

# 論文の内容の要旨

## ディスコイディンドメイン受容体 2 による コラーゲン認識と活性化機構の解明

市川 治

【序】 Discoidin domain receptor 2 (DDR2) は、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線維をリガンドとする受容体型チロシンキナーゼ (RTK) であり、細胞の増殖、遊走などの生理機能や腫瘍細胞の転移、アテローム性動脈硬化などの疾患に関与している。DDR2 の活性化は、細胞外のディスコイディン (DS) ドメインとリガンドであるコラーゲンが結合することで誘起される (Fig.1)。修士課程までの研究において私は、DS ドメインの立体構造を解明し、転移交差飽和 (TCS) 法によりコラーゲン線維に対する結合残基を明らかとすることに成功した。しかしながら、DDR2 のコラーゲン結合様式を理解するためには、これらの知見に加えて DDR2 とコラーゲン複合体構造の解明が不可欠である。

また、DS ドメインへのコラーゲン結合により細胞内へとシグナルが伝達される機構は不明である。DDR2 は一般的な RTK とは異なり、リガンド非結合状態で膜貫通領域 (TM) が二量体を形成していることが報告されているため (Fig.1)、DDR2 の活性化機構の解明にはコラーゲン結合に伴う TM 構造の変化に関する情報を得ることが必要である。

本研究において私は、NMR 法により DDR2 とコラーゲンの複合体構造を解明し、シス

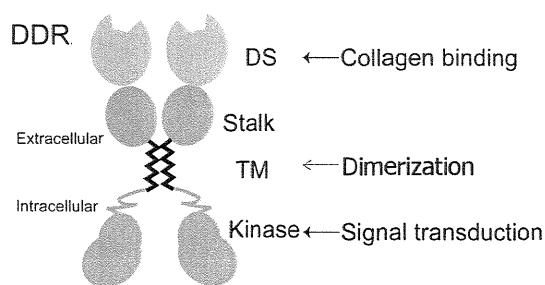


Fig. 1 DDR ドメイン構造の模式図と各ドメインの機能。DS ドメイン (アミノ酸番号: 30-185) によりコラーゲンと結合する。また、膜貫通領域 (TM) はコラーゲン非結合状態で二量体を形成している。

テインスキヤニング法などの生化学的手法により DDR2 の TM の二量体構造とコラーゲン結合に伴う変化の情報を抽出することに成功したのでここに報告する。

### 【結果と考察】 1.コラーゲン模倣ペプチドを用いたコラーゲン結合様式の解析

DDR2はコラーゲンタイプ II の<sup>394</sup>G-<sup>405</sup>O (O: 4-水酸化プロリン) 領域を認識することが報告されている。DDR2 の複合体構造解析には DDR2 結合配列を GPO の繰り返し配列で挟むことによりトリプルヘリックス構造を形成させたコラーゲン模倣ペプチド (GPO)<sub>4</sub>-<sup>394</sup>GPRGQOGVMGF<sup>405</sup>O-(GPO)<sub>4</sub> を用いた。ITC により DDR2-DS ドメインとの結合活性を解析したところ、野生型コラーゲンタイプ II と同程度の解離定数 24 μM を得た。また、TCS 法により同定した合成ペプチドに対する DS ドメインの結合界面は野生型コラーゲンタイプ II に対する結合界面とよく一致した。以上の結果から、DS ドメインはコラーゲン線維のうち一本のトリプルヘリックス鎖を認識することが判明した。そこで、ペプチドを用いて複合体の解析を以降行うこととした。

### 2. DS ドメインとコラーゲン複合体における距離情報の抽出

コラーゲンに対して DS ドメインが結合する配向を常磁性緩和促進 (PRE) 実験により決定した。DDR2 結合配列を含むコラーゲンペプチドの C 末端に、三量体構造を安定化させる foldon を付加したコンストラクト (FFCP: foldon fusion

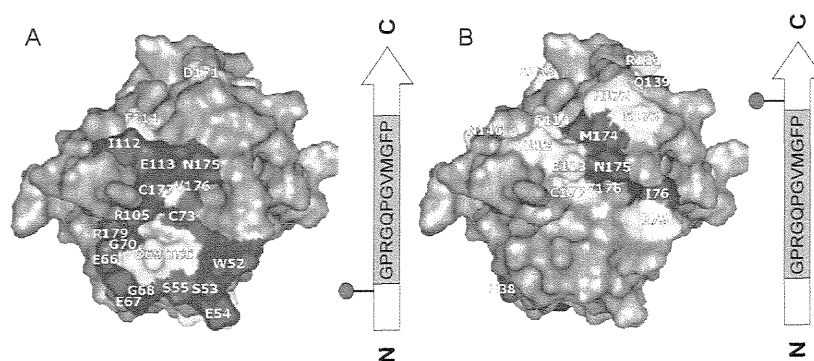


Fig. 2 A. N 末端側に MTSL 修飾した FFCP を用いた PRE 実験の結果。アスコルビン酸による還元前後のシグナル強度比に基づき DS ドメインの表面構造にマッピングした。赤: 強度比 0.74 以下, 黄: 0.74-0.8. B. C 末端側に MTSL 修飾した FFCP を用いた PRE 実験の結果。赤: 強度比 0.8 以下, 黄: 0.8-0.9.

collagen peptide) を大腸菌にて調製後、Cys 残基ヘスピンラベル試薬 MTSL 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促進し、周囲およそ 15Å 以内に位置する原子の NMR シグナル強度を減少させる。DDR2 結合配列よりも N 末端側にスピンラベルを導入した場合にシグナル強度が減少した残基は、Fig. 2A 下側の領域に集中して存在した。一方、C 末端側にスピンラベルを導入した場合には、Fig. 2B 上側に存在する残基のシグナルが強度減少した。以上の結果から、DS ドメインの W52-G70 領域に対してコラーゲンが N 末端側を向けた配向で結合することが明らかとなった。

続いて、コラーゲンと DS ドメインの近接残基対をアミノ酸選択的転移交差飽和 (ASTCS) 法により決定した。ASTCS 法では、特定のアミノ酸のみに <sup>1</sup>H 標識を施した FFCP を用いて TCS 実験を行うことにより、当該アミノ酸からおよそ 5 Å 以内に存在する DS ド

メイン上の残基を決定することが可能である。Arg, Val, Met, Phe についてアミノ酸選択的に  $^1\text{H}$  標識を施した FFCP を調製後、ASTCS 実験を行った。その結果、Arg 標識体については顕著な強度減少を示す残基は観測されなかったものの、Val 標識体では、W52 側鎖、A57、R105、R105 側鎖、A107、E113 が、Met 標識体では W52、W52 側鎖、S53、C73 が、Phe 標識体では R105 側鎖、N175 側鎖、C177 が 20% 以上顕著に強度減少した (Fig. 3)。 $^1\text{H}$  標識したアミノ酸ごとに別々のカラーゲン結合残基のシグナルが強度減少したことから、アミノ酸選択的な距離情報を抽出できたと判断した。

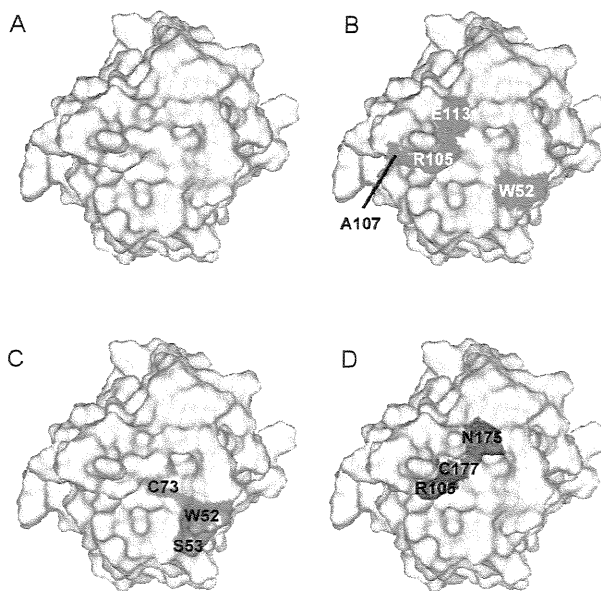


Fig. 3 Arg (A), Val (B), Met (C), Phe (D) 選択的  $^1\text{H}$  FFCP を用いた ASTCS 実験の結果。DS ドメインの表面構造に 0.2 以上のシグナル強度減少率を示した残基を色付けて示した。

### 3. DS ドメインとコラーゲンの複合体モデルの構築

PRE 実験と ASTCS 実験の結果に基づいて DS ドメインとコラーゲンの複合体モデル構造を HADDOCK により作製した (Fig. 4)。得られた複合体構造において、DDR2 結合への重要性が示されているコラーゲンの Met が、W52 と C73 で形成される疎水性領域と相互作用している。W52 に Ala 変異を導入すると、コラーゲンに対する結合親和性が 30 分の 1 に低下するため、W52 と Met の疎水性相互作用は重要であると考えた。同じく、相互作用に重要な Phe の側鎖が C177 などの疎水性残基で形成されるくぼみに位置しており、嵩高で疎水性の芳香環が相互作用するのに適している。

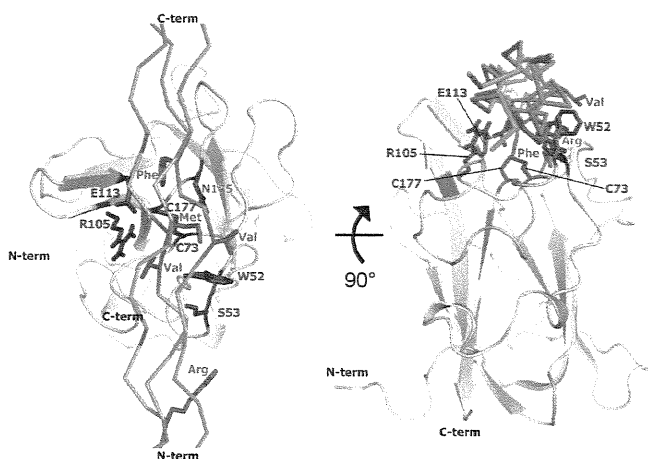


Fig. 4 DS ドメインとコラーゲンの複合体構造。相互作用に重要な残基について側鎖を表示した。

### 4. 膜貫通領域の二量体構造解析

膜貫通領域 (TM) の近接残基対は全長の DDR2 を用いて脂質二重膜中で解析する必要が

あるため、DDR2 を 293T 細胞に発現させ、システインスキャニング法により解析した。システインスキャニング実験では、DDR2 の特定の残基に Cys を導入し、SH 基を介したジスルフィド結合形成の有無をみることで、二量体中で当該残基が近接しているかを調べる。まず、DDR2 の内在性の遊離 Cys 残基に Ser 変異を導入した C288S/C404S 変異体に対して、TM とその近傍の残基について一残基ずつ Cys 変異を導入し、コラーゲン刺激によるリン酸化活性を確認した。コラーゲン非存在下におけるシステインスキャニング実験の結果、TM 領域の変異体は周期的にジスルフィド結合を形成した。これらの残基は TM ヘリックスモデル構造上で片側の面に局在したため、この面で二量体を形成すると考えた (Fig. 5)。また、細胞外膜近傍領域もジスルフィド形成効率が高く、コラーゲン非存在下における二量体構造中において近接していることがわかった。

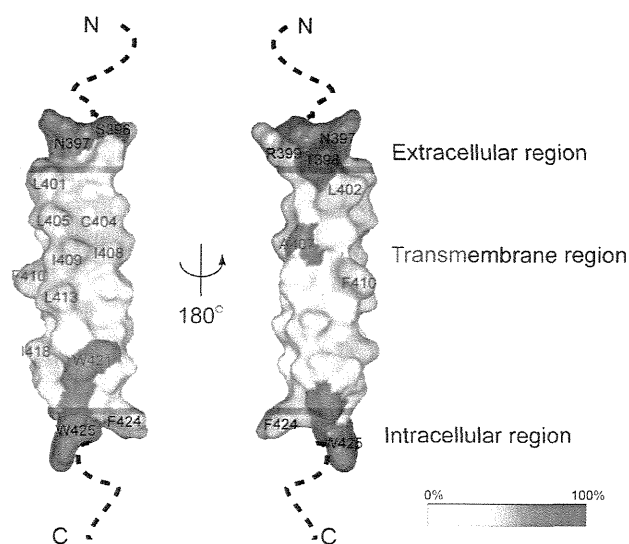


Fig. 5. DDR2 の TM とその近傍領域のシステインスキャニング実験結果。 $\alpha$ -ヘリックスモデル構造上に、ジスルフィド形成効率が高い残基ほど濃い黒色にて示した。

## 5. コラーゲン存在下における DDR2 全体構造の解析

続いて、コラーゲン非存在下で形成されていた二量体が、コラーゲン刺激に伴ってどのように変化して活性化するかについて解析した。自発的にジスルフィド結合を形成する細胞外膜近傍残基の変異体(N397C, T398C, R399C) についてコラーゲン刺激した状態で、二量体と単量体のリン酸化効率をそれぞれ調べた結果、主に単量体においてリン酸化が観測された。この結果から、DDR2 二量体ではリン酸化されにくく、コラーゲン刺激に伴って細胞外の膜近傍領域における二量体が解離することにより、キナーゼドメインが活性化することが示唆された。

さらに、コラーゲン刺激に伴う DDR2 の全体構造の変化を明らかとするため、細胞内のみ遊離のシステインを有する C288S/C404S 変異体を用いて、コラーゲン存在下と非存在下において非還元状態の電気泳動を行った結果、コラーゲン存在下においてのみ多量体由来するバンドが出現した。多量体バンドの出現は、細胞内のシステイン残基が近接していることを示しており、多数の DDR2 がコラーゲン結合を介して空間的に密集していることを示唆する。以上の解析から、DDR2 はコラーゲン刺激に伴って、二量体の解離に加え、DDR2 の細胞膜上における密度が上昇することが明らかとなった。

## 6. DDR2 活性化のモデル

コラーゲン非存在状態では、DDR2 は TM 領域を介した対称な二量体を形成している。コラーゲン線維上で規則的に離れて分布する認識配列に結合することに伴い、二分子の DS ドメインが、空間的な相対配置を制御される。コラーゲン結合により、DDR2 二量体の二分子の DS ドメインが空間的に引き離されることで、ストーク領域を介して TM 領域へと情報を伝える。その結果、DDR の TM 領域で形成されていた二量体が解離し、リン酸化を受ける単量体が生じる。さらに、コラーゲン結合を介して DDR2 の局所的な密度が高くなり、より効率的な相互リン酸化が進行するという、活性化機構が考えられる。

【総括】本研究では、NMR 法を用いた PRE 実験および ASTCS 実験により、コラーゲンと DDR2 の複合体構造を解明した。また、不活性状態における DDR2 膜貫通領域の二量体構造情報とコラーゲン結合に伴う変化を抽出することに成功した。以上の結果を総合して、リガンド結合に伴う二量体の解離が活性化を誘起するという、新たな RTK 活性化スキームを提唱した。今後、本研究において明らかとなった複合体構造に基づくコラーゲン結合阻害剤の設計や、TM 領域の二量体構造を安定化する薬剤の探索により、DDR2 活性化を阻害する抗腫瘍薬の開発へとつながっていくことを期待する。

【参考文献】Ichikawa, O., Osawa, M., Nishida, N., Goshima, N., Nomura, N., Shimada, I. (2007) *EMBO J.*, **26**, 4168-4176.