

課題名 (タイトル) :

がんの浸潤や転移に関わる Autotaxin の分子動力学シミュレーション

利用者氏名 : ○石谷 隆一郎

所属 : 和光研究所 基幹研究所 杉田理論生物化学研究室

1. 本課題の研究の背景、目的、関係するプロジェクトとの関係

オートタキシンは悪性がん細胞の培養上清から単離された細胞遊走促進因子で、リゾホスファチジルコリン (LPC) を加水分解してリゾホスファチジン酸 (LPA) を産出する分泌型のリゾホスホリパーゼ D である (Tokumura et al., J. Biol. Chem., 2002)。脂質メディエーターである LPA は G タンパク質共役型受容体に作用し、細胞増殖、分化、遊走など、様々な細胞応答を誘起する (Moolenaar et al., BioEssays, 2004)。したがって、オートタキシンは脳神経系の発達や分化、胎児の血管形成、創傷治癒など、多岐にわたる生命現象にかかわる。一方で、オートタキシンの発現亢進は乳がん、肺がん、脳腫瘍などのがん、および、動脈硬化、肺線維症、神経因性疼痛などの疾患と関連する (Liu et al., Cancer Cell, 2009)。そのため、オートタキシンは抗がん剤とはじめとする創薬のターゲットとしても非常に注目されている。

2. 当研究室の西増らがオートタキシンの結晶構造解析に世界で初めて成功し (Nishimasu et al., Nat. Struct. Mol. Biol., 2011) (図 1)、ソマトメジン B 様ドメイン、触媒ドメイン、ヌクレアーゼ様ドメインからなるオートタキシンの全体構造が判明した。その結果、オートタキシンが異なる鎖長と飽和度を持つ LPC 分子を同様に認識して

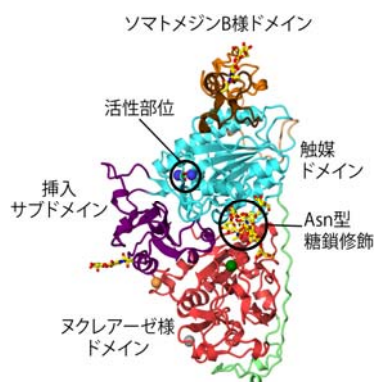


図 1: オートタキシンの結晶構造

切断する機構が明らかになった (図 2)。

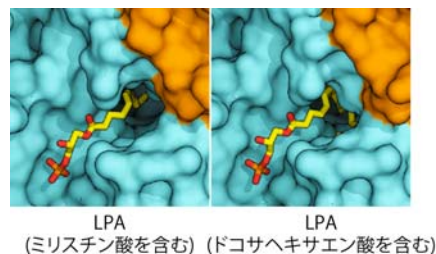


図 2: 異なる脂質分子の認識

3. 同時に、オートタキシンの結晶構造によって新たな疑問も生じた。これまでの生化学的な実験から、オートタキシンは Asn 結合型糖鎖修飾 (図 1) を受けており、この修飾が酵素活性に必須であることが分かっていた (Jansen et al., J. Biol. Chem., 2007)。しかし、結晶構造からは、糖鎖が触媒部位・基質結合ポケットを直接形成しているわけではなく、なぜそれほど大きな影響を与えるのかは謎であった。また、酵素全長の約半分の大きさを占めるヌクレアーゼ様ドメインについても、酵素活性に必須であることが先行研究から判明していた (Cimpean et al., Biochem. J., 2004)。しかし、結晶構造からは触媒部位・基質結合ポケットとは反対側に位置しており (図 1)、触媒ドメインとヌクレアーゼ様ドメイン間は水を介した相互作用が中心であり、お互い独立に動きうることが示唆された。そのため、なぜ酵素活性に大きな影響を与えるのかは謎であった。

4. 具体的な利用内容、計算方法

オートタキシンの糖鎖およびヌクレアーゼ様ドメインが酵素活性に与える影響を調べるため、オートタキシンの MD シミュレーションを行った。具体的には、野生型および一部のドメインや糖鎖を欠損させた変異体をそれぞれ初期構造として MD シミュレーションを行い、シミュレーション中の構造変化の差異を比較し、またそれが生じる原因を相互作用の変化や動きの相関の違いに着目して解析

した。MD シミュレーションには NAMD2 を使用し、水分子を露に考慮した 19 万原子からなる系に対して各構造につきシミュレーションを用いて行った。

5. 結果

野生型、糖鎖を除去した変異体 (Δ glycan)、ヌクレアーゼ様ドメインを除去した変異体 (Δ NLD)、および、糖鎖とヌクレアーゼ様ドメインの両方を除去した変異体 (Δ NLD Δ glycan) のシミュレーション結果の比較から、変異体のシミュレーションでは活性残基である Thr209 と、これまで着目されていなかった触媒ドメイン内の 2 つの挿入サブドメインが不安定化することが確認された。さらに、野生型および各変異体のシミュレーションにおける相互作用や相関解析の結果、オートタキシンには活性残基 Thr209 から 2 つの挿入サブドメインに至る相互作用のネットワークが存在し、この相互作用ネットワークによって Thr209 が安定化されているという新たな知見を得ることができた。そして、糖鎖とヌクレアーゼ様ドメインは上記の挿入サブドメインの柔軟性をそれぞれ異なる方法で抑えることで、活性残基 Thr209 をアロステリックに安定化する役割があるという新たな知見を得た。本研究で得られた糖鎖およびヌクレアーゼ様ドメインによる Thr209 のアロステリックな安定化という知見は、オートタキシン (Enpp2) が属する Enpp ファミリーのメンバーである Enpp1 と Enpp3 にも適用可能であるという点からも興味深い。一方、ソマトメジン B 様ドメインを除去したオートタキシンのシミュレーション (Δ SMB) の結果から、ソマトメジン B 様ドメインは、基質認識に重要であるとされる活性ポケット内のループの構造安定化に寄与することが示唆された。加えて、オートタ

キシンの産物である LPA が結合した状態のシミュレーションからは、LPA の結合がタンパク質構造全体を安定化するという結果が得られた。これは、オートタキシンの熱安定性が LPA 結合により上昇するという実験事実とも一致する。

6. まとめ

オートタキシンの結晶構造に基づいた分子動力学シミュレーションにより、スタティックな構造だけでは不明であったヌクレアーゼ様ドメインのダイナミクスに与える影響を解明した。

7. 今後の計画・展望

現在、研究成果をまとめ学術誌に論文として投稿し改稿中の段階である。

8. RICC の継続利用を希望の場合は、これまで利用した状況 (どの程度研究が進んだか、研究においてどこまで計算出来て、何が出来ていないか) や、継続して利用する際に行う具体的な内容

9. 一般利用で演算時間を使い切れなかった理由 演算時間はほぼ使い切ることができた。申請時間は妥当であったと言える。

10. 利用研究成果が無かった場合の理由

現在、研究成果をまとめ学術誌に論文として投稿し改稿中の段階である。

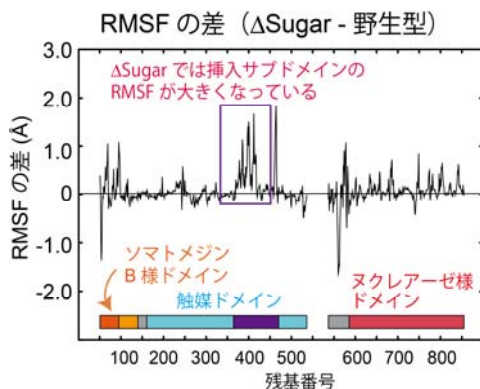


図 3 : Δ Sugar と野生型の RMSF の差