

特集：過渡的複合体が関わる生命現象の統合的理解
—生理的準安定状態を捉える新技術と応用—

CD44 の準安定なヒアルロン酸認識機構と細胞ローリング

西田 紀 貴, 嶋 田 一 夫

CD44 は細胞外マトリックスの主成分であるヒアルロン酸 (HA) を認識する受容体で、血流下で HA との一過的な接着と脱離を繰り返すことによって細胞のローリングを担っている。われわれは、CD44 ヒアルロン酸結合ドメイン (HABD) のリガンド認識機構を NMR 法によって解析し、HABD は C 末端領域が一定の構造を形成し、HA 低親和性を示す ordered (O)-state と一定の構造を形成せず HA 高親和性を示す partially disordered (PD)-state の間を常に交換する平衡にあることを明らかにした。また、2 状態平衡を完全に PD-state に固定した変異体を利用したローリング実験から、血流存在下で CD44 発現細胞が HA に効率よく接着し、かつ HA から適切に脱離してローリングを持続するためには、CD44 の 2 状態平衡の存在が必要であることを明らかとした。ローリングを担う接着分子の構造生物学的な解析はこれまでに多く行なわれてきたが、リガンド結合の有無にかかわらず 2 状態平衡が存在することや、細胞ローリングにおける平衡の重要性を示したのはこれが最初の例である。

1. はじめに

リンパ球などの免疫担当細胞が炎症部位へ遊走したり、リンパ節へホーミングしたりする際には、まず血液中を循環するリンパ球が血管内皮細胞上を一過的な結合と解離を繰り返しながら移動する、いわゆるローリングが起こる。最初のローリングのステップはセレクチンや CD44 などの細胞接着分子によって達成され、細胞がローリングしている間にケモカインなどの刺激によって細胞表面の別の接着分子であるインテグリンが活性化されることでその後の強い接着が達成される。その後、リンパ球は血管内皮細胞の間隙をすり抜けて間質組織へと移行し、さらに炎症部位などへの遊走が起こるといった過程をたどる (図 1A)。細胞の

ローリングは CD44 やセレクチン、ごく一部のインテグリンなど、限られた分子によってのみ担われており、細胞が血流下で適切に接着と脱着を繰り返すことで、内皮細胞上のローリングが達成されていると考えられている¹⁾。

CD44 は多くの細胞に発現し、上述の免疫反応におけるリンパ球のローリングなどの動態制御をはじめ、発生の際の器官形成や神経軸索形成、造血、創傷治癒など、さまざまな生命現象における細胞接着や細胞遊走に関与する。CD44 は一回膜貫通型のタンパク質であり、細胞外領域にはリガンド認識を担うヒアルロン酸結合ドメイン (hyaluronan binding domain; HABD) と、多くの糖鎖修飾部位を持つステム領域が存在し、膜貫通ドメインに続いて約 70 残基の短い細胞内領域によって構成される (図 1B)。CD44 のリガンドであるヒアルロン酸は、グルクロン酸と N-アセチルグルコサミンの 2 糖の繰り返しからなる負電荷に富んだ直鎖状の糖鎖で、全ての組織に存在する (図 1B)。また、炎症時にはヒアルロン酸が血管内皮細胞上に提示され、CD44 を介してリンパ球のローリングに関与していることが知られている。

本稿では、CD44 が血流存在下におけるローリングを達

東京大学大学院薬学系研究科 (〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1)

Two-state equilibrium of hyaluronan-binding domain is crucial for CD44-mediated cell rolling

Noritaka Nishida and Ichio Shimada (Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan)

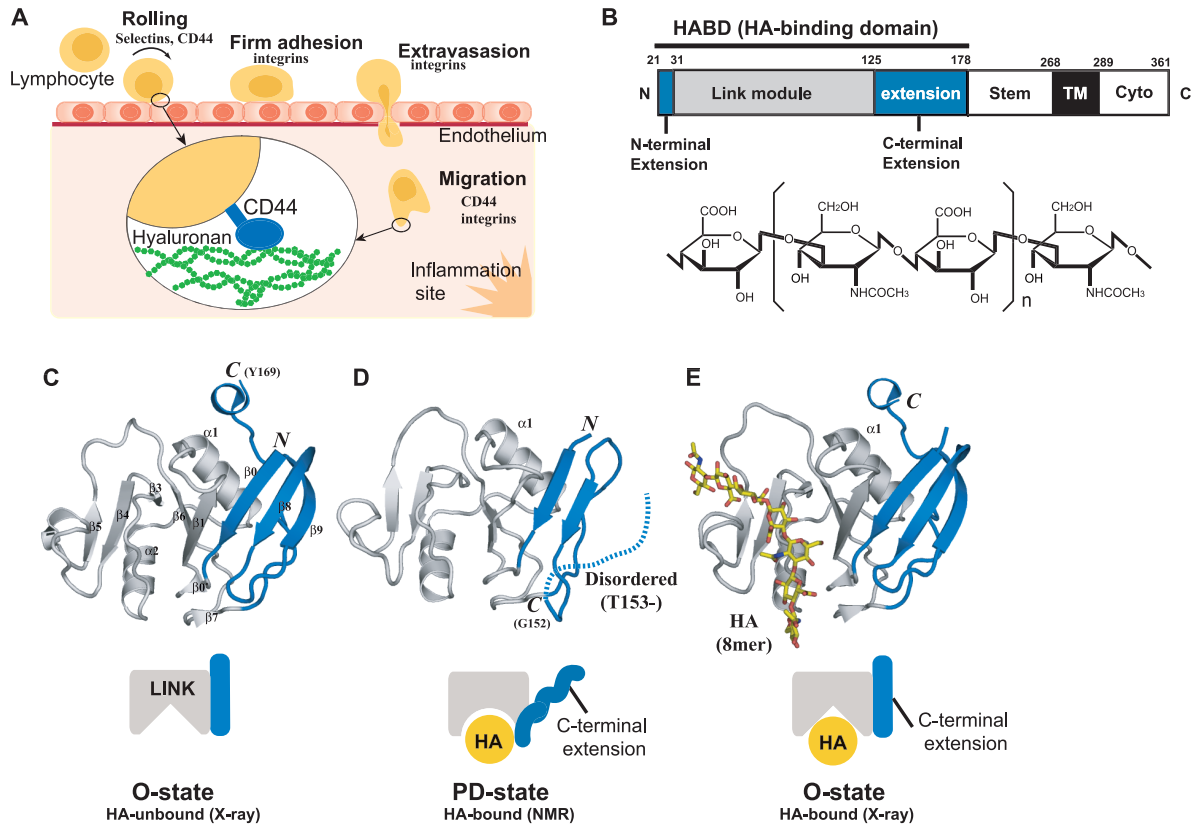


図 1

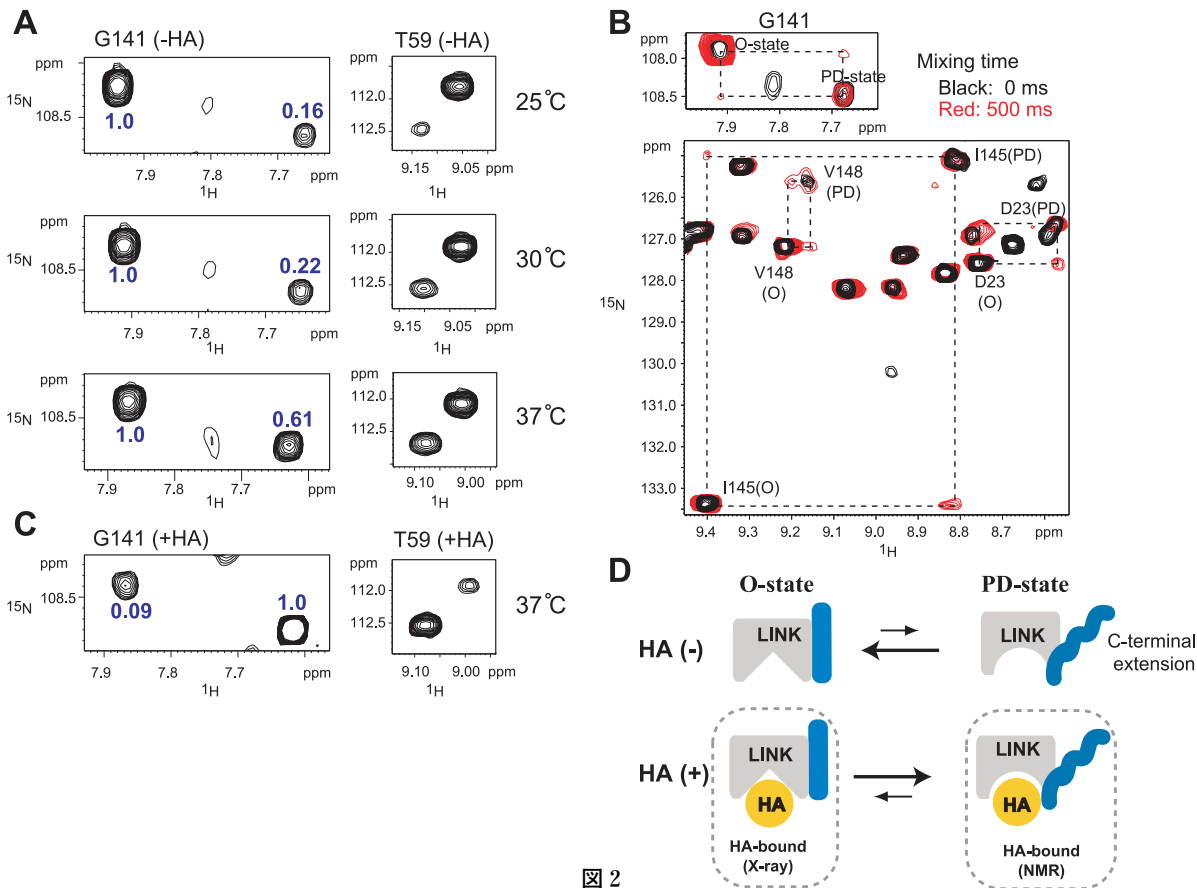


図 2

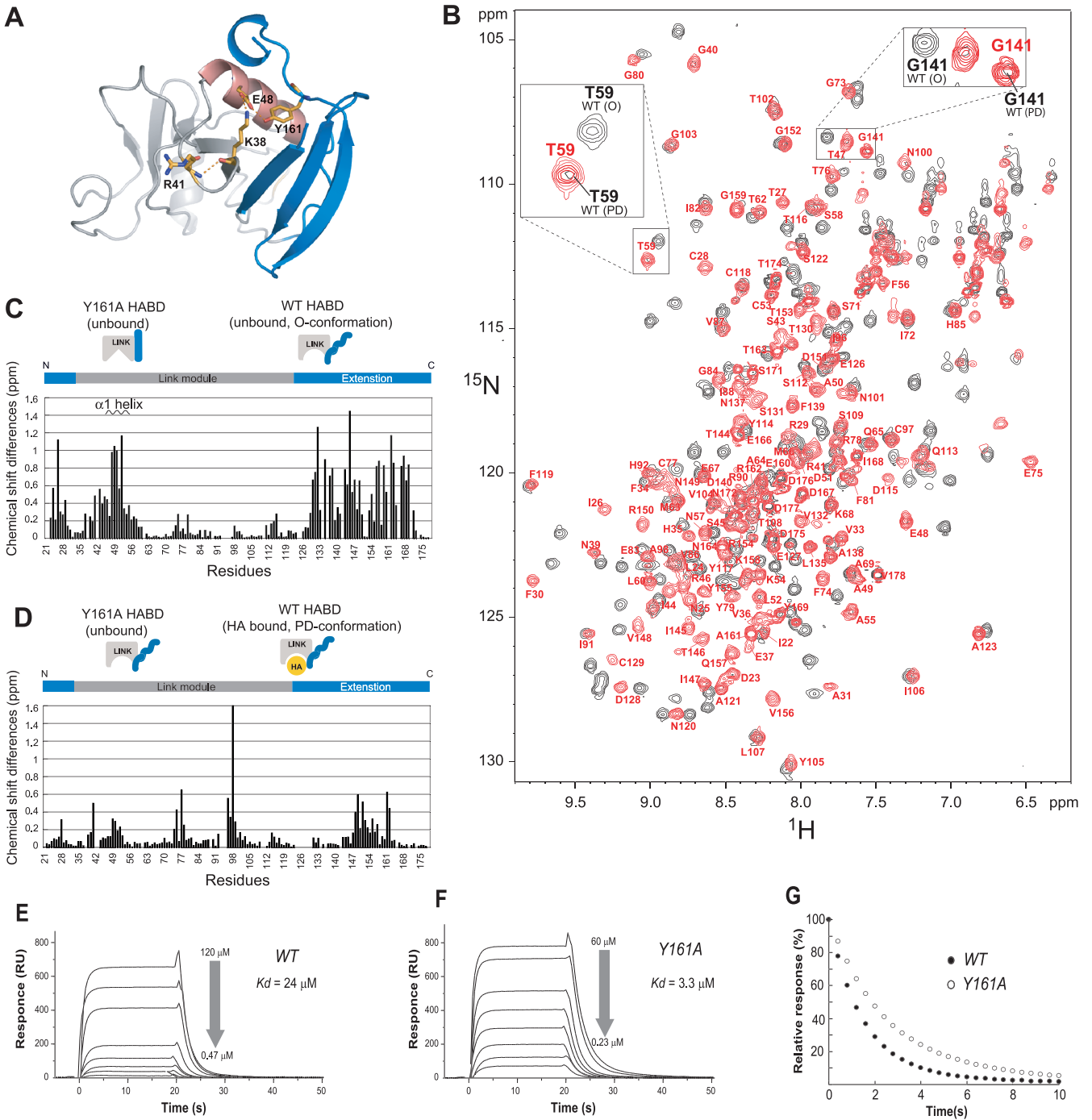


図 3

図 1 CD44 の生理的役割とこれまでの HABD に関する構造生物学的知見 (A)リンパ球の炎症部位への移行メカニズム. 1) ローリング, 2) 強い接着, 3) 漏出, 4) 遊走の過程においてさまざまな細胞接着分子が関与する. (B)CD44 の 1 次構造の模式図とそのリガンドであるヒアルロン酸 (HA) の構造. (C-E) ヒアルロン酸結合ドメイン (HABD) の立体構造. (C)HABD リガンド非存在下の結晶構造. (D)6 mer の HA 結合状態の NMR 構造. (E)8 mer の HA 結合状態の結晶構造.

図 2 HABD の 2 状態平衡の証明 (A) ヒアルロン酸非存在下および (C) 存在下の HSQC スペクトルで観測されるメジャーピークとマイナーピークの強度比の温度依存性. G141 と T59 についてメジャーピークに対するマイナーピークの割合を示す. (B)HA 非存在下において取得した ZZ-exchange スペクトル (黒: 混合時間 0 ms, 赤: 混合時間 500 ms) (D) 明らかとなったリガンド存在下, 非存在下における HABD の 2 状態平衡. 矢印の大きさは各状態の平衡の偏りを示す.

図 3 PD-state を安定化した変異体の作製 (A) 単独状態の HABD の結晶構造で観測される, リガンド結合部位 (R41) から C 末端領域にかけての相互作用ネットワーク (B) Y161A 変異体 (赤) と野生型 HABD (黒) の ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルの重ね合わせ (C) Y161A 変異体と野生型 HABD (リガンド非存在下: O-state) および (D) Y161A 変異体と野生型 HABD (リガンド存在下: PD-state) の HSQC スペクトルの間の化学シフト差の算出. (E) 野生型および (F) Y161A 変異体の SPR 法による HA 親和性の算出 (F) 野生型と Y161A 変異体の SPR センサーグラムにおける解離相の比較.

成する機構を、CD44のHA認識機構に基づいて明らかにしたわれわれの最近の研究成果を中心に紹介する²⁾。

2. CD44のヒアルロン酸結合ドメインの構造

1) 単独状態のHABDの構造

CD44のヒアルロン酸結合ドメイン(HABD)は、他のヒアルロン酸結合タンパク質にも保存されたリンクモジュールと、そのN末端およびC末端側の付加配列からなる約150残基のドメインである(図1B)。CD44と同様に、リンクモジュールと付加配列から構成されるヒアルロン酸結合タンパク質として、リンパ管上のLYVE-1が知られている³⁾。我々のグループでは、リガンド非存在下のHABDのトポロジーをNMR法により明らかとした⁴⁾。その後、CD44 HABDのNMR構造およびX線結晶構造の両方が報告された⁵⁾(図1C)。いずれの構造においても、CD44 HABDは3本の α ヘリックスと8本の β ストランドからなる構造をしており、リンクモジュールに対応する領域(図1B, グレー)と付加配列領域(図1B, 青)が密に相互作用して一つのドメインを形成していた。また、付加配列のN末端とC末端は近接しており、変異実験などから結合部位に重要と考えられる領域とは反対側に位置していた。

2) リガンド結合状態のHABDの構造

われわれのグループは、6糖HA鎖が結合した状態のCD44 HABDの溶液構造(HA鎖の構造は含まずHABDの構造のみ)の決定を行った(図1D)。その結果、単独状態のHABDの構造と比較して大きな構造変化が観測され、HA結合状態ではGly152以降のC末端領域の構造が一定の構造を形成していないことが明らかとなった。C末端領域が一定の構造を形成していないことは、タンパク質の運動性を検知する異核NOE実験においてC末端領域が高い運動性を示すことや、トリプシンによる限定分解実験でC末端領域の消化速度が亢進していることから裏付けられた。そこでわれわれは、リガンド非結合状態のC末端領域が一定の構造を形成した状態をordered(O) state, HA結合状態でC末端が一定の構造を形成していない構造をpartially disordered(PD) stateとよび、リガンド結合に伴ってO-stateからPD-stateへの構造変化が誘起されると考えた⁶⁾。さらに、34merのHA鎖が結合した状態で交差飽和実験を行い、HABD上のHA相互作用部位を同定した。その結果、HABDはリンクモジュールだけではなく、付加配列においてもHA鎖と接触していることが明らかとなった⁴⁾。

われわれのNMR構造に続いて、8糖のHA鎖との複合体状態のHABDの結晶構造が発表された⁷⁾。ところが、HA結合状態のHABDの結晶構造は、上記のNMR解析結

果と大きく矛盾するものであった(図1E)。まず、全体構造については単独状態とほぼ同じくO-state構造のまま8糖のHA鎖を認識しており、NMR構造で観測されたC末端領域のランダムコイル化を伴う構造変化は生じていなかった。また、HA認識様式についても、上述の交差飽和法による解析ではリンクモジュール領域と付加配列領域の両方がHA認識に関与していたのに対し、結晶構造ではHA鎖の接触面はほぼリンクモジュールのみに限局していた(図1E)。

3) HABDは常に2状態平衡にある

NMR構造と結晶構造の違いは何に由来するのか、我々はそのヒントを単独状態のHABDのNMRスペクトルに見出した。単独状態のHABDのHSQCスペクトルには帰属された各残基のメジャーなシグナルの他に、強度の弱いマイナーなシグナルが観測されていた(これは我々が単独状態のHABDの構造に進まなかった大きな理由の一つである)。これらのマイナーなシグナルは、NMR測定温度を上昇させると強度が増大し、逆に温度を下げると強度が下がることから、可逆的に二つの状態の存在割合が変化に対応することがわかった(図2A)。さらに、2状態間の交換を直接検知するためのNMR測定法であるZZ-exchangeスペクトルを単独状態のHABDについて測定すると、メジャーピークとマイナーピークの間クロスピークが観測された(図2B)。この結果は、HABDはメジャーピークとマイナーピークの状態の間を交換していることを示しており、ZZ-exchangeスペクトルで用いた混合時間(500ms)からその交換の時定数は数百ミリ秒のオーダーであることがわかった。さらに興味深いことに、HA存在下のHABDのHSQCスペクトルを測定すると、単独状態のマイナーピークの位置にシグナルが観測された(図2C)。このことから、単独状態のHABDに観測されたメジャーピークとマイナーピークは、HABDのO-stateおよびPD-stateにそれぞれ対応していることが明らかとなった。さらに、HA結合状態のスペクトルでもHA非存在下のメジャーシグナルの位置(すなわちO-stateに対応)にマイナーなシグナルが観測された(図2C)。よってHABDはHAの結合の有無にかかわらず、O-stateとPD-stateの間の平衡にあり、2状態の存在比は、HA単独ではO-stateに平衡が傾いているが、HAとの結合に伴いPD-stateにシフトすることが明らかとなった(図2D)。

HABDがHA結合の有無にかかわらず2状態平衡にあることは、HA結合状態のNMR構造および結晶構造の違いを合理的に説明する。NMRスペクトルにおけるピーク強度から、HA結合状態のHABDでは90%以上がPD-stateとして存在するが、O-stateも存在割合は10%以下ながら存在している。NMR解析においては溶液中で90%以上の

割合で存在する PD-state の構造が得られたと考えられる。一方、X 線結晶解析においては、C 末端領域がランダムコイル化した PD-state よりも C 末端領域が一定の構造を形成した O-state のほうが結晶化しやすく、存在割合の低い O-state が選択的に結晶に取り込まれたのではないかと考えられる。すなわち、HA 結合状態の HABD は、O-state と PD-state の両方の状態が存在し、NMR 構造は存在率 90% 以上のメジャー構造を、結晶構造は 10% 以下のマイナー構造を反映していると結論した。

3. 2 状態平衡と HA 親和性制御

以上の解析から CD44 HABD が単独状態および HA 結合状態のいずれの状態においても O-state と PD-state の間を交換していることが明らかとなった。そこで次に、HABD に見出された 2 状態平衡が CD44 の機能に与える影響を調べるため、構造平衡を片方の状態に固定した変異体の作製を行なった。CD44 の O-state と PD-state の構造の間の最も大きな違いとして、O-state にて形成されているリンクモジュールの $\alpha 1$ ヘリックスと C 末端領域の相互作用が、PD-state では失われている点が挙げられる (図 3A)。特に、C 末端領域の Y161 と $\alpha 1$ ヘリックス上の E48 と L52 の間の相互作用は O-state を安定化するのに必須と考えられる。そこで、Y161 をアラニンに置換した Y161A 変異体を作製し、HABD の平衡状態がどのように変化するか調べた。まず、Y161A の ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルを測定すると、HA 非存在下においても野生型 HABD のようなマイナーなシグナルは観測されなかった。また、野生型 HABD で 2 状態平衡が観測されたシグナルに着目すると、例えば HA 非存在下の G40 や T59 のマイナーなシグナルと一致する位置に、Y161A はただ一つのシグナルを与えた (図 3B)。また、リガンド非存在下の Y161A の HSQC スペクトルと、同じくリガンド非存在下の野生型 HABD の HSQC スペクトルを比較すると、付加配列の領域を含め分子全体にわたって大きな化学シフト差が観測されている (図 3C)。一方、リガンド結合状態の野生型 HABD の HSQC と比較すると、大きな変化した部位はリガンド結合部位に限局されている (図 3D)。この結果は、Y161A は HA 非存在下においてもリガンド結合型の HABD に類似していることを示しており、すなわち PD-state に安定化されていることを示している。さらに、異核 NOE による解析や、トリプシンによる限定分解においても、Y161A はリガンド非存在下において野生型のリガンド結合状態と同様の性質を示すことから、C 末端領域はランダムコイル化していることが示唆され、PD-state を形成していることがさらに裏付けられた。

Y161A HABD と野生型 HABD の HA 結合活性表面プラズモン共鳴 (SPR) 法により比較した (図 3E と 3F)。得

られたセンサーグラムは速い結合と解離の相互作用に特徴的な箱形であり、平衡に達した時に観測されたレスポンスを用いて平衡法により解離定数を算出した。その結果、野生型は K_d が $24 \mu\text{M}$ 、Y161A は $3.3 \mu\text{M}$ と見積もられ、Y161A HABD が野生型 HABD と比較して、約 7 倍高い HA 結合活性を有することが明らかとなった。野生型は O-state と PD-state が平衡として存在するのに対して、Y161A 変異体は、PD 状態のみを保持することから、O-state より、PD-state の方が、HA に対する親和性が高いことが示された。また、SPR センサーグラムの解離相に着目すると、Y161A 変異体の方が比較的遅い解離を示していることから、PD-state の方が、O-state と比較して、HA からの解離速度 (k_{off}) が遅いことが示唆された (図 3G)。以上より、PD-state は O-state よりも高親和性状態にあり、HABD は親和性の異なる 2 状態の間を交換していることが明らかとなった。

4. 細胞ローリングにおける 2 状態平衡の役割

1) CD44 安定発現細胞

次に HABD の 2 状態平衡が CD44 を介した細胞のローリング活性に与える影響を調べるため、CD44 を発現していない VMRC-LCD 細胞 (ヒト肺癌細胞由来) に野生型と Y161A 変異体 CD44 の遺伝子を導入した安定細胞株を作製した。得られた CD44 発現細胞をセルソーターにより発現量が同程度の細胞集団を回収し、以降の解析に用いた (図 4A)。また、野生型 CD44 と Y161A 発現細胞について、FITC 標識 HA に対する結合を FCM によって検出したところ、両者とも HA との結合に伴う蛍光強度の増大が観測され、その結合が HABD に対するブロッキング抗体で阻害されることから、両細胞とも特異的な HA 結合活性を保持していることが明らかとなった (図 4B)。また、流速非存在下で CD44 発現細胞の HA を固定したプレートに対する接着を比較したところ、CD44 を発現していない VMRC-LCD 細胞では全く接着が見られないのに対し、野生型あるいは Y161A 変異体を発現する細胞はいずれも同程度の接着を示した (図 4C)。野生型と Y161A 細胞で接着性に違いが観測されない理由として、流速非存在下では細胞上の CD44 と HA の間で multivalent (多価) な結合が形成されるため、一つ一つの受容体リガンド間の親和性の違いが反映されないほど安定な接着が達成されたと考えた。

2) ローリング実験

次に、HA 鎖を固定化したキャピラリーに CD44 発現細胞を灌流させ、流速存在下において CD44 発現細胞のローリングの観測を行なった。流速存在下で表面にずり応力 (shear stress) が生じる。Shear stress は血流の速さや流体

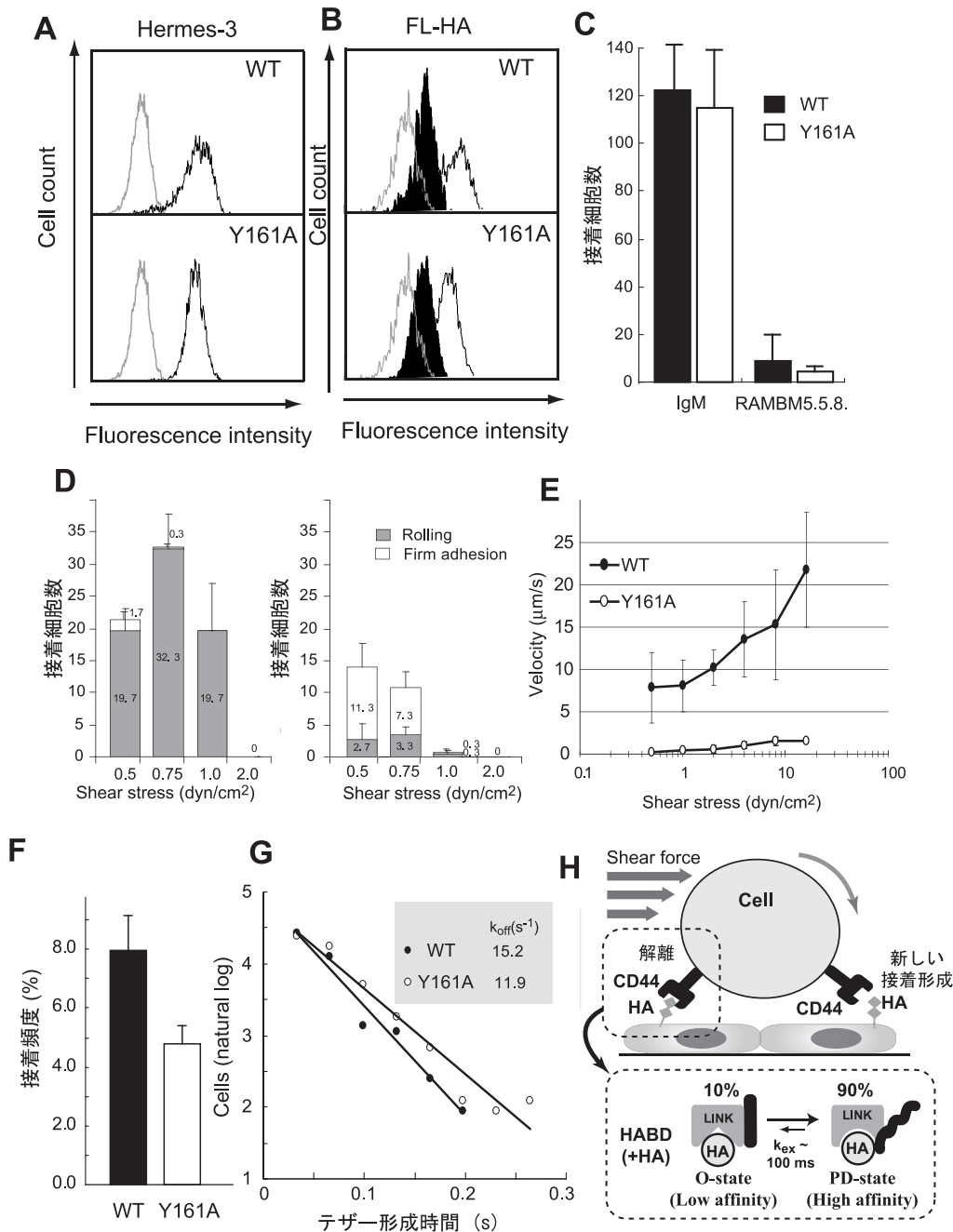


図4 野生型および Y161A 変異体発現細胞を用いたローリング実験

(A)野生型および Y161A 変異体を発現する VMRC-LCD のフローサイトメーター (FCM) による発現量解析 (黒線)。ステム領域を認識する Hermes3 を利用して発現量を比較した。グレーの線は遺伝子を導入していない VMRC-LCD。(B)FITC 標識 HA 鎖の添加前 (グレー)、添加後 (黒線)、およびブロッキング抗体存在時 (黒塗り) の FCM 解析結果。(C)HA を固定したプレートに対する野生型、および Y161A 発現細胞の接着とブロッキング抗体による阻害。(D)HA を固定化したキャピラリーに対する野生型および Y161A 変異体発現細胞のローリング解析。各 shear stress 下において 15 秒間で 10 μm 以上動いた細胞をローリング、それ以下のものを強い接着として定義した。(E)Detachment assay の結果。(F-G)Transient tether 実験における (F)接着頻度と (G)Cellular k_{off} の比較。(H)本研究より明らかになった細胞ローリングにおける 2 状態平衡の意義。

の粘度、流路径などに依存し、単位面積あたりに掛かる力 (dyn/cm²) で表記される (静脈では 1-2 dyn/cm² 程度)。流速存在下で細胞がローリングするためには、細胞前方で

の新しい受容体-リガンド結合の形成と、細胞後方での受容体-リガンド間の解離が適切なバランスで起こることが必要である⁸⁾。

まず、野生型 CD44 発現細胞については、一旦 HA を固定した表面上に接着すると少しずつ流速方向にローリングする様子が観測された。一方、Y161A を発現する細胞は一旦 HA に接着すると流速存在下でもほとんど移動せず強い接着のみが観測された。15 秒間に細胞 1 個分に対応する $10\ \mu\text{m}$ 以上動く細胞を“ローリング”， $10\ \mu\text{m}$ 以下のものを強い接着として、一定時間内に観測される細胞の数を複数の shear stress 下で調べたところ、野生型は主にローリングを、Y161A はほとんどが強い接着を示し、PD-state のみを形成する Y161A 発現細胞ではローリング能が損なわれていることが明らかとなった (図 4D)。また、いずれの shear stress 下においても Y161A よりも野生型発現細胞の方が接着 (ローリングまたは強い接着) を示す細胞の数が多し。特に、速い流速下 ($1\ \text{dyn}/\text{cm}^2$) では野生型発現細胞にのみ相互作用が観測されていることから、O-state と PD-state の 2 状態平衡にある野生型の方が Y161A 変異体よりも HA に対して接着形成が起こりやすいことを示唆する。

次に細胞を低流速下で接着させた後、その後流速を徐々に上昇させたときの解離の様子を野生型 CD44 と Y161A 発現細胞で比較した (図 4E)。まず、 $0.5\ \text{dyn}/\text{cm}^2$ にて細胞をキャピラリー上に集積した後、30 秒ごとに流速を上昇させたときの、細胞の移動速度と観測範囲内に残った細胞数を調べた。その結果、野生型 CD44 を発現する細胞では、平均移動速度が $7\ \mu\text{m}/\text{s}$ 以上であり、流速の上昇に伴いさらに $20\ \mu\text{m}/\text{s}$ 程度までローリング速度を上昇させながらローリングを継続させる細胞が多く見られた。一方 Y161A 発現細胞のローリング速度は低い流速下では $1\text{--}2\ \mu\text{m}/\text{s}$ 程度と遅く、流速を上昇させてもローリング速度はほとんど変化しなかった。また、流速を上げることで shear stress が増大するとローリングが継続できずに HA 表面から解離する細胞が多く見られた。このことから、Y161A 発現細胞では、ローリングの際に起こる細胞前方での新しい結合形成と、後方での受容体のリガンドからの脱離の両方に影響が及んでいることが示唆された。

3) Transient tether 実験

次に、野生型と Y161A のローリングの挙動の違いを、HABD と HA 鎖の 1 分子間に形成される相互作用に基づいて理解するため、transient tether 実験を行なった。通常のローリング実験では、細胞上の受容体と固定したリガンドとの間に多価 (multivalent) な相互作用が形成されているが、リガンドの固定化量を少なくすることにより、細胞上の受容体とリガンドとの 1:1 の相互作用に由来する一過的な接着 (transient tether) を観測することが出来る⁹⁾。このとき tether 形成頻度 (流した細胞のうち transient tether をした細胞の割合) は、受容体-リガンド間の k_{on} を反映し、

tether 形成時間 (transient tether した細胞が HA 上に留まっている時間) は受容体-リガンド間の k_{off} を反映すると考えられる。本研究では、ビオチン標識した 8-34 mer 程度の短鎖 HA 鎖を低濃度のニュートラアビジンを介してプレートに固定し、その上に一定数の CD44 発現細胞を流速 $0.25\ \text{dyn}/\text{cm}^2$ で灌流したときの tether 形成頻度と tether 形成時間を調べた。まず、tether 形成頻度に関しては Y161A 変異体よりも野生型のほうが有意に高く、新しい tether 形成には高親和性状態の PD-state よりも O-state と PD-state の平衡にあるほうが有利であることが分かった (図 4F)。さらに、tether 形成時間の分布から cellular k_{off} を調べたところ、野生型では $15.2\ \text{s}^{-1}$ 、Y161A 変異体 $11.9\ \text{s}^{-1}$ であり、Y161A 変異体では k_{off} が低下していることが示された (図 4G)。この結果は、Y161A で k_{off} の低下が観測された SPR 実験と一致しており、PD-state では HA からの解離が起こりにくくなっていることが明らかとなった。

ローリングにおける 2 状態平衡の役割

ローリング実験と transient tether 実験の結果を以下解釈する。一般的に、流速存在下でリガンドが固定された表面を細胞がローリングするためには、細胞の先端での新たな結合形成と、後方での結合の解離が、適切なタイムスケールで生じる必要がある。野生型 HABD の tether 形成頻度が、PD-state のみを形成する Y161A よりも高いことは、細胞先端では O-state にある HABD によって HA との新しい結合形成が効率よく起こっていることが示唆される。また、一旦 CD44 は HA 上に接着すると、HABD の平衡は高親和性で“cellular k_{off} ”の遅い PD-state にシフトする。しかし、NMR 解析の結果から示されたように、CD44 はリガンド結合状態でも O-state と PD-state の間を交換している。よって、リガンド結合時に PD-state から O-state に遷移することによって、HA からの脱離が促進されていることを示唆する (図 4H)。NMR 解析では O-state と PD-state の交換速度は $100\ \text{ms}$ 程度のタイムスケールであった。また、transient tether 実験における CD44-HA 結合の持続時間 ($\tau=1/k_{\text{off}}$) も数十から数百ミリ秒のオーダーであり、HABD の構造平衡の交換速度と HA-CD44 結合の持続時間は一致している。この結果は、ローリングにおいて、HA 結合時における O-state への遷移によって細胞後方での HA-CD44 結合の脱離が促進されるという仮説を支持する。一方、平衡が完全に PD-state に片寄っている Y161A 変異体ではローリング速度が顕著に低下していた。Y161A においては、HA 親和性が増大したことに加えて、リガンド結合状態において O-state と PD-state 間の平衡が失われることが、ローリングが損なわれたことの原因であると考えた。以上より、CD44 がローリングを達成するためには、O-state と PD-state 間の 2 状態平衡の存在が必要であると結

論した。

他の接着分子との比較

血流下での細胞接着に関与する分子として、これまでにセレクトリン、インテグリン、またバクテリアの表面タンパク質である FimH について、構造生物学的な解析が行なわれている。例えば血小板などに発現する P-selectin については、単独状態とリガンド結合状態の両方の結晶構造が明らかとなっており、CD44 と同様にリガンドの結合に伴って、リガンド結合部位から離れた部位にアロステリックな構造変化が起こることが明らかとなっている¹⁰⁾。すなわちリガンド結合部位を含むレクチンドメインとそれに隣接する EGF 様ドメインの配向が、リガンド非存在下では折れ

曲がった配向であるのに対し、リガンド結合状態では真っ直ぐに変化している (図 5A)。セレクトリンなどの接着分子については、これまでに溶液中の解析は行なわれておらず、2 状態平衡が存在するかについては実験的な証明はなされていないが、CD44 と同様にローリング活性には 2 状態平衡の存在が必須である可能性が考えられる。セレクトリンにおいても CD44 と同様に低親和性状態の構造を不安定化した変異体では、ローリング活性が低下したり、活性が完全に損なわれたりすることが知られており、この仮説を支持する^{11,12)}。

張力に対する応答 (catch bond) について

血流を流れる細胞上の受容体と表面上に固定されたりリガンドが相互作用すると、その結合の間には張力が発生する。その張力の大きさは、shear stress と受容体を発現する細胞の大きさによって決定され、shear stress が静脈中の 1-2 dyn/cm² 程度で、細胞の大きさを 10 μm とすると受容体-リガンド間にかかる張力の大きさは 50-100 pN と見積もられる。張力が掛かると、通常は受容体-リガンド間の結合は弱くなる (slip bond) が、ごく一部の分子では張力の増大にともなって結合が強くなる現象が知られており、catch bond と呼ばれている¹³⁾。Catch bond を形成する利点としては、張力は表面に固定化された状態にあるリガンドとの間のみ働くため、可溶性のリガンドが共存しても固定されたりリガンドのほうに選択的に結合できることや、遅い流速下ではそれほど強く接着せず、速い流速下においてより接着性が増大するため、広い shear stress 下で接着を起こすことが可能であるという点が挙げられる。Catch bond の存在は、原子間力顕微鏡 (AFM) や光ピンセットを使って実際に受容体とリガンド間の結合を観測することにより、セレクトリンなどで存在が実験的に示されている¹⁴⁾。Catch bond 機構の構造的な説明としては、受容体-リガンド間に働く張力によって、低親和性よりも高親和性状態の構造が安定化されることがそのメカニズムであると提唱されている (図 5B)。たとえば、セレクトリンにおいては、張力によってレクチンドメインと EGF ドメインの配向が折れ曲がった低親和性状態から、両ドメインが真っ直ぐに配向した高親和性状態の構造が安定化されるという仮説が提唱されている。CD44 においても、高親和性状態の PD-state でランダムコイル化する C 末端領域は、CD44 の膜貫通ドメインに直接連結されていることを考えると、CD44 と HA 鎖間に張力が働くことによって高親和性状態の PD-state が安定化され catch bond が形成される可能性が考えら

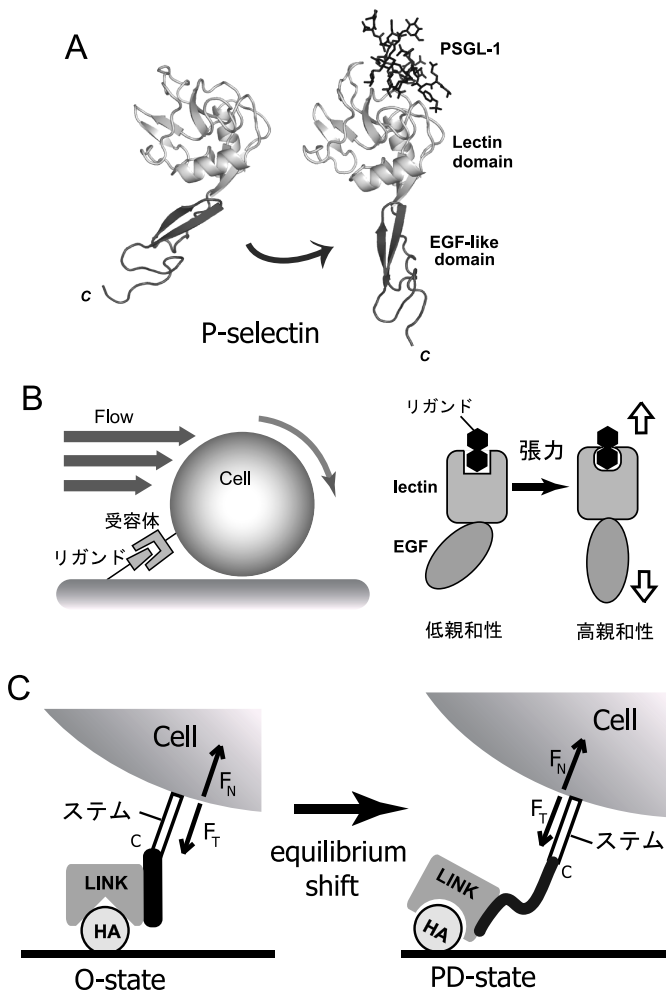


図5 血流下で機能する他の受容体との比較

(A) 単独状態 (左) およびリガンドである PSGL-1 ペプチド結合状態 (右) における P-selectin の立体構造。P-selectin をリボン図で、PSGL-1 をスティック表示で示す。CD44 と同様に、リガンド結合部位 (白) から離れた領域に大きな構造変化が観測され、Lectin ドメイン (白) に対する EGF-like ドメイン (グレー) の配向が変化した。(B) 血流による shear stress で受容体-リガンド間に働く張力の模式図。(C) CD44 で想定される張力依存的な平衡シフトの模式図。F_N: 抗力。F_T: 結合力。

れる (図 5C).

5. まとめと今後の展望

本稿では、まず CD44 のヒアルロン酸結合ドメイン (HABD) が、低親和性状態を反映する O-state と PD-state の 2 状態平衡にあることを NMR 法による解析から明らかとした。これにより、異なった構造が得られていた HA 結合状態の HABD の結晶構造と NMR 構造は、HA 結合状態において平衡状態で存在する O-state と PD-state をそれぞれ反映していることが明らかとなった。さらに HABD の構造を PD-state に安定化した Y161A 変異体と野生型 CD44 のローリング活性の比較から、2 状態平衡の存在がローリングに必要であることを示した。これまでに、セレクチンをはじめ、血流下で動く受容体の構造生物学的な解析の多くは X 線結晶解析によって行なわれており、リガンド認識において受容体が常に二つの状態の平衡にあるという知見は、われわれの溶液中の NMR 解析によって初めて明らかとなった。

CD44 は多くの癌で発現が亢進しており、癌細胞の浸潤や転移にも関与することが知られている。CD44 細胞外ドメイン領域の R223 と 224 の間には選択的スプライシングが生じ、転移性を亢進させ癌の予後と関連することが報告されている¹⁵⁾。また、CD44 は MT1-MMP や ADAM10 などの膜結合型プロテアーゼによる切断を受け、その結果 CD44 発現のターンオーバーが促進されることで細胞運動が亢進することが報告されている¹⁶⁾。CD44 の切断は低分子量の HA によって促進され、腫瘍細胞では切断を受けた可溶性 CD44 が多く存在することも知られている¹⁷⁾。さらに CD44 は近年、癌幹細胞 (cancer stem cell) のマーカーとしても注目されている¹⁸⁾。このように、CD44 は HA との相互作用を介して癌細胞の動態制御にも関与していることから、今後は癌細胞の細胞運動における CD44 の分子メカニズムを解明していくことで、癌の転移・浸潤といった現象を理解し、治療法の開発へとつなげていくことが期待される。

文 献

- 1) Chen, S., Alon, R., Fuhlbrigge, R.C., & Springer, T.A. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 3172–3177.
- 2) Ogino, S., Nishida, N., Umemoto, R., Suzuki, M., Takeda, M., Terasawa, H., Kitayama, J., Matsumoto, M., Hayasaka, H., Miyasaka, M., & Shimada, I. (2010) *Structure*, **18**, 649–656.
- 3) Jackson, D.G., Prevo, R., Clasper, S., & Banerji, S. (2001) *Trends Immunol.*, **22**, 317–321.
- 4) Takeda, M., Terasawa, H., Sakakura, M., Yamaguchi, Y., Kajiwara, M., Kawashima, H., Miyasaka, M., & Shimada, I. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 43550–43555.
- 5) Teriete, P., Banerji, S., Noble, M., Blundell, C.D., Wright, A.J., Pickford, A.R., Lowe, E., Mahoney, D.J., Tammi, M.I., Kahmann, J.D., Campbell, I.D., Day, A.J., & Jackson, D.G. (2004) *Mol. Cell*, **13**, 483–496.
- 6) Takeda, M., Ogino, S., Umemoto, R., Sakakura, M., Kajiwara, M., Sugahara, K.N., Hayasaka, H., Miyasaka, M., Terasawa, H., & Shimada, I. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 40089–40095.
- 7) Banerji, S., Wright, A.J., Noble, M., Mahoney, D.J., Campbell, I.D., Day, A.J., & Jackson, D.G. (2007) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **14**, 234–239.
- 8) Sokurenko, E.V., Vogel, V., & Thomas, W.E. (2008) *Cell Host. Microbe*, **4**, 314–323.
- 9) Dwir, O., Kansas, G.S., & Alon, R. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 18682–18691.
- 10) Somers, W.S., Tang, J., Shaw, G.D., & Camphausen, R.T. (2000) *Cell*, **103**, 467–479.
- 11) Phan, U.T., Waldron, T.T., & Springer, T.A. (2006) *Nat. Immunol.*, **7**, 883–889.
- 12) Lou, J., Yago, T., Klopocki, A.G., Mehta, P., Chen, W., Zarnitsyna, V.I., Bovin, N.V., Zhu, C., & McEver, R.P. (2006) *J. Cell. Biol.*, **174**, 1107–1117.
- 13) Thomas, W.E., Vogel, V., & Sokurenko, E. (2008) *Annu. Rev. Biophys.*, **37**, 399–416.
- 14) Marshall, B.T., Long, M., Piper, J.W., Yago, T., McEver, R.P., & Zhu, C. (2003) *Nature*, **423**, 190–193.
- 15) Brown, R.L., Reinke, L.M., Damerow, M.S., Perez, D., Chodosh, L.A., Yang, J., & Cheng, C. (2011) *J. Clin. Invest.*, **121**, 1064–1074.
- 16) Okamoto, I., Kawano, Y., Tsuiki, H., Sasaki, J., Nakao, M., Matsumoto, M., Suga, M., Ando, M., Nakajima, M., & Saya, H. (1999) *Oncogene*, **18**, 1435–1446.
- 17) Sugahara, K.N., Murai, T., Nishinakamura, H., Kawashima, H., Saya, H., & Miyasaka, M. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 32259–32265.
- 18) Zoller, M. (2011) *Nat. Rev. Cancer*, **11**, 254–267.