

平成 22 年 6 月 7 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20790030

研究課題名（和文）

血小板粘着因子 VWF が血流下で ADAMTS-13 によって切断される構造基盤の解明

研究課題名（英文）

Structural basis for the cleavage of VWF by ADAMTS-13 under shear forces

研究代表者

西田 紀貴 (NISHIDA NORITAKA)

東京大学・大学院薬学系研究科・助教

研究者番号：50456183

研究成果の概要（和文）：

von Willebrand factor (VWF) は、速い血流下の血小板凝集反応を担う多量体タンパク質で、プロテアーゼ ADAMTS-13 は VWF-A2 ドメイン内の Tyr¹⁶⁰⁵-Met¹⁶⁰⁶ の間を特異的に切断することで調節している。しかし、A2 ドメインの結晶構造では切断部位は内部に埋もれており、切断の際には A2 ドメインの構造が血流依存的にアンフォールドすると考えられているが、その詳細は不明である。本研究では、A2 ドメインが切断部位を露出させる機構と、アンフォールドした A2 ドメインを ADAMTS-13 が特異的に認識・切断する機構を、構造生物学的に解明することを目的とする。前年度までに A2 ドメインの酵母 (*P. pastoris*) 発現系を構築し、変性剤存在下および非存在下での構造解析を行った。その結果、運動性の高い A2 ドメインの $\alpha 4$ -less ループ付近は物理的な力によってアンフォールディングが誘起され、その結果 ADAMTS-13 切断部位が露出することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Von Willebrand factor (VWF) mediates platelet adhesion under high shear stress. The activity of VWF is controlled by the ADAMTS13, which cuts the VWF in the force dependent manner. However, the structural basis as to how VWF exposes the cryptic site in the A2 domain for ADAMTS13 is unknown. In this study, I made a recombinant VWF A2 domain, using *Pichia Pastorsis*. Backbone resonance assignment of A2 domain was established for >80% signals. Based on the chemical shift change induced by low concentration of urea, the $\alpha 3$ and $\alpha 5$ helices and $\alpha 4$ less loop, which is proximal to the scissile bond, undergoes a conformational change that would exposes the cleavage site for ADAMTS13.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：構造生物学

1. 研究開始当初の背景

VWF (von Willebrand factor) は、血管損傷部位における血小板凝集反応を担うタンパク質であり、分子間 S-S 結合を介して巨大な多量体を形成する。VWF の血小板凝集活性は多量体形成の度合と相関しており、分泌直後の高分子量 VWF は血小板凝集を強く惹起する。一方、血しょう中には VWF を特異的に切断するメタロプロテアーゼ ADAMTS-13 が存在し、VWF の多量体度、すなわち VWF の活性を調節しており、血栓形成と出血傾向の間の適切なバランスを保っている (Fig. 1d)。ADAMTS-13 の切断活性が低下すると、血流中に高分子量 VWF が蓄積し、血小板凝集塊の形成が亢進する血栓性血小板減少性紫斑病 (TTP) を発症する。

近年、血流や細胞の慎重などによって生じる物理的な力が蛋白質の立体構造を変化させ、さまざまな応答を引き起こすことが明らかとなってきた。例えば、フィブロネクチンは細胞表面のインテグリン受容体と結合して張力を受けると、内部に埋もれていた自己会合部位が露出することにより線維を形成する (PNAS, 99:5139 (2002))。また、細胞内の足場蛋白質である p130Cas は細胞の伸長に伴う張力によってリン酸化部位が露出し、下流へのシグナル伝達が起きている (Cell, 127: 1015 (2006))。このような生命現象においては、物理的な力によって蛋白質の構造が部分的にアンフォールドすると考えられ

ているが、アンフォールド状態となったタンパク質の構造や、それらが他の分子によって認識される機構については、溶液中で常に一定の構造を形成しない天然変性タンパク質と同様に構造生物学な解析が進んでおらず、不明な点が多く残されている。

ADAMTS-13 による VWF の切断においても、血流による「ずり応力」の存在が必要である。近年、ADAMTS-13 切断部位を含む VWF-A2 ドメインの X 線結晶構造が明らかになり、切断部位である Tyr1605 と Met1606 が分子内部に埋もれていることが示された (PNAS, 106: 9226 (2009))。したがって、A2 ドメインは ADAMTS-13 による切断を受ける際には、切断部位が露出するような構造変化が起きていると考えられるが、その構造的詳細は不明である。また、ADAMTS-13 は VWF を唯一の基質とし、一ヶ所の切断部位を特異性高く切断する。これまでの生化学的な研究から、ADAMTS-13 による A2 ドメインの認識には切断部位以外の領域との相互作用が関与していることが報告されている。しかし、一定の構造を形成していない A2 ドメインと、分子量が 100 K を超える ADAMTS-13 との相互作用の解明は、従来の NMR 法では困難であるため、ADAMTS-13 による特異的な切断機構は明らかとなっていない。

2. 研究の目的

本研究では、1) 血流によって誘起される A2 ドメインの構造変化、2) ADAMTS-13 による A2 ドメイン認識様式、の 2 点を明らかにすることにより、ADAMTS-13 が速い血流下において A2 ドメインを特異的に切断する構造的基盤を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、血流下でアンフォールドした VWF-A2 ドメインが ADAMTS-13 によって特異的に認識・切断される機構を明らかにするため、以下の 2 点を明らかにする。

(1) 血流によって A2 ドメインの ADAMTS-13 切断部位が露出する機構の解明

VWF-A2 ドメインは、1M 程度の尿素存在下では、ADAMTS-13 によって切断を受けることから、変性剤が張力と類似した構造変化を A2 ドメインに及ぼしていることが想定される。A2 ドメインに徐々に変性剤を加えた際に、A2 ドメインにどのような構造変化が生じてくるのか、様々な NMR 手法を用いて明らかにする。また同様の条件で、ADAMTS-13 による A2 ドメインの切断実験を行い、構造解析の結果との比較を行うことで、A2 ドメインの切断が受けるために必要な構造変化について明らかにする。

(2) アンフォールド状態の A2 ドメインが ADAMTS-13 によって認識される機構の解明

本研究では、アンフォールド状態にある A2 ドメインと ADAMTS-13 との相互作用様式を明らかにするため、複合体の分子量に依存せず相互作用残基の同定が可能な転移交差飽和 (TCS) 法の適用を試みる。また、複合体の構造を電子顕微鏡によっても観測を行い、NMR で得られた情報と併せて複合体構造のモデルを提唱する。

4. 研究成果

まず、A2 ドメインの大腸菌を用いた大量発現系の構築を行った。その結果、可溶画分への発現量が極めて少なく、NMR 解析に供するには不十分であった。そこで、安定同位体標識蛋白質の調製が可能な真核細胞であるメタノール資化酵母 (*P. pastoris*) を用いた発現系を構築した。その結果、NMR 解析に十分な 1L あたり 5mg 程度の発現量を得ることに成功した。得られた A2 ドメインが正しく立体構造を形成していることを均一 15N 標識 A2 ドメインの NMR スペクトルより確認した。

さらに、13C, 15N 標識を施した A2 ドメインを調製し、各種三重共鳴実験により A2 ドメインの主鎖連鎖帰属を行った。その結果、A2 ドメインの主鎖アミドシグナルの 80% を帰属することに成功した。A2 ドメインに低濃度の変性剤 (Urea) を滴定したところ、Urea 濃度依存的な化学シフト変化が観測された。化学シフト変化は、ADAMTS-13 切断近傍に存在する $\alpha 3 \cdot \alpha 5$ ヘリックス、および $\alpha 4$ -less ループ近傍に観測された。また、A2 ドメインの異核 NOE 実験において、同様の領域が高い運動性を示した。以上の結果から、運動性の高い A2 ドメインの $\alpha 4$ -less ループ付近は物理的な力によってアンフォールディングが誘起され、その結果 ADAMTS-13 切断部位が露出することが示唆された。

また、ADAMTS-13 の活性発現に十分な領域を含む動物細胞発現系を取得し、Ni アフィニティー精製により十分な純度で精製することにも成功した。得られた ADAMTS-13 を用いて A2 ドメインの切断反応を行い、2M 尿素存在下において、A2 ドメインの特異的な切断が起こることを明らかにした。

今後は A2 ドメインと ADAMTS-13 との相互作用について研究を推進する予定である。すでに ADAMTS-13 の活性発現に必要な MDTCS 領域の哺乳細胞発現系の構築は完了している。今後、MDTCS と A2 ドメインの相互作用解析を表面共鳴プラズモン法および NMR 法によって進める予定である。

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 8 件)

1) Ogino S, Nishida N, Umemoto R, Suzuki M, Takeda M, Terasawa H, Kitayama J, Matsumoto M, Hayasaka H, Miyasaka M, Shimada I “Two-state conformations in the hyarulonan-binding domain regulate CD44 adhesiveness under flow condition”, *Structure*, 18, 649-56 (2010)

2) Xie C, Zhu J, Chen X, Mi LZ, Nishida N, Springer TA “Structure of an integrin with an αI domain, complement receptor type 4” *EMBO J*, 29, 666-79 (2010)

3) Ogino S, Kubo S, Umemoto R, Huang

S, Nishida N, Shimada I “Observation of NMR signals from proteins introduced into living mammalian cells by reversible membrane permeabilization using a pore-forming toxin, Streptolysin O” J Am Chem Soc, 131, 10834-5 (2009)

4) Shimada I, Ueda T, Matsumoto M, Sakakura M, Osawa M, Takeuchi K, Nishida N, Takahashi H. “Cross-saturation and transferred cross-saturation experiments.” Prog. Nuc. Magn. Reson. Spect., 54, 123-140 (2009)

5) Zhu J, Luo BH, Xiao T, Zhang C, Nishida N, Springer TA. “Structure of a complete integrin ectodomain in a physiologic resting state and activation and deactivation by applied forces” Mol Cell 32, 849-61 (2008)

6) Mi LZ, Grey MJ, Nishida N, Walz T, Lu C, Springer TA. “Functional and structural stability of the epidermal growth factor receptor in detergent micelles and phospholipid nanodiscs” Biochemistry. 47, 10314-23 (2008)

7) 西田紀貴・嶋田一夫
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
生化学, 80 483-92 (2008)

8) 西田紀貴・嶋田一夫
不溶性の細胞外マトリックスとの相互作用を解明する新しいNMR測定法
生体の科学, 59 358-59 (2008)

[学会発表] (計1件)

○宝田理、西田紀貴、久保智史、吉川雅英、嶋田一夫

Structural Mechanism for the Affinity Regulation of Cytoplasmic Dynein

International Workshop Dynein 2009

(ポスター発表、査読なし)

神戸 (2009年11月)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西田 紀貴 (NISHIDA NORITAKA)

東京大学・大学院薬学系研究科・助教

研究者番号：50456183