Structure and Biology of Type VIII Collagen

VIII型コラーゲンの構造と生物学

M. Luisa Iruela-Arispe, Lawrence E. Chun, and E. Helene Sage

Department of Biological Structure, University of Washington, Seattle, WA 98195, USA, FAX: 1-206-543-1524

Key Words: *cardiogenesis, collagens, Descemet's membrane, endothelial cells, extracellular matrix*

Abstract

Type VIII collagen was initially characterized as a bio-synthetic product of bovine aortic endothelial cells *in vitro* and thus named Endothelial Collagen (EC). The protein has now been identified in avian and mammalian species as a product secreted by cultured corneal endothelial cells, keratinocytes, fibroblasts, astrocytoma and other tumor cells, and endothelial cells derived from several classes of blood vessels. *In vivo*, the distribution of type VIII collagen is restricted to specialized extracellular matrices such as meninges, periosteum, perichondrium, and Descemet's membrane of the cornea. It is also present in the subendothelium of large and small blood vessels and has been localized in capillary-like structures formed by sprouting cultures of endothelial cells. Data from protein and nucleotide sequencing have identified two distinct chains, termed $\alpha 1(\text{VIII})$ and $\alpha 2(\text{VIII})$; however, the assembly of these chains in the extracellular space is still poorly understood. Protein extracts from Descemet's membrane indicate that, in this tissue, type VIII collagen is a heterotrimer. Our understanding of the biological role of type VIII collagen is rather limited. Although type VIII collagen seems to perform a structural role in the Descemet's membrane, its temporally and spatially restricted expression during development suggests an involvement in tissue remodeling and differentiation.

要旨

VIII型コラーゲンは、ウシ大動脈内皮細胞の培養系における生合成産物として最初に報告されたので、従来は内皮細胞コラーゲン(EC)と呼ばれていた。このタンパク質は現在、トリおよび哺乳類のケラチノサイト、線維芽細胞、星状細胞腫や他の腫瘍細胞、さらに様々な大きさの血管に由来する内皮細胞などによって分泌されることが知られている。生体内ではVIII型コラーゲンの分布は限られており、例えば髄膜、骨膜、軟骨膜、角膜のデスメ膜などの細胞外マトリックスに存在する。また大小血管の内皮下層や内皮細胞の発芽培養系で形成される毛細血管様構造にも存在する。タンパク質のアミノ酸配列と核酸塩基配列から、VIII型コラーゲンは $\alpha 1(\text{VIII})$ および $\alpha 2(\text{VIII})$ と名づけられた2本の異なる α 鎖から構成されていることが明らかにされたが、細胞外場所ではこれらの α 鎖がどのような会合体を作っているのかまだよくわかっていない。しかしデスメ膜からタンパク質を抽出したところ、VIII型コラーゲンはこの組織においてヘテロ3本鎖構造をとっていることが示された。一方VIII型コラーゲンの生物学的機能に関する我々の知識はまだ不足している。VIII型コラーゲンはデスメ膜の特殊な六角格子構造の形成に関与していると考えられているが、発生分化の過程では本コラーゲンの発現は一定の期間、特定の場所に限定されており、このことから組織再構築や分化にも関与していると思われる。

A. Introduction

Collagens are members of a large family of proteins that share at least three common characteristics: i) an extended sequence or sequences containing the repeating tripeptide Gly-X-Y, which allows collagen α chains to form triple-helical molecules; ii) organization of homotypic or heterotypic supramolecular aggregates, and iii) an extracellular location(1). For many years, collagens were believed to play primarily, if not exclusively, a structural role. However, it has been recently appreciated that collagens can also influence basic cellular properties that include cell shape, proliferation, and differentiation. Although the molecular mechanisms by which these macromolecules initiate cellular responses are not understood, there is evidence that signal transduction through cell surface receptors such as integrins might be involved (reviewed in ref. 2).

Over the last decade, considerable progress has been

A. はじめに

コラーゲンは多数のメンバーからなるタンパク質の一大ファミリーを形成しており、少なくとも3つの共通する特徴を持っている。i) Gly-X-Yというトリペプチドの繰り返し構造から成る一連の長いアミノ酸配列、または繰り返し構造が分断された配列を持ち、この繰り返し構造によりコラーゲンの α 鎖は3本鎖ヘリックス構造を形成することができる、ii) 単一ないしは複数のタイプから構成される超分子集合体を形成する、iii) 細胞外に存在する—という特徴である(1)。長い間コラーゲンは、主として組織の構造を支える役割を果たしていると信じられてきた。しかし近年、コラーゲンは基本的な細胞の性質、すなわち細胞の形態、増殖、分化に影響を及ぼすことが認識されるようになってきた。これら高分子物質が細胞側の応答を開始させる分子機構については明らかではないが、インテグリンのような細胞表面の受容体を介する情報伝達機構が関与していることが証明されている(文献2に概説)。

made in understanding how collagen gene expression is regulated (for a review, see ref. 3). In addition, the molecular cloning and sequencing of the collagen genes has provided new information on the structure of this large family of proteins. Consequently, the collagen family has been categorized into five basic groups: i) fibrillar collagens (types I, II, III, V, and XI); ii) collagens that do not form typical banded fibrils (types VI, VII, and XIII); iii) fibril-associated collagens with interrupted triple-helices, or FACIT collagens (types IX, XII, and XIV); iv) basement membrane collagens (type IV), and v) short-chain collagens (type X)(4). Our present knowledge of the structure of the type VIII collagen gene identifies it as a short-chain collagen that appears to be closely related to type X.

In this review we provide an overview of the research that has been conducted on type VIII collagen genes and proteins and discuss some of the basic observations that have been made regarding its biological function.

B. Structure of Type VIII Collagen

The primary structure of type VIII collagen has recently been elucidated by the cloning and sequence analysis of two new collagen genes, designated COL8A1 and COL8A2. The identity of these genes with collagenous peptides isolated from Descemet's membrane has led to their description as the $\alpha 1$ and $\alpha 2$ chains of type VIII collagen, respectively. At present, sequence data have been reported for the rabbit $\alpha 1$ (VIII) gene(5), human $\alpha 1$ (VIII) gene(6), and the mouse and human $\alpha 2$ (VIII) genes(7). The molecular data corroborate earlier protein stud-

ここ10年余りの間に、どのようにコラーゲン遺伝子の発現が調節されているかを理解する上で、めざましい進展があった(文献3に概説)。さらに、コラーゲン遺伝子の分子クローニングや塩基配列の決定により、この一大ファミリーのタンパク質の構造に関して新しい情報が得られた。その結果、コラーゲンファミリーは5つの基本的グループに分類されている。すなわち、i)線維形成型コラーゲン^{*1}(I、II、III、V、XI型)、ii)典型的な縞模様を示す線維を形成しないコラーゲン(VI、VII、XIII型)、iii)中断した三本鎖ヘリックス構造を持ち、線維型に会合しているコラーゲン、これはFACIT^{*2}コラーゲンとも呼ばれる(IX、XII、XIV型)、iv)基底膜コラーゲン(IV型)、v)短鎖コラーゲン(X型)、である(4)。VIII型コラーゲン遺伝子の構造に関する情報によれば、本コラーゲンは短鎖コラーゲンであり、X型と非常に近縁な関係にあると考えられている。この総説では、VIII型コラーゲンの遺伝子及びタンパクに関する研究成果を概説し、生物学的機能に関する基本的な知見について解説する。

B. VIII型コラーゲンの構造

近年、VIII型コラーゲンの一次構造が、COL8A1、COL8A2と称される2つの新しいコラーゲン遺伝子のクローニングと塩基配列決定により明らかにされた。デスメ膜から単離されたコラーゲンのペプチドと、これらの遺伝子から推定されるアミノ酸配列が一致したことから、それぞれVIII型コラーゲンの $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 鎖と記述された。現在ウサギ $\alpha 1$ (VIII)遺伝子(5)、ヒト

^{*1} これらのコラーゲンが形成する線維は、電子顕微鏡下でコラーゲンに特有な一定周期の横縞を示す

^{*2} Fibril Associated Collagen with Interrupted Triple helices

Fig. 1. Purification of $\alpha 1$ (VIII) (50K-B) and $\alpha 2$ (VIII) (50K-A) from extracts of Descemet's membrane by high performance liquid chromatography (HPLC). Type VIII collagen, isolated from bovine Descemet's membrane by pepsin digestion and differential salt fractionation (lane 1), was resolved into two polypeptide chains by reverse-phase HPLC. 200 μ g of protein was solubilized in 1% trifluoroacetic acid and chromatographed on a Vydac C18 column with a linear gradient of 15-40% acetonitrile : water (60 : 40 v/v) in 0.1% trifluoroacetic acid over 60 min.

Insert: Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis of 50K-A (lane 2) and 50K-B (lane 3) purified by HPLC.

Fig. 2. Diagram of the COL8A1 gene and the $\alpha 1(\text{VIII})$ and $\alpha 2(\text{VIII})$ polypeptide chains of type VIII collagen.

A. Schematic representation of the COL8A1 gene and its translation product, the $\alpha 1(\text{VIII})$ chain. In COL8A1, exons are represented in boxes and are numbered from the 5' end of the gene. Exons 1, 2, and three nucleotides of exon 3 contribute to the 5' untranslated region of $\alpha 1(\text{VIII})$ mRNA. The rest of exon 3 encodes the majority of the amino-terminus (NC2). Exon 4 encodes a small part of the NC2 domain (7/23 codons), the entire triple-helical domain (COL1), the carboxy-terminus (NC1), and the 3' untranslated region. The numbers of amino acids in NC2, COL1, and NC1 are indicated in parentheses.

B. Diagram of the $\alpha 2(\text{VIII})$ chain. The exact number of nucleotides of the NC2 domain is not known. The triple-helical domain (COL1) contains 457 amino acids and the carboxy-terminus (NC1) contains 167 amino acids. Cysteines are indicated (●).

ies that predicted the existence of two structurally distinct type VIII collagen polypeptides (50K-A and 50K-B) in bovine corneal Descemet's membrane (8). Additional type VIII collagen peptides isolated from rabbit Descemet's membrane (9,10) match the predicted DNA sequences and indicate that the structure of type VIII collagen is conserved among several mammalian species. Fig.1 identifies 50K-A and 50K-B after extraction from bovine Descemet's membrane and further purification by high performance liquid chromatography.

From an analysis of the nucleotide sequence, type VIII collagen contains a central triple-helical (COL1) domain of 454 amino acids [rabbit $\alpha 1(\text{VIII})$] or 457 amino acids [human $\alpha 2(\text{VIII})$], that is flanked by short non-collagenous extensions. The molecular weight of an intact chain is estimated to be 60,000. Fig.2 shows the basic structure of the $\alpha 1$ and $\alpha 2$ chains of type VIII collagen. The triple-helical domain, composed of Gly-X-Y repeats, is characterized by the presence of eight imperfections located at the same relative position within each α chain. This pattern of helix interruption distinguishes type VIII collagen from the other short collagenous sequences found in types IV, VI, IX, and XII collagens (11). Curiously, type X collagen also contains a similar pattern of helix imperfections (9). Furthermore, the sequence identity between the rabbit $\alpha 1(\text{VIII})$ and the chicken $\alpha 1(\text{X})$ chains in the collagenous (COL1) domain is 57% at the nucleotide level; even greater sequence conservation is seen in the carboxy-terminal portion of the non-collagenous domain NC1 (9). Moreover, the primary structures of the $\alpha 1(\text{VIII})$, $\alpha 2(\text{VIII})$, and $\alpha 1(\text{X})$ chains are

$\alpha 1(\text{VIII})$ 遺伝子(6)、マウスおよびヒト $\alpha 2(\text{VIII})$ 遺伝子(7)の塩基配列データが報告されている。これらの分子データは、ウシ角膜デスメ膜に二種の構造的に異なるVIII型コラーゲンペプチド(50K-Aおよび50K-B)が存在することを予想したタンパク質側の研究結果を裏付けるものである(8)。さらに新たなVIII型コラーゲンペプチドがウサギデスメ膜から単離され(9,10)、DNAの塩基配列から予想されるアミノ酸配列と一致したことより、VIII型コラーゲンの構造は数種の哺乳類間で保存されていることが指摘された。図1はウシデスメ膜よりタンパクを抽出後、高速液体クロマトグラフィーにより精製した50K-Aと50K-B断片を示している。

核酸塩基配列を分析した結果、VIII型コラーゲンはウサギ $\alpha 1(\text{VIII})$ では454アミノ酸残基、ヒト $\alpha 2(\text{VIII})$ では457アミノ酸残基からなる中央の三本鎖ヘリックス領域(COL1)を含んでおり、その両端から短い非コラーゲン領域が伸びている構造をしていることがわかった。完全な α 鎖の分子量は約6万と推定されている。図2には、VIII型コラーゲンの $\alpha 1$ および $\alpha 2$ 鎖の基本的な構造を示した。Gly-X-Yの繰り返し構造から構成される三本鎖ヘリックス領域にはトリプレットが不完全な部分が8ヶ所存在し、各 α 鎖においてその相対的な位置は一致している。このヘリックス構造中断のパターンはVIII型コラーゲンと他の短いコラーゲン配列を持つIV、VI、IXおよびXII型コラーゲンとは全く異なっている(11)。しかし奇妙なことにX型コラーゲンはVIII型コラーゲンと同様なヘリックス構造中断のパターンを示す(9)。さらに、ウサギ $\alpha 1(\text{VIII})$ とトリ $\alpha 1(\text{X})$ 鎖のコラーゲン領域(COL1)における核酸レベルの配列相同性は57%であり、カルボキシ末端側の非コラーゲン領域NC1では、さらに両鎖間で配列が保存

highly similar. These features have led Yamaguchi and co-workers(5, 9) to propose a common evolutionary origin for the three chains.

Diversity of structure is more apparent in the NC2 domain of these collagens. This region in the $\alpha 1(\text{VIII})$ chain, which shows little sequence homology with a comparable region of $\alpha 1(\text{X})$, is composed mainly of basic amino acids, with an estimated pI of 10.6 for both the rabbit and human $\alpha 1(\text{VIII})$ chains(6, 9). Differences in the NC2 domain may thus direct the tissue-specific organization of type X collagen in hypertrophic cartilage, and that of type VIII collagen in Descemet's membrane. In both collagens, the conserved regions of the COL1 and NC1 domains might participate in intramolecular interactions such as triple-helix formation and multimeric assembly, whereas interactions between the NC2 domain and polyanionic molecules such as proteoglycans or glycosaminoglycans might participate in the organization of specific extracellular matrices.

Another unique feature of the type VIII collagen helix is the unusually high content of hydroxyproline (Hyp) residues. For example, $\alpha 2(\text{VIII})$ contains 167 residues of Hyp per 1,000 amino acids(10). In comparison, type I collagen typically contains 85 Hyp per 1,000 amino acids(12). This characteristic could account for the melting temperature(T_m) of type VIII collagen(41°C), which is higher than those of the fibrillar collagens($T_m = 35-37^\circ\text{C}$)(13). It is interesting that type X collagen also has a high content of Hyp and a high thermal stability ($T_m = 47^\circ\text{C}$)(14).

Relatively little is known about the organization of type VIII collagen within extracellular matrices. Several structural models have been proposed that were based on the characterization of type VIII collagen purified as a soluble protein from cell culture media or isolated from the insoluble components of Descemet's membrane. These models include a cassette model(8), the interrupted helix model(15), and a "conventional" model(16) with the chain composition $[\alpha 1(\text{VIII})]_2\alpha 2(\text{VIII})$ (10). Recent evidence from studies of gene structure supports the conventional model that was based on a homotrimeric or heterotrimeric arrangement of Mr 60,000 chains in a typical collagen triple helix. Higher molecular weight forms of type VIII collagen[e.g., EC1, 2, and 3 (reviewed in 17); 300K, 200K, and 100K(18), and Mr 185,000 disulfide-bonded complexes(19)], cannot presently be reconciled with the conventional model. The identity of these high molecular weight forms and their structural relationship to 50K-A and 50K-B remain to be clarified.

Another enigma surrounding the type VIII collagen protein is the question of its trimeric structure. The identification of two distinct collagen genes is suggestive of several distinct isoforms that include homotrimers of $\alpha 1(\text{VIII})$, homotrimers of $\alpha 2(\text{VIII})$, and/or heterotrimers of $\alpha 1(\text{VIII})$ and $\alpha 2(\text{VIII})$.

されている(9)。 $\alpha 1(\text{VIII})$ 、 $\alpha 2(\text{VIII})$ 、 $\alpha 1(\text{X})$ 鎖の一次構造は非常によく似ており、これらの特徴からYamaguchiと共同研究者(5, 9)はこれら3本の α 鎖は共通の祖先から進化したのではないかと考えている。

ところが、これらのコラーゲンのNC2領域には明らかな構造の多様性が認められる。 $\alpha 1(\text{VIII})$ 鎖のNC2領域は、 $\alpha 1(\text{X})$ との類似性がなく、ウサギおよびヒト $\alpha 1(\text{VIII})$ 鎖両鎖とも塩基性アミノ酸で構成され、等電点は10.6と算定されている(6, 9)。NC2領域における両鎖の違いは、X型コラーゲンが肥大軟骨の、またVIII型コラーゲンがデスメ膜のそれぞれ組織特異的な構造を形成するのに関係しているのかもしれない。両コラーゲンで保存されている領域、COL1とNC1領域は、三本鎖ヘリックス構造の形成や、集合体の構築などの分子間相互作用に関与し、一方、NC2領域はプロテオグリカンやグリコサミノグリカンなどの多価陰イオン性分子と相互作用して、組織特異的な細胞外マトリックスの構築に関与しているのであろう。

VIII型コラーゲンのもう一つの特徴は、ハイドロキシプロリン(Hyp)含量が著しく高いことである。たとえば $\alpha 2(\text{VIII})$ においては、1,000残基のアミノ酸中、Hypが167残基を占める(10)。これに対して、I型コラーゲンにおけるHyp含量は、1,000残基のアミノ酸中、85残基である(12)。この特異的な性質がI型などの線維型コラーゲンの変性温度($T_m = 35-37^\circ\text{C}$)よりVIII型コラーゲンの変性温度($T_m = 41^\circ\text{C}$)が高い原因であろう(13)。X型コラーゲンもまたHyp含量が高く、高い変性温度($T_m = 47^\circ\text{C}$)を示すのも興味深い(14)。

VIII型コラーゲンの細胞外マトリックスにおける形態については、まだよく分かっていない。何種類かの構造モデルが提案されているが、それらはすべて細胞培養液から得られる、可溶性タンパク質として精製されたVIII型コラーゲンかデスメ膜の不溶性成分から単離されたVIII型コラーゲンの性質に基づいている。これらのモデルは、カセットモデル(8)、中断したヘリックス構造モデル(15)、そして $[\alpha 1(\text{VIII})]_2\alpha 2(\text{VIII})$ の鎖構成から成る典型的なコラーゲンモデル(10)である。近年、遺伝子構造の研究から、上述のモデルのうち典型的なコラーゲンモデル、すなわち分子量60,000の同一種の α 鎖から形成されるホモ三本鎖または、異種の α 鎖から形成されるヘテロ三本鎖よりなる典型的なコラーゲン三本鎖ヘリックスのモデルが正しいことが証明された。

高分子量のVIII型コラーゲン[例えばEC1, 2, 3(文献17に概説);分子量300K、200K、100K(18)、さらに分子量185,000のジスルフィド結合した複合体(19)]は、現在のところ典型的なコラーゲンモデルとは一致しない。これら高分子量の形態が存在すること、それらの構造が50K-Aや50K-Bとどのような関係にあるのかは不明である。

VIII型コラーゲンタンパクに関するもう一つの謎は、その三本鎖構成が明らかでないことである。二種のコラーゲン遺伝子が同定されたことから、数種のイソ型、すなわち $\alpha 1(\text{VIII})$ のホモ三本鎖ないしは $\alpha 1(\text{VIII})$ と $\alpha 2(\text{VIII})$ から成るヘテロ三本鎖が存在する可能性がある。これらの組み合わせは、二本の $\alpha(\text{VIII})$

These combinations are based on the existence of only two α (VIII) polypeptide chains. It is conceivable that type VIII collagen might be similar in one respect to type IV collagen, for which five chains and several molecular permutations have been described in different tissues (for a review, see ref. 4). Alternatively, a type VIII collagen heterotrimer might be composed of α chains of different molecular sizes(19), a configuration that characterizes the structure of type VI collagen(4). The collagen family continues to provide us with a wide variety of examples in which changes in secondary structure can result in rather diversified functions.

C. Type VIII Collagen Genes

The isolation of an α 1(VIII) collagen cDNA from rabbit corneal endothelial cells by Yamaguchi et al.(9) has led to the cloning and sequencing of the rabbit COL8A1 gene(5), human COL8A1 gene(6), and human and mouse COL8A2 genes(7). The rabbit COL8A1 gene contains four exons of irregular size. The first two exons(69 and 120 bp, respectively) code for the 5' untranslated region; exon 3(331 bp) and exon 4(2,278 bp) encode the translated portion. The inclusion of the entire triple-helical domain within a single exon (exon 4) contributes to the unusual structure of this gene(Fig. 2A). With the exception of type X collagen and collagens of some invertebrate species, all known collagenous domains are encoded by multiple exons (11). **Partial characterization of human COL8A1 and human**

Fig. 3. Detection of α 1(VIII) collagen mRNA in rabbit tissues. Total RNA was purified from neonatal rabbit cornea(lane 1) and neonatal rabbit retina, choroid, and sclera(lane 2). 10 μ g of total RNA from these preparations was denatured and resolved on a 1.2% agarose gel. After electrophoresis, the RNA was transferred onto nitrocellulose and the resulting Northern blot was hybridized with an α 1(VIII) collagen cDNA(2.2kb)(a gift from Dr. Y. Ninomiya, Okayama University, Okayama, Japan). The open arrows indicate two type VIII collagen mRNAs of 2.5kb and 3.8kb. Positions of migration of the 28S and 18S ribosomal subunits are shown.

From scanning densitometry and subsequent normalization (to 28S rRNA) for equal amounts of blotted RNA, mRNA in lane 2 was increased 2.8-fold over that seen in lane 1. Immunocytochemical studies have indicated that these differences might reflect the large number of vessels identified in the choroid that express high levels of type VIII collagen at birth.

ポリペプチド鎖しか存在しないことに基づいている。IV型コラーゲンには、五種の α 鎖が存在し、種々の組織での分子型、すなわち異なる α 鎖の組み合わせから成る分子が報告されている(文献4を参照)。VIII型コラーゲンもこの点でIV型コラーゲンと似ている可能性がある。さらに、VIII型コラーゲンのヘテロ三本鎖は、分子量の異なる α 鎖で構成されている可能性もあり(19)、このような形態はVI型コラーゲンの特徴である(4)。コラーゲンファミリーは、二次構造の多様性によって多彩な機能が生みだされるという様々な例を我々に示してくれる。

C. VIII型コラーゲン遺伝子

α 1(VIII)コラーゲンcDNAはYamaguchiら(9)によってウサギ角膜内皮細胞から単離され、それによりウサギCOL8A1遺伝子(5)、ヒトCOL8A1遺伝子(6)、更にヒトおよびマウスCOL8A2遺伝子(7)が次々とクローニングされ、塩基配列が決められた。ウサギCOL8A1遺伝子は大きさの異なる4つのエクソンを含んでいる。最初の2つのエクソン(69および120塩基対)は5'側非翻訳領域をコードしており、3番目のエクソン(331塩基対)と4番目のエクソン(2278塩基対)が翻訳領域をコードしている。三本鎖ヘリックス領域全体が1つのエクソン(第4エクソン)に含まれていることは、コラーゲンとしては異例な遺伝子構造を持つことを示している(図2A)。X型コラーゲンやある種の無脊椎動物のコラーゲンを除いて、既知のすべてのコラーゲン領域は多数のエクソンに分断されてコードされている(11)。ヒトCOL8A1、ヒトおよびマウスCOL8A2遺伝子の特徴を検討した結果、このユニークな遺伝子構造は数種の哺乳類に共通して認められた。in situハイブリダイゼーション法により、ヒトCOL8A2遺伝子は第1染色体に(7)、ヒトCOL8A1遺伝子は第3染色体に(6)存在することがわかった。

現時点ではプロモーター配列、ならびにエンハンサー、リプレッサーモチーフに関する研究報告はなされていない。ウサギ角膜内皮細胞に α 1(VIII)および α 2(VIII)mRNAの存在が確認され(7, 9)、各々のポリペプチドがウシデス膜の抽出物中に存在することから(8)、VIII型コラーゲンの両 α 鎖とも角膜に発現されていることが指摘された。ノーザン分析からウサギ α 1(VIII)遺伝子は2,500から3,800塩基対長の3種のmRNAに転写発現されているが、 α 2(VIII)コラーゲンmRNAは3,800塩基対長ただ一種類であるらしい(7, 9)。 α 1(VIII)mRNAの長さの相違は、ポリアデニル化の位置の違いが原因であると考えられている(5)。図3はVIII型コラーゲンmRNAがウサギ新生仔の角膜(レーン1)、強膜、脈絡膜、網膜(レーン2)に存在することを示している。

D. VIII型コラーゲンの分布と分子形態:組織形態形成における役割

成体の器官のうちで最もVIII型コラーゲン含量が高いのはデス膜である(20, 21)。デス膜は厚い基底膜様の構造を持ち、角膜の実質と内皮の中間に位置している。デス膜のVIII型コラーゲンは大部分4 M グアニジン塩酸に不溶性で(13)、ペプシンにより切断される結合を介してマトリックスと会合してい

and mouse COL8A2 indicates that the unique structure of these genes has been conserved in several mammalian species. In situ hybridization studies have shown that the human COL8A2 gene is located on chromosome 1(7), whereas the human COL8A1 gene is located on chromosome 3(6). At this point no studies have been published that identify promoter sequences and/or enhancer/repressor motifs.

Identification of $\alpha 1$ (VIII) and $\alpha 2$ (VIII) mRNA in rabbit corneal endothelial cells(7, 9) and the presence of each polypeptide in extracts of bovine Descemet's membrane(8) indicate that both chains of type VIII collagen are expressed in the cornea. Northern analysis has shown that the rabbit $\alpha 1$ (VIII) gene is expressed as 3 distinct mRNAs that range in size from 2,500 to 3,800 nucleotides, whereas $\alpha 2$ (VIII) collagen mRNA appears to be a single species of 3,800 nucleotides(7, 9). Variations in size of $\alpha 1$ (VIII) mRNA are believed to be due to differences in polyadenylation(5). Fig.3 illustrates the presence of type VIII collagen mRNA in the cornea(lane 1) and in the sclera, choroid, and retina(lane 2) of neonatal rabbits.

D. Distribution and Molecular Organization of Type VIII Collagen: A Role in Tissue Morphogenesis?

In adult organisms, the highest concentration of type VIII collagen can be found in Descemet's membrane(20, 21), a thick basement membrane-like structure situated between the stroma and the endothelium of the cornea. Type VIII collagen from Descemet's membrane is largely insoluble in 4M guanidinium hydrochloride(13) and remains associated with the matrix through pepsin-sensitive linkages. Matrix interactions involving desmosine crosslinks(22) or disulfide bridges(17) do not appear to be involved. Electron microscopy revealed that the Descemet's membrane is formed by an hexagonal lattice-like structure with basic units of 160 nm(23). Rotary shadowing images of type VIII collagen isolated from either cell culture(5) or pepsin digests of tissue(13) revealed a rod-like molecule of approximately 132 nm with knob-like extensions at each end, with an overall length of 160 nm(9). This structure was consistent with the cDNA sequence data(9) and immunoelectron microscopy studies(24). Together the data provide strong evidence that type VIII collagen is responsible for the hexagonal lattice structure observed in Descemet's membrane(24). Although it was less abundant, type VIII collagen has also been described in other areas of the eye such as Bruch's membrane, the cribiform plates of the optic nerve, the walls of Schlemm's canal, and the choroid stroma(25).

Type VIII collagen has also been identified in other specialized extracellular matrices that include perichondrium, periosteum, meninges, and sclera(26, 27). In addition, Kittelberger and co-workers(28) have described type VIII collagen in the connective tissue sheath that surrounds hair follicles. This sheath is rich in oxytalan fibers(microfibrils)(29), and

る。デスモシン架橋結合(22)やジスフィルド架橋(17)などによるマトリックス相互作用は、関与していないと思われる。デスメ膜を電子顕微鏡下で観察すると、1つの格子の単位が160 nmの六角形の格子構造が見られる(23)。細胞培養(5)ないしは組織をペプシン消化して(13)得られたVIII型コラーゲンのロータリーシャドウイング像から、約132 nmの棒状の部分とその両端にノブ様の部分を持つ全長160 nmの分子形態が明らかにされた(9)。この構造はcDNAの塩基配列から予想される構造(9)、さらに免疫電子顕微鏡による研究結果(24)と一致した。以上のデータにより、VIII型コラーゲンはデスメ膜で観察された六角形の格子構造を構成していることが確認された(24)。しかし小量ながらVIII型コラーゲンは眼の他の場所、たとえばブルック膜、視神経の節板、シュレム管壁、脈絡膜実質にも存在し(25)、また軟骨膜、骨膜、髄膜、強膜などの他の細胞外マトリックスにも局在している(26, 27)。さらにKittelbergerと共同研究者(28)は、VIII型コラーゲンが毛根鞘の結合組織に存在することを報告している。この毛根鞘はマイクロフィブリルであるオキシタラン線維に富み(29)、数人の研究者はVIII型コラーゲンが弾性線維のマイクロフィブリルを形成していることを観察している(27, 30)。しかしこのような現象はすべての組織に認められるわけではなく、弾性線維の豊富な項韌帯ではVIII型コラーゲンは検出されていない(27)。VIII型コラーゲンはまた血管内皮下層(内膜)や新生毛細血管の成分でもある(31, 32)。最後に星状細胞腫、ガン化したケラチノサイト、歯肉上皮細胞が培養系でかなりの量のVIII型コラーゲンを産生分泌することを付け加えておく(33-35)。図4に皮膚(A、B)、小血管(C、D)、さらに骨膜や軟骨膜(E、F)のような特殊なマトリックスにおけるVIII型コラーゲンの分布を示した。

発生の過程では、VIII型コラーゲンは妊娠中期のトリおよびマウス胚で合成、発現される。発生11日のマウス胚で、初めて頭部に間葉組織が出現する。12日目には抗VIII型コラーゲン抗体で小血管が染色され、より大きな血管の内皮下層はそれ以降のステージで免疫染色陽性となる(19)。血管系におけるVIII型コラーゲンの発現は、心臓の発生分化にも関連しており、心臓ではある特定の場所に、しかもある一時期のみ発現されるように調節されている。VIII型コラーゲンは最初、免疫細胞化学的な手法により、12日胚の心臓の筋芽細胞に認められた。その後17日まで染色は陽性であったが、17日以降、徐々に染色性は減弱し、出生後の動物では全く検出されなかった。VIII型コラーゲンはまた、マウスの13日から17日胚の心臓内隆起にも存在する(19)。これは心臓弁の前駆体である。しかしこのタンパク質の分布は急速に変化する。最初は心筋層と、心筋層の基底膜として知られている心臓のゼリー間の移行部に認められる。15日になると、VIII型コラーゲンは発生段階の心臓弁の心内膜下層に存在する。ところが、以後のステージ(17日)では、心臓弁の実質にのみ存在するようになった。成体においては、VIII型コラーゲンは心臓弁や心筋層には存在せず、大血管の内膜下層に存在する。Kittelbergerと共同研究者も同様な報告をしている(28)。

several investigators have observed that type VIII collagen is often coincident with microfibrils in elastic fibers(27, 30). This association is not characteristic of all tissues, however, as type VIII collagen has not been detected in nuchal ligament(27), a structure containing abundant elastic fibers. Type VIII collagen is also a component of the subendothelium(tunica intima) of blood vessels(19, 28) and of newly-formed capillaries(31, 32). Finally, astrocytoma cells, transformed keratinocytes, and gingival epithelial cells secrete significant amounts of type VIII collagen *in vitro*(33, 34, 35). Fig. 4 illustrates the distribution

心臓の発生段階におけるVIII型コラーゲンのユニークな発現パターンは、このタンパク質が筋芽細胞の分化と関係していることを示している。発生分化の各ステージに相関して、特定の細胞外マトリックス成分が心筋層に出現する現象が知られている(36)。たとえば、I型コラーゲンの分泌は、心臓内隆起の上皮-間葉系の形質転換と深いつながりがある。線維型のI型コラーゲンは、この形質転換のマーカーであり、心臓内の内皮細胞が心臓のゼリーへ遊走する際の足場を提供している(37)。筋芽細胞の分化には、VIII型コラーゲンを含む数種の細胞外間質分子が必要であると思われる。それらの分子は、細胞の遊走、

Fig. 4. Immunolocalization of type VIII collagen in tissues. Paraffin sections of mouse tissues were incubated with a polyclonal affinity-purified anti-type VIII collagen IgG(19). Immunolocalization was performed by indirect immunofluorescence(A) or with an avidin-biotin-peroxidase technique(B-F) followed by detection with diaminobenzidine. A light counterstaining with toluidine blue was used in B - F to identify surrounding structures. This counterstain appears in the photomicrographs as a light gray, in contrast to the black color of the immunopositive reaction product. A) Transverse section of hair follicles. Immunoreactivity is associated with the connective tissue sheath that surrounds each hair follicle(arrows); B) Neonatal mouse skin(area of fused eyelids). Type VIII collagen is detected in the terminally differentiated layer of keratinocytes, particularly in regions of immediate contact(arrows); C) Neonatal mouse brain. Open arrow points to the pia mater, which shows discrete reactivity with anti-type VIII collagen IgG. In the gray matter, small vessels can be easily identified(closed arrow); D) Choroid plexus. Arrow indicates a capillary consisting of one cell positive for type VIII collagen. Immunoreactivity with anti-type VIII collagen IgG can also be identified in several other vessels, particularly those under the cuboidal epithelium; E) Cartilage. The perichondrium(PC) displays strong immunoreactivity; F) Bone. The periosteum(PO) shows a strong fibrillar pattern corresponding to type VIII collagen. Bar: 100 μm.

of type VIII collagen in skin (A, B), small vessels (C, D), and specialized matrices such as periosteum and perichondrium (E, F).

During development, type VIII collagen is expressed in mid-gestation chicken and mouse embryos. At day 11 of mouse development, it was first observed in the head mesenchyme. Small vessels stained positively for type VIII collagen by day 12, and the subendothelium of larger vessels was immunolabeled at later stages(19). The expression of type VIII collagen in the vascular system extends to the developing heart, in which the distribution is spatially and temporally regulated. Initially, type VIII collagen was detected by immunocytochemistry in cardiac myoblasts at day 12. Positive staining was present until day 17, after which it gradually lessened and was undetectable in postpartum animals. Type VIII collagen was also present in endocardial cushions, the precursors of the cardiac valves(day 13 through 17 in the mouse embryo)(19); however, the distribution of this protein changed rapidly. Initially, it was observed in the transition zone between the myocardium and the cardiac jelly (also known as the myocardial basement membrane). At day 15, type VIII collagen was present in the subendocardium of the developing valves, whereas at later stages(17 days), it was restricted to the stroma of the cardiac valves. Type VIII collagen was not detected in adult heart valves or myocardium, although it was present in the subendothelium of large vessels, as also reported by Kittelberger and coworkers(28).

The unique pattern of expression of type VIII collagen in the developing heart indicates that this protein might be relevant to the differentiation of myoblasts. The appearance of specific extracellular matrix components in the myocardium has previously been correlated with stages in development(36). For example, secretion of type I collagen has been implicated in the epithelial-mesenchymal transformation observed in cardiac cushions. Fibrillar type I collagen, a marker for this transformation, provides support for the migration of endocardial endothelial cells into the cardiac jelly(37). We have proposed that differentiation of myoblasts requires the presence of several extracellular molecules, including type VIII collagen, which could facilitate migration, proliferation, or cellular recognition and sorting(19).

The precise spatial and temporal regulation of type VIII collagen in the developing heart has elicited further speculation that the protein might function in tissue remodeling and cell differentiation. Transient expression during embryogenesis has been described for several extracellular proteins that include collagens. For example, types II and IX collagen are found in the embryonic but not in the adult chicken cornea(38, 39), and type IV collagen might contribute to the provisional matrix of migrating neural crest cells(40). Such transiently expressed structural molecules are thought to provide bio-

増殖、細胞間の認識や識別を助けるものと考えられている(19)。

心臓の発生分化過程において、VIII型コラーゲンの発現部位と発現時期が正確に制御されていることから、このタンパク質は、組織の再構築や細胞分化に何らかの機能を果たしていると考えられている。コラーゲンを始めとして、数種の細胞間質タンパクが胚形成期に一過性に発現されることが知られている。たとえば、II型、IX型コラーゲンは胎児性の角膜には存在するが、成長したトリの角膜には存在しない(38, 39)。また、神経冠細胞が遊走する時には、IV型コラーゲンによる一時的な仮のマトリックスが形成される(40)。このように一過性に発現される構造分子は、細胞の誘導や分化を促進する生化学的な情報を提供していると考えられる。これらの分子は、細胞表面の受容体と直接結合したり、増殖因子と結合して細胞と増殖因子の反応を抑制したり、他のマトリックス分子と会合してマトリックスのトポロジーを調節することなどによって、細胞の挙動を調節しているのであろう。

現時点では、VIII型コラーゲンの心臓形成における役割は推測の域を出ないが、本コラーゲンの発現が調節されていることから、心臓の発生分化を決定する重要な因子であると考えられる。将来、VIII型コラーゲンのジーンターゲットングや突然変異誘発などの研究が必要となるであろう。この細胞外タンパク質が、胚の発生分化過程でどのような役割を果たすかを研究する上で、分子の合成を完全に抑えたり不完全な分子を合成させることによって、貴重な情報が得られるものと思われる。

E. VIII型コラーゲンの生物学的機能: 血管形成における役割?

VIII型コラーゲンは、多種多様な培養内皮細胞の分泌成分として発見された(17, 41)。例えば、ウシ大動脈内皮細胞のVIII型コラーゲン合成量は、全コラーゲン合成量の25%を占めている。VIII型コラーゲンには分子量の異なる3種のイソ型が報告されており、それぞれ分子量177,000、125,000、100,000で、EC1、EC2、EC3と呼ばれている。ペプチドマップから、EC2とEC3は、EC1に由来するものであると考えられている(42)。EC1とEC2をペプシンで消化すると、分子量50,000のこれ以上分解をうけない安定な断片が得られ、この断片は、アフィニティークロマトグラフィーで精製した抗VIII型コラーゲンIgGと反応する(43)。免疫細胞化学的な手法により、内皮細胞の培養系から、VIII型コラーゲンは内皮のマトリックスに存在することがわかった。この知見は、生体内ではこのコラーゲンが、ある種の血管の内皮下層に存在することとよく対応している(19, 27)。さらに、培養内皮細胞がひも、ないしは管状の構造を形成する時、VIII型コラーゲンの合成が増加することが知られている(31, 43)。この情報が生体内での血管形成とどのように結びつくのかは明らかではないが、VIII型コラーゲンが、脳の新生血管の構築に関係しているという報告がなされている(32)。

生体内においては、内皮細胞がVIII型コラーゲンを産生しているという確たる証拠がある。そのほとんどのデータは、ア

chemical information that facilitates cellular induction and differentiation. These molecules might regulate cell behavior by binding directly to cell surface receptors, by sequestering growth factors, and/or by regulating matrix topography through an association with other matrix molecules.

Although any role that type VIII collagen might play in cardiogenesis is speculative at this point, regulation of its expression appears to be an important factor in directing the development of the heart. Future experiments should include gene targeting and mutagenesis of the type VIII collagen gene. The ablation or genesis of a defective molecule would provide valuable information concerning the function of this extracellular protein during embryonic development.

E. Cell Biology of Type VIII Collagen: A Role in Angiogenesis?

Type VIII collagen has been found as a secreted component of a large variety of endothelial cells in culture(17,41). In bovine aortic endothelial cells, for example, it accounts for 25% of total collagen synthesis. Three isoforms of different molecular size have been reported: EC1, EC2, and EC3, of approximate Mr 177,000, 125,000, and 100,000, respectively. From peptide maps, it was suggested that EC2 and EC3 were related to EC1(42). Digestion of EC1 and EC2 with pepsin generated stable fragments of Mr 50,000 that were recognized by affinity-purified anti-type VIII collagen IgG(43).

Immunocytochemical studies of cultured endothelial cells revealed type VIII collagen in the endothelial matrix, a finding compatible with the location of this collagen in the subendothelium of certain vessels *in vivo*(19, 27). In addition, type VIII collagen was increased when endothelial cells formed cord and tube-like structures *in vitro*(31, 43). Whether this information is relevant to angiogenesis *in vivo* is unclear, although there are indications that type VIII collagen might participate in the organization of new blood vessels in the brain(32).

In vivo, there is good evidence that endothelial cells produce type VIII collagen. Most of these data have been derived from immunolocalization studies performed with affinity-purified polyclonal or monoclonal antibodies. Several investigators have observed type VIII collagen in the subendothelium of medium and large vessels(13, 27, 28). Type VIII collagen is also present in capillaries of embryonic mice(31) and in microvessels associated with a number of human brain tumors(32). During development, positive staining for type VIII collagen is seen in organs which undergo vascularization primarily by angiogenesis, such as brain (see Fig. 4, C and D). Although these data indicate a potential role in the genesis of new blood vessels, it is difficult to delineate a specific function for type VIII collagen in the morphogenetic process of neovascularization. Early studies showed that type VIII collagen was

フィニティクロマトグラフィーで精製したポリクローン抗体、あるいはモノクローン抗体を用いた免疫組織染色の結果得られたものである。数人の研究者は、VIII型コラーゲンが中程度の血管ないしは、大血管の内皮下層に存在することを観察している(13, 27, 28)。VIII型コラーゲンはまた胎生マウスの毛細血管(31)、ヒト脳腫瘍に結合している微小血管にも存在する(32)。発生分化の過程では、血管の新生により、主として血管形成の盛んな脳などの臓器で、VIII型コラーゲンの染色が陽性となる(図4, CとDを参照)。これらのデータはVIII型コラーゲンが新生血管の形成を促進する役割を果たしていることを示している。にもかかわらず、血管が新生される際に、血管の形態形成過程において、VIII型コラーゲンがどのような特別な機能を果たすのかを正確に記述するのは難しい。初期の研究から、VIII型コラーゲンは増殖能や遊走能の高い細胞と特異的に会合していることが知られている(41, 44)。面白いことに、この点に関連して、VIII型コラーゲンは星状細胞腫(神経膠腫)を始めとする多数の悪性腫瘍細胞系の培養液に存在することが知られている(17)。これらの細胞は、正常組織においては脳血管と密着して存在している細胞である。培養系におけるVIII型コラーゲンの合成は、生体内におけるその分布と非常によく相関している。従って、VIII型コラーゲンの発現が生体内外で一致していることは、本コラーゲンの調節や機能に関係するより核心的な問題をすでに確立された実験系を用いて究明していく上で、非常に都合がよいと思われる。

F. おわりに

VIII型コラーゲンは、デスメ膜に見られる六角系格子構造の構成成分としての機能を持っていることが明らかであるにもかかわらず、内皮細胞の合成産物としての役割や、血管系、軟骨膜、骨膜、硬膜、眼組織、そして軟骨などの特定の結合組織における機能は明らかではない(24, 26, 27)。またVIII型コラーゲンとX型コラーゲンのアミノ酸および塩基配列の相同性が、類似した機能を反映したものかどうかははっきりしていない。X型コラーゲンの組織分布は、主として軟骨成長板の肥大(軟骨細胞)層に限られており(14)、明らかにVIII型コラーゲンの分布とは一致しない。

我々は最近、角膜の発生初期のステージ、胎生14日から15日の間、一次性角膜実質にVIII型コラーゲンが出現し、胎生17日ではこの組織から消失してしまうことを明らかにした(L. ChunとH. Sage, 論文作成中)。一次性角膜実質も肥大軟骨と同様に、組織の再構築が行われている間、組織を支えている一時的なマトリックスである。VIII型コラーゲンとX型コラーゲンは、両者のユニークな構造上の特徴から、組織再構成において特殊な役割を果たすユニークな「移行性」マトリックスを構築することができるのであろう。線維型コラーゲンに比較して、X型、VIII型コラーゲンは熱に安定で、それ故、代謝活性の高い環境に適応しやすいのかもしれない。三本鎖ヘリックス領域は何ヶ所もヘリックス構造が中断されているが、この構造は組織のタンパク質分解酵素によって迅速に分解される自由度の高い

preferentially associated with highly proliferative and migratory cells(41, 44). In this regard, it is interesting that type VIII collagen was found in the culture media of a significant number of malignant lines that included astrocytoma(glioma) cells, which are closely associated in normal tissue with the cerebral vasculature(17). The synthesis of type VIII collagen *in vitro* correlates reasonably well with its distribution *in vivo*. This coincidence of expression is favorable for the pursuit of more specific questions concerning the regulation and function of type VIII collagen in well-defined systems.

F. Concluding Remarks

Although type VIII collagen appears to function as a component of the hexagonal lattice observed in Descemet's membrane, its role as a product of endothelial cells(31), in vasculature(19, 28), or in specialized connective tissues such as perichondrium, periosteum, dura mater, ocular tissues, and cartilage(24, 26, 27) is less apparent. It is also uncertain whether the sequence homology between types VIII and X collagen reflects a functional homology. The tissue distribution of type X collagen, which is restricted primarily to the hypertrophic zone of growth plate cartilage(14), clearly does not coincide with that of type VIII collagen.

We have recently shown that type VIII collagen appears in the primary corneal stroma during the early stages of corneal development(embryonic day 14 and 15) but disappears from this tissue by embryonic day 17(Fig.5)(L. Chun and H. Sage, manuscript in preparation). Similar to hypertrophic cartilage, the primary stroma is a temporary matrix that supports the tissue during remodeling. As a consequence of their unique structural features, types VIII and X collagens could assemble into unique "transitional" matrices which play a specialized role in remodeling tissues. Compared to the fibrillar collagens, both type X and type VIII collagens are thermally more stable and may therefore be better adapted to metabolically active environments. A triple-helical domain containing multiple interruptions is also suitable for a flexible structure that can be rapidly degraded by tissue proteases. Type VIII collagen is associated with angiogenesis *in vitro*(43) and with capillary formation *in vivo*(31); it is also expressed at epithelial-mesenchymal interfaces during cardiac morphogenesis(19). In each instance, the unique structure of type VIII collagen might be required for the transitional matrices that are established during the morphogenesis of specific tissues.

The protein structure of type VIII collagen remains an unresolved question. Although two genes have been characterized, there is good evidence for the existence of a protein larger than that predicted from the cDNAs. The transcriptional products of both type VIII collagen genes, $\alpha 1$ (VIII) and $\alpha 2$ (VIII), encode polypeptide chains of approximate Mr 60,000. However, the existence of a larger molecule has been suggested by

Fig. 5. Distribution of type VIII collagen in developing mouse cornea. Paraffin sections of developing mouse cornea at day 14(A), 15(B), and 17(C) were incubated with monoclonal anti-type VIII collagen IgG. Immunoreactivity was visualized by an avidin-biotin-peroxidase treatment followed by diaminobenzidine. Reactivity with anti-type VIII collagen IgG was identified in the stroma of the cornea(labeled C) at day 14(A). At day 15(B), fibrillar immunoreactivity was evident in the stroma(arrow). The newly-organized Descemet's membrane exhibited strong but discontinuous reactivity (arrowhead). Small vessels are also stained with anti-type VIII collagen IgG(open arrow). On day 17(C), the stroma appears negative and the reactivity of the organized Descemet's membrane is now apparent (arrow). L, Lens. Bar: 100 μ m.

構造と適合している。VIII型コラーゲンは、培養系における血管形成(43)、生体内における毛細血管の形成(31)に関与している。また心臓の形態形成が行われている間、上皮-間葉系の境界に発現される(19)。それぞれの場合において、特定の組織の形態形成期間に作られる移行性のマトリックスに、このVIII型コラーゲンのユニークな構造が必要とされているのかもしれない。

VIII型コラーゲンのタンパク質構造は未解決の問題として残されている。2つの遺伝子が解明されたが、cDNAから予想されるタンパク質より高分子量のタンパク質が存在する確かな証拠がある。VIII型コラーゲン遺伝子、 $\alpha 1$ (VIII)と $\alpha 2$ (VIII)の転写

studies of protein purified from cultured cells and from tissues. Metabolically labeled type VIII collagen from several types of endothelial cells, an astrocytoma cell line, transformed murine keratinocytes, and human gingival epithelial cells has consistently been purified as two and occasionally three chains of approximate Mr 180,000, 125,000, and/or 100,000(33-35, 42, 45). Although studies *in vitro* are subject to artefacts, cultured cells have been used successfully to study the synthesis and secretion of molecules. For example, certain forms of procollagen that can be purified readily from culture medium are difficult to isolate from tissues in which rapid proteolytic processing occurs. The large forms of type VIII collagen produced *in vitro* could be an example of an immature, intermediate, or extremely labile tissue form of the protein. After purification from culture medium, the larger forms are unusually susceptible to cleavage by pepsin, as well as by several neutral serine proteases, under conditions in which other collagens are relatively resistant(42, 45). This lability is indicative of a partially unfolded or interrupted triple helix and could explain the difficulties encountered in purifying an intact form of type VIII collagen from tissues. However, tissue extracts from developing mouse hearts contained high molecular weight forms that could be identified by specific affinity-purified anti-type VIII collagen antibodies(19). The higher molecular weight forms that have been described for type VIII collagen could be explained by the existence of a third gene encoding for a large polypeptide chain, as shown for type VI collagen(46). Alternatively, type VIII collagen might associate with proteoglycans or glycosaminoglycans in the extracellular space, an interaction predicted from the basic nature of the NC2 domain of $\alpha 1$ (VIII)(9) and from its apparent sensitivity to hyaluronidase(19).

In summary, we have presented an overview of the research that has been conducted on the type VIII collagen genes and protein. It was our goal to discuss the available information in a context that would outline some of the basic questions that remain unanswered. Future directions include the identification of regulatory elements in type VIII collagen genes that contribute to the unusual patterns of expression observed for the corresponding protein. The recent cloning of the $\alpha 1$ and $\alpha 2$ (VIII) genes, and the use of cultured cells that express type VIII collagen, will greatly accelerate this process. Secondly, it will be important to characterize the higher molecular weight forms of the type VIII collagen protein to understand its role and interactions with other components of the extracellular matrix. The cloning of murine type VIII collagen genes will facilitate studies on the role of this protein in development through the ablation of the gene by homologous recombination or by overexpression of the gene product in transgenic animals. It is our belief that the study of type VIII collagen will provide novel insight into the role of specific extracellular matrix proteins in cell regulation.

産物は、分子量約60,000のポリペプチド鎖をコードしている。しかし、培養細胞や組織から精製されたタンパクの研究結果は、より高分子量の分子が存在する可能性を示している。数種の内皮細胞、星状細胞腫系、ガン化したマウスメラノサイト、ヒト歯肉上皮細胞などの培養系で、VIII型コラーゲンを代謝的に標識すると、常時2種の、時には3種のポリペプチド鎖が精製され、その分子量は約180,000、125,000と100,000である^{*3}(33-35、42、45)。培養系の研究は人為的な実験誤差を生じやすいが、培養細胞は分子の合成、分泌の研究に成功裏に利用されてきた。たとえば、ある形態のプロコラーゲンは、培養液から簡単に精製できるが、組織から単離するのは困難である。組織では急速なタンパク分解による修飾がおこるからである。培養系で産生される高分子量のVIII型コラーゲンは、未熟な形や中間体であるかもしれないし、極端に分解されやすい組織形のタンパク質である可能性もある。培養液から精製した後、高分子形のVIII型コラーゲンは、他のコラーゲンが比較的タンパク質分解に抵抗性を示す条件下でもペプシンや数種の中性セリンプロテアーゼによる分解を受けやすい(42、45)。この不安定な性質は、三本鎖ヘリックスが一部巻き戻っていたり、中断していることを示している。また組織からそのままの形のVIII型コラーゲンを精製することが、いかに困難であるかを説明している。しかし、分化発生過程のマウスの心臓から得られる組織抽出液には、アフィニティークロマトグラフィーで精製した特異的な抗VIII型コラーゲン抗体と反応する高分子量の形態が含まれていた(19)。上述のVIII型コラーゲンの高分子形は、VI型コラーゲンのように、より大きなポリペプチド鎖をコードする3番目の遺伝子が存在することで、説明できるかもしれない(46)。あるいは、VIII型コラーゲンは細胞外ではプロテオグリカンやグリコサミノグリカンと会合して存在するのかもしれない。 $\alpha 1$ (VIII)のNC2領域が塩基性であること(9)や、ヒアルロニダーゼに対して明らかに感受性であること(19)からそれらの会合の存在が予想される。

要約すると、我々はVIII型コラーゲンの遺伝子とタンパク質について行われてきた研究を概説した。我々の最終目標は、利用できる情報を論議して、未解決のまま残されたいくつかの基本的な問題を明らかにすることであった。これからの研究は、VIII型コラーゲン遺伝子の調節エレメントを見つけ、このタンパク質で認められている珍しい発現パターンを解明することを目指している。最近クローニングされた $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ (VIII)遺伝子とVIII型コラーゲンを発現する培養細胞系を利用することによって、問題解決時期が早められると考えている。次に、VIII型コラーゲンタンパク質の高分子量形の性質を解明して、その機能と他の細胞外マトリックス成分との相互作用を理解することが重要であると考えている。マウスVIII型コラーゲン遺伝子のクローニングによって、発生分化におけるこのタンパク質の

^{*3}星状細胞腫の培養液にはEC2(分子量125,000)とEC3(分子量100,000)、ウシ大動脈内皮細胞の培養液にはEC1(分子量180,000)とEC2、ウシ大静脈内皮細胞の培養液にはEC1、EC2、EC3のポリペプチド鎖が存在する。

Acknowledgements

The authors thank Dr. Paula Hasselaar and Timothy Lane for their critical comments. Work from the authors' laboratory was supported by National Institutes of Health grant HL-18645.

役割を研究することが容易になった。これらの研究には、トランスジェニックマウスにおいて相同遺伝子を除去したり、遺伝子産物を過剰に発現させる実験も含まれる。VIII型コラーゲンの研究は、特定の細胞外マトリックスタンパク質が、細胞の制御にどのような役割を果たしているかを考察する上で、貴重な資料を提供してくれるものと信じている。

東京医科歯科大学・難治疾患研究所
山口 典子 訳

References

- Ninomiya, Y., Showalter, A.M., and Olsen, B.R. (1984) in *The Role of Extracellular Matrix in Development* (Trelstad, R.L., ed.) pp 255-276. Alan R. Liss, New York
- Albelda, S.M., and Buck, C.A. (1990) *FASEB J.* **4**, 2868-2880
- Bornstein, P., and Sage, H. (1989) *Prog. Nuc. Acids Res. Mol. Biol.* **37**, 66-105
- Jacenko, O., Olsen, B.R., and LuValle, P. (1991) *Crit. Rev. Gene Exp.* **1**, 327-353
- Yamaguchi, N., Mayne, R., and Ninomiya, Y. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 4508-4513
- Muragaki, Y., Mattei, M.-G., Yamaguchi, N., Olsen, B.R., and Ninomiya, Y. (1991) *Eur. J. Biochem.* **197**, 615-622
- Muragaki, Y., Jacenko, O., Apte, S., Mattei, M.-G., Ninomiya, Y., and Olsen, B.R. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 7721-7727
- Kapoor, R., Bornstein, P., and Sage, H. (1986) *Biochemistry* **25**, 3930-3937
- Yamaguchi, N., Benya, P.D., van der Rest, M., and Ninomiya, Y. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 16022-16029
- Mann, K., Jander, R., Korsching, E., Kühn, K., and Rauterberg, J. (1990) *FEBS Lett.* **273**, 168-172
- Ninomiya, Y., Castagnola, P., Gerecke, D., Gordon, M.K., Jacenko, O., LuValle, P., McCarthy, M., Muragaki, Y., Nishimura, I., Oh, S., Rosenblum, N., Sato, N., Sugrue, S., Taylor, R., Vasios, G., Yamaguchi, N., and Olsen, B.R. (1990) in *Extracellular Matrix Genes* (Sandell, L.J., and Boyd, C.D., eds.) pp. 79-114. Academic Press, New York
- Bornstein, P., and Traub, W. (1979) in *The Proteins*. (Neurath, H., and Hill, R. L., eds.) Vol. 4, pp. 412-605 Academic Press, New York
- Jander, R., Korsching, E., and Rauterberg, J. (1990) *Eur. J. Biochem.* **189**, 601-607
- Schmid, T.M., Mayne, R., Jeffrey, J.J., and Linsenmayer, T.F. (1986) *J. Cell Biol.* **109**, 939-945
- Benya, P. (1980) *Renal Physiol.* **3**, 30-35
- Benya, P.D., and Padilla, S.R. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 4160-4169
- Sage, H., and Bornstein, P. (1987) in *Biology of the Extracellular Matrix: Structure and Function of Collagen Types* (Mayne, R. and Burgeson, R., eds.) pp. 173-194. Academic Press, Orlando, FL.
- Labermeier, U., Demlow, T.A., and Kenney, M.C. (1983) *Exp. Eye Res.* **37**, 225-237
- Iruela-Arispe, M.L., and Sage, E.H. (1991) *Dev. Biol.* **144**, 107-118
- Labermeier, U., and Kenney, M. C. (1983) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **116**, 619-625
- Kapoor, R., Bornstein, P., and Sage, H. (1985) in *Basement Membranes* (Shibata, S., ed.) pp. 105-118 Elsevier Science Publishers, Amsterdam
- Davis, P.F., Ryan, P.A., Kittelberger, R., and Greenhill, N.S. (1990) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **171**, 260-265
- Sawada, H., Konomi, H., and Nagai, Y. (1984) *Eur. J. Cell Biol.* **35**, 226-234
- Sawada, H., Konomi, H., and Hirosawa, K. (1990) *J. Cell Biol.* **110**, 219-227
- Tamura, Y., Konomi, H., Sawada, H., Takashima, S., and Nakajima, A. (1991) *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **32**, 2636-2644
- Kapoor, R., Sakai, L. Y., Funk, S., Roux, E., Bornstein, P., and Sage, E.H. (1988) *J. Cell Biol.* **107**, 721-730
- Kittelberger, R., Davis, P.F., Flynn, D.W., and Greenhill, N.S. (1990) *Connect. Tiss. Res.* **24**, 303-318
- Kittelberger, R., Davis, P.F., and Greenhill, N.S. (1989) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **159**, 414-419
- Cotta-Pereira, G., Guerra-Rodrigo, F., and Sampaio, S.B. (1977) *J. Invest. Dermatol.* **66**, 143-151
- Sakai, L.Y., Roux, E.R., Bornstein, P., Sage, H., and Ciment, G. (1987) *J. Cell Biol.* **105**, 214a
- Sage, H., and Iruela-Arispe, M. L. (1990) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **580**, 17-31
- Paulus, W., Sage, E.H., Liszka, U., Iruela-Arispe, M.L., and Jellinger, K. (1991) *Brit. J. Cancer* **63**, 367-371
- Alitalo, K., Bornstein, P., Vaheri, A., and Sage, H. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 2653-2661
- Tokimitsu, I., Ohyama, K., Tajima, S., and Nishikawa, T. (1991) *J. Invest. Dermatol.* **96**, 267-272
- Salonen, J., Oda, D., Funk, S., and Sage, H. (1991) *J. Periodont. Res.* **26**, 355-360
- Borg, T.K., Rubin, K., Lundgren, E., Borg, K., and Öbrink, B. (1984) *Dev. Biol.* **104**, 86-96
- Mjaatvedt, C.H., and Markwald, R.R. (1989) *Dev. Biol.* **136**, 118-128
- von der Mark, K., von der Mark, H., Timpl, R., and Trelstad, R.L. (1977) *Dev. Biol.* **59**, 75-85
- Fitch, J.M., Mentzer, A., Mayne, R., and Linsenmayer, T.F. (1988) *Dev. Biol.* **128**, 396-405
- Perris, R., Krotoski, D., and Bronner-Fraser, M. (1991) *Development*, in press.
- Sage, E.H. (1986) in *Contemporary Issues in Haemostasis and Thrombosis: Vascular Endothelium in Haemostasis and Thrombosis* (Gimbrone, M., ed) Vol. 2, pp. 198-208. Churchill Livingstone, Edinburgh
- Sage, H., Pritzl, P., and Bornstein, P. (1980) *Biochemistry* **19**, 5747-5755
- Iruela-Arispe, M.L., Diglio, C.A., and Sage, E.H. (1991) *Arterioscler. Thromb.* **11**, 805-815
- Sage, H., Balian, G., Vogel, A.M., and Bornstein, P. (1984) *Lab. Invest.* **50**, 219-231
- Sage, H., Trüeb, B., and Bornstein, P. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 13391-13401
- Trüeb, B., and Winterhalter, K.H. (1986) *EMBO J.* **5**, 2815-2819