

審査結果の要旨

氏名 市川 治

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と題する本論文は、核磁気共鳴 (nuclear magnetic resonance; NMR) 法と生化学的な手法を用いて、ディスコイディンドメイン受容体 2 (discoidin domain receptor 2; DDR2) とコラーゲンの相互作用と活性化について解析した研究成果を述べたものである。本論文は、五つの章からなり、第一章において序論を述べ、第二章においてコラーゲンとの相互作用に関する実験の結果をまとめ、第三章において DDR2 の活性化に関する実験の結果をまとめ、第四章において実験結果に対する考察と、第二章と第三章を総合してコラーゲンによる DDR2 の活性化機構に関して考察を加え、第五章において実験材料および方法を記述している。

第二章においては、DDR2 のコラーゲン結合ドメインである DS ドメインとコラーゲンの相互作用について解析した研究成果を述べている。まず、DDR2 認識配列を含むコラーゲン模倣ペプチドを用いて、結合親和性と結合のストイキオメトリを決定している。また、DS ドメインとコラーゲン模倣ペプチド間の距離情報を抽出する NMR 実験を行い、得られた構造情報に基づいて DDR2-コラーゲン複合体モデル構造を決定している。

DDR2 は、合成コラーゲンペプチドを用いた解析を行った先行研究によりコラーゲンタイプ II の ³⁹⁴G-⁴⁰⁵O (O: 4-水酸化プロリン) 領域を認識することが示されていた。本研究においては、DDR2 とコラーゲン模倣ペプチドの性状解析を行うため、DDR2 結合配列を GPO の繰り返し配列で挟んだコラーゲン模倣ペプチドを用いている。等温滴定カロリメトリにより DDR2-DS ドメインとの結合活性を解析し、野生型コラーゲンタイプ II と同程度の解離定数で結合することを明らかとしている。また、NMR 法による解析も行うことで、一分子の DS ドメインが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を明らかとしている。

続いて、複合体の構造情報を得るため、まず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 (paramagnetic relaxation enhancement; PRE) 実験により決定している。解析には、大腸菌にて調製した DDR2 結合配列を含むコラーゲン模倣ペプチドにスピンラベル試薬を導入したペプチドを用いている。スピンラベルを導入したペプチドにおいて特異的に観測された NMR シグナルの強度減少から、DS ドメインのループ 1・2 と呼ばれる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を明らかとしている。さらに、コラーゲンと DS ドメインの近接する残基対を明らかにするため、アミノ酸選択的転移交差飽和 (amino acid-selective transferred cross-saturation; ASTCS) 実験を行っている。コラーゲン上に存在するバリン、メチオニン、フェニルアラニンと近接する DS ドメイン上の残基をそれぞれ同定している。

以上の 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作製している。得られた複合体構造から、DS ドメインは疎水性残基を多く含む

溝において、コラーゲン配列上で特徴的な嵩高で疎水性の側鎖を持つアミノ酸と相互作用することで特異的に認識する機構を明らかとしている。

第三章においては、DDR がリガンド非存在下で膜貫通領域において形成している二量体構造がコラーゲン結合に伴ってどのように変化するかについて、全長の DDR2 を用いた生化学的な解析により膜貫通領域の構造情報を抽出している。膜貫通領域 (TM) の近接残基対は全長の DDR2 を 293T 細胞に発現させ、生化学的な手法により解析している。まず、システインスキャニング法により、TM とその近傍の残基について距離情報を抽出することで、コラーゲン非存在下における TM の二量体を形成する界面を決定している。

また、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も解析している。細胞外膜近傍において二量体を形成した DDR2 においては単量体と比較してリン酸化されにくいことを明らかにしている。この結果から、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と考えている。さらに、コラーゲン刺激に伴う DDR2 の全体構造の変化を非還元状態の電気泳動により解析することで、コラーゲン存在下においてのみ細胞内領域を介した多量体に由来するバンドが出現することを示している。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と考えている。

第四章においては、第二章の結果である特定のコラーゲン配列を認識する機構と、第三章の結果である DS ドメインの構造変化さらに膜貫通領域の構造変化に関する知見を総合して DDR の活性化機構等について考察している。すなわち、コラーゲン非存在状態で TM 領域を介した二量体を形成している DDR2 が、コラーゲン線維に結合することに伴って DS ドメインどうしの空間的な相対配置を制御され、ストーク領域を介して TM 領域へと情報を伝えると考えている。その結果、DDR の TM 領域で形成されていた二量体が解離してリン酸化を受ける単量体が生じ、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ることで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を考えている。このような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機構は、従来の RTK の活性化機構とは異なっており、本研究の結果から新たな RTK 活性化スキームを提唱している。

以上、本研究の成果は、コラーゲンによる DDR2 の活性化機構の解明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。