

## ヒト CD44 のヒアルロン酸結合メカニズムに関する理論的研究

(材料設計) 稲塚 有紀

### 1. 諸言

CD44 はリンパ球のローリングや炎症部位への浸潤など、様々な生命現象における細胞接着や細胞遊走に関与する一回膜貫通型のタンパク質で、細胞外領域にヒアルロン酸結合ドメイン (hyaluronan binding domain;HABD)を持つ。一方、CD44 のリガンドであるヒアルロン酸 (hyaluronan acid;HA)は、グルクロン酸と N-アセチルグルコサミンの二糖の繰り返しからなる糖鎖である。CD44 と HA は血流下で一過的な接着と脱着を繰り返すことで細胞のローリングを担っていることが知られている。CD44 HABD は HA の結合の有無に関わらず、C 末端領域が一定の構造を形成した状態 (ordered(O)-state) と形成していない状態 (partially disordered(PD)-state)の間で平衡状態にあり、この平衡は HA 非結合状態では O-state に、HA 結合状態では PD-state にシフトするとされている[1]。

disorder 領域を切断して CD44 HABD のモデル化をした先行研究では、HA は一定距離を保ちながら CD44 HABD に近づいたり、離れたりを繰り返していることがわかった。本研究では、disorder 領域を含めたシミュレーションを行い、先行研究との比較による disorder 領域の役割の解明、HA 結合および非結合状態の熱力学安定性の評価を目的とした。

### 2. 計算方法とモデル

ヒト CD44 HABD の結晶構造(PDB ID: 1UUH)、NMR 構造(PDB ID:2I83)がそれぞれ O-state、PD-state にあると仮定し、HA 結合状態に対してはマウス CD44 HABD の結晶構造(PDB ID:2JCR)からホモロジーモデリングを行いモデル化した(Fig. 1)。

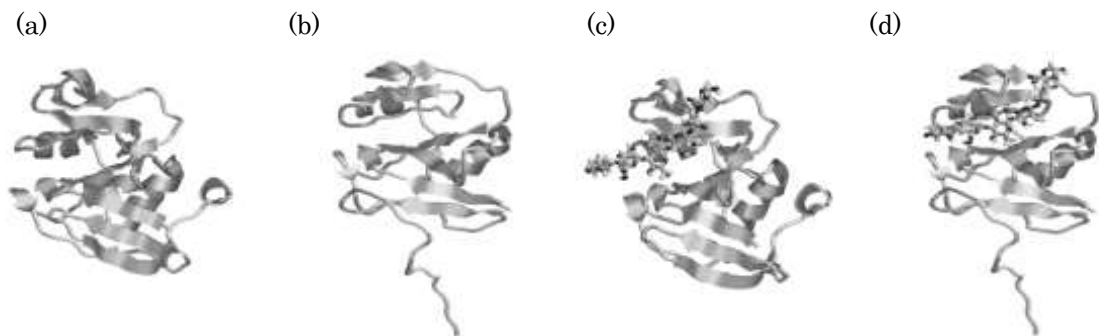
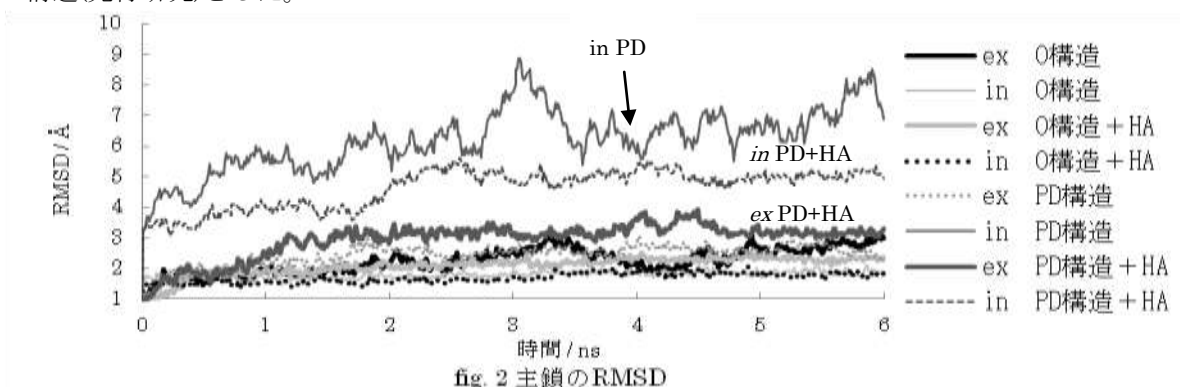


Fig. 1 計算で使用したモデル (a)O 構造、(b)PD 構造、(c)O 構造+HA、(d)PD 構造+HA へリックスとストランドをリボン表示、その他を棒状表示で示している。

MD シミュレーションは myPresto ver.4.0 を用い、NVT アンサンブル、温度 300 K、力場 Amber99、cutoff 12 Å、溶媒 tip3p モデル、長距離クーロン力 FMM 法で行った。タイムステップ 2 fs、平衡化 1 ns、平衡後 6 ns の MD 計算を行った。自由エネルギー計算は、エンタルピー項を GBSA 法、エントロピー項を二面角の揺らぎをもって見積もった。

### 3. 結果と考察

1 ns 平衡化後の主鎖の RMSD を Fig. 2 に示す。なお、disorder 領域を含むタンパク質を including disorder domain(*in*)構造、切断しているタンパク質を excluding disorder domain(*ex*)構造(先行研究)とした。



O 構造については、HA 結合の有無に関わらず、disorder 領域を含むことで RMSD は約 2 Å 以内と一定になり、0.5 ~ 1.0 Å ほど *ex* 構造の結果より小さい値となっている。これは、disorder 領域により *ex* 構造部分が安定化されることに起因するものと考えている。一方、PD 構造は disorder 領域を含むことで HA 結合の有無に関わらず、*ex* 構造の結果より 2 ~ 4 Å 増大している。これは disorder 領域の自由度によるものである。また、*in* PD 構造は HA 結合により RMSD が約 1 Å 低下しており、2 ns 以降は約 5 Å を保っている。このことから、大きく揺らいでいる disorder 領域は HA の結合により安定するのではないかと考えられる。

*in* 構造の平衡後 6 ns の熱力学パラメータを Table1 に示す。自由エネルギーから HA 結合・非結合どちらに関しても O 構造の方が安定であることがわかる。これは先行研究の *ex* 構造の結果と一致しており、HA 結合状態に関して、実験で仮定されている O-PD 平衡状態と一致しない。したがって、HA 結合状態の PD 構造に関しては新たな結合サイトの検討と比較が必要であると考えられる。

Table1 平衡後 6 ns の熱力学パラメータ

<i>in</i> 構造	H(kcal)	TS(kcal)	G(kcal)
O	-4421.96	805.800	-5227.76
PD	-4177.82	850.245	-5028.07
O+HA	-4244.51	882.026	-5123.54
PD+HA	-3970.94	931.612	-4902.55

#### 参考文献

[1]Ogino,S.,Nishida,N.,Umemoto,R.,Suzuki,M.,Takeda,M. (2010) Structure.,18,649-656