

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570155

研究課題名(和文) X線結晶構造解析による血栓症発症機構の解明

研究課題名(英文) Crystal structure analysis for the pathogenesis of thrombosis

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・研究所・室長

研究者番号：30298179

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：日本人の10人に1人がヘテロで持つADAMTS13遺伝子のP475S多型変異は保因者のプラズマVWF切断活性の低下を引き起こす。その分子機構を解明するため、P475S変異型DTCS領域の結晶構造を決定した。その結果、本変異は変異部位が存在するループに局所的な構造変化をもたらし、ループ構造が不安定化すること、酵素学的実験からVWFとの相互作用が低下し切断効率が低下すると考えられた。変異型酵素のずり応力下でのVWFマルチマー切断活性は正常型の7割程度で、P475S変異は先天性血栓性血小板減少性紫斑病の原因変異ではないというこれまでの結果と一致した。

研究成果の概要(英文)：A P475S polymorphism in the ADAMTS-13 gene causes an reduction in plasma VWF-cleaving activity. To demonstrate the impact of this mutation, we determined the crystal structure of the P475S mutant of ADAMTS13-DTCS (DTCS-P475S) and the enzymatic parameters of MDTCS-P475S. Structural analysis showed that the conformation of the V-loop was significantly different in DTCS-P475S, where no obvious interactions of Ser475 with other residues were observed. MDTCS-P475S showed a reaction rate similar to that of wild-type MDTCS, but showed two-fold lower affinity for the peptidyl substrate. MDTCS-P475S can moderately cleave shear-treated VWF. We have provided structural evidence that the P475S polymorphism in ADAMTS-13 leads to increased local structural instability, resulting in lowered affinity for the substrate without changing the reaction rate. The moderate activity of ADAMTS-13-P475S for shear-treated VWF is sufficient to prevent thrombotic thrombocytopenic purpura onset.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：構造生物化学

キーワード：ADAMTS13 von Willebrand因子 結晶構造

1. 研究開始当初の背景

ヒト成熟型 ADAMTS13 は 1,398 アミノ酸からなる血漿中の亜鉛メタロプロテアーゼで、血小板血栓の形成を促進する von Willebrand 因子 (VWF) を切断する。ADAMTS13 活性の消失は血中で超高分子量 VWF マルチマーの蓄積をもたらす、血小板減少、溶血性貧血を示す全身性の重篤な疾患である血栓性血小板減少性紫斑病 (TTP) の病因となる。我々は 2009 年に、ヒト ADAMTS13 のディスインテグリン様ドメインからスパーサードメインまでの 399 アミノ酸残基にわたる領域 (DTCS) の結晶構造を決定し、空間的に隔たった分子表面に 3 カ所の VWF 結合エキソサイトが 90 Å にわたって直線状に並んでいることを明らかにした。TTP の 9 割を占める後天性 TTP 患者の ADAMTS13 中和抗体の共通エピトープは、我々が VWF 結合エキソサイトの一つとして同定したスパーサードメインのループを構成するアミノ酸残基に相当していた。

2. 研究の目的

ADAMTS13 の C ドメインには、東アジア人特有の遺伝子多型 P475S (c.1423C>T) が存在し、日本人の約 10 人に 1 人は本変異のヘテロ接合体である。我々は P475S 変異によって酵素活性が低下すること、正常型の Pro475 はシス体であり Pro475 が位置するループ (V ループ) 構造の保持に重要である可能性があること、このループは基質 VWF が結合するエキソサイトであることを明らかにしたが、触媒部位から離れた C ドメインに位置する Pro475 の Ser への置換が ADAMTS13 の構造および活性に及ぼす詳細は不明であった。本研究では、P475S 変異の活性低下機構を明らかにするために、変異体の立体構造決定と酵素学的解析を行った。

3. 研究の方法

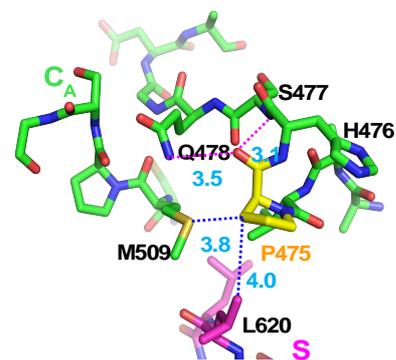
(1) P475S 型 ADAMTS13 の DTCS ドメインを発現・精製して X 線結晶構造解析を行った。(2) 低分子基質 FRETS-VWF73 を用いて ADAMTS13-MDTCS の酵素キネティクスを決定した。(3) ずり応力で変性させた天然基質 (VWF マルチマー) を用いて P475S 変異 ADAMTS13-MDTCS の切断活性を測定した。

4. 研究成果

変異により均一な高マンノース型の糖鎖タンパク質を分泌する CHO Lec 3.2.8.1 株を用いて P475S 変異型 DTCS を精製・結晶化し、2.8 Å の分解能で立体構造を決定した (PDB ID: 3VN4) (図 1A)。P475S 変異型の骨格構造は以前に我々が決定した正常型 DTCS とほぼ一致したが、P475S 変異が存在する V ループ周辺の立体構造が局所的に野生型の構造と異なっていた (図 1B)。正常型 DTCS の 2 つの構造モデル (PDB ID: 3GHM, 3GHN) においては、Pro475

は Ser477 および Gln478 の側鎖とそれぞれ 3.5/3.8 Å および 3.1/3.5 Å の距離で水素結合を形成していたが、P475S 変異型においては、それらの距離は 5.0 Å および 8.3 Å となり、水素結合は失われていた。さらに正常型 DTCS では、Pro475 は C_A ドメインの Met509 と S ドメインの Leu620 とファンデルワールス結合を形成し構造を安定化させていたのに対し、P475S 変異型 DTCS では相互作用が見られなかった。P475S 変異型 DTCS において、Ser475 は C および S ドメイン内の他の残基との明確な相互作用がないという結果から、変異型 DTCS においては V ループの構造が正常型よりも不安定である可能性が示唆された。

正常型 (PDB: 3GHN)



P475S 型 (PDB: 3VN4)

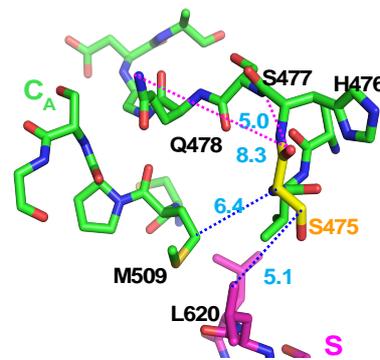


図 1. 正常型および P475S 型 DTCS の Pro475 および Ser475 周辺の構造。正常型 DTCS 構造 (上図) の橙色と紫色の破線はそれぞれ Pro475 の水素結合とファンデルワールス結合を示す。P475S 変異型 DTCS 構造 (下図) の破線は正常型の破線に対応する。数字は距離を示す (単位: Å)。

この構造変化が酵素活性に及ぼす影響を解明するために、正常型と P475S 変異型の酵素活性に必要な十分な領域 (ADAMTS13-MDTCS) を発現・精製し、その酵素学的パラメーターを蛍光ペプチド基質の FRETS-VWF73 を用いて決定した。その結果、正常型および P475S 変異型 MDTCS は V_{max} および k_{cat} はほぼ等しいのに対し、 K_m 値は変異型が正常型よりも約 2 倍高か

った。P475S 変異型 MDTCS における触媒活性の約 2 倍の低下はペプチド基質に対する親和性の低下によるものであることが示唆され、C_A ドメインの V ループが基質との相互作用を担うエキソサイトに一つであるとい考えに合致した。

ADAMTS13 により切断される A2 ドメインの Tyr1605-Met1606 は立体構造的に内部に埋もれており、通常の条件では VWF マルチマーは ADAMTS13 によって *in vitro* で切断されない。VWF マルチマー切断実験においては、切断部位を露出させるために、尿素を加えて変性させた後に切断を行ってきた。しかし P475S 変異型 ADAMTS13 は尿素に対して正常型よりも感受性が強く、反応液中の尿素の影響が無視できない。より生理的な条件で VWF マルチマー切断活性を測定するために、ボルテックスを用いてすり応力をかけることで切断部位を露出させ、正常型と変異型の切断活性を比較する手法を用いて実験を行った (図2)。その結果、P475S 変異型の反応 2 時間後の VWF 切断効率は正常型のおよそ 60%であった。これは活性が 10%以下にまで減少する尿素を変性剤に用いた場合とは対照的で FRETs-VWF73 を用いた測定による活性値に近かった。したがって、尿素を用いない測定法では合成基質に加え天然基質である VWF マルチマーでも P475S 変異型 MDTCS は正常型の 60%~70%程度の活性を示し、P475S 変異は先天性 TTP の原因変異ではないという考えと一致した。

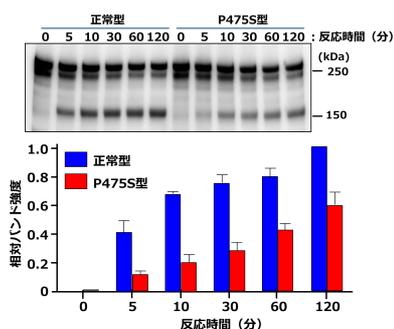


図2. 正常型および P475S 変異型 MDTCS による VWF マルチマーの切断。ボルテックス処理 (2,500 rpm, 3 分) した VWF マルチマー (100 nM VWF モノマー相当) に 1 nM の正常型および P475S 変異型 ADAMTS13-MDTCS を加えて 0 分-120 分 37°C で処理し、ウエスタンブロッティングによって切断活性を検出した。

今回の結果から、ADAMTS13 は VWF の切断において複数のエキソサイトを使って VWF を認識して結合することがより確かなものとなった。血漿中に低濃度でしか存在しない ADAMTS13 が、漿タンパク質 (約 80 mg/ml) のうちのわずか 10 μg/ml にしか過ぎない VWF の 1 か所のペプチド結合を正確に切断するには、ADAMTS13 の複数ドメイン上のエキソサイトを介した多段階

での VWF への結合が必要と考えられる。様々な病態に關与している他の ADAMTS プロテアーゼの特異的な基質認識においても同様な考え方が提唱されており、その構造学的な解明がなされることで、特異的な拮抗薬の開発など新規治療につながると考えられ、今後の ADAMTS プロテアーゼの構造学的研究の発展が期待される。

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 6 件)

- 1) Akiyama M, Nakayama D, Takeda S, Kokame K, Takagi J, Miyata T. Crystal structure and enzymatic activity of an ADAMTS-13 mutant with the East Asian-specific P475S polymorphism. J Thromb Haemost 11: 1399-1406, 2013 (査読有).
- 2) 秋山正志、武田壮一、宮田敏行. 東アジア人特有の P475S 変異を持つ ADAMTS13 の立体構造と機能解析. 日本血栓止血学会誌 第 24 巻、613-618 頁、2013 年 (査読有).
- 3) Doi M, Matsui H, Takeda H, Saito Y, Takeda M, Matsunari Y, Nishio K, Shima M, Banno F, Akiyama M, Kokame K, Miyata T, Sugimoto M. ADAMTS13 safeguards the myocardium in a mouse model of acute myocardial infarction. Thromb Haemost 108:1236-1238, 2012 (査読有).
- 4) Shin Y, Akiyama M, Kokame K, Soejima K, Miyata T. Binding of von Willebrand factor cleaving protease ADAMTS13 to Lys-plasmin(ogen). J Biochem 152:251-258, 2012 (査読有).
- 5) 秋山正志、平井秀憲、宮田敏行. プラスミノゲンの立体構造. 日本血栓止血学会誌 第 23 巻、516-519 頁、2012 年 (査読有).
- 6) 宮田敏行、小亀浩市、秋山正志、坂野史明、中山大輔、武田壮一. ADAMTS13 研究の最先端. 臨床血液 第 53 巻、672-679 頁、2012 年 (査読有).

(学会発表) (計 5 件)

- 1) 平井秀憲、秋山正志、宮田敏行. 「哺乳類細胞を用いた ADAMTS13 ドメインの一過性大量発現」 第 13 回日本蛋白質科学会年会、2013 年 6 月 12 日-14 日、鳥取市.
- 2) 小亀浩市、秋山正志、宮田敏行. 「ADAMTS13 の正常な分泌にはシクロフィリン B によるプロリン残基異性化が必要であ

る」第35回日本血栓止血学会学術集会、
2013年5月30日-6月1日、山形市。

- 3) 土井政明、松井英人、竹田征治、斎藤能彦、
武田麻衣子、松成泰典、西尾健治、嶋緑倫、
坂野史明、秋山正志、小亀浩市、宮田敏行、
杉本充彦。「マウス急性心筋梗塞モデルに
おける ADAMTS13 の心筋保護作用」第
35回日本血栓止血学会学術集会、2013年
5月30日-6月1日、山形市。
- 4) Masaaki Doi, Hideto Matsui, Yukiji Takeda,
Yoshihiko Saito, Maiko Takeda, Yasunori
Matsunari, Kenji Nishio, Midori Shima,
Fumiaki Banno, Masashi Akiyama, Koichi
Kokame, Toshiyuki Miyata, Mitsuhiko
Sugimoto. Protective role of ADAMTS13
for myocardium in mouse model of
experimental myocardial infarction. 54th
American Society of Hematology, Annual
Meeting and Exposition, December 8-11,
2012, Atlanta, USA.
- 5) Hideto Matsui, Masaaki Doi, Yasunori
Matsunari, Maiko Takeda, Kenji Nishio,
Midori Shima, Kenji Soejima, Fumiaki
Banno, Masashi Akiyama, Koichi Kokame,
Toshiyuki Miyata, Mitsuhiko Sugimoto.
ADAMTS13 improving the cell engraftment
efficacy in mouse model of bone marrow
transplantation. 54th American Society of
Hematology, Annual Meeting and Exposition,
December 8-11, 2012, Atlanta, USA.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

- 出願状況(計0件)
- 取得状況(計0件)

〔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・研
究所・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・研
究所・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・研
究所・室長

研究者番号: 80332279

(3) 連携研究者

なし