

特集：タンパク質の化学構造から生物機能に迫る

コラーゲン結合タンパク質を介した生命プロセスの活性化機構

西 田 紀 貴, 嶋 田 一 夫

細胞外マトリックスは、細胞の周囲を隙間なく充填して生体組織に機械的強度や柔軟性・可塑性を与え、周囲の細胞が接着する際の足場を提供し、細胞が秩序正しく集合して組織・器官を形成するために必要な外部環境を提示している。さらに、細胞外マトリックスは細胞へ積極的にシグナルを伝達することにより、発生、分化、免疫応答、血液凝固、創傷治癒などの多様な生体プロセスを制御している。本稿では、最も主要な細胞外マトリックスであるコラーゲンと細胞表面の受容体との相互作用メカニズムを立体構造の観点に基づいて解説し、不溶性の線維を形成する細胞外マトリックスがどのようにして多様な生体プロセスを時間的・空間的に制御しているのかについて概説する。

1. 細胞外マトリックス

われわれの体はおよそ 60 兆個の細胞と細胞以外の成分が集合して形づくられている。細胞以外の成分は細胞外マトリックスと総称され、細胞の周囲に存在して組織や器官に機械的な強さや柔軟性を賦与するとともに、細胞が接着する足場となる環境を提供し、細胞と相互作用して様々な生体プロセスを制御している。

細胞外マトリックスは、表 1 に示すように線維形成タンパク質や糖タンパク質、プロテオグリカンなどのさまざまな分子によって構成される。細胞外マトリックスを構成する成分の代表的な分子はコラーゲンであり、体内の総タンパク質量のおよそ 30% を占める。コラーゲンは強靱な線維（膠原線維）を形成し、組織に線維方向への張力に抵抗する機械的強度を与える。またエラスチンやフィブリリンによって形成される線維（弾性線維）はコラーゲン線維と比較すると強靱ではないものの、極めて弾力性に富んでおり、組織に柔軟性・可塑性を賦与する。線維状基質の周囲には、糖やタンパク質を含む無定形のゲル状の成分が存在

表 1 細胞外マトリックスを構成する分子

線維形成タンパク質	コラーゲン, エラスチン, フィブリリン
グリコサミノグリカン	ヒアルロン酸, コンドロイチン硫酸, ケタラン硫酸, ヘパラン硫酸, デルマタン硫酸など
プロテオグリカン	シンデカン, アグレカン, パーシカンなど
その他	フィブロネクチン, ラミニン, テネイシン, ナイドジェンなど

しており、ヒアルロン酸やコンドロイチン硫酸のようなグリコサミノグリカンや、アグレカンやパーシカンのようなプロテオグリカンを主な構成成分とし、必要な水分の保持やコラーゲン線維を安定化する役割を持っている。また、糖タンパク質の一つであるフィブロネクチンや、基底膜の構成成分であるラミニンやナイドジェンなども細胞外マトリックスを構成する重要な分子である。

本稿においては、細胞外マトリックスを構成する主要な分子であるコラーゲンに着目し、コラーゲンがどのようにして線維状のマトリックスを形成し、周囲の環境とどのように相互作用して多様な生命現象を支えているのか、最新の構造生物学的な知見に基づいて解説する。

2. コラーゲンの生合成と高次構造の形成

2.1 コラーゲンの一次配列

ヒトゲノム中には少なくとも 43 種類のコラーゲンポリペプチド鎖をコードする遺伝子があり、それらが三量体を

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)
Structural basis for biological processes activated by collagen-binding proteins
Noritaka Nishida and Ichio Shimada (Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan)

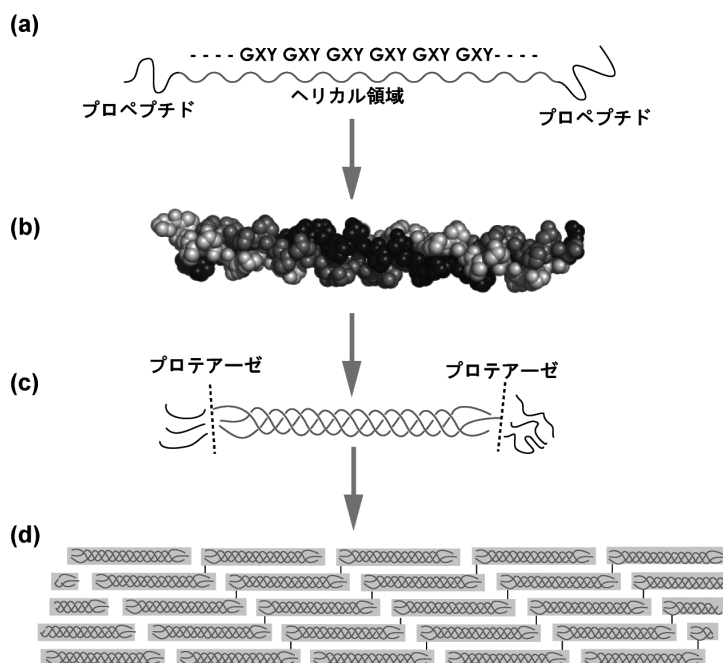


図1 コラーゲンのトリプルヘリックスおよび線維形成機構

(a) 線維型コラーゲンのα鎖の一次構造。GXYの繰り返しから成るヘリカル領域とN・C末端に短いプロペプチドを含む。(b) コラーゲンのトリプルヘリックス構造 (PDB code: 1CGD)。コラーゲンが正しくフォールドして三量体を形成すると、(c) N・C末端のプロペプチドが切断され、(d) 規則正しく重合して不溶性の線維を形成する。

形成して28種類のコラーゲン分子を形成することが知られている¹⁾。コラーゲンは、3残基ごとにグリシン (Gly) が繰り返されるアミノ酸配列 (Gly-X-Y) が含まれる点を特徴とする。コラーゲンを構成するポリペプチド鎖はα鎖と呼ばれ、3本のα鎖がホモあるいはヘテロ三量体を形成し、それらが寄り合わさってコラーゲンを特徴づける右巻きトリプルヘリックス (三重らせん) 構造を形成する (図1b)。X位とY位に入るアミノ酸は、トリプルヘリックス構造の安定性に影響を与え、X位にはプロリン、Y位にはヒドロキシプロリン (プロリンの4位のプロトンが水酸化されたもの) が存在する場合が最も安定であり、実際の配列においても最も高頻度で出現する²⁾。

2.2 コラーゲンの高次構造形成

三量体化してトリプルヘリックスを形成したコラーゲンは分子間で会合してさらなる高次構造を形成する。形成される高次構造に基づいてコラーゲンは表2に示すようにクラス分けされる。生体内に最も多く含まれるのは線維を形成するタイプのコラーゲンで、タイプI, II, III, Vなどが線維型に分類される³⁾。タイプIコラーゲンは主に真皮や血管、タイプIIは軟骨や眼の硝子体、タイプIIIは血管の内壁などに主に存在する。タイプIコラーゲンは2本のα1鎖と1本のα2鎖からなるヘテロ三量体であり、タイプ

表2 コラーゲンタイプの分類

線維型コラーゲン	タイプ I, II, III, V, XI
ネットワーク形成コラーゲン	タイプ IV, VIII, X
FACIT型コラーゲン	タイプ IX, XII, XIV, XVI
膜貫通型コラーゲン	タイプ XIII, XXV
ミクロフィブリルコラーゲン	タイプ VI

IIおよびタイプIIIコラーゲンは3本のα1鎖からなるホモ三量体である。線維型のコラーゲンは、およそ1,000残基のGly-X-Yの繰り返しからなるヘリカル領域とその両端の短いプロペプチド領域から構成されている (図1a)。細胞内の生合成過程においては、小胞体でC末端側を起点としたトリプルヘリックス構造の形成とY位のプロリンの水酸化が生じ、ゴルジ体を通じて細胞外へ分泌される際に、N末端とC末端のプロペプチド領域がプロテアーゼによって切除される (図1c)。プロペプチド部分が切断されると、コラーゲンは自発的に自己会合をして不溶性の線維を形成するようになる。線維型コラーゲンにおいては分子が一定の距離だけ規則正しくずれて会合しているため、顕微鏡にて観察すると67nmの間隔の周期的な縞模様が観測される。また、会合したコラーゲン分子の間には共有結合が形成され、強固な線維が形成される (図1d)。

線維を形成しないタイプのコラーゲンも存在する。タイプIV, VIIIおよびXはネットワーク形成コラーゲンと呼ばれる。特にタイプIVコラーゲンは基底膜コラーゲンと

呼ばれ、網目状の構造を形成して、上皮細胞が接着する足場や、また腎臓糸球体における選択フィルターとしての役割を果たす。タイプ XIII およびタイプ XXV は膜貫通型コラーゲンで、C 末端側を細胞外に露出しており、細胞接着などに関与していると考えられている。FACIT (fibril-associated collagen with interrupted triple helix) コラーゲンは比較的短いコラーゲンで、線維型コラーゲンに結合した状態で存在しており、タイプ IX, XII, XIV などがある。タイプ VI コラーゲンは四量体を形成し、短いコラーゲン鎖が数珠つなぎになったマイクロフィブリル (microfibril) を形成する。またコラーゲンとしては分類されていないが、一次配列中にコラーゲンと同様の 3 残基ごとの繰り返し配列を含みトリプルヘリックス構造を形成する、補体 C1q やマンノース結合タンパク質 (MBL) のようなタンパク質も生体内には多数存在する⁴⁾。

2.3 コラーゲン分子との相互作用が関与する生体プロセス

生体内にはコラーゲンと相互作用する様々な分子が存在する。小胞体に発現する heat-shock protein 47 (HSP47) は、コラーゲンの生合成過程においてその折りたたみを補助する分子シャペロンとしての役割を果たしている⁵⁾。また、コラーゲンはフィブロネクチンやラミニンなどの多数の細胞外マトリックスを構成する分子と結合して高次構造を形成し、細胞が接着するための足場を提供する。さらに、コラーゲンは内皮細胞の直下に存在することから、血管壁の損傷時におけるセンサーとしての役割を果たしている⁶⁾。同時に、コラーゲン結合タンパク質を表面に発現している、感染の際にコラーゲンを足場として利用する細菌や黄色ブドウ球菌のような外来の病原体が存在することも知られている⁷⁾。発生や形態形成、創傷部位が回復する過程において、コラーゲンをはじめとする細胞外マトリックスは分解と再構築を頻繁に起こしているが、このような細胞外マトリックスのリモデリングの際には、特定のコラーゲンを分解するマトリックスメタロプロテイナーゼ (MMP) が周囲の細胞から分泌されている⁸⁾。コラーゲンの刺激によって、がん細胞の MMP の分泌が亢進することも報告されており、細胞外マトリックスががん細胞が浸潤・転移するプロセスにも関与していると考えられる。

このようにコラーゲンとの相互作用がさまざまな生体応答を引き起こしているが、コラーゲンがどのようにして細胞表面の受容体と相互作用して細胞へシグナルを伝達しているのかについては、これまであまり解析が進んでいなかった。それはコラーゲンが不溶性の線維を形成するため、通常の NMR 法や X 線結晶構造解析によって構造生物学的解析をすることが不可能であったことが理由の一つである。近年、ペプチド合成法によって作製したコラーゲン模倣ペプチドを使った解析が行われるようになり、X 線結

晶構造解析からコラーゲンとの相互作用を原子レベルで観測することができるようになってきた。また、近年の NMR 法の方法論の開発が進み、不溶性の線維をそのまま使って相互作用を解析することも可能となってきた。以下の章では、血小板凝集反応と細胞外マトリックスのリモデリングに焦点をあて、構造生物学的な手法によって明らかとなったコラーゲン受容体とコラーゲンの特異的な相互作用について見ていくことにする。

3. 血小板凝集反応に関与するコラーゲン受容体

3.1 血管損傷時の血小板凝集反応メカニズム

血管が損傷して血管内皮細胞の下層のコラーゲン組織が露出すると、直ちに血液中の血小板が損傷部位に集合して血液の損失を妨げる。これが血小板凝集反応である⁹⁾。血小板上には多数のコラーゲン受容体が発現しており、それぞれが連携することによって血小板凝集反応が達成されている (図 2a)。動脈のような速い血流存在下においては、フォンビルブランド因子 (vWF) と呼ばれる血漿中の糖タンパク質が、露出したコラーゲンと血小板上の glycoprotein (GP) Ib 受容体を架橋することによって、効率よく血小板を血管損傷部位へリクルートしている¹⁰⁾。それにより、血小板上のコラーゲン受容体 GPVI 受容体を介して露出したコラーゲンに直接結合できるようになる。その結果、細胞内へシグナルが伝達されて血小板が活性化状態へと移行し、ADP やトロンボキサン A2 などのメディエーターを含む顆粒の放出や、血小板の形態変化などが起こる¹¹⁾。また、血小板上に発現している 2 種類の細胞接着因子インテグリン $\alpha_2\beta_1$ と $\alpha_{\text{m}}\beta_3$ がともに活性化し、 $\alpha_2\beta_1$ インテグリンはコラーゲン線維と結合して血小板を損傷部位にさらに強く接着させ、 $\alpha_{\text{m}}\beta_3$ インテグリンは RGD 配列を含むフィブリノーゲンなどの分子と結合して血小板を架橋し、巨大な血小板塊を形成させる。以上のように、血小板凝集反応においては 3 種類のコラーゲン結合タンパク質・受容体 vWF, GPVI, $\alpha_2\beta_1$ インテグリンが異なる局面で重要な役割を果たしている。

3.2 vWF および $\alpha_2\beta_1$ インテグリンのコラーゲン結合ドメイン

vWF は全長 2,050 残基から成るマルチドメインタンパク質で、巨核球や内皮細胞において産生される。vWF は生合成の過程において、モノマーの N 末端同士と C 末端同士がそれぞれ S-S 結合により連結されて巨大な多量体を形成する¹²⁾。一つのサブユニット中には A ドメインとよばれる 200 残基程度のドメインが三つ連続して存在しており、A1 ドメインは血小板上受容体 GPIb との結合を、A3 ドメインがコラーゲンとの結合を担っている (図 2b)。

インテグリンは α サブユニットと β サブユニットから

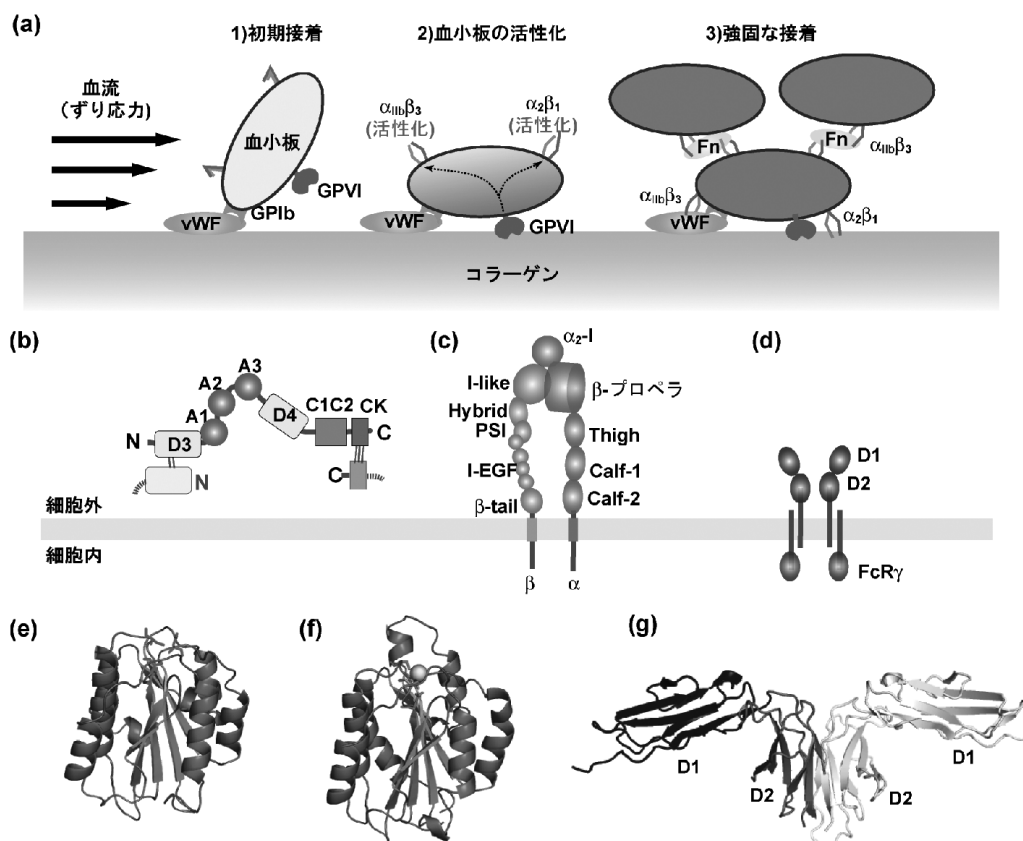


図2 血小板凝集反応に関与する因子

(a) 血小板凝集反応の模式図。血小板凝集反応は、1) vWF を介した初期接着、2) GPIIb/IIIa を介した血小板の活性化、3) インテグリンを介した強固な接着と血小板塊の形成、の3段階で進行する。血小板凝集に関与する (b) vWF, (c) $\alpha_2\beta_1$ インテグリン, (d) GPIIb/IIIa のドメイン構造の模式図と、それぞれのコラーゲン結合ドメイン (e) vWF-A3 ドメイン (PDB code: 1AO3), (f) α_2 -I ドメイン (同 1AOX), (g) GPIIb/IIIa-D1D2 ドメイン (同 2G17) の立体構造。 (e), (f) において MIDAS 形成に関与する残基をスティック表示し、金属イオンを球にて示す。 (g) では、GPIIb/IIIa の D1 ドメインと D2 ドメインを濃いグレーで、結晶中で隣接するもう 1 分子の GPIIb/IIIa を薄いグレーで示す。図中において、 $\alpha_2\beta_1$ は $\alpha_2\beta_1$ インテグリン、 $\alpha_{IIb}\beta_3$ は $\alpha_{IIb}\beta_3$ インテグリン、Fn はフィブリノーゲンを示す。

成るヘテロ二量体であり、巨大で複雑な細胞外ドメインを有し、 $\alpha\beta$ サブユニットそれぞれの1回膜貫通 (TM) ヘリックスに続いて短い細胞内ドメインを持っている¹³⁾ (図 2c)。通常、インテグリンはリガンドに対する親和性が低い状態に保たれているが、細胞の内側からのシグナル (inside-out) を受けると活性化して高親和性状態へと移行する。この親和性の変化は2本の TM ヘリックスの解離とそれによって誘起される細胞外ドメインの全体構造変化によって説明されている^{14,15)}。 $\alpha_{IIb}\beta_3$ インテグリンのように RGD 配列を含むリガンドと結合するタイプのインテグリンは、 β_2 サブユニットの I-like ドメインと β -プロペラドメインの境界付近でリガンドを認識している。一方、 α_2 インテグリンをはじめとするおよそ半数のインテグリン α サブユニットには、vWF の A ドメインと相同性の高いドメインが β -プロペラドメインの一次配列中に挿入 (insert) されており、I ドメインと呼ばれる。コラーゲン結合型の

インテグリン (α_1 , α_2 , α_{10} , α_{11}) はすべて α サブユニットに I ドメインを有しており、I ドメインのみを介してコラーゲンと相互作用する。

3.3 vWF-A3 ドメインとインテグリン α_2 -I ドメインの単独の立体構造

$\alpha_2\beta_1$ インテグリンのコラーゲン結合ドメイン (α_2 -I ドメイン) と vWF のコラーゲン結合ドメイン (A3 ドメイン) は一次配列の相同性が高く、ともに VWA ドメインファミリーに分類される¹⁶⁾。X 線結晶構造解析においても、 α_2 -I ドメイン¹⁷⁾ と A3 ドメイン^{18,19)} は類似したトポロジー構造を形成しており、中央の β ストランドの両側を α ヘリックスが挟み込んだ Rossmann (あるいは dinucleotide binding) フォールドとよばれる構造を形成していた (図 2e と 2f)。これまでの他の VWA ドメインの解析から、VWA ドメインでは保存された三つのループによって、MIDAS (metal

ion dependent adhesion site) モチーフと呼ばれる 2 価イオン結合部位が形成され、リガンドの認識に中心的な役割を果たすことが明らかとなっていた²⁰⁾。α₂-I ドメインの結晶構造においては、MIDAS モチーフが形成され Mg²⁺ イオンの配位が見られた (図 2f)。ところが vWF-A3 ドメインでは、MIDAS モチーフの形成に関与する残基はほぼ完全に保存されていたものの、結晶構造中では MIDAS モチーフが形成されず、金属イオンの配位も観測されなかった¹⁸⁾ (図 2e)。そのため、α₂-I ドメインと vWF-A3 ドメインの単独の構造からでは、両ドメインが共通の機構でコラーゲンを認識しているのか不明であった。

3.4 インテグリン α₂-I ドメインとコラーゲンペプチド複合体の X 線結晶構造

α₂-I ドメインはタイプ I あるいはタイプ III コラーゲンの一部を認識することから、合成ペプチドを用いて認識配列を同定する試みが行われてきた²¹⁾。合成ペプチドを用いる場合、形成されるトリプルヘリックス構造を安定化させるために、目的の配列の両側を GPO (O はヒドロキシプロリン) の繰り返し配列で挟み込んだり、N および C 末端の電荷を除去するなどの工夫が施される。配列探索の結果、α₂-I ドメインは GXOGER (X は Phe, Leu など) という配列を含むコラーゲンペプチドと高い親和性を有することが明らかとなった²²⁾。さらに Emsley らは、同定された配列を含む合成コラーゲンペプチドと α₂-I ドメインとの複合体構造を、X 線結晶構造解析により明らかにすることに成功した²³⁾。複合体の構造において、合成ペプチドはコラーゲン様のトリプルヘリックス構造を形成しており、α₂-I ドメインの分子の上部にある MIDAS モチーフを中心とするエリアにやや湾曲するように結合していた (図 3a)。コラーゲンペプチド中の Glu 残基は MIDAS モチーフの 2 価イオンに直接配位しており、隣接する Arg 残基は MIDAS 近傍に存在する酸性残基 D219 と塩橋を形成していた (図 3a)。さらにコラーゲンを構成する 3 本のポリペプチド鎖のうち二つの鎖の Phe 残基は、いずれも α₂-I ドメインにおいて形成されている疎水性パッチと相互作用していた (図 3a)。このことは、Phe 残基が認識に重要な役割を果たしており、Leu などの他の疎水性残基と交換可能であることも合致する。また、リガンドと複合体を形成した α₂-I ドメインの構造と単独の構造を比較すると、リガンドの Glu 残基の配位によって MIDAS 構造の再構成が生じるため、ドメイン全体におよぼアロステリックな構造変化が生じていた。特に顕著な構造変化として、α₂-I ドメインにユニークな C ヘリックスが消失することに加え、C 末端の α₇ ヘリックスは 10 Å 程度下方向にスライドしていた (図 3b)。α₇ ヘリックスの構造変化はリガンドが結合したという情報をインテグリンの隣接する細胞外ドメインへ伝

達し、さらに細胞内へ活性化シグナルを送る機構に関与していると考えられる。同様の C 末端ヘリックスの構造変化は、他のインテグリン I ドメインにおいても共通して観測される²⁴⁾。

3.5 NMR 法によって明らかとなった vWF-A3 ドメインのコラーゲン認識様式

一方、vWF が認識するコラーゲン配列は明らかではなく、合成ペプチドとの複合体解析によってコラーゲン認識機構を明らかにすることは不可能であった。そもそもコラーゲン結合タンパク質のリガンド認識を構造生物学的に明らかにする際に合成ペプチドを用いなければならない理由は、コラーゲンが巨大で不均一な不溶性の線維を形成するからである。近年われわれのグループでは、複合体の分子量に依存せず結合部位を同定することのできる NMR 測定法である、転移交差飽和 (TCS) 法²⁵⁾を開発した。TCS 法では、複合体形成時の情報を遊離状態に移して観測するため、不溶性の線維を対象としても相互作用面を同定することが原理的には可能である。そこで、TCS 法を A3 ドメインと線維コラーゲンの相互作用系に適用し、A3 ドメイン上のコラーゲン結合部位を決定することを試みた。

まず、非標識の線維型 (タイプ III) コラーゲンに対して、均一-²H, ¹⁵N 標識を施した A3 ドメインを過剰量添加した試料を調製した。図 4a に示すように、A3 ドメインは溶媒と交換可能なアミドプロトンを除くすべてのプロトンを重水素に置換しているため、メチル基などに選択的なラジオ波照射を行った場合、コラーゲンのみを選択的に飽和することができる。飽和は距離に依存して周囲に拡散するので、コラーゲンと近接している A3 ドメインには交差飽和現象が生じ、コラーゲン結合界面に存在する A3 ドメインのアミドプロトンにも飽和が伝わる。さらに A3 ドメインはコラーゲン分子との結合と解離を非常に速い速度で繰り返しているため、結合時に受けた飽和の影響を遊離の A3 ドメインで観測することができるようになる (図 4a)。例えば図 4b に示すスペクトルにおいて、A1047 は飽和を行ったときと行わないときでシグナル強度がほとんど変化しないので結合界面には存在せず、I978 はシグナル強度が大きく減少しているため結合時にコラーゲンに近接している、すなわち結合界面残基であることが示唆される²⁶⁾。

TCS 法において飽和の影響を強く受けた残基を A3 ドメインの立体構造上にマッピングすると、一つの連続した面として観測された (図 4c)。この領域には直径約 15 Å のコラーゲンのトリプルヘリックスを収容することができそうな溝 (trench) が見出された (図 4c)。さらに A3 ドメインに変異を導入したところ、TCS 法で同定された面への変異導入はコラーゲン結合活性を大きく低下させる一方、MIDAS 領域に対応する分子上面への変異導入はコラーゲ

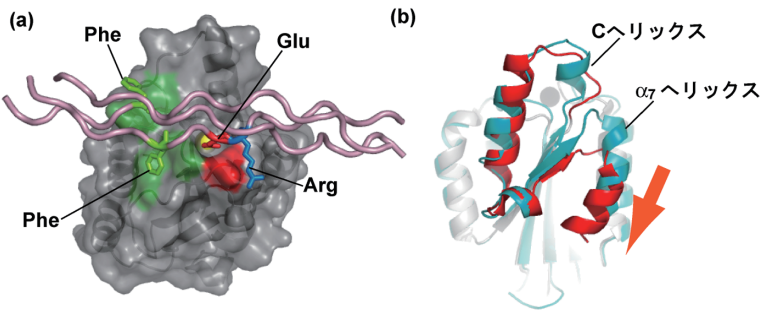


図 3

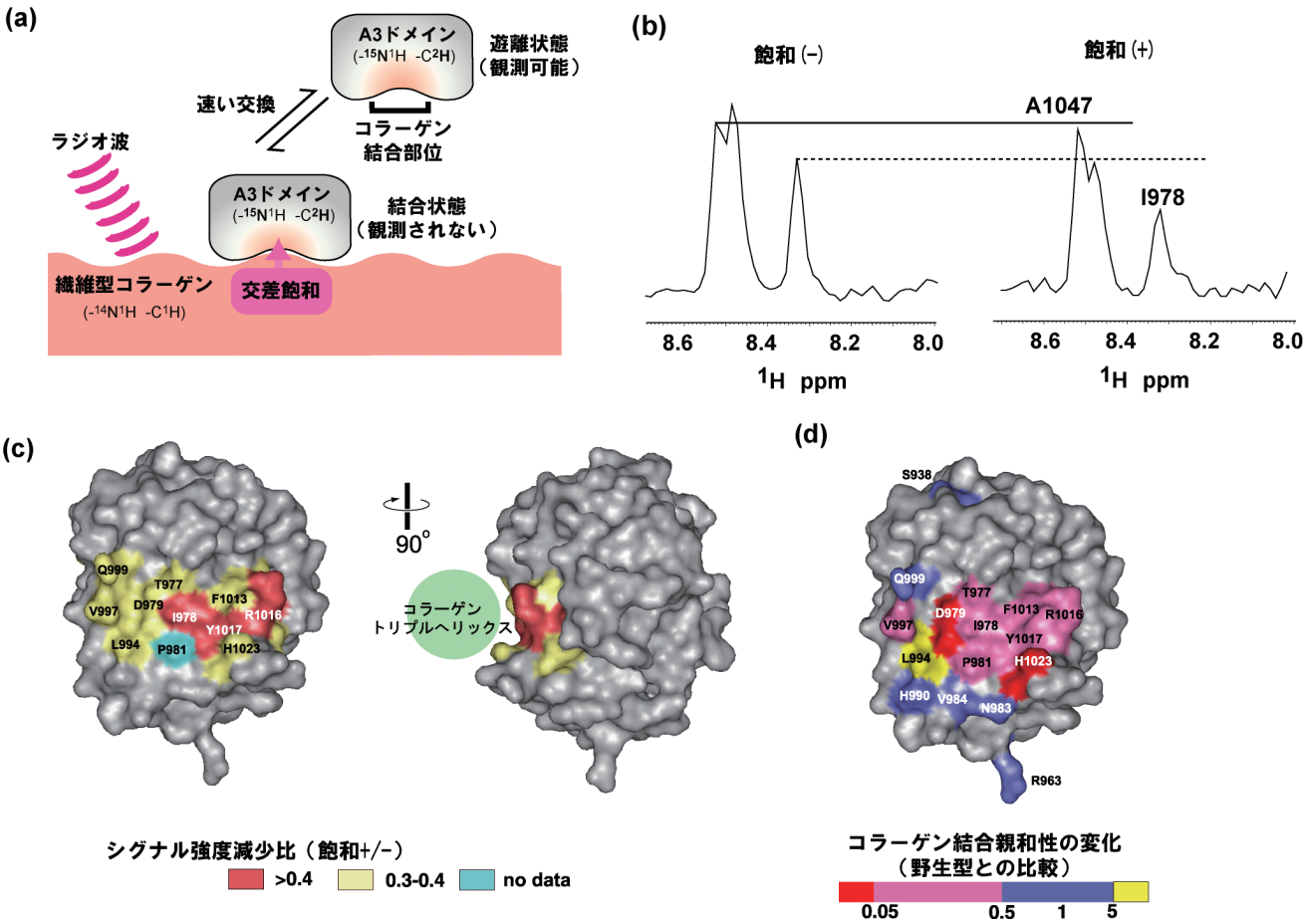
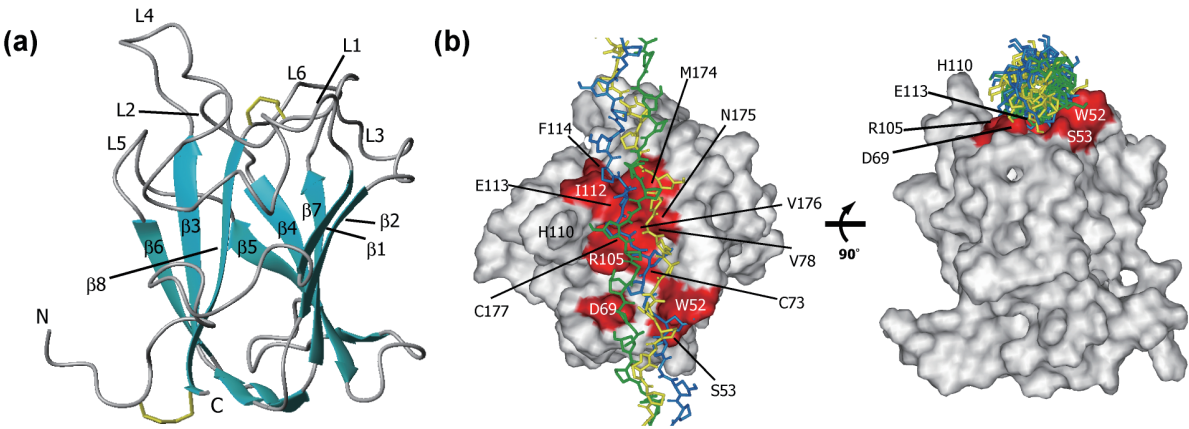


図 4



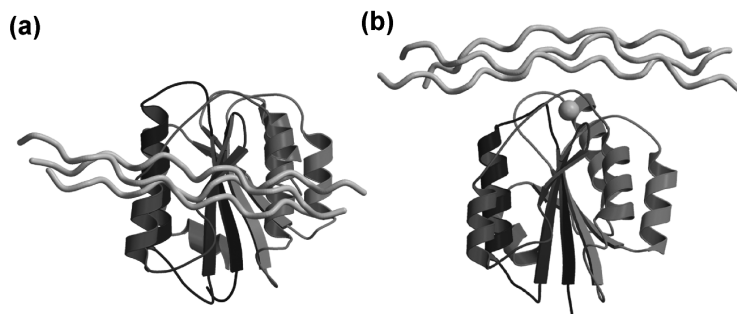


図5 (a) vWF-A3 ドメインと (b) α_2 -I ドメインのコラーゲン認識機構の比較

ン結合には影響を及ぼさなかった (図 4d). 全長 vWF を用いた変異実験においても, 同様の結果が得られた²⁷⁾. 以上の結果から, A3 ドメインは MIDAS 領域ではなく分子の側面においてコラーゲンを認識しているものと結論した. 以上の結果に基づいて, GPO の繰り返し配列からなるコラーゲンのモデル構造を用いてドッキングモデルを作成した²⁸⁾ (図 5a). 複合体モデルにおけるコラーゲン結合部位は α_2 -I ドメインのコラーゲン結合部位とは完全に異なっており (図 5b), A3 ドメインと α_2 -I ドメインは同一のフォールドを共有し, ともにコラーゲンをリガンドとするにもかかわらず, コラーゲン認識様式は全く異なっていることが明らかとなった. ここで用いた TCS 法の利点は, 1) 遊離の A3 ドメインに由来するシグナルを観測対象としているので複合体の大きさは全く問題とならない (不溶性であっても適用可能である) こと, 2) ネイティブ状態のコラーゲンとの相互作用を観測しているのも, もし受容体が単体のトリプルヘリックスではなく線維を形成した状態のコラーゲンを認識する場合でも相互作用部位を特定できるという点にある.

3.6 GPVI のコラーゲン結合の立体構造とコラーゲン認識

GPVI は 1 回膜貫通型のタンパク質で, 細胞外にコラーゲン結合を担う D1 ドメインと D2 ドメインを有している. また, GPVI は細胞膜上において Fc 受容体 γ サブユニット

と共役しており, コラーゲン結合に伴って細胞内の ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif) と呼ばれるリン酸化モチーフがリン酸化を受け, 細胞内へシグナルが伝達される²⁹⁾.

GPVI の細胞外ドメインはイムノグロブリン (Ig) フォールドを形成する二つのドメイン (D1 および D2) からなり, 変異体実験によって D1 ドメインがコラーゲン結合に重要であることが示されている^{30,31)}. 近年, D1D2 ドメインの X 線結晶構造が明らかとなり³²⁾, D1 ドメインと D2 ドメインはドメイン間の相対配置がほぼ 90° 折れ曲がった構造を形成することが分かった (図 2g). また, D1 ドメイン上にやはりコラーゲンを収容可能な溝が形成されており, ドッキングモデルにおいてもこの結果が支持された. これまでに GPVI のコラーゲン配列認識の特異性についても解析が行われてきた. GPVI はコラーゲンに一般的に含まれる GPO 繰り返し配列をトリプルヘリックス形成依存的に認識し, さらに GPO 繰り返し配列を人工的に架橋すると GPVI への反応性が向上することから, GPVI は線維を形成したコラーゲンを認識しているものと考えられる³³⁾. 興味深いことに, GPVI の結晶中には 2 分子の GPVI 分子が D2 ドメインを介して会合する分子パッキングが存在し, D1 ドメイン上のコラーゲン結合部位がおよそ 55 Å 程度 (コラーゲン分子四つ分) 離れて配置していた³²⁾ (図 2g). よって, 生体内においてもコラーゲンが 2 分子 (あるいは

図3 インテグリン α_2 -I ドメインのコラーゲン認識機構

(a) α_2 -I ドメインと GFOGER 配列を含むコラーゲンペプチド複合体の X 線結晶構造 (PDB code: 1DZI). α_2 -I ドメインを表面表示で, コラーゲンペプチドをチューブ表示した. コラーゲンペプチドの結合関与残基の側鎖をスティック表示した. α_2 -I ドメインの金属イオンを黄色で示す. (b) α_2 -I ドメイン単独 (シアン) およびコラーゲンペプチド複合体 (赤) の構造比較. C ヘリックス領域と C 末端の α_1 ヘリックス領域に大きな違いがみられる.

図4 TCS 法によって同定された A3 ドメインのコラーゲン結合残基

(a) 転移交差飽和法の概念図 (b) TCS 実験におけるスペクトル変化 (c) TCS 実験結果において強度減少を示した残基のマッピング (d) 変異実験におけるコラーゲン結合活性の変化のマッピング (野生型を 1.0 として標準化).

図7 DDR2-DS ドメインの構造とコラーゲン結合認識機構

(a) DDR2-DS ドメインの溶液構造. 2 組の S-S 結合を黄色で示す. (b) TCS 実験結果の DDR2-DS ドメイン上へのマッピング. TCS 実験で顕著なシグナル強度減少が見られた残基と変異実験で結合に関与することが示された D69 について着色した. ドッキングによって得られたコラーゲントリプルヘリックスの位置と合わせて示す.

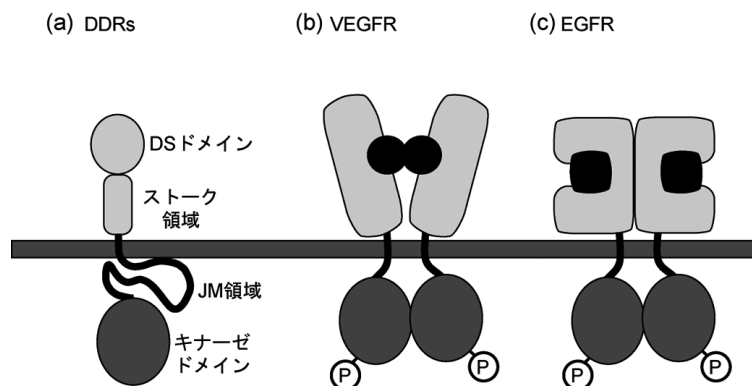


図6 受容体型チロシンキナーゼDDRのドメイン構造と二量体形成機構
(a) DDRのドメイン構造模式図、(b) VEGF受容体と(c) EGF受容体のリガンド結合にともなう二量体形成機構

それ以上)のGPVIを架橋して、細胞内へシグナルを伝達するというメカニズムも考えられる。今後、GPVIとコラーゲンペプチド複合体構造の解明が期待される。

4. 細胞外マトリックスのリモデリングにかかわるコラーゲン受容体DDR

4.1 コラーゲンをリガンドとする異端な受容体型チロシンキナーゼDDRの特徴

Discoidin domain receptor (DDR)は、コラーゲンによって活性化される受容体型チロシンキナーゼ(RTK)である。DDRは増殖因子などの可溶性分子ではなく、不溶性のコラーゲン線維をリガンドとするという点で極めて特徴的なRTKである。DDRは1回膜貫通型のタンパク質であり、細胞外にコラーゲン結合を担うdiscoidin (DS)ドメインと200残基程度のストーク領域を持っており、細胞内にRTKで保存されているキナーゼドメインを持っている(図6a)。また、DDRは膜貫通領域とキナーゼドメインの間に他のRTKよりも長い膜近傍領域(JM領域)を持っているが、その役割はよくわかっていない。DDRは二つのアイソフォームDDR1とDDR2によって構成される。DDR1は主に上皮細胞や白血球などに発現し、DDR2は間質細胞などに多く発現が見られる³⁴⁾。DDR1とDDR2はともに線維型コラーゲンを主に認識するが³⁵⁾、DDR1はタイプIVコラーゲンのような基底膜コラーゲンも認識するのに対して、DDR2はタイプIVを認識せずタイプXコラーゲンを認識することが知られており³⁶⁾、特異性がやや異なっている。DDRは細胞の接着や遊走に関与し、DDRの活性化はMMPの発現を亢進させることから、細胞外マトリックスのリモデリングを介して発生、分化、創傷治癒などに関与していると考えられる。また、DDRは多くの腫瘍細胞において発現が亢進しているという報告もあり、がん細胞の浸潤や転移にも関与していると考えられている³⁴⁾。

EGF受容体やVEGF受容体をはじめとする通常のRTK

活性化のパラダイムにおいては、受容体がりガンド結合によって二量体を形成し、その結果細胞内のキナーゼドメインが自己リン酸化して活性化シグナルが細胞内へ伝わると説明される³⁷⁾(図6b)。しかし、DDRは線維型コラーゲンのような不溶性分子をリガンドとしており、対称な二量体を形成するというメカニズムではDDRの活性化メカニズムを説明することは困難である。

4.2 DDR2-DSドメインの立体構造の決定

われわれのグループではコラーゲンによるDDRの活性化機構を解明するため、まずDDR2-DSドメインの立体構造をNMR法により明らかにすることとした³⁸⁾。酵母*Pichia pastoris*によって発現させたDDR2-DSドメインを用いて、NMR法によって距離情報・角度情報を収集し、分子動力学的な構造計算を行った。得られたDDR2-DSドメインは8本のβストランドからなるdistorted jelly rollフォールドを形成していた(図7a)。β-バレルの下面にはS-S結合が存在し、それにより近接したN末端およびC末端と二つのターン構造により広く平らな面が形成されていた。また、N・C末端の反対側(すなわち細胞膜の反対側)にもう一組のS-S結合が存在し、6本のループ(L1からL6)が分子上面に形成されていた。DDRのDSドメインと高い配列相同性を有する機能ドメインは真核生物に数多く存在しており、すでに立体構造が明らかとなっている血液凝固第Vおよび第VIII因子のC2ドメイン^{39,40)}や、神経細胞の発生にかかわるneuropilinのB1ドメイン⁴¹⁾は29%以上のアミノ酸配列相同性を示す。DDR2-DSドメインとこれらのドメインの構造を比較すると、βシートを形成する領域についてはほとんどよく一致したが、ループ領域については長さや配列、さらにはコンフォメーションに大きな違いがみられた。他のDSドメインにおいてはループ領域を使ってリガンドを認識しており、DDR2もループ領域がコラーゲン結合を担っていると予測される。ところ

が、これまでに報告されている他のDSドメインが認識するリガンド分子は、タンパク質分子から、二重膜中の脂質分子、糖鎖など多様性に富んでおり⁴²⁾、DDR2-DSドメインがどのようにしてリガンドを認識するかについては単独の構造から決定することは困難であった。

4.3 DDR2-DSドメインによるコラーゲン認識機構

そこで、NMR法を用いてDDR2-DSドメインのコラーゲン認識機構を明らかにすることにした。表面プラズモン共鳴 (SPR) 法による解析から、DDR2-DSドメインとタイプIIコラーゲンとの結合定数はおよそ 3×10^{-5} (M) であると見積もられた。一方、全長のDDR2を用いた解析と合致して、タイプIVコラーゲンとの相互作用は観測されなかったことから、DSドメイン単独でコラーゲンのタイプ特異性を決定していることがわかった。つぎに、線維を形成したタイプIIコラーゲンと重水素標識したDDR2-DSドメインを用いてTCS法による解析を行ったところ、コラーゲンと近接することによって大きくシグナル強度が減少した残基がDDR2のループ領域、特にL1, L4, L6ループにおいて数多く観測された。これらの残基をDDR2-DSの立体構造上にマッピングすると、DDR2-DSドメインの分子上面に一つの連続面を形成していた (図7b)。TCS実験と変異実験の結果をあわせると図7bに示すような複合体モデルが作製され、コラーゲンがDDR2分子上面のループによって形成される溝に収容されるように結合していると結論された (図7b)。ここで明らかとなったコラーゲン結合部位にはW52やI112をはじめとする疎水性残基が多く存在することに加えて、D69などの酸性残基が含まれている。この結果から、DDRが認識するコラーゲン配列は、(GPOのような配列ではなく) 疎水性残基や塩基性残基を含む比較的ユニークな配列を認識していることが示唆される。

さて、DDRはコラーゲンが結合することによって、どのようにして二量体を形成して、細胞内のキナーゼドメインが活性化されるのであろうか？最近の細胞を使った生化学的な実験により、DDRはリガンドが存在しない場合でもTM領域を介して二量体を形成していることが報告された⁴³⁾。したがって、DDRはコラーゲンが結合することによって二量体の相対位置が変化し、その結果何らかの形で細胞内のキナーゼの活性化が起こっている可能性が示唆される。今後、DSドメインだけでなく、ストーク領域やTM領域を含めた構造生物学的な解析により、このユニークな受容体型チロシンキナーゼの活性化メカニズムが解明されていくことが期待される。

おわりに

近年、コラーゲン結合タンパク質の認識配列を探索するために、タイプI, II, IIIコラーゲンの部分配列を含む合成コラーゲンペプチドが網羅的に作製され⁴⁴⁾、コラーゲンツールキットという手法として確立された⁴⁴⁾。このキットを用いることにより、DDR2-DSドメイン⁴⁵⁾とvWF-A3ドメイン⁴⁶⁾の認識配列が最近相次いで報告された。その結果、興味深いことにA3ドメインとDDR2-DSドメインは“GPRGQOGVMGFO”という共通する配列を認識していることが明らかとなった。vWFが血管内壁のタイプIIIコラーゲンを認識し、DDR2が間質組織のタイプIIコラーゲンを認識するため、二つの分子が同一の部位を競合するという状況は考えにくい、全く異なる分子が1,000残基以上にもおよぶコラーゲンの配列中の同一のモチーフを認識するに至ったという点は非常に興味深い。今後同定された配列のコラーゲン模倣ペプチドを用いて、これらのコラーゲン結合タンパク質が同一のコラーゲン配列を認識する機構を原子レベルで明らかにすることが期待される。

文 献

- Kadler, K.E., Baldock, C., Bella, J., & Boot-Handford, R.P. (2007) *J. Cell Sci.*, **120**, 1955–1958.
- Persikov, A.V., Ramshaw, J.A., Kirkpatrick, A., & Brodsky, B. (2000) *Biochemistry*, **39**, 14960–14967.
- Canty, E.G. & Kadler, K.E. (2005) *J. Cell Sci.*, **118**, 1341–1353.
- Myllyharju, J. & Kivirikko, K.I. (2001) *Ann. Med.*, **33**, 7–21.
- Nagata, K. (1996) *Trends Biochem. Sci.*, **21**, 22–26.
- Farndale, R.W., Sixma, J.J., Barnes, M.J., & de Groot, P.G. (2004) *J. Thromb. Haemost.*, **2**, 561–573.
- Rich, R.L., Deivanayagam, C.C., Owens, R.T., Carson, M., Hook, A., Moore, D., Symersky, J., Yang, V.W., Narayana, S. V., & Hook, M. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 24906–24913.
- Egeblad, M. & Werb, Z. (2002) *Nat. Rev. Cancer*, **2**, 161–174.
- Ruggeri, Z.M. (1997) *J. Clin. Invest.*, **99**, 559–564.
- Ruggeri, Z.M. (2003) *J. Thromb. Haemost.*, **1**, 1335–1342.
- Nieswandt, B. & Watson, S.P. (2003) *Blood*, **102**, 449–461.
- Sadler, J.E. (1998) *Annu. Rev. Biochem.*, **67**, 395–424.
- Hynes, R.O. (2002) *Cell*, **110**, 673–687.
- Takagi, J., Petre, B.M., Walz, T., & Springer, T.A. (2002) *Cell*, **110**, 599–611.
- Nishida, N., Xie, C., Shimaoka, M., Cheng, Y., Walz, T., & Springer, T.A. (2006) *Immunity*, **25**, 583–594.
- Springer, T.A. (2006) *Structure*, **14**, 1611–1616.
- Emsley, J., King, S.L., Bergelson, J.M., & Liddington, R.C. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 28512–28517.
- Bienkowska, J., Cruz, M., Atiemo, A., Handin, R., & Liddington, R. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 25162–25167.
- Huizinga, E.G., van der Plas, R.M., Kroon, J., Sixma, J.J., & Gros, P. (1997) *Structure*, **5**, 1147–1156.
- Lee, J.O., Rieu, P., Arnaout, M.A., & Liddington, R. (1995) *Cell*, **80**, 631–638.
- Knight, C.G., Morton, L.F., Onley, D.J., Peachey, A.R., Mes-

- sent, A.J., Smethurst, P.A., Tuckwell, D.S., Farndale, R.W., & Barnes, M.J. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 33287–33294.
- 22) Knight, C.G., Morton, L.F., Peachey, A.R., Tuckwell, D.S., Farndale, R.W., & Barnes, M.J. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 35–40.
- 23) Emsley, J., Knight, C.G., Farndale, R.W., Barnes, M.J., & Liddington, R.C. (2000) *Cell*, **101**, 47–56.
- 24) Shimaoka, M., Xiao, T., Liu, J.H., Yang, Y., Dong, Y., Jun, C. D., McCormack, A., Zhang, R., Joachimiak, A., Takagi, J., Wang, J.H., & Springer, T.A. (2003) *Cell*, **112**, 99–111.
- 25) Nakanishi, T., Miyazawa, M., Sakakura, M., Terasawa, H., Takahashi, H., & Shimada, I. (2002) *J. Mol. Biol.*, **318**, 245–249.
- 26) Nishida, N., Sumikawa, H., Sakakura, M., Shimba, N., Takahashi, H., Terasawa, H., Suzuki, E.I., & Shimada, I. (2003) *Nat. Struct. Biol.*, **10**, 53–58.
- 27) Romijn, R.A., Westein, E., Bouma, B., Schiphorst, M.E., Sixma, J.J., Lenting, P.J., & Huizinga, E.G. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 15035–15039.
- 28) Chen, J.M., Kung, C.E., Fearheller, S.H., & Brown, E.M. (1991) *J. Protein. Chem.*, **10**, 535–552.
- 29) Moroi, M. & Jung, S.M. (2004) *Thromb. Res.*, **114**, 221–233.
- 30) Smethurst, P.A., Joutsu-Korhonen, L., O'Connor, M.N., Wilson, E., Jennings, N.S., Garner, S.F., Zhang, Y., Knight, C.G., Dafforn, T.R., Buckle, A., IJsseldijk, M.J., De Groot, P.G., Watkins, N.A., Farndale, R.W., & Ouwehand, W.H. (2004) *Blood*, **103**, 903–911.
- 31) Dumont, B., Minullina, I., Loyau, S., Monteiro, R.C., Lacapere, J.J., Arocas, V., & Jandrot-Perrus, M. (2006) *J. Mol. Biol.*, **361**, 877–887.
- 32) Horii, K., Kahn, M.L., & Herr, A.B. (2006) *Blood*, **108**, 936–942.
- 33) Smethurst, P.A., Onley, D.J., Jarvis, G.E., O'Connor, M.N., Knight, C.G., Herr, A.B., Ouwehand, W.H., & Farndale, R.W. (2007) *J. Biol. Chem.*, **282**, 1296–1304.
- 34) Vogel, W.F., Abdulhussein, R., & Ford, C.E. (2006) *Cell Signal*, **18**, 1108–1116.
- 35) Leitinger, B., Steplewski, A., & Fertala, A. (2004) *J. Mol. Biol.*, **344**, 993–1003.
- 36) Leitinger, B. & Kwan, A.P. (2006) *Matrix Biol.*, **25**, 355–364.
- 37) Schlessinger, J. (2000) *Cell*, **103**, 211–225.
- 38) Ichikawa, O., Osawa, M., Nishida, N., Goshima, N., Nomura, N., & Shimada, I. (2007) *EMBO J.*, **26**, 4168–4176.
- 39) Macedo-Ribeiro, S., Bode, W., Huber, R., Quinn-Allen, M.A., Kim, S.W., Ortel, T.L., Bourenkov, G.P., Bartunik, H.D., Stubbs, M.T., Kane, W.H., & Fuentes-Prior, P. (1999) *Nature*, **402**, 434–439.
- 40) Pratt, K.P., Shen, B.W., Takeshima, K., Davie, E.W., Fujikawa, K., & Stoddard, B.L. (1999) *Nature*, **402**, 439–442.
- 41) Lee, C.C., Kreusch, A., McMullan, D., Ng, K., & Spraggon, G. (2003) *Structure*, **11**, 99–108.
- 42) Baumgartner, S., Hofmann, K., Chiquet-Ehrismann, R., & Bucher, P. (1998) *Protein Sci.*, **7**, 1626–1631.
- 43) Noordeen, N.A., Carafoli, F., Hohenester, E., Horton, M.A., & Leitinger, B. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 22744–22751.
- 44) Raynal, N., Hamaia, S.W., Siljander, P.R., Maddox, B., Peachey, A.R., Fernandez, R., Foley, L.J., Slatter, D.A., Jarvis, G.E., & Farndale, R.W. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 3821–3831.
- 45) Konitsiotis, A.D., Raynal, N., Bihan, D., Hohenester, E., Farndale, R.W., & Leitinger, B. (2008) *J. Biol. Chem.*, **283**, 6861–6868.
- 46) Lisman, T., Raynal, N., Groeneveld, D., Maddox, B., Peachey, A.R., Huizinga, E.G., de Groot, P.G., & Farndale, R.W. (2006) *Blood*, **108**, 3753–3756.