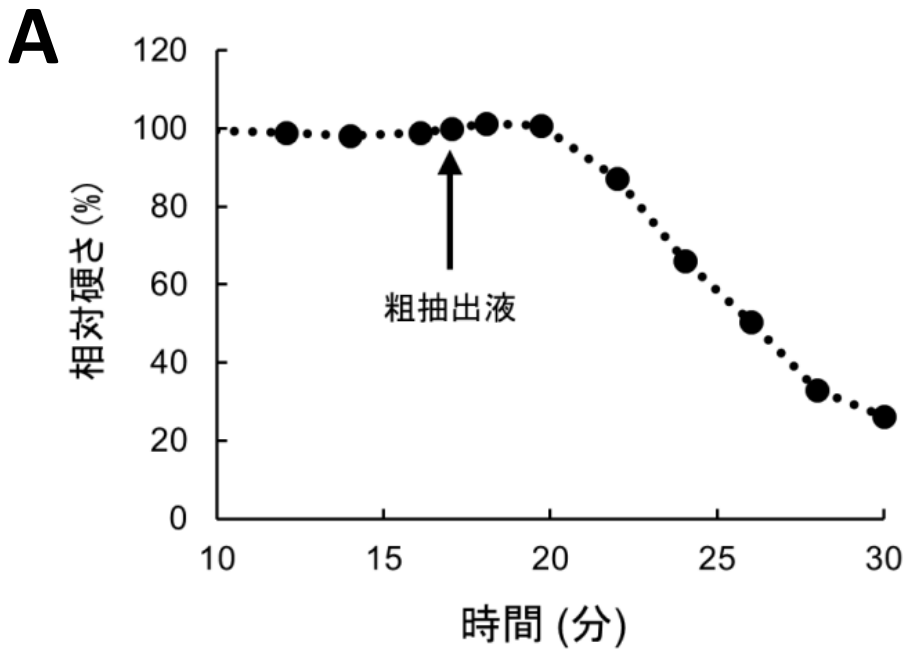


図9: 粗抽出液の軟化活性

(A): ニセクロナマコ真皮から得られた粗抽出液をニセクロナマコのトリトンモデルに与えると(上矢印)、顕著な軟化が起こった。

(B): シカクナマコ真皮から得られた粗抽出液をシカクナマコのトリトンモデルに与えると(上矢印)、顕著な軟化が起こった。

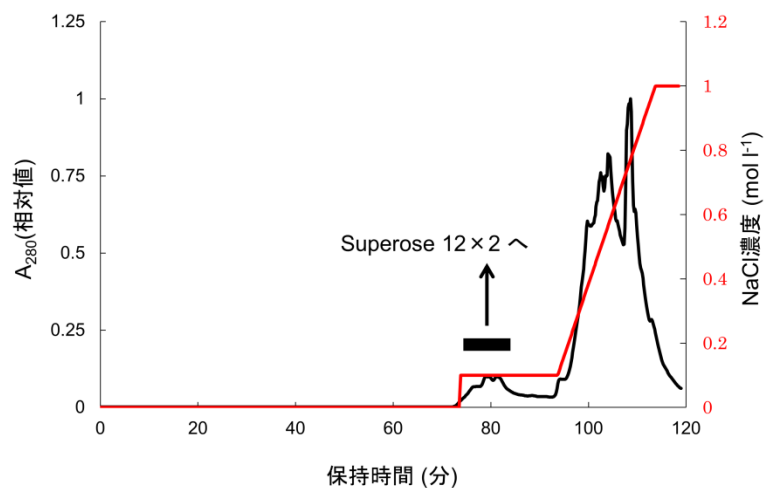


図10:シカクナマコ粗抽出液のMono Qカラムによる陰イオン交換クロマトグラフィー

右の縦軸は図のグラフの赤線に対応し、溶出時の塩濃度を表している。図12-14の左側の縦軸はグラフ中の黒い線に対応し、280 nmの吸光を各分画での最大値を1とした相対値で表している。水平線で示した画分は軟化活性のある画分であり、これを次の精製に使った。

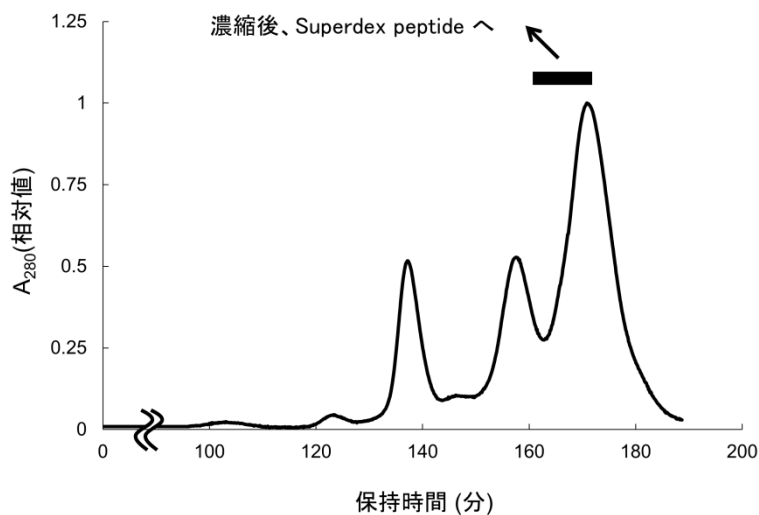


図11: Superose 12カラムによるゲルろ過クロマトグラフィー

水平線で示した画分は軟化活性のある画分であり、これを次の精製に使った。

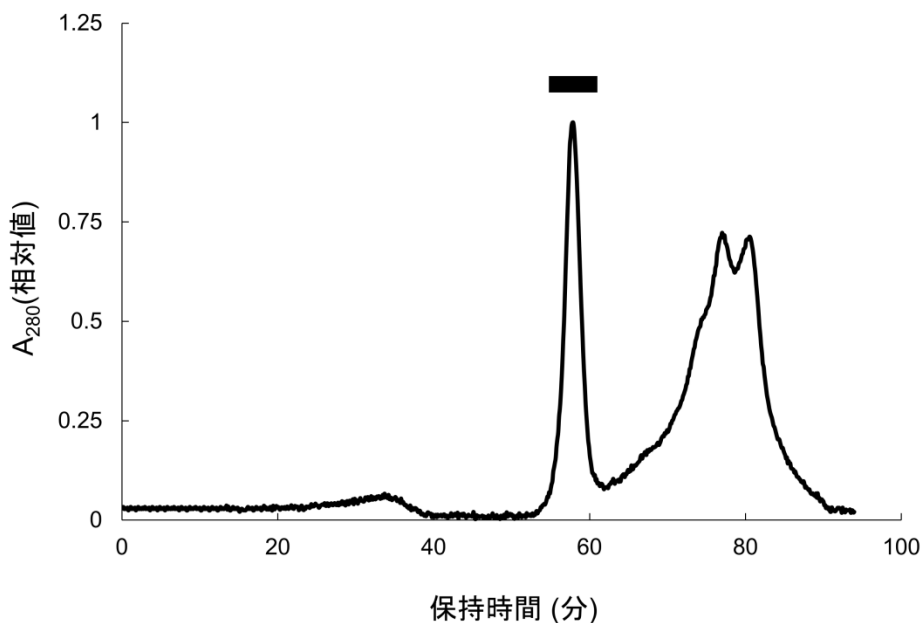


図12: Superdex peptideカラムによるゲルろ過クロマトグラフィー
青い水平線で示した画分に軟化活性がみられ、これを精製軟化因子とし、以降の実験に用いた。

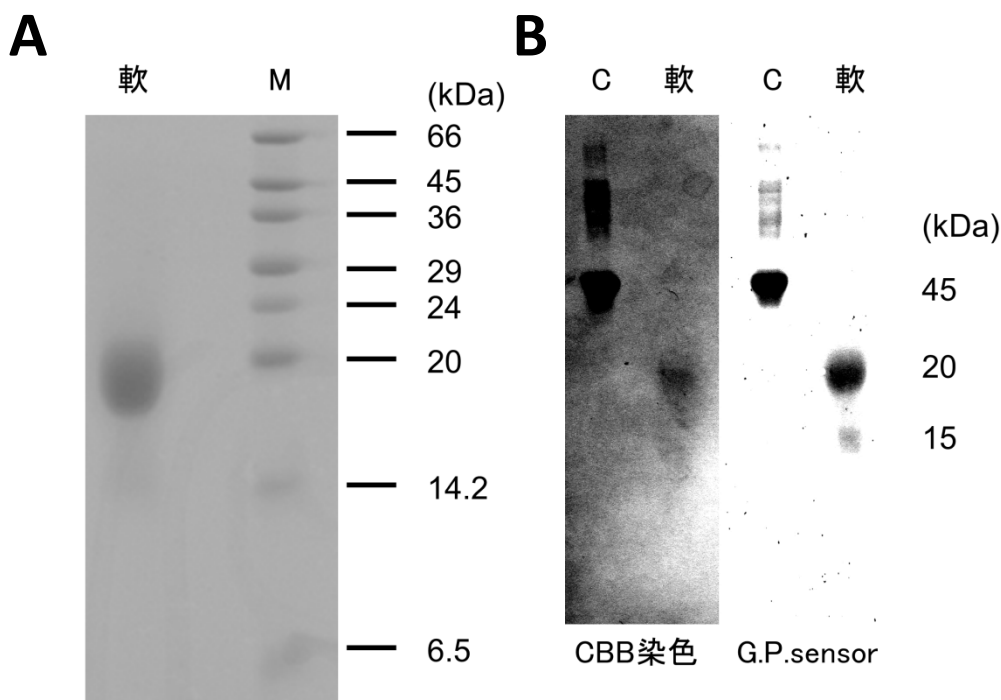


図13: 精製軟化因子の電気泳動像及び糖鎖検出実験

(A): “M”は分子量マーカのレーンを表し、“軟”は軟化活性を持つ精製画分のレーンを表している。精製した画分には分子量約20 kDaの単一のバンドが検出された。
(B): “C”はポジティブコントロールであるオボアルブミンのレーンを表し、“軟”は精製した軟化因子のレーンを表している。軟化因子のバンドは糖鎖検出試薬G.P. Sensorに対して強い反応を示した。

A

軟化因子	S	E	X	V P P	S	-	T S	Y	T P	V	X	I	T	K
ウニ	V	E	P	V P P	G	C	T S	F	T P	I	I	L	Q	R

B

軟化因子	S	E	X	V	P	P	S	T S Y T P V	X	I T K
<i>Carnobacterium</i>	Y	D	I	S	H	Y	I	T S Y T P V	L	I T K

図14: 軟化因子と既知タンパク質とのアミノ酸配列比較

(A): 軟化因子のN末端アミノ酸配列と、アメリカムラサキウニから得られた ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 34-like protein(350-367残基目、XP_785288.3)との比較。

(B): *Carnobacterium* sp. 17-4から得られたGntR family transcriptional regulator (162-178残基目、YP_004375176.1)との比較。

四角で囲まれた区間は比較した配列間で一致したアミノ酸配列を表している。

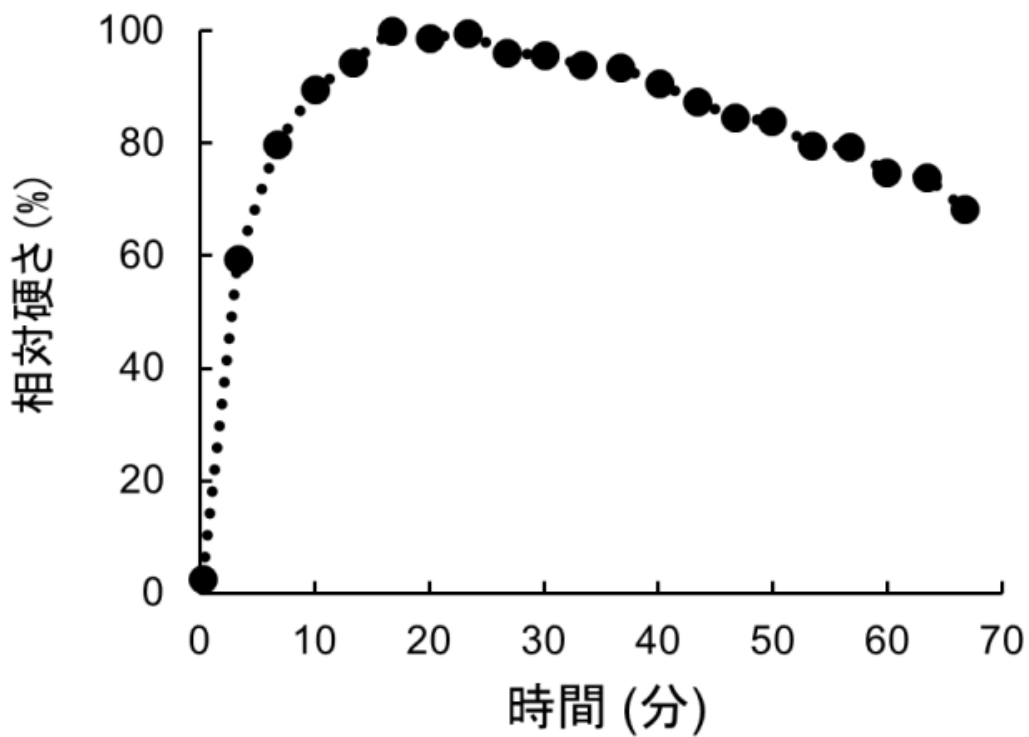


図15:シカクナマコのトリトンモデルの力学試験における挙動
振動開始から顕著に硬さが増加していき、ピークに達した後は、硬さはゆっくりと減少していった。

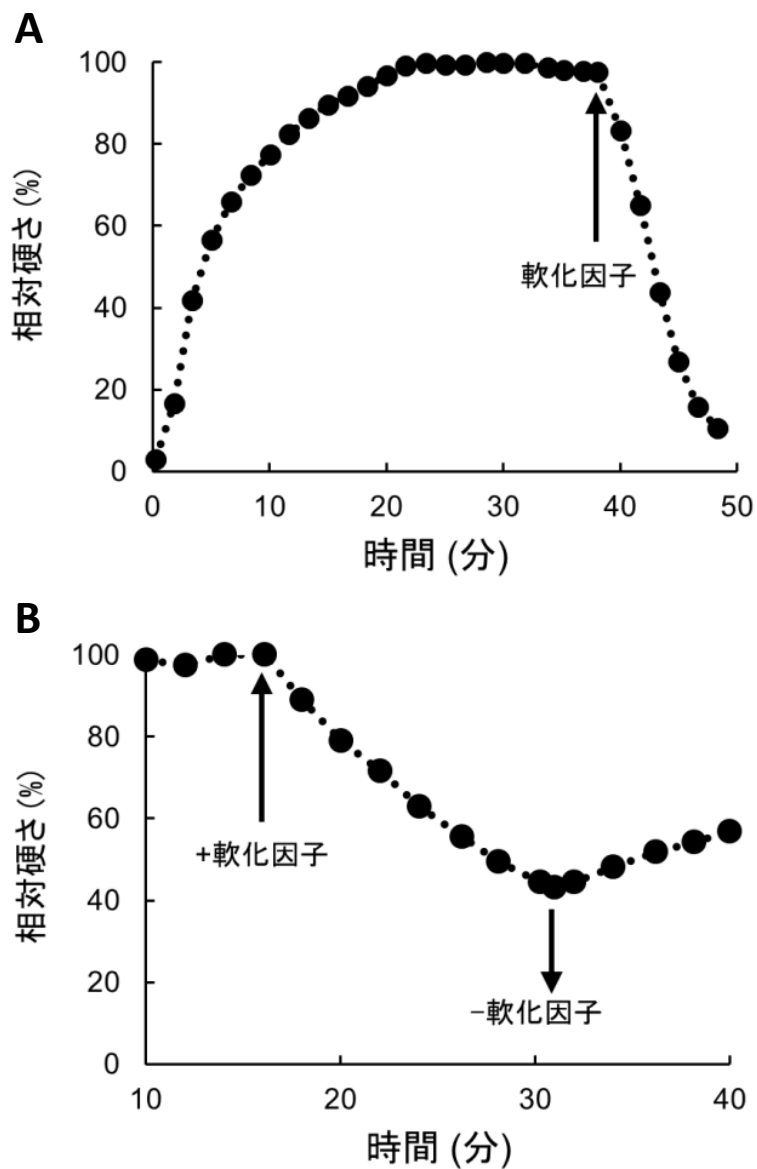


図16:シカクナマコのトリトンモデルに対する軟化因子の効果
(A): 軟化因子を与えると(上矢印)、急激な軟化が起こった。
(B): 軟化因子を与え(上矢印)、その後軟化因子を洗い流すと(下矢印)、硬さがわずかに回復した。

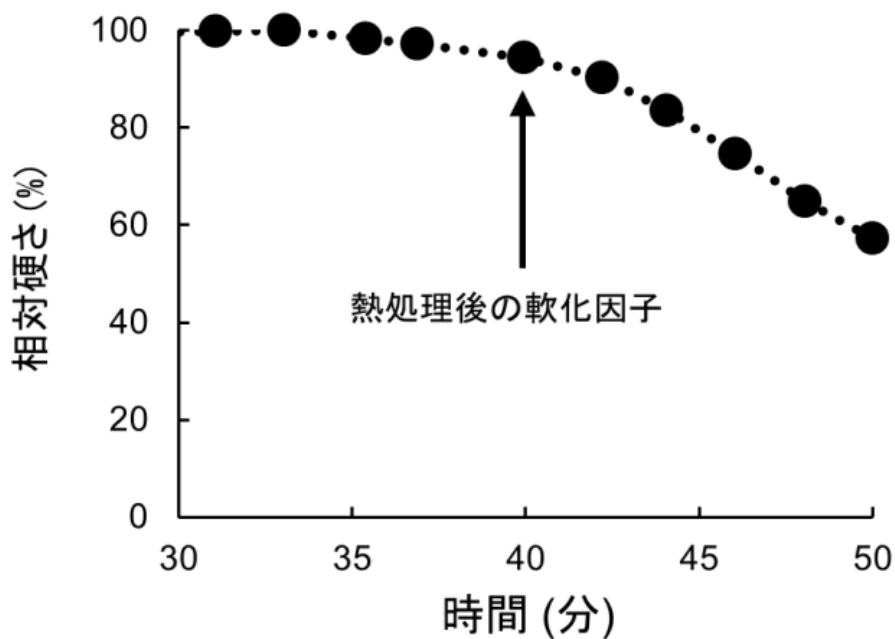


図17: 軟化因子は熱処理しても活性を失わない
シカクナマコのトリトンモデルに対して80°Cで20分熱処理した軟化因子を与えると(上矢印)、軟化が起こった。

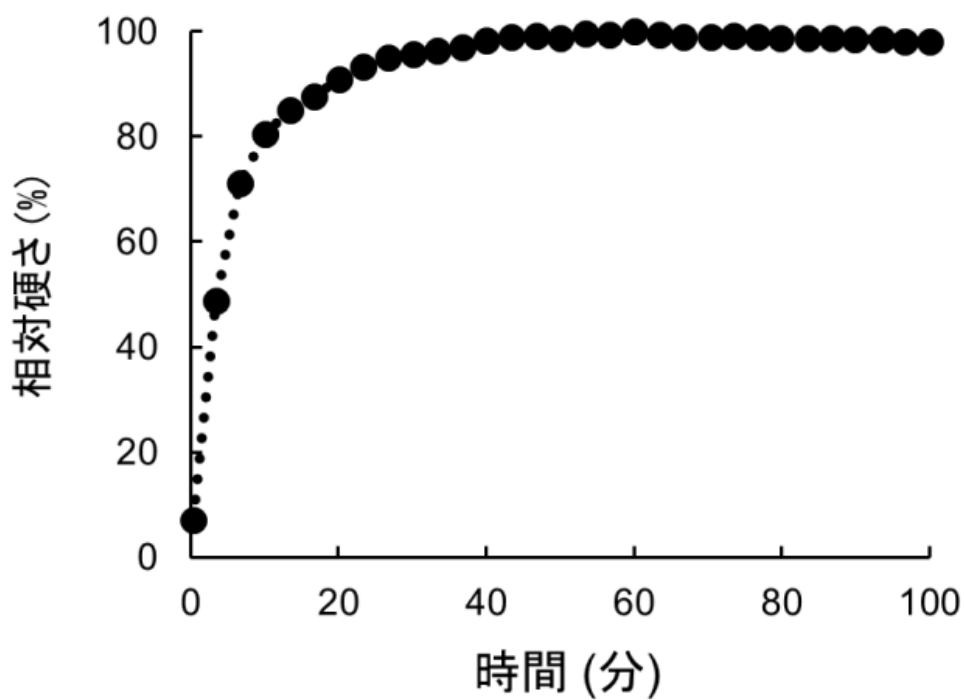


図18:ニセクロナマコのトリトンモデルの力学試験における挙動
振動開始から顕著に硬さの値が増加していき、ピークに達した後は
ほぼ一定の硬さを保った。

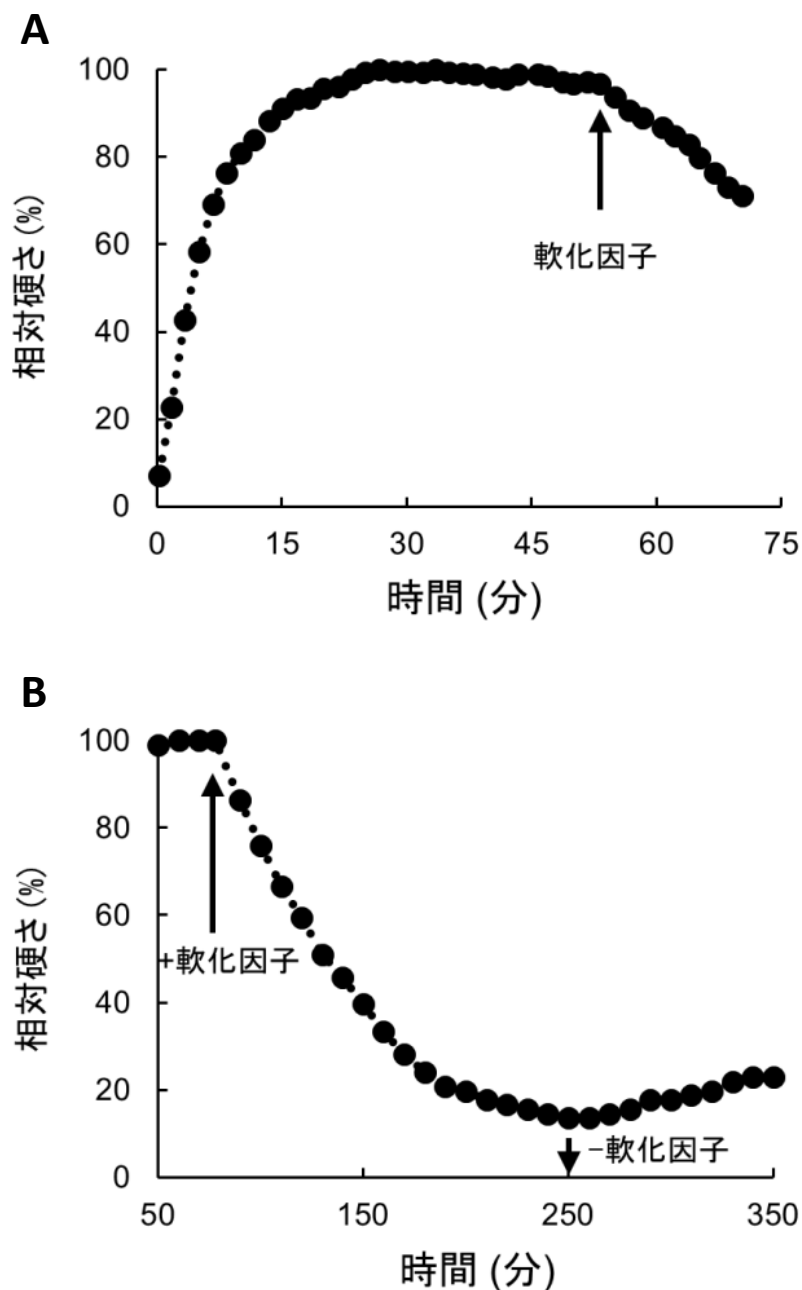


図19:ニセクロナマコのトリトンモデルに対する軟化因子の効果
 (A): 軟化因子を与えると(上矢印)、軟化が起こった。
 (B): 軟化因子を与え(上矢印)、その後軟化因子を洗い流すと(下矢印)、硬さがわずかに回復したが、シカクナマコに比べて回復までに時間がかかった。

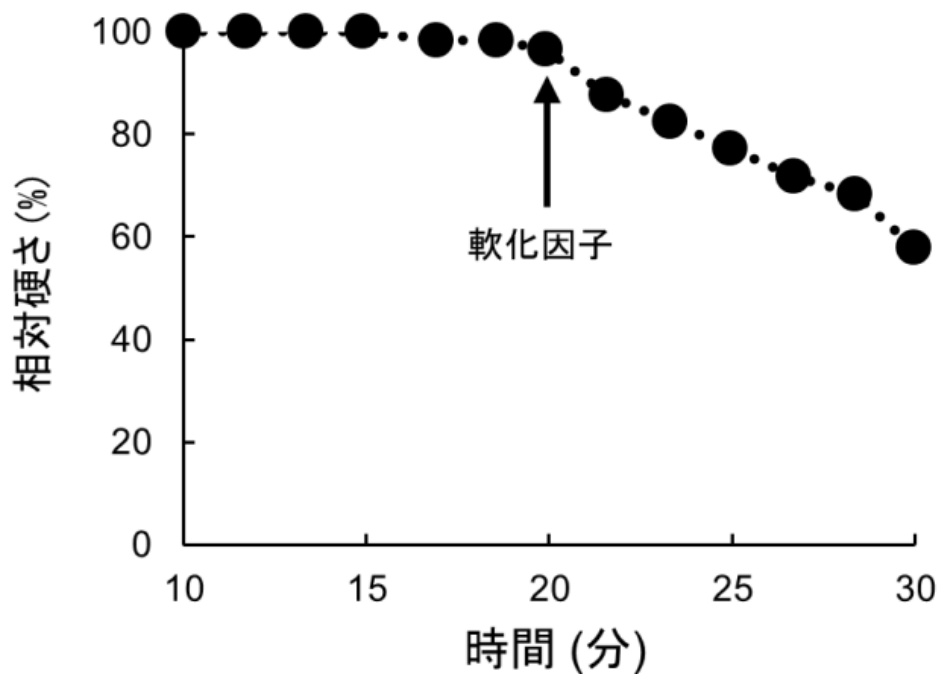


図20: ニセクロナマコの生きた真皮に対する軟化因子の効果
ニセクロナマコの生きた真皮に対して軟化因子を与えると(上矢印)、軟化が起こった。

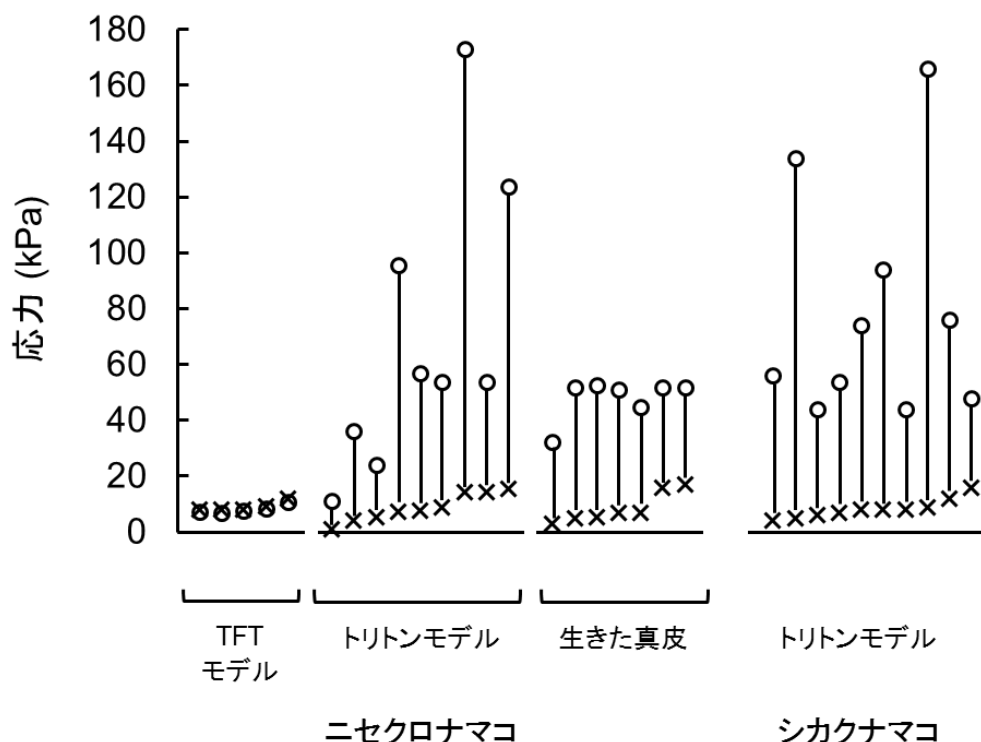


図21: 力学試験時の振動に対する応答

本研究に用いた種々の真皮試料が、力学試験時の振動に対し、どのような硬さの変化応答を示すかをまとめた。縦軸は硬さの指標とした応力を絶対値で表しており、×印は力学試験開始直後の、○印は試験開始15分後の各真皮の硬さを表している。15分後には、TFTモデル以外は全試行で硬さが増加したのに対し、TFTモデルは全試行で硬さが減少した。

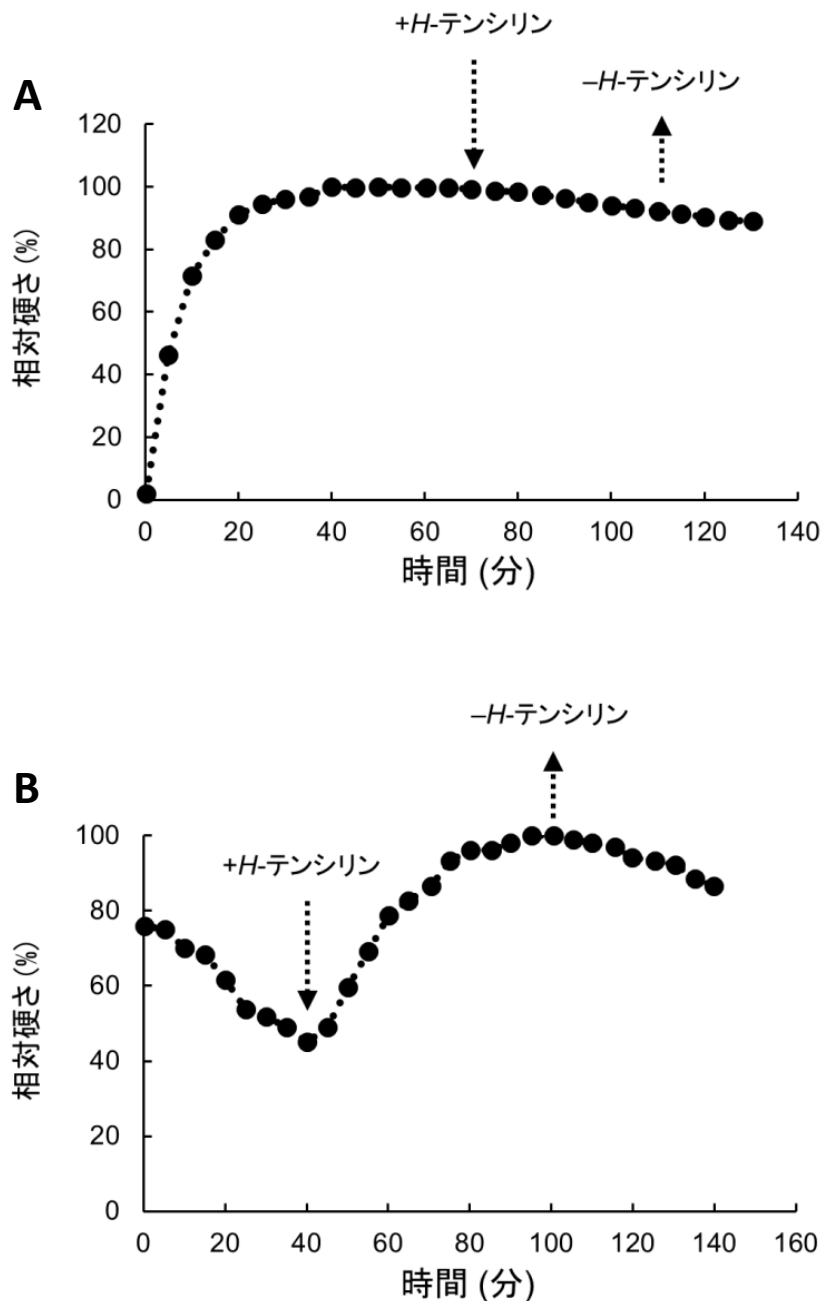


図22: ニセクロナマコモデルに対するH-テンシリンの効果
 (A): トリトンモデルに対してH-テンシリンを与えても(下矢印)硬化は起こらず、洗い流しても(上矢印)硬さに変化は見られなかった。
 (B): TFTモデルに対してH-テンシリン与えると(下矢印)顕著な硬化が起こった。この図と図23では、縦軸はテンシリンを与えた後のピークの硬さを基準にしている。

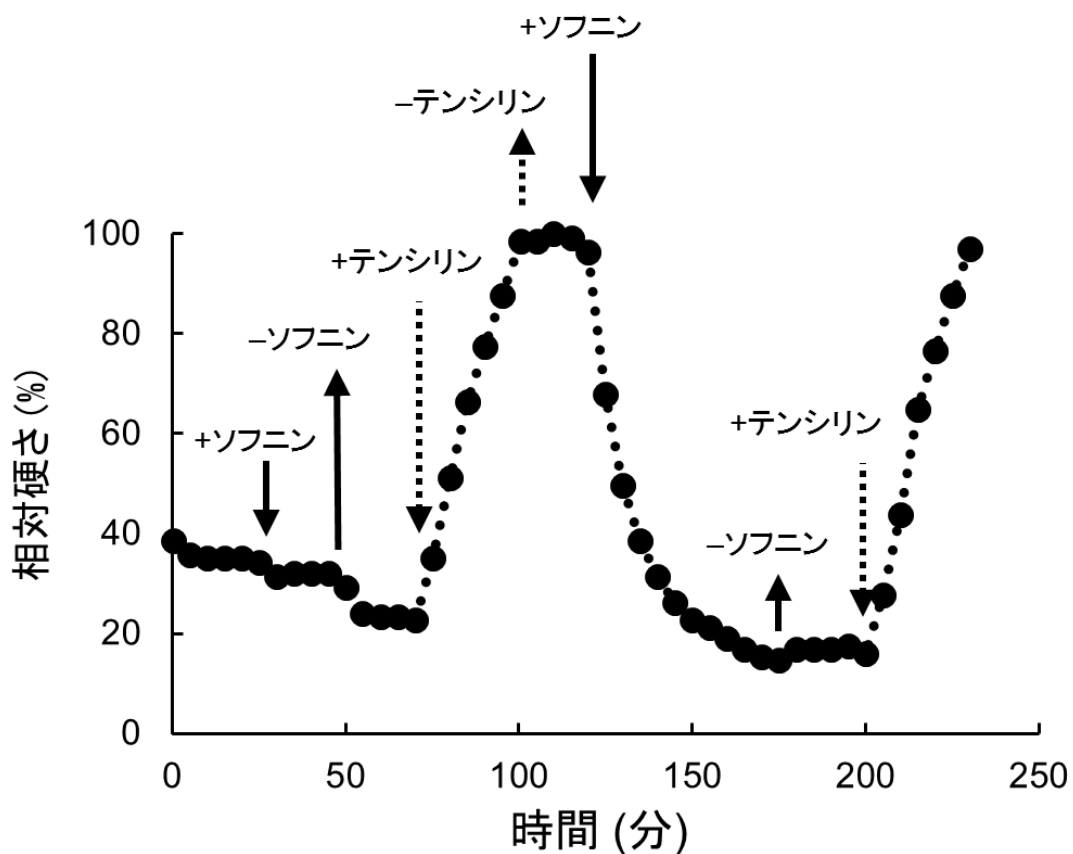


図23:ニセクロナマコのTFTモデルを用いた軟化因子とH-テンシリンの組み合わせ実験

実線の矢印はソフニン、破線の矢印はテンシリンに関する操作を表している。下矢印は与えた時、上矢印は洗い流した時を表している。最初にソフニンを与えても軟化は起こらないが、テンシリンで硬化させた後にもう一度ソフニンを与えると、硬化前とほぼ同程度まで軟化した。その後テンシリンを与えると再び硬化が起こった。

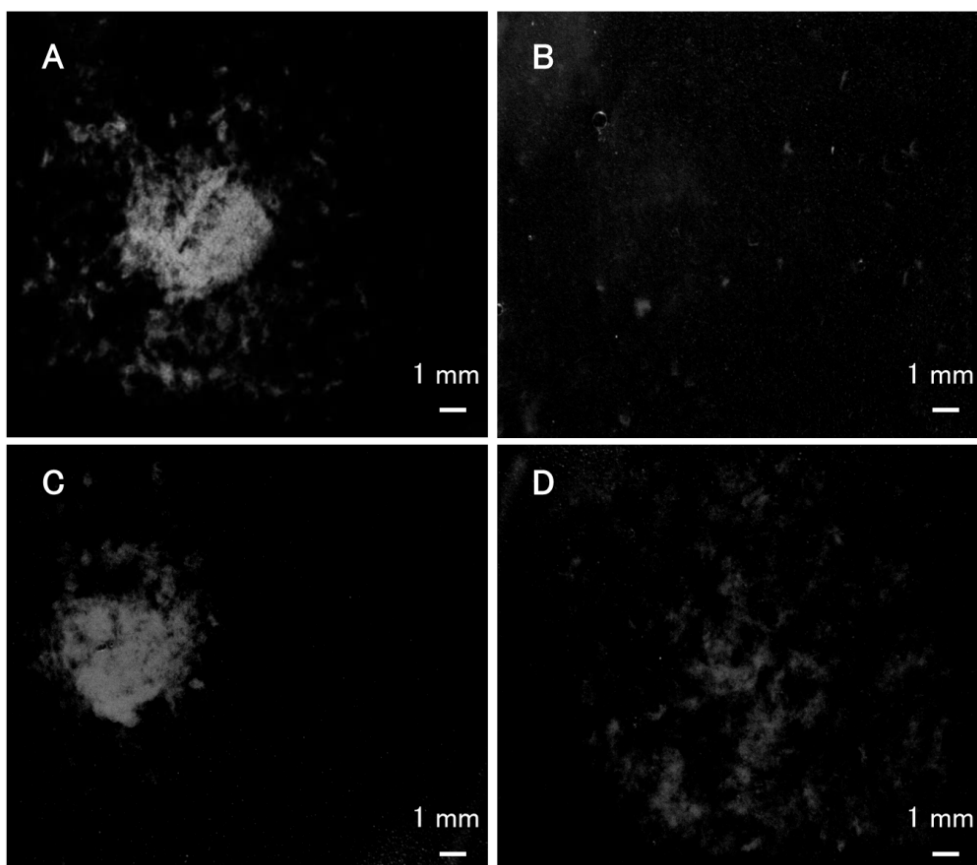


図24: 単離コラーゲン繊維懸濁液を用いた凝集検定

(A, B): 凝集塊に対する軟化因子の効果。懸濁液にテンシリンを与えると単一の大きくて密な凝集塊が得られたが(A)、ソフニンを与えることで沢山の小さくて密度の低い凝集塊へと分散した(B)。

(C, D): 凝集塊に対する凍結融解処理の効果。テンシリンにより作られた凝集塊は、4°Cで24時間静置しても保持されるが(C)、凍結融解処理を3回繰り返すと軟化因子を与えた時と同様、小さい凝集塊へと分散した(D)。

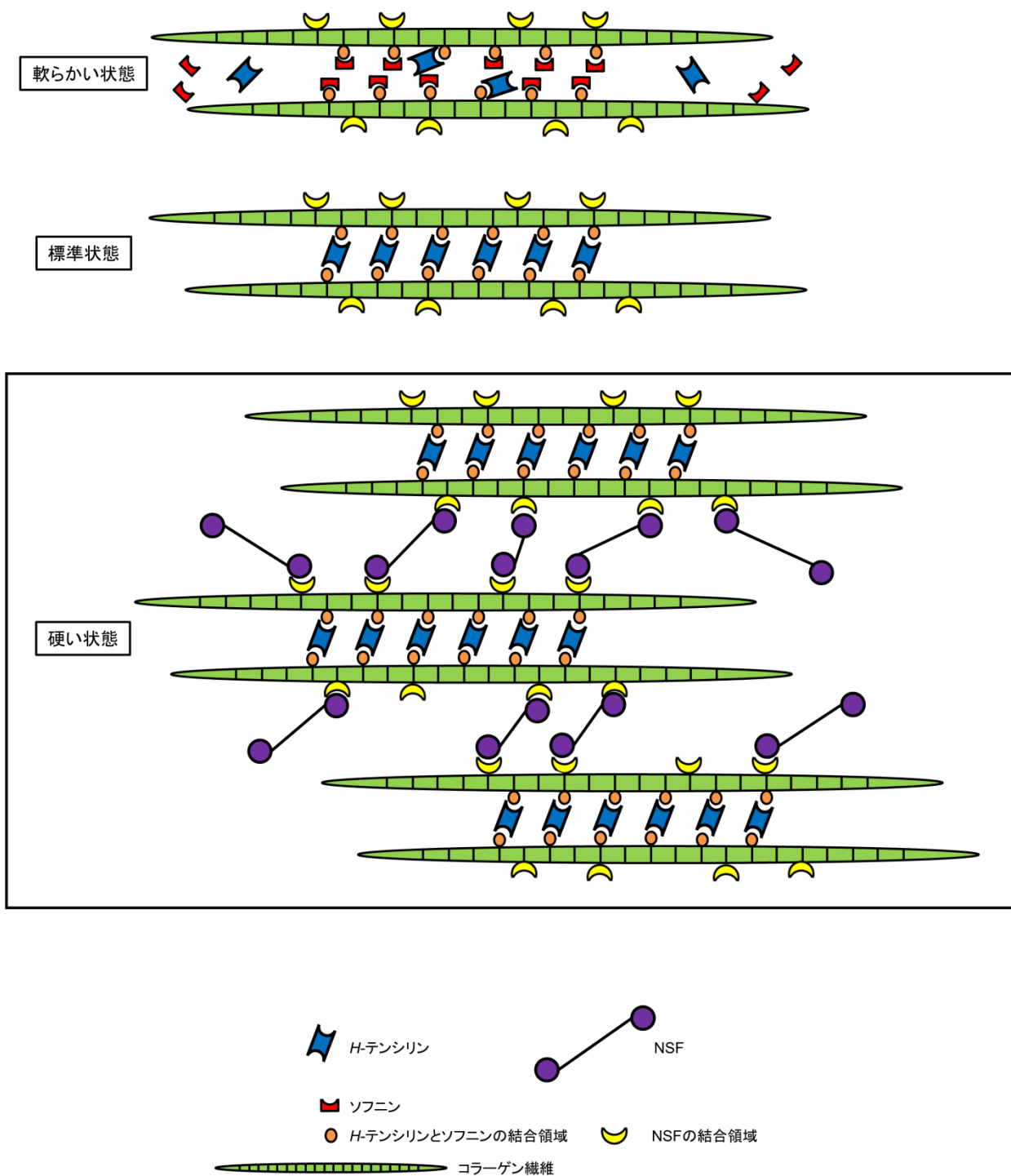


図25: ソフニンの作用機構の想像図

(上): 軟らかい状態。ソフニンの競合作用により結合領域が奪われてH-テンシリンが外れてしまい、繊維同士の架橋が解除される。

(中): 標準状態。H-テンシリンが結合領域に結合することでコラーゲン繊維同士が架橋されて太い繊維になる。

(下): 硬い状態。H-テンシリンによって束ねられたコラーゲン繊維同士が、NSFによる架橋で更に太い繊維となる。