

平成30年6月22日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26440040

研究課題名(和文) ADAM/ADAMTSプロテアーゼによる基質認識と制御機構の構造生物学的研究

研究課題名(英文) Structural basis of substrate recognition and regulation by ADAM/ADAMTS family proteinases

研究代表者

武田 壮一 (TAKEDA, Soichi)

国立研究開発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) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ADAM/ADAMTSファミリータンパク質は切断活性を担うMドメイン以外に複数の機能ドメインを持つ細胞外モジュラープロテアーゼであり、発生分化や形態形成、様々な病態にも関わる。ADAMは主に一回膜貫通型タンパク質であるのに対して、ADAMTSは可溶性であり、Mドメイン以外にも共通した複数の機能ドメインを有している。本研究はADAM/ADAMTSファミリープロテアーゼについて主にX線結晶構造解析により、その構造-機能相関を明らかにすることを目的として進めた。成熟の過程で除かれるプロ・ドメインについて初めて結晶構造を解明し、ADAM/ADAMTSプロテアーゼに共通した構造基盤を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：ADAM and ADAMTS family of proteins are extracellular modular metalloproteinases composing of several functional domains other than the catalytic domain. ADAM/ADAMTS proteinases play key roles in development and morphogenesis, and are also involved in numerous disease conditions. Most ADAMs are type I membrane proteins whereas all ADAMTS members are soluble proteinases. ADAMs and ADAMTSs share functional domains other than the catalytic domain. The purpose of this study is to elucidate structure-function relationships of ADAM/ADAMTS family proteinases. We have solved crystal structures of the zymogen form of VAP2, a snake venom ADAM, and revealed the common architecture of the pro-domain of ADAM/ADAMTS family proteinases.

研究分野：構造生物学

キーワード：プロテアーゼ 結晶構造解析 タンパク質間相互作用 マルチドメイン構造 細胞間シグナリング 基質認識機構 X線

## 1. 研究開始当初の背景

ADAM (a disintegrin and metalloproteinase)ファミリータンパク質は発生・分化、形態形成、がんやアルツハイマー病、心臓病など様々な病態に関わる、主に一回膜貫通型のプロテアーゼである。膜結合 ADAM は膜貫通領域を持つ各種増殖因子やサイトカイン前駆体や受容体分子などの細胞外部分(ectodomain)を切断遊離(shedding)する主要な酵素として様々な細胞間シグナリングに関与している。例えば ADAM17 は生理的な TNF- $\alpha$ 産生酵素(TNF- $\alpha$  converting enzyme, TACE)として知られる。一方、ADAM ファミリーと類縁の ADAMTS (ADAM with thrombospondin type-1 motif)ファミリーは膜貫通領域を持たない可溶性プロテアーゼである。トロンボスポンジン・タイプ I 型様のドメイン(TSP-1 ドメイン)を少なくとも1つ持つのが特徴であり、細胞外マトリックスや基底膜の構成蛋白質などの特定単一分子を標的とするものが多い。循環血中に存在する ADAMTS13 はフォンビルブランド因子(VWF)のみを基質として、単一箇所(1605Tyr-1606Met)の特異的切断により VWF を介した血小板血栓形成の調節に重要な働きを担っており、その機能的欠失は重篤な血栓性血小板減少性紫斑病(Thrombotic thrombocytopenic purpura, TTP)を引き起こす。

ADAM および ADAMTS は共に、約 200 アミノ酸余りからなる触媒部や構造骨格の配列の良く保存されたメタロプロテアーゼドメインを持つが、それ以外に特徴的な複数のドメインを持つモジュラープロテアーゼである。ADAM は N 末端部より、プロ(P)、メタロプロテアーゼ(M)、ディスインテグリン様(D)、システインリッチ(C)の4つのドメインを共通して持ち、膜貫通部および細胞内ドメインが続く。ADAM10 および 17 以外の ADAM では、C ドメインの後ろに EGF ドメインが挿入される。細胞膜上に提示された成熟型分子では P ドメインは除かれていると考えられている。M ドメインについてはヒトで 20 存在する ADAM の内、ADAM8, 17, 33 について結晶構造が解明されているが、細胞外部のマルチドメイン構造についてはプロテアーゼ活性の無い ADAM22 のみが 2009 年に報告されている。マルチドメインの立体構造解析は我々の研究グループが行った蛇毒 ADAM ホモログの一連の研究が先行した(EMBO J (2006), FEBS Letters (2007)二報)。蛇毒 ADAM 研究でヒト膜型 ADAM に共通した C 字型の M/D/C ドメイン構造や C ドメイン中に存在する超可変領域(Hyper-variable region, HVR)が基質認識のエキソサイトである可能性が見出された。

ADAMTS は N 末端から P、M、D ドメイン、その後 TSP-1(T)ドメインが挿入され、C ドメイン、スペーサー(S)ドメインが続く。P ドメインは ADAM 同様に成熟過程で欠落する。M/D/T/C/S ドメイン部はヒトで 19 存在するす

べての ADAMTS に共通して存在し、その中心的機能を担うと考えられる。ADAMTS によっては、これより C 末端側下流にそれぞれの ADAMTS に固有の 1 つ、ないしは複数の TSP-1 ドメインを含む多様な領域が存在する。ADAMTS について、M ドメインおよび MD ドメイン部の立体構造は複数報告され、M ドメイン部については ADAM とよく保存された構造が、D ドメインについては、ADAM の C ドメインと共通した構造モチーフの存在が明らかになっている。それ以外の部分については我々が ADAMTS13 の D/T/C/S ドメイン部の結晶構造を 2009 年に報告しているのが唯一であり、それにより中核の MDTCS 部分の立体構造モデルと基質認識のエキソサイト部が同定されている(PNAS (2009))。

ADAM および ADAMTS 共に、機能中心部の基本的な立体構造の概要は解明されつつあるが、個々の分子についてのマルチドメイン全体の構造については多くは未知である。特に、成熟型プロテアーゼで取り除かれる P ドメインは、フォールディング時のシャペロンの機能を担うのみならず、活性調節を担うことが示されているが、いずれの ADAM/ADAMTS についても立体構造は解明されておらず、構造-機能相関は不明である。

## 2. 研究の目的

本研究では ectodomain shedding の主要な担い手である ADAM17 等のプロテアーゼ活性のある ADAM の細胞外ドメイン部全体や P ドメインの結合した前駆体型の構造決定を進める。これにより、膜型 ADAM による基質認識機構の詳細、および P ドメインによるシャペロン機構や活性制御機構を明らかにすることを旨とする。さらに類縁の ADAMTS プロテアーゼについても既に立体構造が明らかでない ADAMTS13 以外の ADAMTS についてもエキソサイトドメインを含むマルチドメイン構造を解明し、基質認識機構や P ドメインによる活性制御機構を明らかにすることを旨とする。また、ADAMTS13 について基質である VWF との共結晶化を行い、エキソサイト認識機構の詳細を明らかにすることを旨とする。ADAM/ADAMTS の P ドメインは、M ドメインのフォールディングに類似性を持つマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)のプロドメインと同様に良く保存されたシステイン残基を有する。結晶構造が既に明らかになった MMP の P ドメインの場合と同様に、この保存されたチオール基が亜鉛イオンをキレートする「システインスイッチ」機構が働いていると予想されているが、P ドメイン全体あるいはシステイン残基周辺のアミノ酸配列について、ADAM/ADAMTS と MMP との間には相同性が見いだされていない。したがって、P ドメインが全体としてどのような立体構造をとり、いかにしてプロテアーゼ活性を阻害し、フォールディングのシャペロ

ン機能を担うのかは全く予想が出来ないのが現状であり、本研究でその詳細が解明されることが期待される。

### 3. 研究の方法

様々なヒト ADAM および ADAMTS 分子について、分子全長のみならず、複数の機能ドメインを含むコンストラクトを調製し、大量発現、精製を進めた。発現系には主に昆虫細胞 Sf9 とバキュロウィルスの系を用い、補完的に大腸菌による発現および *in vitro* リフォールディングも行った。特に P ドメインに着目して P ドメインを含むコンストラクトについて重点的に進めた。また、ADAM/ADAMTS による基質認識機構を明らかにするため、特に先行研究で進めていた ADAMTS13 と基質 VWF の系に着目し、基質とエキソサイトドメインとの融合タンパク質を作成して構造解析により相互作用を明らかにすることを進めた。

昆虫細胞の系では目的の ADAM/ADAMTS 分子をミツバチメリチンの分泌シグナルを用いて分泌発現する系を構築し、無血清培地を用いて大量培養した後、培地から主に Ni-NTA レジンを用いて His-tag タンパク質を回収後、イオン交換、ゲルろ過クロマトグラフィー等で高純度に精製後、限外ろ過により濃縮して結晶化標品とした。結晶化スクリーニングは主に市販の結晶スクリーニングキットを用いて 4 及び 20 で行った。実験室の X 線発生装置が使用できなかったため、得られた結晶は回折能が不明のまま、外見を基準に結晶化条件の最適化を行い、複数の異なる凍結条件で凍結した後、SPring-8 の放射光を利用して X 線回折能の確認からデータの収集までを行った。得られた回折データを元に、既知構造をモデル分子として利用する分子置換法により、立体構造を決定した。

### 4. 研究成果

様々な ADAM/ADAMTS コンストラクトを調製し、大量発現、精製の後、十分な純度と収量 (~ 1 mg 程度) の標品が得られたものについて、順次結晶化スクリーニングを進めていった。その結果、下記二つのコンストラクトについて再現よく結晶が得られ、SPring-8 共用ビームラインのマシントimeを確保し、X 線回折データ収集および構造解析を行った。

ADAMTS13-S ドメイン/VWF 複合体 ADAMTS13 において S ドメイン (ADAMTS13-S) はエキソサイト 3 を形成し、基質 VWF-A2 ドメイン C 末端部を認識する。大腸菌に発現させた ADAMTS13-S のほとんどが不溶性分画にくるが、それらを変性した状態で精製した後、リフォールディング条件の最適化により、可溶化し、単分散性を示す標品を得ることに成功した。この ADAMTS13-S

自体が結晶化することを確認したのち、その C 末端に長さの異なるフレキシブルなリンカー配列と、ADAMTS-S と結合すると推定される VWF の領域のアミノ酸残基とを繋いだ融合タンパク質を設計した。数種のリンカー配列を持つ融合タンパク質を発現・リフォールディング、精製し、結晶化試料を得た。スクリーニングにより得た結晶の条件の最適化を行い、ビームライン BL26B1 において 2.9

分解能の回折データセットを得ることに成功した。得られた回折データセットを元に、既知の S ドメインの構造を用いた分子置換法による立体構造解析を進めた。構造解析の結果、S ドメイン全体の明瞭な電子密度は観察されたが、残念ながら、結合していると考えられる VWF 由来の電子密度を観察することができなかった。原因としては結晶化条件での pH や塩濃度条件下では VWF と S ドメイン間で十分な親和性が確保できずリンカー配列で繋ぎ止められているのに関わらず、結合が乖離してしまったと考えられる。実際に VWF の結合が予想されるエキソサイト 3 自体が隣の S ドメイン分子との相互作用部位として、使われており、その結果結合パートナーである VWF の領域が排除されたことが想定された。この結晶化標品について、別のパッキングを持つ結晶を得るべく、スクリーニングを再度行ったが、残念ながら、構造解析に資する単結晶を得ることはまだ出来ないのが現状である。以下の別のコンストラクトの結晶構造解析に着手したため、本コンストラクトの解析は一旦保留となっている。

#### P ドメインを含む VAP2

VAP2 は南米産ガラガラヘビ (*Crotalus atrox*) 由来の蛇毒 ADAM で、最初の単量体型 ADAM として我々が 2007 年に立体構造解析を行い、報告したものである。様々なヒト由来 ADAM の P ドメインを含むコンストラクトの大量発現を進めてきたが、残念ながらいずれも十分な発現量を確保することが出来ず、結晶化スクリーニングに進むことが出来なかった。そこで、蛇毒 ADAM に再度目をつけ、発現系の構築を進めたところ、昆虫細胞 Sf9 を用いた VAP2 分子全長の大量発現系の構築に成功した。精製法の確立を進めている段階で、600 アミノ酸あまりからなる VAP2 全長分子には非常に切断を受けやすい部位が存在していることが判明した。時間経過とともに、分子全長を示す 1 本のバンドが 2 本になり、これら 2 本のバンドがクロマトグラフィー的に分離できないことから、切断を受けたものの、2 つのバンドの成分は強固な結合を保持したままであることが推察された。N 末端アミノ酸シーケンシングを行ったところ、P ドメインとそれに続く M ドメイン間、ちょうど成熟化に伴って切断を受ける部位で、精製過程で混入したプロテアーゼにより全長 VAP2 を受けることが判明した。この結果、切断を受けた後も P ドメインは分子の他の部分と強く結

合し、プロテアーゼ活性を抑制していることが判明した。切断を受けていない全長分子の精製には難航したが、逆にこの P/M 間で 100%切断を受けている分子は高純度で得られたので、結晶化標品としてスクリーニングを行った。その結果、初期スクリーニングで微結晶を得られたものの、残念ながら、X 線回折実験に資するだけの十分な大きさの単結晶は得られないことが判明した。

以前の我々の研究で、VAP2 分子 C 末端部、約 100 アミノ酸からなる Ch サブドメイン部がその手前の Cw サブドメインとの間で高い可動性を持つことを見出していた。そこで、可動領域を減らして結晶化能を改善することを目的に、Ch サブドメインを欠失した変異体を調製した。Ch サブドメイン欠損変異体においても、全長分子と同様に M/P ドメイン間でペプチド鎖の切断が起こっており、切断された P ドメインは分子の残りの部分と強い結合をしていることが分かった。この新たなコンストラクトを用いて再度結晶化スクリーニングを行ったところ、様々な結晶化条件下で、外形の異なる結晶を複数種類得ることに成功した。これら初期スクリーニングでのヒットを元に結晶化条件の最適化を進め、結晶の外形から推測される晶系が異なると考えられる結晶 3 種類について、結晶解析に資する大きさの単結晶を得ることに成功した。これらの結晶について、SPRING-8 の共用ビームライン BL26B1 で回折データ測定を行った。3 種類の結晶のうち、2 つから空間群  $P2_1$  と  $P6_1$  のもの、それぞれから最高分解能 2.2 および 3.5 の X 線回折データセットを得て、構造解析に着手した。

まず分解能の高い単斜晶系の結晶データを解析し、構造精密化を終えたのち、六方晶系の結晶の解析を行った。それぞれ非対称単位に 2 分子の VAP2 を含むため、合計 4 分子の構造決定を行った。約 500 アミノ酸あまりからなるコンストラクトの内、既知構造部分は 300 アミノ酸あまりであり、立体構造が完全に未知の部分は P ドメイン部約 200 アミノ酸となる。まず、ソリッドな構造コアを持つ M ドメイン 2 分子の空間配置を分子置換法により決定し、続く D ドメイン部について、可動領域を二つに分けて、分子置換法による解析を試みた。しかし、比較的構造変化の少ないと考えられる D ドメイン N 末端部分についても分子置換法で優位な解が得られず、D ドメイン部を残したまま、構造未知の P ドメイン部に着手した。結果として、P ドメイン全体で約 200 アミノ酸の内、約 150 アミノ酸について分子モデルを構築することに成功し、構造精密化を終えることが出来ている。非対称単位の 2 分子間の構造の一致および、その後の解析を行った六方晶系の結晶から得た構造との一致から、P ドメインの立体構造と M ドメインとの相対結合関係が正しく決まったといえる。未発表のため詳細は触れないが、VAP2 の P ドメインには MMP とよく似

たシステイン残基側鎖の触媒亜鉛イオンへの配位（システインスイッチ機構）が見られるが、その他の部分の P ドメインの立体構造については既知の MMP の P ドメインや、ADAM や MMP を含む Metzincin スーパーファミリーの他の亜鉛メタロプロテアーゼの P ドメインとも全く相同性を持たないことが判明した。VAP2 と ADAM/ADAMTS ファミリープロテアーゼの立体構造を元にしたアミノ酸配列アラインメントを行うと、今回構造決定した VAP2 の P ドメインの立体構造および M ドメインとの結合構造は、ほとんど全ての ADAM/ADAMTS で保存されていることが判明した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

宮田 敏行、内田 裕美子、武田 壮一「内因系凝固反応活性化機序と遺伝性血管性浮腫」、補体、54(2)、4-22、(2017)

武田 壮一「プロトロンビナーゼ複合体の立体構造とトロンピン産生の構造基盤」、日本血栓止血誌、27(4)、450-455、(2016)

Takeda S. “ADAM and ADAMTS family proteins and snake venom metalloproteinases: a structural overview” *Toxins*, 8(5), 155, (2016)

〔学会発表〕(計 1 件)

武田 壮一「ヘビ毒由来プロテアーゼの立体構造と作用機構」ワークショップ、第 15 回蛋白質科学会年会、2015 年 6 月 (招待講演)

〔図書〕(計 2 件)

武田 壮一「蛇毒メタロプロテアーゼ」日本の結晶学(II)-その輝かしい発展-(日本結晶学会編)、2014、p374

Takeda S. “Structure-function relationship of the modular domains of the P-III class snake venom metalloproteinases (SVMPs)” in *Handbook of Toxinology, Venom Genomics and Proteomics* (Gopalakrishnakone P. (ed.)), Springer Reference, Springer, (2014)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

武田 壮一 (TAKEDA, Soichi)  
国立研究開発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