

機関番号：84404

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20570120

研究課題名（和文）構造解析にもとづくADAMTS13の基質認識・切断機構の解明

研究課題名（英文）Crystal structures of the noncatalytic domains of ADAMTS13 reveal multiple discontinuous exosites for von Willebrand factor.

研究代表者

秋山 正志 (MASASHI AKIYAMA)

独立行政法人国立循環器病研究センター・分子病態部・室長

研究者番号：30298179

研究成果の概要（和文）：ADAMTS13 はフォンビルブランド因子（VWF）を切断することで血小板凝集を制御している。我々はADAMTS13の活性にメタロプロテアーゼドメインとともに必要とされるC末側の領域（残基番号297-685）の立体構造を決定した。その結果、異なるドメイン上に存在する3箇所のVWF結合エキソサイトが空間的に隔たりながらも直線状に並び、ずり応力等でほどけたVWFを広範囲で認識し、VWFに対する特異的な親和性を高めていることが分かった。

研究成果の概要（英文）：We determined crystal structures of an exosite-containing human ADAMTS13 fragment (residues 287-685) required for the cleavage of von Willebrand factor (VWF). We identified 3 VWF-binding exosites on the linearly aligned discontinuous surfaces of the multiple domains traversing the W-shaped molecule. This arrangement suggests that these exosites bind collaboratively to multiple discontinuous regions of VWF.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物化学・構造生物化学

キーワード：分子認識及び相互作用

1. 研究開始当初の背景

ADAMTS13は、2001年にフォンビルブランド因子(VWF)切断酵素として同定されたマルチドメインからなるメタロプロテアーゼである。ADAMTS13は、血中の超高分子量VWF多量体を適度な大きさに断片化することにより、止血機能を適切に維持している。ADAMTS13活性が著減すると、超高分子量VWF多量体が血漿中に蓄積し、その強力な血小板凝集能により血小板血栓が形成され、血小板数減少・溶血性貧血・紫斑を典型症状

とする血栓性血小板減少性紫斑病(TTP)の発症原因となる。

2. 研究の目的

in vitroにおいてADAMTS13によるVWFの切断には、メタロプロテアーゼ(M)ドメインに加えて、C末側に隣接するディスインテグリン様(D)、TSP-1(T1)、Cys-rich (C)、スパーサー(S)ドメインが必要である。すでにADAMTS1、4、5においてM・Dドメインの立体構造が報告されている。しかしながら

T1・C・S ドメインについては立体構造が決定されていなかった。なかでも S ドメインは、除去すると酵素活性が事実上消失すること、TTP の大半を占める後天的 TTP 患者で出現する自己中和抗体のエピトープが集中して存在していることから非常に重要なドメインである。そこで我々は本研究において、エキソサイトの存在する D ドメインから S ドメインまでの 611 アミノ酸に渡る領域 (ADAMTS13-DTCS) の立体構造の決定を試みた。

3. 研究の方法

結晶化を容易にするために糖鎖修飾変異動物細胞 CHO-Lec 3.8.2.1. において ADAMTS13-DTCS を分泌発現させ精製した。Ni-NTA、イオン交換クロマトグラフィーによって精製したタンパク質を用いて結晶化を行い、X 線回折実験によって結晶構造を決定した。決定した立体構造をもとに、基質との相互作用に重要と考えられるアミノ酸残基へ変異を導入し FRETS-VWF73 測定法により ADAMTS13 活性を測定し、VWF 結合エキソサイトを同定した。

4. 研究成果

(1) ADAMTS13-DTCS の結晶構造

格子定数の異なる二つの ADAMTS13-DTCS 結晶から、2.6 Å と 2.8 Å の分解能の立体構造を決定した。両者の構造は互いによく似ていた。C ドメインは構造的に C_A ドメインと C_B ドメインに分けられ、ADAMTS13-DTCS は球状ドメインの D、C_A、S の各ドメインが、伸展モジュールである T1 ドメインと C_B ドメインによって連結された構造を取っていた (図 1)。

二つの DTCS 結晶構造を D ドメインもしくは S ドメイン同士で重ね合わせると、ドメイン間相互作用がほとんどない D-T1 ドメイン間で最もヒンジが曲がりやすいことが分かった。

ADAMTS1, 4, 5 と同様に、ADAMTS13 の D ドメインの立

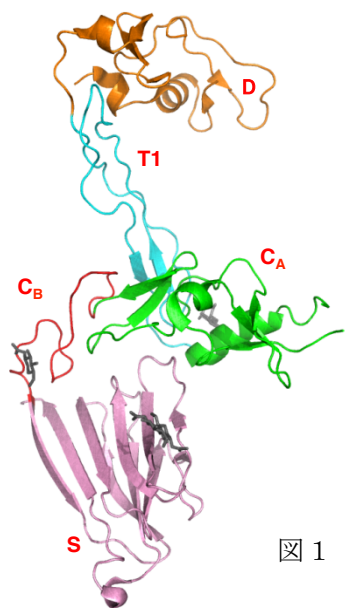
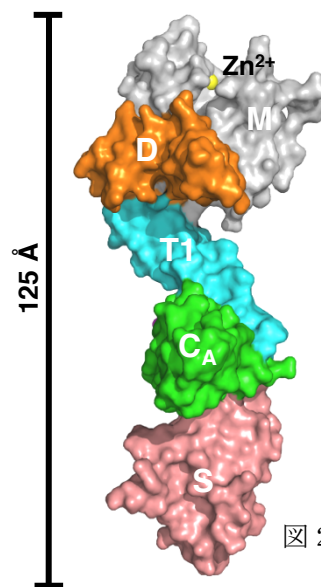


図 1

体構造は ADAM の C ドメインと相同であることが明らかとなった。したがって、ADAMTS の D ドメインをディスインテグリン様ドメインと呼ぶことは誤りである。さらに、C_A ドメインの折り畳み構造は D ドメインと相同であった。ADAMTS ファミリー間で、両ドメインのジスルフィド結合の位置や構造上重要な残基が保存されており、すべての ADAMTS において D および C_A ドメインは類似したコア構造をとると推定される。S ドメインは ADAMTS にのみ存在するジスルフィド結合のない約 120 アミノ酸からなる領域である。S ドメインは 10 本の β ストランドが 2 枚の並行した β シートを形成し、β サンドイッチと呼ばれる構造をとった球状の機能ドメインであることが明らかになった。

(2) VWF 結合エキソサイトの同定

ADAMTS4 の MD と ADAMTS13-DTCS の立体構造をもとに作成した ADAMTS13-MDTCS モデルを図 2 に示す。MDTCS の全長は約 125 Å と推定された。VWF が結合する DTCS 内のエキソサイトを同定するために、立体構造上で基質との相互作用に重要であると考えられるループを中心に 25 箇所に変異を導入し、変異体の酵素活性を FRETS-VWF73 法で測定し、ADAMTS13-MDTCS モデル上に図示した。M ドメインの基質結合ポケットに近い D ドメイン内の荷電



残基のクラスター、C_A ドメインの V ループと周辺の親水性ならびに荷電残基のクラスター、S ドメインの Arg で囲まれた疎水性クラスターはエキソサイトとして機能すると考えられ、それぞれエキソサイト-1、2、3 と名付けた。これら三つのエキソサイトは空間的に隔たりながらも直線上に並んでいた。

(3) ADAMTS13-VWF 相互作用モデル

ADAMTS13 と VWF の相互作用モデルを図 3 に示す。ADAMTS13 の切断部位、Tyr1605-Met1606 は球状の VWF A2 ドメイン内に埋もれているが、血管内で高ずり応力が加わると、A2 ドメインは構造的に不安定な C 末側からほどけ、

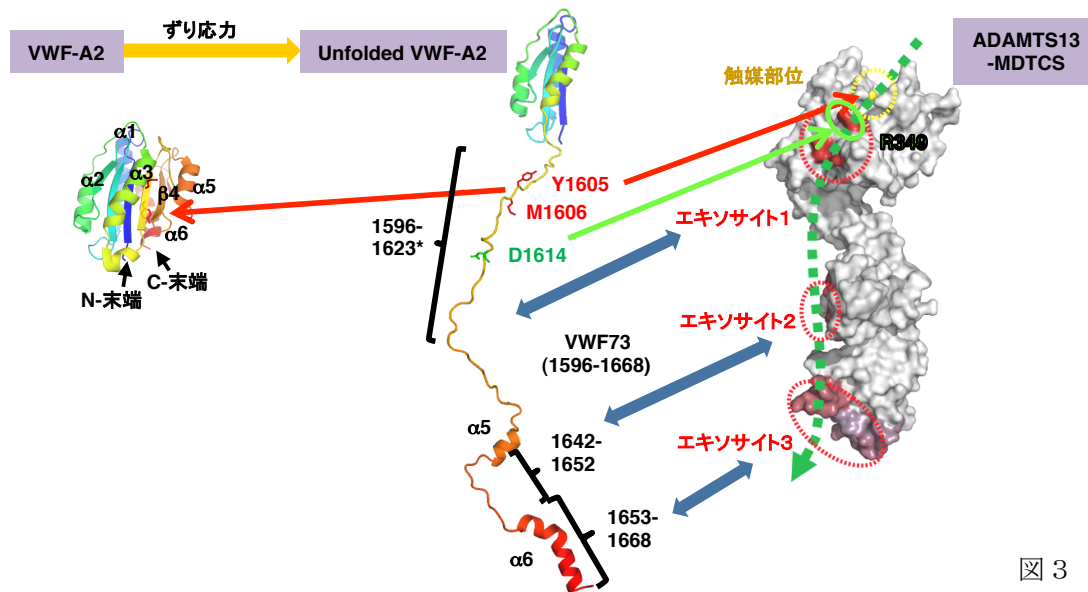


図 3

部分的に伸展した構造を取り、切断部位が露出すると考えられる。A2 ドメイン C 末側 73 アミノ酸残基（残基番号 1596-1668）は ADAMTS13 の特異的な最小基質（VWF73）である。VWF73 は最大 200 Å まで伸展できるので、部分的に進展した状態で、およそ 90 Å にわたって直線上に並ぶ ADAMTS13 の触媒部位と複数のエキソサイト領域との間で相互作用できる。その結果、ADAMTS13 は VWF への特異的な親和性を高め、切断効率が增强されると推察される。S ドメインに結合する後天性 TTP 患者の中和抗体のエピトープ（残基番号 657-666）16 はエキソサイト-3 を構成する β 9- β 10 ループと完全に一致する。 β 9- β 10 ループを構成する残基の変異により、中和抗体の ADAMTS13 への結合が阻害されることから、後天性 TTP 患者では、中和抗体が β 9- β 10 ループへ結合することで、ADAMTS13 と VWF の相互作用が阻害され、ADAMTS13 活性が著しく低下している可能性があることが示唆された。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 4 件）

秋山正志、武田壮一、小亀浩市、高木淳一、宮田敏行「VWF 切断酵素 ADAMTS13 のエキソサイト認識機構」生化学、第 82 巻、第 10 号、950-956 頁、2010 年。

秋山正志「ADAMTS13 のフォンビルブランド因子認識機構の構造学的基盤」日本血栓止血学会誌、第 21 巻、第 3 号、319-326 頁、2010 年。

Akiyama M, Takeda S, Kokame K, Takagi J,

Miyata T. Crystal structures of the noncatalytic domains of ADAMTS13 reveal multiple discontinuous exosites for von Willebrand factor. Proc Natl Acad Sci U S A, 106:19274-19279, 2009.

Akiyama M, Takeda S, Kokame K, Takagi J, Miyata T. Production, crystallization and preliminary crystallographic analysis of an exosite-containing fragment of human von Willebrand factor-cleaving proteinase ADAMTS13. Acta crystallogr Sect F, 65:739-742, 2009.

〔学会発表〕（計 6 件）

秋山正志、武田壮一、小亀浩市、高木淳一、宮田敏行. Crystal structures of the noncatalytic domains of ADAMTS13 reveal multiple discontinuous exosites for von Willebrand factor. (受賞講演) 第 33 回日本血栓止血学会学術集会（鹿児島市、2010 年 4 月）

秋山正志、武田壮一、小亀浩市、高木淳一、宮田敏行. ADAMTS13 非触媒ドメインの結晶構造解析と von Willebrand 因子に対する複数の非連続エキソサイトの同定（ポスター）第 82 回日本生化学会大会（神戸市、2009 年 10 月）

Akiyama M, Takeda S, Kokame K, Takagi J, Miyata T. Identification of multiple discontinuous exosites of ADAMTS13. (ポスター) The MMP Gordon Research Conference 2009 (スイス・Les Diableret 市、2009 年 9 月)

秋山正志. X線解析による ADAMTS13 の非触媒ドメインの構造決定とエキソサイトの同定 (口演) 第7回血液・血管オルビス (東京都、2009年8月)

Akiyama M, Takeda S, Kokame K, Takagi J, Miyata T. Crystal structure of the exosites-containing fragment of ADAMTS13. (口演、Abstract Symposia) XXII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (アメリカ・ボストン市、2009年7月)

秋山正志、武田壮一、小亀浩市、高木淳一、宮田敏行. X線解析による ADAMTS13 の部分立体構造の決定とエキソサイトの同定 (口演) 第32回日本血栓止血学会学術集会 (北九州市、2009年6月)

[その他]

ホームページ等

<http://www.ncvc.go.jp/res/divisions/etiology/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

秋山 正志 (AKIYAMA MASASHI)

独立行政法人国立循環器病研究センター・分子病態部・室長
研究者番号：30298179

(2) 研究分担者

小亀 浩市 (KOKAME KOICHI)

独立行政法人国立循環器病研究センター・分子病態部・室長
研究者番号：40270730

武田 壮一 (TAKEDA SOICHI)

独立行政法人国立循環器病研究センター・分子病態部・室長
研究者番号：80332279

(3) 連携研究者

なし