

# 審査の結果の要旨

氏名 西田 紀 貴

フォンヴィルブランド因子(vWF)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と題する本論文は、新規 NMR 測定法である転移交差飽和法を利用して、vWF のコラーゲン結合ドメインである A3 ドメインの基質認識メカニズムを明らかにした研究成果を述べたものである。全体は主に2つのセクションに分かれており、第1章の序論に続く第2章は転移交差飽和法を利用した A3 ドメインのコラーゲン結合部位の決定、第3章は 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と題されている。

第2章においては、まず A3 ドメインの大腸菌大量発現系を構築して、主鎖アミドシグナルを三重共鳴法によりほぼ完全に帰属している。続いて、A3 ドメインのコラーゲン結合部位を決定するために転移交差飽和法を適用している。この方法は、複合体形成時に受けた飽和の影響を遊離状態において観測しているため、原理的には複合体の分子量に制限を受けることなく結合界面を決定できると考えられていた。本研究で行われた A3 ドメインと線維型コラーゲン複合体に対する転移交差飽和実験の結果は、この手法がコラーゲンのような巨大かつ不溶性の生体物質に対して適用可能であることを実験的に示すものである。転移交差飽和実験の結果の妥当性は、部位特異的変異体のコラーゲン結合活性を調べることにより精密に裏付けが行われている。転移交差飽和実験の結果、A3 ドメインのコラーゲン結合部位は分子の前面に形成されており、コラーゲンのトリプルヘリックスをちょうど収容することができる溝が形成されていることが認められる。以上の結果にもとづいて、A3 ドメインとコラーゲンモデルペプチド複合体の構造が構築されている。この A3 ドメイン・コラーゲンペプチド複合体の構造とインテグリン $\alpha 2$ -I ドメイン・コラーゲン複合体の結晶構造を比較して、A3 ドメインと $\alpha 2$ -I ドメインは共通したフォールドを形成し、共通のリガンドを認識するにもかかわらず、リガンド認識様式は全く異なっていることが明らかにされた。このような同一のフォールドを有するタンパク質間で、共通するリガンドタンパク質の認識様式が全く異なっているということはこれまでに例がなく、新たな知見を与えている。

第3章においては、転移交差飽和実験の結果から明らかとなった A3 ドメインのコラーゲン結合界面の情報を用いて、A3 ドメインが認識するコラーゲン配列の探索が行われている。A3 ドメインのコラーゲン結合溝が多くの疎水性残基によって構成されていること、他のコラーゲン結合タンパク質と比較して溝の形状が浅いことから、A3 ドメインは疎水性で側鎖が小さい残基を認識することを推測している。また、コラーゲンへの化学修飾実験およびこれまでの文献報告から、A3 ドメインと相互作用することが考えられるコラーゲンセグメント KGAA 配列が同定された。KGAA 配列を含むコラーゲン模倣ペプチドを作製し、A3 ドメインとの複合体に対して交差飽和実験を適用したところ、KGAA 配列が A3 ドメインとネイティブコラーゲンと同じ様式で相互作用することが確認されている。またコラーゲンペプチドをスピラブル化して、コラーゲンの結合の配向を決定することに成功している。以上の結果に基づいた A3 ドメイン・コラーゲンモデルペプチド複合体の構造は

KGAA 配列が認識されることをよく説明しており、結果の妥当性が裏付けられている。

フォンウィルブランド因子(vWF)は血管損傷部位において露出した血管内皮下コラーゲンと血小板を架橋することにより、血小板凝集反応を引き起こす。本研究の結果は、未だ十分な解明がなされていない、血小板粘着反応が進行するメカニズムの解明において大きく貢献するものである。また、本研究におけるvWF-A3 ドメインとコラーゲンとの相互作用様式の解明によって、今後抗血栓薬の開発につながる可能性が開かれた。

以上、本研究の成果は、構造生物学および免疫学の領域に大きく貢献するものであり、これを行った学位申請者は博士(薬学)の学位を得るにふさわしいと判断した。