

論文の内容の要旨

論文題目: フォンヴィルブランド因子 A3ドメインによる

コラーゲン認識メカニズムの構造生物学的解明

氏名: 西田 紀貴

【序論】

細胞外マトリックスの主要な構成成分であるコラーゲンは、Gly-X-Yの反復配列のXおよびY位にプロリン、4-ヒドロキシプロリンがそれぞれ高頻度で出現する一次配列を有する。コラーゲンは翻訳後、3本のポリペプチド鎖がトリプルヘリックス構造へとフォールディングし、さらに生理的条件下においては、自己会合して不溶性の線維を形成する。生体内におけるコラーゲンの役割は多様であり、細胞組織・器官の形成を物理的に支えるだけでなく、細胞表面にあるコラーゲン受容体との相互作用における足場として、細胞接着・遊走・血小板粘着、創傷治癒、形態形成などの生命現象に深く関わっていることが知られている。本研究では、血小板粘着反応の最初のステップである、von Willebrand factor(vWF)と細胞内皮下コラーゲンとの相互作用に着目し、その相互作用様式を構造生物学的に解明することを目指す。しかしながら、不溶性の超分子会合体を形成するコラーゲンの性質は、コラーゲンとその結合タンパク質の相互作用を構造生物学的手法により解析する際の大きな妨げとなっていた。本博士論文においては、まずvWF-A3ドメイン上におけるコラーゲン結合部位を決定するため、NMRによる新規相互作用界面決定法である転移交差飽和(Transferred cross saturation; TCS)法の適用を試みた。TCS法は、複合体形成時に受けた情報を遊離状態で観測するため、原理的に複合体の分子量に依存せず結合界面を決定することが可能である。これを利用すれば、これまで構造生物学のアプローチが困難であったコラーゲンをはじめとする不溶性・不均一性を有する生体物質との相互作用解析が可能となることが期待できる。また本研究では、TCS法により明らかとなったA3ドメインの結合界面の情報などから認識するコ

ラーゲン配列を絞り込み、それに基づいて作製したコラーゲン模倣ペプチドと A3 ドメイン複合体の構造解析を行った。

【結果と考察】

1. 転移交差飽和法を用いた A3 ドメインのコラーゲン結合部位の決定

線維形成タイプ III コラーゲンと非交換性プロトンを重水素化した A3 ドメイン複合体を用いて TCS 実験を行った。TCS 実験においては、A3 ドメインのコラーゲン結合界面残基のみがラジオ波照射により飽和されたコラーゲンからの交差飽和の影響を受ける。すなわち、交差飽和の影響を強く受けシグナル強度が減少した残基を A3 ドメインの結合界面残基と結論できる。TCS 実験の結果を A3 ドメインの立体構造上にマッピングすると、顕著なシグナル強度減衰が観測された残基は分子表面において一つの連続した面を形成した (Fig.2a)。またこの領域には、直径約 15 Å のトリプルヘリックスを収容可能な溝が見出される (Fig.2a)。以上の結果より、A3 ドメインはコラーゲントリプルヘリックスを分子前面に形成された溝を使って認識していることが強く示唆される。この結果に基づいて行ったアラニンスキャン変異実験は、TCS 実験の結果を完全に支持するものであった (Fig.2b)。以上のことから、TCS 法は不溶性の生体分子との相互作用界面を決定するための手法として利用可能であることが明らかとなった。

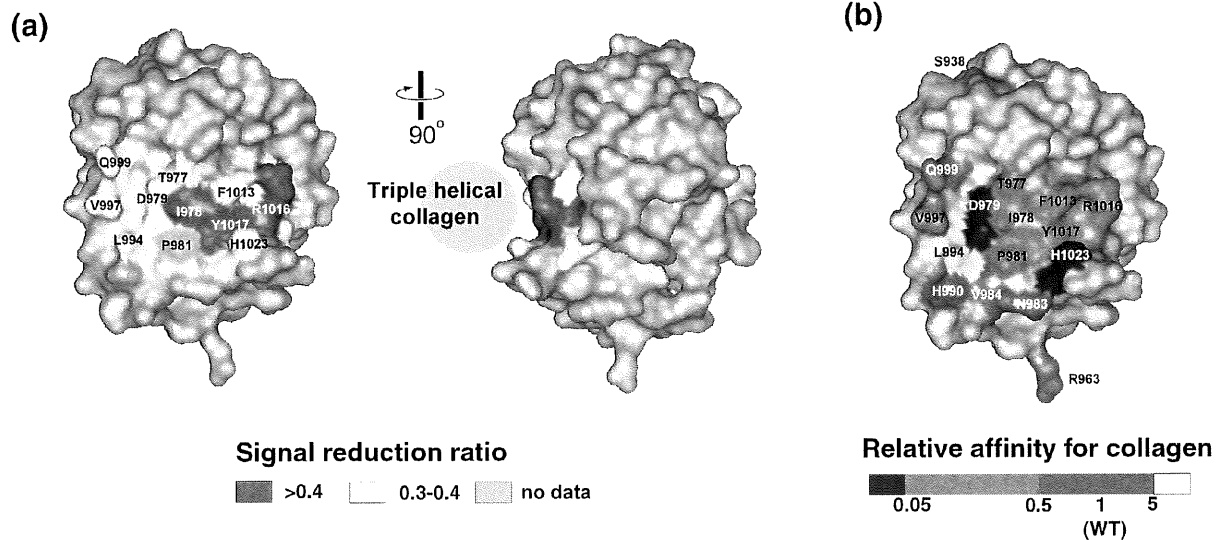


Fig.1 (a)A3ドメインの立体構造上に、TCS 実験において顕著にシグナル強度が減衰した残基を示す。Z軸に沿って90°回転した右側の図においては、コラーゲントリプルヘリックスを収容可能な溝が見出される。(b)変異体のコラーゲン結合定数を野生型と比較し構造上にマッピングした。L994Aでは野生型と比較して親和性が約5倍上昇した。

vWF-A3 ドメインと相同性の高い配列は数多くのタンパク質中において見出され、VWA ドメインファミリーとして分類される。細胞接着因子インテグリンの $\alpha 2$ -I ドメインは、A3 ドメインと同じくコラーゲン受容体として機能する VWA ドメインであり、これまでにコラーゲンペプチドとの複合体構造が報告された唯一の例である (Fig.2b)。A3 ドメインと $\alpha 2$ -I ドメインの構造を比較すると、A3 ドメインは分子の前面において、 $\alpha 2$ -I ドメインは分子の上面においてコラーゲンと結合しており、リガンド認識様式が共通のフォールドを有するドメイン間で全く異なるという点において極めて興味深い。

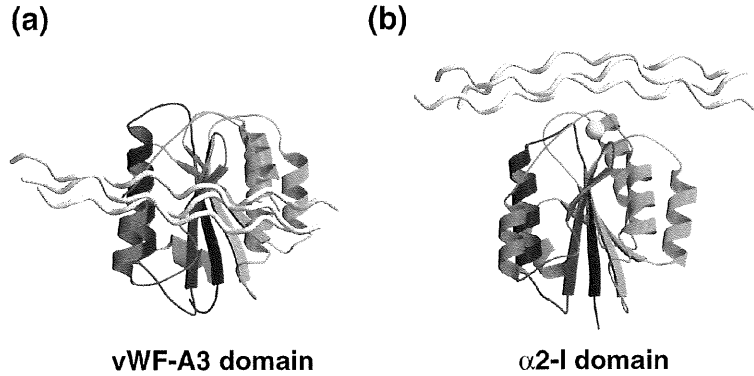


Fig.2 (a) A3ドメインとコラーゲンモデルペプチドとのドッキングモデル構造。 (b) α2-Iドメインとコラーゲンペプチド複合体の結晶構造 (PDB entry 1DZI)。リガンド結合部位にある金属イオンを球で示す。

2. A3ドメインが認識するコラーゲン配列の探索および複合体の構造解析

これまでに、タイプ III コラーゲンの CNBr 分解産物である CB4(III)は vWF を介した血小板凝集反応を引き起こすこと、さらにその部分ペプチド(CB4(III)-7)が⁵⁴¹G-⁵⁵⁸Q 領域を介して vWF と結合することが報告されていた。TCS 法により明らかとなった A3 ドメインのコラーゲン結合部位で特徴的な点は、①溝を形成する A3 ドメインの表面残基に I978、Y1017 をはじめ疎水性残基が非常に多く含まれること、②結合溝の深さが他のコラーゲン結合タンパク質と比較して浅く、わずか 4 Å 程度しかないという点である。このことは A3ドメインが側鎖の小さい疎水性残基を認識することを示唆しており、CB4(III)-7 においてこの条件に合致するのは⁵⁴¹GAA あるいは⁵⁵⁰GSA である。さらにコラーゲンの Lys 側鎖アミノ基をアセチル化修飾して SPR 実験を行った結果、固定化した A3 ドメインとの相互作用が修飾度依存的に失われた (Fig.3b)。以上を総合すると、⁵⁴⁰KGAA 配列が A3ドメイン認識の決定要素となりうると考えた。

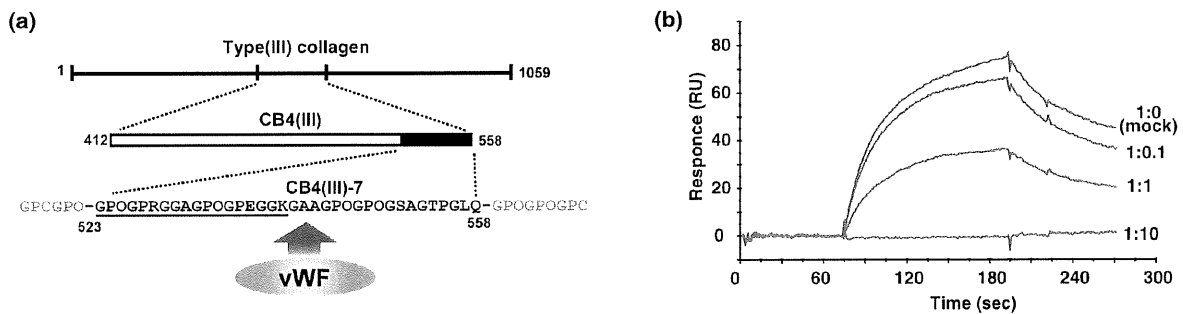


Fig.3 (a) タイプ III コラーゲンの CNBr 分解産物 CB4(III)をさらに断片化した合成ペプチド CB4(III)-7 は vWF と結合することが示される一方、下線で示す 523-540 のみを含むペプチドでは vWF との結合が観測されないことが報告されている。O は Hydroxyproline を示す。(b)A3 ドメインを固定化し、アセチル化を施したタイプ III コラーゲンをインジェクトしたときのセンサーグラム。コラーゲンに含まれる Lys 残基と反応に用いたアセチル化試薬 N-acetylsuccinimide のモル比を示す。

以上の結果に基づき、KGAA 配列を含むコラーゲンペプチドを作製し、A3ドメインとの相互作用を解析した。A3 ドメインとコラーゲンペプチド複合体の交差飽和実験を行ったところ、交差飽和の影響を強く受けた残基が A3 ドメインの分子前面において観測されたことから、コラーゲンペプチドがネイティブコラーゲンと同じ様式で A3ドメインと結合していることが明らかとなった (Fig.4a)。また、KGAA 配列を含むコラーゲンペプチドと均一¹⁵N 標識 A3ドメインと混合して HSQC スペクトルを測定した。その結果、コラーゲ

ン結合部位近傍に位置するいくつかの残基が顕著な化学シフト変化が認められ、KGAA 配列を含むコラーゲンペプチドが A3ドメインと特異的な相互作用を示すことがさらに確認された (Fig.4b)。興味深いことに、化学シフト変化はコラーゲン結合部位よりもむしろそのやや上部に強く観測されており、コラーゲン結合に伴う構造変化が生じている可能性も示唆される。

次に KGAA 配列を含む合成コラーゲンペプチドの Cys 残基へスピンラベル試薬 MTSL ((1-oxyl-2,2,5,5-tetramethyl- Δ 3-pyrroline-3-methyl)methanethiosulfonate) を導入した。スピンラベルなどのラジカル分子は近接する核スピンの緩和を強く促進し、周囲およそ 20 Å 以内に位置する原子の NMR シグナル強度を減少させる。本実験においては、A3ドメインとスピンラベル試薬の非特異的な相互作用に由来する影響を補正するため、ラジカルによる緩和速度の増大値 ΔR_2 を評価の尺度とした。MTSL 化したコラーゲンペプチド存在下において測定した A3ドメインのシグナル強度と、MTSL 試薬のみが存在する状態で測定した A3ドメインのシグナル強度比から算出した補正後の ΔR_2 値を A3ドメインの立体構造上にマッピングした。その結果、ラジカルによる緩和速度の増大を示す残基はヘリックス 4 およびそれに続くループ領域に集中して存在した (Fig.4c)。MTSL は認識配列よりも N 末端側に位置していることから、コラーゲンは N 末端方向をヘリックス 4 側に C 末端方向をヘリックス 3 側に向けた配向で結合していることが明らかとなった (Fig.4c)。

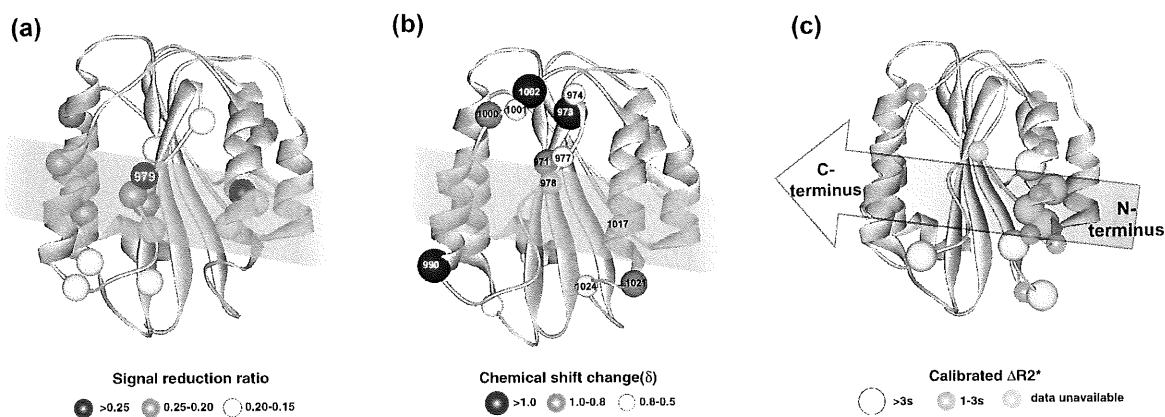


Fig.4 (a)A3ドメインと KGAA 配列を含むコラーゲンペプチドに対して交差飽和法を適用した結果を示す。ネイティブコラーゲンを使った TCS 実験の結果より明らかとなっているコラーゲン結合部位を、半透明の帯にて表示している。(b)コラーゲンペプチド存在下において、顕著な化学シフト変化を示した残基を表示した $[\delta = \{(\Delta\text{NH})^2 + (\Delta\text{N}/5)^2\}^{1/2} * 100]$ 。(c)ラジカル存在下で顕著に緩和速度が増大した残基の位置を示す。この実験では、上段の配列中 * で示す Cys 残基にスピンラベル試薬 MTSL が導入してある。明らかとなったコラーゲンの結合の方向を半透明の矢印で示した。

【総括】

本研究では TCS 法を利用することにより、A3ドメインにおけるコラーゲン結合部位の同定に成功した。この結果は線維型コラーゲンのように不溶性・不均一性を有する生体物質を含むサンプルを対象とした原子レベルの相互作用解析が可能であることを示した最初の例である。また、結合界面の情報等を用いて認識するコラーゲン配列 KGAA を同定し、この配列を含むコラーゲン模倣ペプチドが実際に A3ドメインと相互作用していることを示すとともに、スピンラベル実験からコラーゲン複合体構造に関する情報を得ることに成功した。今後 NOE などの距離情報を収集して複合体構造をさらに精密に決定することにより、vWF をターゲットとした抗血栓薬の開発へとつながっていくことを期待する。