

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570156

研究課題名(和文)立体構造に基づくADAMプロテアーゼによるシェディング機構の解明

研究課題名(英文)Structural study for understanding the molecular mechanism of ectodomain shedding by ADAM family proteinases

研究代表者

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

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)：ADAMは増殖因子やサイトカインの前駆体、様々な膜タンパク質の細胞外ドメイン(エクストドメイン)を切断遊離(シェディング)する主に膜結合型のメタロプロテアーゼであり、発生分化や形態形成、あるいはがんやアルツハイマー病など様々な病態にも関わる。ADAMが切断配列には特異性が無く、どのように基質を認識しているか不明である。本研究では基質の明確な蛇毒ADAMに着目して構造解析を行った。Multitactivaseはプロトロンビンを切断しトロンビンを産生する活性を持つ蛇毒ADAMである。Multitactivaseの主要ドメインについて2.6 Å分解能での結晶構造決定を行い、基質認識機構を考察した。

研究成果の概要(英文)：ADAM proteinases are mostly type-1 membrane-bound glycoproteins and function as major sheddases for the processing of cell-surface-protein ectodomains, including the latent forms of growth factors and cytokines. ADAMs play key roles in normal development and morphogenesis and are associated with several diseases, including cancer and Alzheimer's disease. There are no consensus amino acid sequences around the sites cleaved by ADAMs and the molecular mechanism how ADAMs recognize the target molecules remains elusive. We focused on several ADAMs from snake venoms for crystallographic studies because snake ADAMs are soluble proteinases without membrane-spanning regions and usually display high specificity for distinct target molecules. Multitactivase isolated from Echis multimantus has a prothrombin-activating activity. We have determined a crystal structure of the exosite domain of Multitactivase and discussed the molecular mechanism of prothrombin recognition for cleavage by Multitactivase.

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：プロテアーゼ シグナリング 構造生物学 基質認識機構 マルチドメイン構造 X線結晶構造解析 タンパク質間相互作用 ディスインテグリン

1. 研究開始当初の背景

ADAM ファミリープロテアーゼは発生・分化、形態形成、あるいは癌やアルツハイマー病など様々な病態に関わる主に膜結合のプロテアーゼである。ADAM の基質としては TNF- α やそのレセプター、HB-EGF など EGF ファミリー増殖因子前駆体、カドヘリンなどの接着分子、APP などが含まれ、ADAM はこれらを切断遊離(エクストドメインシェディング)する主要な酵素群を構成する。ADAM はこのシェダーゼとしての重要な機能の他にインテグリンなどの他の膜タンパク質や細胞外マトリックスタンパク質と相互作用し、細胞間接着にも関与することが知られる。しかし、ADAM が切断する基質の切断部位周辺にコンセンサス配列は存在せず、ADAM がどのように基質を特異的に認識し切断するか、あるいは他のタンパク質とどのように相互作用するか、などの詳細はほとんど分かっていない。我々は出血蛇毒に含まれるプロテアーゼが膜型 ADAM の細胞外ドメインと同様のドメイン構造を持つことに着目し、X 線結晶構造解析を進めてきた。これまで 3 種類の蛇毒 ADAM の構造決定を行い、哺乳動物膜型分子とも共通した ADAM 細胞外ドメインの基本立体構造を世界で初めて明らかにした。特に ADAM に共通して含まれるシステインリッチドメイン(ADAM-CR ドメイン)に配列の超可変領域(hyper-variable region, HVR)を見出し、それが ADAM の基質認識のエクソサイト(触媒部位以外の基質結合部位)である可能性を提案している。さらに、類縁の可溶性プロテアーゼ群 ADAMTS ファミリーについても研究対象を広げている。ADAMTS13 は血漿 von Willebrand 因子(VWF)の生理的な切断プロテアーゼで、その遺伝的あるいは後天的な機能欠損は血中の超高分子量 VWF を蓄積し重篤な血栓性血小板減少性紫斑病を引き起こす。我々は ADAMTS13 の VWF 認識部位と考えられる D, T, C, S の各ドメインを含むフラグメ

ントの構造決定に成功し、ADAMTS ファミリーについても世界で初めて基本立体構造を明らかにした。その結果、ADAMTS ファミリーは ADAM-CR ドメインを 2 つ含むことが明らかになり、それらの HVR とその周辺領域が ADAM と同様に基質認識のエクソサイトであることが強く示唆された。本研究では基質が明確に分かっている様々な ADAM を対象とし、それらの結晶構造解析および基質複合体の結晶構造解析を行うことで ADAM の基質認識機構のさらなる理解を進めることを目的に研究を行うことにした。

2. 研究の目的

上述したように研究の大きな焦点の一つは、「ADAM がどのように切断する基質タンパク質を認識するか」である。膜結合型 ADAM の基質は数多く知られるが、それらの切断部位の周辺配列には共通性は見られず、ADAM は切断部位周辺のアミノ酸配列を直接読み取っているのではなく、基質認識には切断部位以外のエクソサイトが関与する可能性が強く示唆されている。また、ADAM の触媒ドメインについては既に結晶構造が数多く解かれているが、いずれにおいても基質ペプチド鎖は、触媒クレフトに連続 β シートを形成するように進展した構造を取って結合し、溝に嵌らない外側を向いた側鎖はほぼプロテアーゼ本体と相互作用しないことから、ADAM の触媒部は切断部周辺の連続したアミノ酸側鎖を厳密には認識しないであろうことが予測されている。蛇毒 ADAM は膜貫通領域を持たない可溶性 ADAM であり、膜型 ADAM に比較して、特定の基質のみを切断するものが多い。そこで本研究では基質が明確にされている蛇毒 ADAM についてさらに結晶構造解析を進め、それらの基質特異性がどのように生じているかを見出すことで、膜型 ADAM と共通した基質認識機構を明らかにすることを目指す。

3. 研究の方法

本研究では様々な ADAM の内、蛇毒由来の一群の ADAM に着目して研究を行った。プロトロンビン切断・活性化作用を持つ数種蛇毒 ADAM について比較検討し、中東由来の *Echis multisquamatus* の毒腺液に含まれる multactivase に絞って以下の研究を進めた。まず、蛇毒凍結乾燥品より、各種液体クロマトグラフィにより、Multactivase を単離精製した。さらに基質複合体の結晶を得るために触媒部を欠損させたエキソサイト断片 Multactivase M を調製し、プロトロンビンとの複合体試料を調製した。得られた精製標品を濃縮 (5mg/ml 以上) し、結晶化ロボット Mosquito とハンプトンリサーチ社製結晶化キットを主に用いて結晶化スクリーニングを行った。得られた結晶の結晶化条件の精密化を行い、Rigaku Micromax-007 で初期解析、結晶学的特徴づけを行った後、SPring-8 のビームラインで回折データセットを取得し、構造解析を行った。

4. 研究成果

Multactivase 分子全体の結晶については 3.3 Å 分解能の回折データセットを得て構造解析に着手した。しかし、既知の ADAM および C 型レクチン様ドメインの構造を用いた分子置換法による位相決定をすることが出来ず、また有効な重原子置換体を得ることも出来なかったため、構造解析の進展が困難であった。そこで、基質との共結晶化を目的として調製していたメタロプロテアーゼドメインを欠失した Multactivase M について結晶スクリーニングを進めたところ、複数の結晶化条件下で異なる結晶系の結晶を得ることに成功した。それぞれの晶系の結晶について特徴づけ、結晶化条件、凍結条件等の最適化を進めたところ、単斜晶系 ($P2_1$, $a=84.5\text{\AA}$, $b=93.4\text{\AA}$, $c=94.1\text{\AA}$, $\beta=108.7\text{deg}$) の結晶が最も高い X 線回折能を示した。この結晶から BL44XU にて 2.6 Å 分解能の回折データセッ

トの取得に成功し、分子置換法による構造解析に着手した。結晶中には非対称単位に 2 分子の Multactivase M が存在すると見積もられ、まず高分解能で構造決定された C 型レクチン様ドメインの複数の結晶構造をサーチモデルとして分子置換法を行った。その結果、Factor IX-Binding protein (1J34) 2 分子を有意に置くことに成功した。1J34 分子のアミノ酸配列を Multactivase に置き換え、TLC 精密化の後、この分子を固定した状態で、さらに catrocollastatin/VAP2B の各ドメインをサーチモデルとして分子置換法による解法を進め、結果として長鎖については D ドメインおよび ADAM-CR ドメインの一部をモデリングおよび精密化することに成功した。最終的な分子モデルは R-factor=26.4% (Rfree =29.2%) を示し、MolProbity を用いた Clashescore が 3.42 であり、Ramachandran 等の立体化学的パラメーターも良好な値を示した。

得られた Multactivase M の結晶構造を見ると、分子置換法による解が得られたことから分かるように、各ドメイン個別の立体構造はこれまで得られていたものと大きくは変わっていなかった。また、ドメイン間の可動性についても大部分は予測された通りであった。しかし、一方で、予想と大きく異なる結果だったのは、ADAM 型長鎖と C 型レクチン様ドメインを持つ軽鎖との相互作用である。Multactivase と非常によく似たヘテロ三量体 ADAM である RVV-X は以前の我々の結晶構造解析により、長鎖の ADAM-CR ドメインの HVR を介して軽鎖が結合しており、HVR が間接的に基質認識を行うモデルを提案するキッカケを与えた。しかし、今回得られた Multactivase M の結晶構造では、エキソサイトを形成する軽鎖ドメインは CR ドメインではなく、D ドメインに結合していた。非対称単位中の二分子とも長鎖と軽鎖の結合は共通し、また結晶中での分子パッキングにおける接触面積比較等においても、この長

鎖 D ドメインと軽鎖の結合は生理的なものと考えられた。残念ながら Multactivase M とプロトロンビンとの複合体の結晶が得ることが出来なかったため、現在得られている結晶構造を基に Multactivase によるプロトロンビン認識・切断機構の考察を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

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, 24(6): 613-618, (2013) 査読無し

Akiyama M, Nakayama D, Takeda S, Kokame K, Takagi J, Miyata T. "Crystal structure of an ADAMTS13 mutant with the East Asian-specific P475S polymorphism" J. Thromb. Haemost. 11: 1399-1406 (2013) 査読有

武田壮一 「ADAM/ADAMTS ファミリープロテアーゼの構造と機能」 臨床検査, 57(5), 535-540, (2013) 査読無し

宮田敏行、小亀浩市、秋山正志、坂野史朗、中山大輔、武田壮一 「ADAMTS13 研究の最先端」 臨床血液, 53(7), 672-679, (2012) 査読無し

Takeda S, Takeya H, Iwanaga S "Snake venom metalloproteinases: structure, function and relevance to the mammalian ADAM/ADAMTS family proteins (Review article)" Biochim Biophys Acta: Proteins and Proteomics 1824: 164-176, (2012) 査読有

Kang TS, Georgieva D, Genov N, Murakami MT, Sinha M, Kumar RP, Kaur P, Kumar S, Dey S, Sharma S, Vrieland A, Betzel C, Takeda S, Arni RK, Singh TP, Kini RM. "Enzymatic Toxins from Snake Venom: Structural Characterization and Mechanism of Catalysis (Review article)" FEBS J, 278, 4544-4576, (2011) 査読有

〔学会発表〕(計 6 件)

"Structural basis of coagulation factor V recognition for cleavage by RVV-V" Soichi Takeda, International Society of Thrombosis and Hemostasis (ISTH) Meeting, Registry of Exogenous factors, 17th World Congress of the International

Society on Toxinology, Honolulu, Hawaii, 2012.7. (招待講演)

"Snake venom metalloproteinases; Structure, function and relevance to the mammalian ADAM/ADAMTS family proteins" Soichi Takeda, Concurrent session-34: Structure/Function of Venom, 17th World Congress of the International Society on Toxinology, Honolulu, Hawaii, 2012.7. (招待講演)

秋山正志、中山大輔、武田壮一、小亀浩市、高木淳一、宮田敏行 「P475S 型 ADAMTS13 タンパク質の部分立体構造決定第」84 回日本生化学会大会、京都国際会館、2011.9.

中山大輔、秋山正志、武田壮一、小亀浩市、高木淳一、宮田敏行 「P475S 型 ADAMTS13 の非触媒領域の立体構造決定」 第 16 回日本病態プロテアーゼ学会学術集会、千里ライフサイエンスセンター、2011.8

Daisuke Nakayama, Youssef Ben Ammar, Soichi Takeda "Structural basis of factor V recognition by russell's viper venom proteinase RVV-V" XXIII Congress of the International Society of Thrombosis and Haemostasis (ISTH2011), Kyoto International Conference Center, 2011.7

Masashi Akiyama, Daisuke Nakayama, Soichi Takeda, Koichi Kokame, Junichi Takagi, Toshiyuki Miyata "Structural basis for ADAMTS13 function" XXIII Congress of the International Society of Thrombosis and Haemostasis (ISTH2011), Kyoto International Conference Center, 2011.7

〔図書〕(計 2 件)

Takeda S. "Structure-function relationship of the modular domains of the P-III class snake venom metalloproteinases (SVMPs) (Book chapter)" In Handbook of Toxinology, Venom Genomics and Proteomics (Gopalakrishnakone P. (ed.)), SpringerReference, Springer (in press)

Takeda S "Russellysin (Book chapter)" In The 3rd edition of Handbook of Proteolytic Enzymes (Rawlings, N. and Salvesen, G. (ed.)), Elsevier, 1051-1053, (2013)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武田 壮一 (TAKEDA, Soichi)
国立循環器病研究センター・研究所・室長
研究者番号: 80332279