

平成 21 年 5 月 25 日現在

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2007-2008

課題番号：19370047

研究課題名 (和文) ADAM ファミリー関連タンパク質の立体構造と作用機構の解明

研究課題名 (英文) Structural and functional analysis of ADAM family proteins

研究代表者

武田 壮一 (TAKEDA SOICHI)

国立循環器病センター研究所・心臓生理部・室長

研究者番号：80332279

研究成果の概要：本研究では様々な膜タンパク質のエクトドメインシェディングに関わる ADAM プロテアーゼの作用機構を理解するために関連タンパク質の X 線結晶構造解析を行った。ラッセルクサリヘビ毒由来の RVV-X は ADAM 型の重鎖と C 型レクチン様の軽鎖二本を持つ三量体プロテアーゼであり、結晶構造から RVV-X が基質である血液凝固第 X 因子を認識・切断する仕組みを明らかにした。これは ADAM による基質認識機構の良いモデルとなる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	9,900,000	2,970,000	12,870,000
2008年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
総計	13,700,000	4,110,000	17,810,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：メタロプロテアーゼ、細胞外シグナル伝達、エクトドメインシェディング、X 線結晶構造解析

1. 研究開始当初の背景

ADAM は各種サイトカイン、増殖因子の切断遊離 (エクトドメインシェディング) によるシグナル伝達や接着分子、細胞外マトリックス分子 (ECM)、レセプター分子等の切断代謝に関与し、細胞の恒常性維持のみならず癌化などの病態にも深く関与する膜結合プロテアーゼである。ADAM はメタロプロテアーゼドメイン以外にタンパク間相互作用ドメインを持つマルチドメインタンパク質で、成熟型 ADAM の多くは分子 N 末端部より細胞外に、メタロプロテアーゼ (M) ドメイン、ディスインテグリン (D) ドメイン、システインリッチ (C) ドメインおよび EGF 様ドメインを持つ。ADAM 関連タンパク質としては M ドメインのみから成る蛇毒メタロプロテアーゼ

(SVMP) の一つである Adamalysin II の結晶構造が 1993 年に最初に報告され、その後 ADAM17 および ADAM33 の M ドメインの結晶構造がそれぞれ 1998 年および 2004 年に報告された。D ドメイン部については配列類似の蛇毒ディスインテグリンの結晶構造が 2002 年に報告され、さらに ADAM10 の D/C ドメイン部の結晶構造が 2005 年に報告された。しかし、MDC ドメイン全体の結晶構造は全く明らかにされていなかった。本研究からはガラガラ蛇毒由来の ADAM ホモログである VAP1 を用いて様々な結晶化の工夫により ADAM 関連タンパク質としては世界で最初に MDC ドメイン部の結晶構造を得ることに成功した (Takeda *et al.* EMBO J 25, 2388-2396 (2006))。この結果、MDC ドメイン

部は全体として C 字型の構造を持つこと、ADAM 間での配列超可変領域(Hyper-variable-region: HVR)を明らかにした。さらに HVR と酵素活性部位が構造的にも C 字型の両端に向き合うことから、HVR が ADAM の基質認識のエクソサイトである可能性を示した。

2. 研究の目的

本研究の目的は ADAM ファミリーの立体構造と作用機構の解明であるが、具体的な目的の最も重要なものは我々自身で提案した HVR による基質認識機構の検証であり、そのためにターゲットとの複合体の結晶構造解析が必要となる。膜結合 ADAM については生理的な標的分子が明らかにされていないものが多い一方、SVMP は基質が判明し、高い特異性が示されているものが多い。中でも特にラッセルクサリヘビ RVV-X (Russell's viper venom factor-X activator) は血液凝固第 X 因子(FX)を特異的に切断・活性化する事が知られ、基質複合体の解析から ADAM ファミリー全体の基質認識・作用機構理解への良いモデルと成る事が予想され、本研究ではまず着目した。RVV-X は ADAM と相似の MDC ドメインを有し、HVR 内に存在するシステイン残基を介して2本の軽鎖からなる C 型レクチン様ドメイン (CLP) と共有結合したユニークな高分子量ハイブリット型プロテアーゼである。HVR 自体が CLP との結合インターフェースになっている事も予想され ADAM による基質認識の手がかりが得られる可能性が大きいと考えられた。これらのことから、RVV-X の結晶構造の解明と基質認識機構の解明を目的に研究を行った。

3. 研究の方法

RVV-X について市販の標品(Enzyme Research laboratory より入手)およびラッセルクサリヘビ *Daboia russelli* 粗毒 ((財) 日本蛇族学術研究所より入手) よりイオン交換クロマトグラフィーにより既報を参考に精製法を確立した。精製した RVV-X を 3-5mg/ml 程度に濃縮し、市販の様々な結晶化スクリーニングキットを用いてシッティングドロップ法により結晶化の初期スクリーニングを行った。結晶が得られた条件を中心に条件の最適化を行い、単結晶が得られる方法と条件を決定した。最適化された結晶化条件は、0.1M カコジル酸ナトリウム、0.1M 酢酸カルシウム、10% PEG8000、2%PEG3350、pH6.5 をリザーバー溶液に、タンパク溶液とリザーバー溶液それぞれ 1 マイクロリットルずつ混合したドロップを母液とするものであった。20℃、約一週間で結晶は成長し、回折実験に用いることが出来た。得られた結晶のクライオ条件の検討

を行ったところ、リザーバー液への 15% の MPD(1-methyl-2,4-pentandiol)添加が最適であることが分かり、100K の窒素ガス吹き付けによる凍結の前に溶液を置き換え、凍結した。実験室 X 線源 (Rigaku Micromax-007) で回折能を確認し、良好な回折能を示す結晶について放射光を用いたデータ収集を行った。データ収集は SPring-8 の共用ビームライン BL41XU で行った。得られた回折イメージから構造因子を求め、分子置換法による解析を行い、分子モデルの構築を行った。

4. 研究成果

RVV-X は 30 年以上も前よりラッセルクサリヘビ毒中に存在する FX 活性化プロテアーゼとして知られ、その特異性の高さから研究ツールあるいは臨床検査ツールとして広く使われてきた。しかし、容易に高純度標品が入手でき、なおかつ非常に興味深い性質を有しているに関わらずこれまで結晶構造解析されていなかった。それには RVV-X が複雑なドメイン構造を持つこと、計 6 箇所の糖鎖修飾部位を持つこと、などから高純度の精製標品を用いてもそのままでは結晶化しないためと考えられ、実際我々自身でもそのことを確認した。我々は先行研究の VAP1, VAP2 における構造解析の過程で活性部位への特異的阻害剤結合が新たな結晶パッキングインターフェースを生み出す可能性を見出した。活性部位に結合する様々な阻害剤の存在下で RVV-X の結晶化スクリーニングを行ったところ、ヒドロキサム酸骨格を持つ MMP 阻害剤 GM6001 を用いて結晶を得ることに成功した。結晶化条件の最適化を進め、二つの晶系の結晶群、orthorhombic($P2_12_12_1$, $a=70.4\text{\AA}$, $b=91.7\text{\AA}$, $c=152.9\text{\AA}$)および monoclinic ($P2$, $a=73\text{\AA}$, $b=108\text{\AA}$, $c=84.4\text{\AA}$, $\beta=100.8^\circ$)を再現よく得ることに成功した。これらの結晶を用い、ビームライン BL41XU での測定により、それぞれ 2.9\AA ($R_{\text{merge}}=0.069$ (0.212), completeness = 96.4% (79.5%), カッコ内は最外郭データ)および 3.8\AA ($R_{\text{merge}}=0.10$ (0.188), completeness = 93.5% (72.1%))の回折強度データセットを得ることに成功した。分解能の高い Orthorhombic 結晶について様々な重原子溶液を用いて同型置換体の検索を行った。しかし、約半年に渡る検索にもかかわらず有効な重原子置換体を得ることが出来なかったため、分子置換法による構造解析を行った。RVV-X は総アミノ酸数 680 残基以上あるが、分子置換に用いることが出来る各ドメインのモデルはそれぞれ 200 アミノ酸残基以下しかなく、当初構造解析の難航が予想された。しかし幸いなことに M ドメイン、C ドメイン、それぞれの軽鎖部の分子モデルを順次置いていくことにより全体の分子モデル構築に成功し

た。2.9Å の分解能で決定した RVV-X の結晶構造を図 1 に示す。

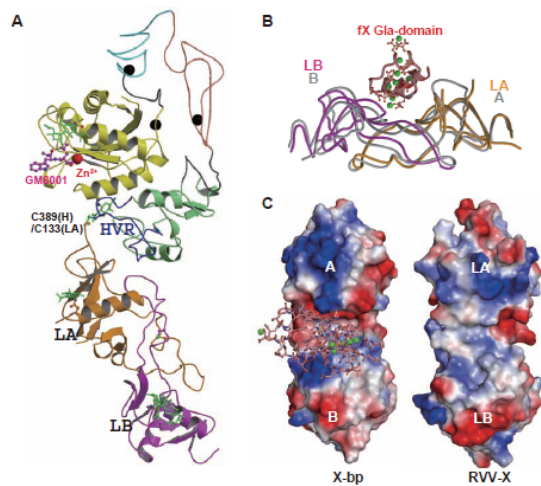


図 1. RVV-X の結晶構造。

A 全体構造のリボン図。B, C、RVV-X 軽鎖部と X-bp との構造比較。雑誌論文①より引用。

アミノ酸配列からの予想通り、分子は P-III 型 SVMP や ADAM の C 字型の MDC ドメイン構造を持つ長鎖部と CLP 構造を持つ軽鎖 (LA および LB) から成っていた (図 1A)。長鎖の HVR 領域にあるシステイン残基 C389 と LA の C 末端システイン残基(C133)間の SS 結合が確認された。また、HVR と LA は SS 結合のみならず、複数の疎水性残基同士の相互作用を形成し、その結果長鎖の C ドメインと軽鎖部は一体として機能することが示唆された。軽鎖部は既に報告されている凝固因子結合タンパク質 X-bp と表面電荷分布を含め、非常に類似した構造を持っていた (図 1B, C)。X-bp は X 因子の Gla ドメインに非常に高い親和性で結合し無力化する毒素である。構造の類似性から RVV-X が 2 本の軽鎖の中央部で形成する窪みが Gla ドメインを認識するエクソサイトである可能性が示唆された。得られた RVV-X の結晶構造と既に報告されている Xa 因子(PDB: 1XKA)および X-bp と X 因子 Gla ドメイン複合体の結晶構造 (PDB: 1IOD)を基にドッキングモデルを作成した。これまでの知見から X 因子の二つの EGF ドメイン間および Gla ドメインと FGF1 の間は溶液中で高い自由度を持つことが示されている。Gla ドメインが X-bp と同様に RVV-X 軽鎖の中央部に結合すると仮定すると、想定されるドメイン間の可動範囲で RVV-X 分子の表面に分子構造の凹凸を基に Xa 因子の分子構造をうまく合わせる事が出来た(図 2A)。前駆体である X 因子の結晶解析はなされていないが、他のセリンプロテアーゼ同様に前駆体では切断部位 (Arg194-Ile195 結合) が分子表面に露出していると考えられる。こ

のドッキングモデルでは想定される切断部のポリペプチド鎖の向きがちょうど RVV-X の活性クレフトに結合できる向きと一致し (図 2B)、また MDC 部に内在する可動性で十分結合可能な近傍に位置している。

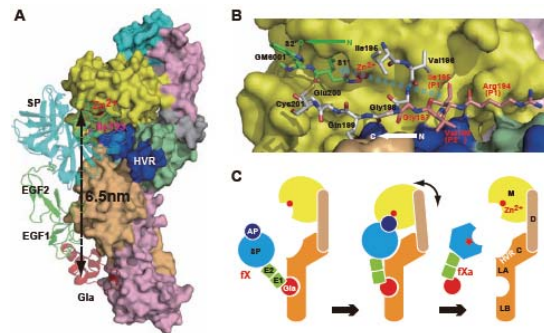


図 2. RVV-X と FX のドッキングモデル。

雑誌論文①より引用。

RVV-X は触媒部と立体構造的に約 6.5nm 離れて存在するエクソサイトで X 因子の Gla ドメインを認識することで高い基質特異性を発揮すると考えられる (図 2C)。このモデルは RVV-X が Gla ドメインを欠損した X 因子を活性化出来ない事、また活性化に Gla ドメインのフォールディングに必要な mM オーダーのカルシウムイオンの存在が必要な事など、これまでの知見をよく説明する。

RVV-X は X 因子の Gla ドメインを認識するエクソサイト部を軽鎖として持ち、HVR はその軽鎖とのインターフェースとして機能している。RVV-X 軽鎖は X-bp 等と同様にドメインスワッピングにより Gla ドメイン結合性を獲得したと考えられるが、さらに MDC ドメイン構造を有するメタロプロテアーゼの HVR 部と結合することで、RVV-X は基質特異性の非常に高い酵素として進化したと考えられる。ハイブリット型 ADAM の初めての結晶構造であり、RVV-X の立体構造とそれから見出される作用規序は、蛇毒素と生体分子の相互作用の理解に留まらず、ADAM プロテアーゼの基質認識機構に重要な示唆を与え、我々が以前提案した ADAM において HVR が基質あるいは基質と結合するタンパク質を認識する部位であるとの仮説を強く支持する。

今後の研究の方向性としてはより詳細な基質認識機構を明らかにするために RVV-X と FX の複合体の結晶構造解析を進めると共に哺乳動物膜型 ADAM の結晶構造の解明も進め、ADAM ファミリータンパク質に共通した基質認識機構、タンパク質間相互作用機構の理解を目指したいと考えている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7件)

- ① 武田 壯一 「蛇毒メタロプロテアーゼの立体構造とラッセルクサリヘビ毒素による X 因子活性化機構」 血栓止血学会誌 (印刷中)
- ② Takeda S. “Three-dimensional domain architecture of the ADAM family proteinases (review article)” *Semin Cell Dev Biol*, 20, 146-152 (2009)
- ③ 荒木 聡彦、五十嵐 智子、武田 壯一 「血管の破壊毒素：明らかになった ADAM 型細胞表面プロテアーゼの結晶構造」 表面 46 (4), 24-33 (2008)
- ④ Takeda S., Igarashi T, Mori H. “Crystal structures of RVV-X: evolutionary gain of specificity by ADAM family proteinases” *FEBS Lett*, 581: 5859-64, (2007)
- ⑤ Igarashi T, Araki S, Mori H, Takeda S “Crystal structures of catrocollastatin /VAP2B reveal a dynamic, modular architecture of ADAM/adamalsin /reprolysin family proteins” *FEBS Lett*, 581, 2416-22, (2007)
- ⑥ 武田 壯一 「ADAM ファミリータンパク質のドメイン構造」 生化学 79(11), 1051-1055 (2007)
- ⑦ 武田 壯一 「蛇毒メタロプロテアーゼの結晶構造と ADAM ファミリーの基質認識機構」 日本結晶学会誌 49, 192-197 (2007)

[学会発表] (計 10件)

- ① 武田壯一 「ADAM プロテアーゼの立体構造と基質認識機構」、国立循環器病センター・東海大学医学部合同シンポジウム「近未来の革新的医療を志向する nano-medicine 研究と personal medicine 研究」、東海大学伊勢原校舎会議室、2008.12.15 (口頭発表)
- ② 武田壯一 「発生・分化・病態に関わる ADAM プロテアーゼ - 出血蛇毒素の結晶構造から見えてきた ADAM の作用機構」、シンポジウム「生体分子による生物間の攻撃と防御」、東京大学弥生講堂・一条ホール、2008.11.8 (招待講演)
- ③ 武田壯一 「蛇毒高分子量メタロプロテアーゼの結晶構造と作用機構」、第 55 回毒素シンポジウム、ラフォーレ山中湖 (山梨県)、2008.7.3 (実行委員長指名講演)
- ④ 武田壯一 「蛇毒ホモログの結晶構造から見えてきた ADAM ファミリープロテアーゼの立体構造と作用機構」、シンポジウム「膜近傍におけるプロテオリシス」、第 60 回日本細胞生物学会年会、2008.6.29

(招待講演)

- ⑤ 武田壯一、盛英三、五十嵐智子「ラッセルクサリヘビ由来血液凝固第 X 因子活性化プロテアーゼ RVV-X の結晶構造」、第 8 回日本蛋白質科学会年会、タワーホール船堀 (東京)、2008.6.11 (ポスター)
- ⑥ 武田壯一: 「蛇毒高分子量メタロプロテアーゼの結晶構造から見えてきた ADAM ファミリータンパク質の基本構造」、BMB2007 (第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同大会)、「ベノミクス・毒生物ゲノムプロジェクト」ワークショップ、横浜、2007.12.11 (招待講演)
- ⑦ Takeda S: "ADAMs' MDC domain architecture revealed by the crystal structures of snake venom metalloproteinases", Gordon Research Conference: Matrix Metalloproteinases, Il Ciocco, Barga, Italy, 2007.6.6 (招待講演)
- ⑧ 五十嵐智子、荒木聡彦、盛英三、武田壯一 「ヘビ毒メタロプロテアーゼの X 線結晶構造解析による ADAM タンパク質の基本構造の解明」第 7 回日本蛋白質科学会年会、仙台、2007.5.26 (ポスター)
- ⑨ Takeda S: "Snake venom metalloproteinases: crystal structures and relationship to the mammalian ADAM family proteins", The 5th Aso International Meeting (AIM) Thrombosis, Hemostasis, and Vascular Science, Aso, Kumamoto, Japan, 2007.5.19 (招待講演)

[図書] (計 1件)

- ① Takeda S. “VAP1: snake venom homolog of mammalian ADAMs (book chapter, p.1-15)” *Handbook of Metalloproteins*, Jhon Wiley & Sons, Inc. (オンライン出版) DOI:10.1002/0470028637.met234 (2008)

6. 研究組織

(1)研究代表者

武田 壯一 (TAKEDA SOICHI)
国立循環器病センター研究所・心臓生理部・室長
研究者番号：80332279

(2)研究協力者

五十嵐 智子 (IGARASHI TOMOKO)
国立循環器病センター研究所・心臓生理部・流動研究員