

CD44 の構造遷移によるヒアルロン酸結合モードのアロステリック制御

(材料設計学) 松本 克久

1. 研究背景・目的

CD44 は多様な細胞間の接着を媒介する細胞接着分子の 1 つで細胞表面に広く分布しており、細胞接着に関与する現象にとって重要であることが分かっている。その現象の 1 つに細胞のローリング現象が挙げられる。CD44 ヒアルロン酸結合ドメイン(HABD)は血流下で糖鎖ヒアルロン酸(HA)と接着-脱着を繰り返すことで細胞ローリングが達成される。HA を介した細胞ローリングに対して様々な機構が提案されているがその詳細は明らかでない。

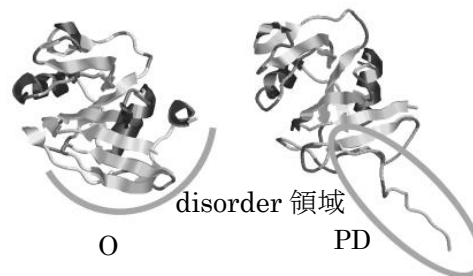


Fig. 1 CD44 HABD の O 構造と PD 構造

NMR 実験の結果より CD44 HABD は C 末端が一定の構造をとる Ordered State(O)構造と一定の構造をとらない Partially disordered(PD)構造の 2 構造が報告されており、2 構造間の平衡関係が HA と接着-脱着を制御しているとする two-state 機構が提案されている(Fig. 1)[1]。HA に対して低親和性の O 構造に血流等の外部摂動力が加わるにより、PD 構造へと遷移し HA 結合溝が形成され HA 高親和性へと移行すると考えられている。そこで本研究室では O、PD 両構造に実験でマウスに対して提案されている 2 つの結合様式を仮定し、MD シミュレーションを行ったところ O 構造と PD 構造で HA に対する結合様式が異なり、PD 構造がより高親和性であるという Two-State 機構を支持する結果となった[2]。本研究においては、2 つの構造間移行のダイナミクスの詳細を明らかにし、CD44HABD と HA の接着-脱着のメカニズムを解明することを目的とする。

2. 研究方法

ヒト CD44 HABD(PDB ID:1UUH)の 5 つのアミノ酸残基(Asn149、Arg150、Arg154、Lys158、Tyr161)について Ala 変異体を作成し、30 ns の分子動力学(MD)シミュレーションを行った。NVT アンサンブル、300 K、力場を Amber99、TIP3P とし、タイムステップは 2 fs、相互作用カットオフ長は 12 Å とした。全ての計算に myPresto プログラムを用いた。

3. 結果と考察

3.1 先行研究で提案されたメカニズムと本研究における仮説

NMR で提示されている PD 構造は disorder 領域が完全にほどけた状態であるが、生体内で細胞膜に結合している場合にはこの構造をとることは不可能である。β9 の C 末端側が β7/β8 ループが形成している輪を潜り抜ける形となっているためである。我々は PD 構造では disorder 領域は完全にほどけてしまうのではなく、それぞれの 2 次構造がずれてしまうことが重要なのではないかと考えた。そこで我々は MD 計算で得られた O 構造と PD 構造の比較を行ったところ、O

構造では $\beta 8$ は $\beta 9$ と $\beta 0$ の前半分ほどのアミノ酸残基と相互作用している一方、PD 構造では $\beta 9$ が無くなることから、 $\beta 8$ は $\beta 0$ 全体と相互作用することになる。この相互作用の変化はさらに $\beta 0$ と $\beta 1$ 間の相互作用を通じて他の 2 次構造間の相互作用様式に変化を与えている。これらの観察結果から以下の仮説を立てた。disorder 領域の C 末端が細胞ローリングとともに引っ張られると disorder 領域はすべてがほどけてしまうのではなく、 $\beta 9$ が引っ張られることで $\beta 8$ との相互作用にずれが生じる。そのずれは $\beta 0$ との相互作用に作用し、さらに 2 次構造間の相互作用を伝搬していき、最終的に HA 結合部位にずれが生じる(Fig. 2)。

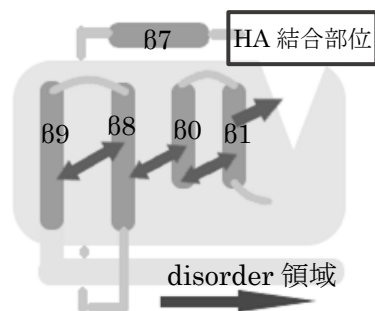


Fig. 2 仮定したメカニズムの模式図

O-PD 構造遷移の情報伝搬に重要であると考えられるアミノ酸残基として、O 構造における $\beta 0$ 、 $\beta 1$ 、 $\beta 8$ 、 $\beta 9$ の 2 次構造間のパッキングを強固にするものを候補として、自由エネルギー解析と結合距離解析より Asn149、Arg150、Arg154 を選出した。さらに、ローリング実験および Steered MD の結果から disorder 領域(残基番号 154~169)の Tyr161 が $\alpha 1$ の Glu48 と塩橋を形成しているのに対し血流等の外部摂動力が加わることで塩橋が破壊され、続いて構造の遷移が誘起されると報告されている [3]。このことから、Tyr161 も重要な残基として採用した。

3.2 CD44 HABD の Arg154 と Tyr161 の役割

5 つの Ala 変異体の MD シミュレーションを行った結果、Tyr161-Glu48 間の相互作用の消失(弱まり)が HA 結合部位付近の構造を大きく変化させることが分かった。また、R154A 変異体で Tyr161-Glu48 間の距離の変化が観察された(Fig. 3)。これらの結果から、Arg154-Asp23 の塩橋が disorder 領域の”留め具”の機能を果たしており、この塩橋の消失(弱まり)が disorder 領域の構造変化を誘起し、その結果として Tyr161-Glu48 間の相互作用の切断が起こる可能性が示された。

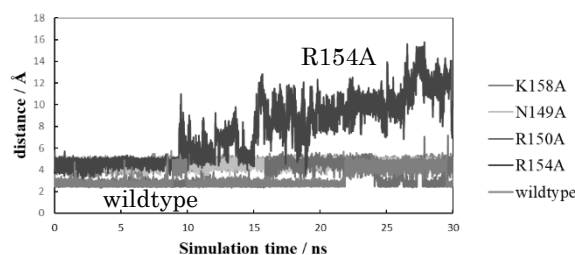


Fig. 3 Ala 変異体における 30ns 間の Tyr161(O^N)-Glu48(O^E)の距離変化

[参考文献]

- [1] Ogino, S.; Nishida, N.; Umemoto, R.; Suzuki, M.; Takeda, M.; Terasawa, H.; Kitayama, J.; Matsumoto, M.; Hayasaka, H.; Miyasaka, M.; Shimada, I. Two-state conformations in the hyaluronan-binding domain regulate CD44 adhesiveness under flow condition. *Structure*. **2010**, *18*, 649-656
- [2] 堀岡洋太「Two State モデルによる CD44 のヒアルロン酸結合様式と接着機構に関する考察」京都府立大学院学位論文 **2018**.
- [3] Suzuki, T.; Suzuki, M.; Ogino, S.; Umemoto, R.; Nishida, N.; Shimada, I. Mechanical force effect on the two-state equilibrium of the hyaluronan-binding domain of CD44 in cell rolling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2015**, *112*, 6991-6996.