最近の研究から

蛇毒メタロプロテアーゼの結晶構造と ADAM ファミリーの基質認識機構

国立循環器病センター研究所 武田壮一

Soichi TAKEDA: Crystal Structures of Snake Venom Metalloproteinase and Implication for the Molecular Mechanism of Substrate Recognition by ADAM Family Proteins

ADAMs (A disintegrin and Metalloproteinases) are major sheddases possessing extracellular metalloproteinase/disintegrin/cysteine-rich (MDC) domains. ADAMs uniquely display both proteolytic and adhesive functions on the cell surface, however, most of their physiological targets and adhesion mechanisms remain unclear. Crystal structures of vascular apoptosis-inducing protein-1 (VAP1), a snake venom homolog of mammalian ADAMs, reveal ADAMs' MDC domain architecture and a potential target recognition site. The C-shaped structure implies interplay between the ADAMs' proteolytic and adhesive domains and suggests a molecular mechanism for ADAMs' target recognition for shedding.

1. はじめに

毒蛇の毒腺にはさまざまなタンパク性の生理活性物質が存在し、それらは獲物である小動物の体内に毒牙を通して注入され多様な標的タンパク質と作用し致命的なダメージを与える。毒の作用は時に人を含め大動物を死に落とし入れるほど非常に劇的であり、そこに含まれる成分の研究は生物・医学の面から非常に興味深くこれまで多くの研究がなされてきた。コブラやウミヘビの類には中枢神経系に作用する神経毒が多く含まれている。他方、マムシやハブなどの出血性蛇毒には出血を引き起こしたり血栓形成を促進したりする成分や、血小板凝集を阻害あるいは逆に亢進したり、循環器系に障害を与える成分などが多く含まれている。出血性蛇毒の出血に直接かかわる成分(出血因子)としては触媒部位に亜鉛イオンをもつ一群のメタロプロテアーゼ (snake venom metalloproteinase (SVMP)) が中心的な役割を担っていることがわかっている。しかし、これら SVMP がどのようなメカニズムで血管を破壊し出血を引き起こすか依然不明である。蛇毒 SVMP は哺乳動物の細胞膜に存在するシェディング (Shedding) 酵素である ADAM (A disintegrin and metalloproteinase) ファミリータンパク質群と高いアミノ酸配列の相同性を示す。¹⁾ ADAM は細胞膜上に提示された各種の増殖因子やサイトカインの前駆体を切断遊離 (シェディング) する。例えば、ADAM17 は関節リウマチなど炎症性疾患に関与する TNF α をシェディングする酵素 (TNF α converting enzyme (TACE)) として同定された。^{2),3)} また、ADAM はそれら増殖因子やサイトカインのレセプター分子やカドヘリン

図1 ADAM ファミリータンパク質のドメイン構成. (Domain structure of ADAM family proteins.) 保存された金属イオン結合部位を● (一部保存されていない場合を含むものを○) で示す.

などの接着分子も切断し、発生・分化の過程やさまざまな病態にも深くかかわることがわかってきている。^{4),5)} 多くの ADAM は分子 C 末側に一回膜貫通領域をもつ I 型膜タンパク質である (図 1). ADAM の細胞外の主要ドメインは出血蛇毒 SVMP と相同な構造をもち、これらを含めより広範な ADAM/adamalsin/reprolysin ファミリーを形成する。¹⁾ ファミリーの名前については前述の構造からの由来以外に、哺乳動物の最初の ADAM, 精巣・精子 (male reproductive tract) のファティリンが受精の鍵タンパク質として発見されたこと,⁶⁾ 象徴的な意味合い (アダムと

イブにかけて)、相同タンパクが爬虫類 (reptile) にあること、北米生息の毒蛇 (*Crotalus adamanteus*)、加水分解酵素であること (-lysin)、などに由来する。一般にreprolysinが主にSVMPに使われることが多いのに対し、ADAMは哺乳動物膜プロテアーゼ群に限定した狭義の意味で用いられることが多いが、本論説ではSVMPを含めた広義のファミリーとして一括してADAMとして取り扱う。哺乳動物で発生分化やさまざまな病態にかかわる分子が他方で蛇の毒腺で独特の進化を遂げている事実は非常に興味深く、われわれの構造研究への動機付けとなった。

ADAMファミリーの分子群は分子内に多数のジスルフィド結合を有することからリコンビナントタンパク質の大量発現が非常に困難であり、全体の分子構造は明らかにされていない。われわれは構造解析に必要な量の試料が比較的容易に入手できることに着目し、蛇毒より血管内皮細胞アポトーシス誘導因子1 (Vascular apoptosis-inducing protein-1 (VAP1)) を単離精製しX線結晶構造解析を行った。⁷⁾ このSVMPの構造解析によりADAMファミリータンパク質の基本構造と基質認識・分解機構に関しての新しい知見が得られたので本稿で紹介する。

2. SVMPとADAMファミリータンパク質

マムシやハブ、ガラガラヘビなど咬傷により顕著な出血が見られる出血性蛇毒には血管内皮細胞に特異的に作用し細胞の自爆 (アポトーシス) を引き起こす成分が存在することが知られ、出血機構との関連で興味もたれている。⁸⁾ 単離されたこれらの成分はVAPと名付けられ、そのcDNA解析からP-III型SVMPに属するタンパク質であることが判明している。⁹⁾ SVMPは①メタロプロテアーゼドメイン (Mドメイン) のみからなるP-I型、②血小板凝集阻害活性を有しRGD配列をもつディスインテグリンの前駆体と考えられ、Mドメインとディスインテグリンドメイン (Dドメイン) からなるP-II型、③MおよびDドメイン、さらにC末端側下流にシステイン残基を多く含むシステインリッチドメイン (Cドメイン) をもつP-III型、④P-III型にさらに分子進化的にレクチン様ドメインが付加されたP-IV型の4つのクラスに分類される。¹⁾ この中でP-III型が特に強い出血活性をもつと考えられている。¹⁾ 一方、哺乳動物のADAMの多くは膜結合型であり、細胞外ドメインとしてP-III型SVMPと相同のMDCドメイン部と多くはその下流にEGF様の構造を介した後、細胞膜に貫入する。図1はこれらADAMファミリーのタンパク質群のドメイン構造を模式的にまとめた物である。多くの膜結合型に存在するEGF様構造の生理的機能は明らかにされていないが、これまで報告されたさまざまな実験結果はMDCドメイン部に重要な機能が集約されていることを示唆している。^{4),5)}

3. VAP1の結晶構造

3.1 VAP1のX線結晶構造解析

北米に生息するクサリヘビ科のニシキダイヤガラヘビ (*Crotalus atrox*) 由来のVAP1は分子量約55キロダルトンのポリペプチド鎖2本がMドメインどうし1つのSS結合で結ばれたホモダイマー型SVMPである。¹⁰⁾ われわれはホモダイマー型分子であること、すなわち分子内に対称性を有することが結晶化および構造解析の双方で有利と考え、多数報告があるP-III型SVMPの中から特にユニークなダイマー構造をもつVAP1に着目して研究を進める戦略をとった。実際に通常の結晶化キットを用いたスクリーニングで結晶が容易に得られ、¹¹⁾ 比較的短期間に構造解析に着手することができた。VAP1はモノマー当たり427アミノ酸残基からなるが、機知構造とほぼ相同と考えられる領域が分子N末端部のMドメイン (197アミノ酸残基) に限られ、重原子置換体の作成が必須と考えられた。しかし、有効な重原子置換体ができずにあくせくする一方、Mドメインのサーチモデル (同一アミノ酸残基約50%) を起点としてモデルの寄与をできるだけ排除することを心がけて徐々にモデル構築・精密化を進めた所、最終的に分子全体のモデル構築を完成するに至った。既知構造と相同性のない新規の構造モチーフ (Cドメイン、約100アミノ酸残基)、二次構造のほとんどない領域 (リンカー/Dドメイン、約100アミノ酸残基) をそれぞれ分子全体の約4分の1ずつ含み、このような構造が分子置換法による解析で解けたことはある意味非常に幸運な結果であったと思われる。これにはモデリングの過程において非対称単位内の2つのモノマー分子間の非結晶学的二回対称 (non-crystallographic symmetry (NCS)) を有効に使えた効果が大きく、ここでもダイマー型のVAP1を選択したメリットが活かせることになった。解析の詳細は原著⁷⁾ を参照されたい。最終的にはSPRing-8のBL45XU-PXで得た2つの異なる結晶系 (斜方晶系および正方晶系) のNative結晶データを用いてそれぞれ2.5 Å分解能での構造精密化を行った。それぞれの結晶は非対称単位に1つのダイマー分子を含んでいた。

3.2 C字型MDCドメイン構造

ADAMは活性部位にZn²⁺を配位する3つのヒスチジン残基と活性触媒基であるグルタミン酸残基を含む配列 (HEXGHXXGXXHD)、さらに下流にあるメチオニン残基 (立体構造的に3つのヒスチジン残基を下から支えるMetターンと呼ばれる構造) が保存されたメタロプロテアーゼドメインをもつ (図3)。同様な配列と構造は細胞間マトリックスタンパク質を分解するコラゲナーゼなどにも見られるが、これらとの構造的な違い、活性部位やMドメインの立体構造の詳細はほかで詳しく述べられている¹²⁾ ので本稿では省く。図2aにNCS軸方向から見たVAP1の

図2 VAP1の結晶構造. (Crystal structure of VAP1) (a) NCS 方向から見たダイマー構造. 結合した阻害剤 (GM6001) を矢印で示す. (b) モノマーの構造 (ステレオ図). 結合した金属イオン (Ca^{2+} および Zn^{2+}) を●で示す.

図3 VAP1とヒト膜結合型ADAMのアミノ酸配列. (Sequence alignments of VAP1 and human ADAMs.)

全体構造と一方のモノマーのステレオ図2bを示す. VAP1はほかのADAMにないMドメイン内のシステイン残基 (Cys365) を介してホモダイマーを形成し, このジスルフィド結合がNCS上に存在する. 2つのモノマーはドメイン間の揺らぎ (図5b) を除くとほぼ同一の構造をもち, メタロプロテアーゼの基質結合部 (図1ではペプチド様骨格をもつヒドロキサン酸阻害剤GM6001の結合構造を示している) がNCS軸に直交して互いに反対方向を向いて

開くように配置している. すでに構造が解かれているヒトのADAM33¹³⁾のMドメインと比較すると基質結合ポケットを形成する領域に若干の構造違いが見られたが (図4a), この領域はアミノ酸配列上も可変な領域であり (図3), 切断部位周辺での基質認識に直接かわると思われる. その他は非常によく似た構造をもつといえる.

それぞれのモノマーはM, D, Cドメインが全体としてアルファベットのC字型になるよう配置している. D, C

図4 VAP1 (薄いグレー) と ADAM33 (濃いグレー) の M ドメインの構造比較. (Superposition of the M-domains of ADAM33 and VAP1.) (a) M ドメイン全体像. 大きく構造の異なる領域を楕円で囲んでいる. VAP1 (カッコ内は ADAM33) のアミノ酸残基を示す. (b) Ca^{2+} 結合部位 (I) の構造.

図5 D ドメイン部の構造. (D domain structure.) (a) D ドメイン部のステレオ図. SS 結合およびカルシウム結合にかかわるアミノ酸残基を示す. ディスインテグリンループの DECD 配列を黒で示す. (b) VAP1 モノマー 4 分子 (グレー) およびトリメスタチン (1J2L, 黒で示す) の構造重ね合わせ.

ドメインはドメイン間の揺らぎやジスルフィド結合のパターンなどから構造的に人体の腕の関節構造に対応させ、ショルダー (D_s)、アーム (D_a)、リスト (C_w)、ハンド (C_h) とさらに細かくサブドメインに分けられる (図3). D_s 部は M ドメインの Zn^{2+} 結合部位と正反対の位置から突き出ている. その根元 M ドメイン側に ADAM で保存されたカルシウム結合部位 (I) が存在する (VAP1 では例外的に Ca^{2+} に配位するグルタミン酸残基がリジン残基 (Lys202) に変わっていて, 側鎖のアミノ基が Ca^{2+} の位置を占めている (図4b)). D_s および D_a 部はほとんど二次構造をもたないが, 多数のジスルフィド結合と Ca^{2+} 結合により構造形成されており (図5a), それらにかかわるアミノ酸残基およびその間隔は ADAM で非常によく保存されている (図3).

D_a 部は血小板凝集阻害活性のあるディスインテグリン, トリメスタチン¹⁴⁾ と類似の構造をもつ (図5b). RGD 配列をもつディスインテグリンは血小板上の主要なフィブリ

ノーゲン受容体であるインテグリン $\alpha\text{IIb}\beta 3$ に結合し, インテグリンへのフィブリノーゲン結合を阻害することで血小板凝集を阻害すると考えられる. しかし VAP1 の RGD に相当する配列は DECD であり, RGD タイプにない Ca^{2+} 結合部位 (III) をもつ. このディスインテグリンループ (D ループ) と称されるループ先端部のシステイン残基はジスルフィド結合 (Cys468/Cys499) を形成し, またループ部全体も次に続く C_w 部と相互作用しており (図5), インテグリンへのリガンドとして働くことは不可能と考えられる. ADAM の D ドメインが RGD ディスインテグリン群とアミノ酸配列上の高い類似性を持ち, またこれまで多くの研究が ADAM とインテグリンの相互作用に着目し, またそれを支持する結果を得られていたことから, 必然的に D ループが直接インテグリン結合するとの認識が浸透している. VAP1 の結晶構造は ADAM とインテグリンの相互作用について再検討が必要であることを示した.

3.3 超可変領域 (HVR)

C ドメイン (C_h/C_w) についてアミノ酸配列からはほかのタンパク質との相同性が見出されず、機能についてもほとんど理解されていない。 C_h/C_w 部の構造を図 6a に示すが、データベース上で類似構造を見出せないことから新規のホルドと考えられた。さらに結晶中での分子の配置から興味深いことがわかった。2つの異なる結晶系において共通した分子パッキングが見られ、それらは隣り合う2分子の C_h どうしが手を取り合うように相互作用し NCS を形成しているものであった (図 6b)。この C_h 部どうしの接触面積は $860 \text{ \AA}^2$ で、ダイマーを形成するモノマー間の接触面積の $800 \text{ \AA}^2$ より大きい。すなわち、結晶中では見かけ上 M と C_h 部で分子が珠数つなぎの状態にある。溶液中での VAP1 分子の振る舞いとしてポリマーを形成している兆候はないので C_h どうしの結合は結晶化によって誘導された構造と考えられる。接触にかかわる部分の中心をなすのは 562 から 583 番目のアミノ酸残基からなる領域でこの部分はファミリー分子のアミノ酸配列をアラインメントした際に最も可変 (保存性、長さ (16-55 アミノ酸残基) とともに) な領域であること (図 3) が判明し、超可変領域

図 6 C ドメインの構造と HVR. (C-domain architecture and HVR.) (a) C ドメイン (C_w/C_h) のリボン図 (ステレオ). (b) 結晶中での分子パッキング. HVR を濃いグレーで示す. (c) HVR の詳細構造.

(Hyper variable region (HVR)) と名付けた。HVR の構造をよく見てみると、中央部で隣り合う NCS 分子間で β シート構造を形成している (図 6c)。分子間は主鎖どうしの水素結合を形成しているのに対し、HVR の裏打ちは主として水分子を介した水素結合ネットワークで保持されている。 β シート形成部は比較的低い温度因子を示すが、HVR の両端部の温度因子は高い。さまざまな ADAM の配列を用いて二次構造予測を行ったところ、いずれにおいてもこの HVR の中央部は β シートと予測されない。さまざまな視点から NCS 分子間の HVR を中核とした比較的大きな相互作用はインデュードフィットによるものと結論付けられた。すなわち、溶液中では (中央付近で 572-526 残基間のジスルフィド結合で C_h の残りの部分に固定されているものの) HVR は全体として動きやすいループを形成しており、タンパク質間相互作用に都合のよい構造をもつと考えられる。

4. ADAM ファミリーの基質認識機構

VAP1 モノマーは C 字型の構造をもち、HVR と触媒部位周辺が C 字のそれぞれ両端を占め、分子内で二者が対面する (図 2b)。立体構造において HVR の中心部と亜鉛イオンの間の距離は約 3.5 nm である。上述のようにこれら2つの領域は配列が可変であり、C 字型の構造は保存されたジスルフィド結合とカルシウム結合により形成された ADAM に共通した基本骨格といえる。この構造から HVR が触媒部位以外に基質認識を行う部位 (エクソサイト) である可能性が直感的に見出される。すなわち異なる ADAM が異なるターゲットを認識するのに2つの離れた部位を利用している、という考えである。この可能性を基にした膜結

図 7 膜型 ADAM によるシェディング機構のモデル. (Model for ADAM's shedding.)

合型 ADAM が膜結合型タンパク質を切断遊離するモデルを図 7 に示す。ここでは X は増殖因子前駆体などの分子をイメージしているが、分子 X の切断部位から離れたある領域を ADAM が HVR (エクソサイト) を介して認識し、切断する。場合によっては HVR がほかのタンパク分子 Y と結合し、分子 Y に結合する分子 X を切断するケースなども想定することもできる。ここでは鎖状の分子 X を切断するモデルを描いたが、HVR と亜鉛イオンの位置関係は一般的な分子量数万の球状タンパク (あるいは球状ドメイン) を直接結合して切断するにも都合のよい距離と考えられる。構造の比較により、各サブドメイン間に揺らぎがあることを述べたが、この揺らぎは活性基とエクソサイトとの位置の微調整、あるいは活性の調節機構に重要なものかもしれない。この点の検証は今後の課題である。

5. おわりに

ADAM はシェダーゼとして重要な機能を担っているが、その基質認識機構やマルチドメイン構造の生理的意味についてはこれまでほとんど何もわかっていない。プロテアーゼドメインのみでは高い基質特異性が発揮されないことからエクソサイトの存在が示唆されてきたが、VAP1 の構造は ADAM の機能を理解するうえで重要な足がかりを与えたといえる。HVR がエクソサイトであることはあくまで仮説の段階であり、変異体などを使った実験の裏付けや基質複合体の立体構造を解くことなどが今後の課題となる。VAP1 はホモダイマーであることが結晶化、構造解析を有利に導いたが、反面に結晶中で数珠繋ぎ構造をとるために各サブドメイン間の動きに制約を生じている可能性が指摘される。この点については、モノマー P-III 型 SVMP の複数の結晶構造を得て、構造比較によるドメイン間の動きを解析した結果を最近報告した。¹⁶⁾

VAP1 の論文を執筆中に ADAM10 の D/C ドメイン部分の結晶構造が報告された。¹⁵⁾ この構造と VAP1 の相当部分と比較すると非常に興味深いことに C_w/C_h 間がまるで手首を捻ったように 180 度向きを変えていること、両者に C_h 部のアミノ酸配列の相同性がほぼない (ADAM10 は ADAM17 とともにほかのファミリー分子と C_h 部の相同性がきわめて悪い) にかかわらず共通の基本骨格があることが見出された。VAP1 の結晶構造解明によりすべての ADAM 分子について同一の構造基盤で語ることが可能になった。この点について詳しくは原著¹⁵⁾を参照されたい。

ADAM をはじめ細胞外で機能するタンパク質は多数の SS 結合や構造的な Ca^{2+} 結合により細胞内タンパク質とは異なる構築原理で安定な構造が維持されるものが多い。このような対象は一般的に構造解析に必須の大量発現系の構築がボトルネックとなる。本研究は天然物由来の類似構造に着目して進めたが、このような大量発現が困難な、しかし生理的に重要なタンパク質群をいかにして構造解析

していくかがポストタンパク 3000 の大きな課題の 1 つであるといえよう。

本研究は国立循環器病センター研究所、五十嵐智子氏、盛 英三博士および名古屋大学大学院理学研究科、荒木聡彦博士との共同研究の成果である。

文 献

- 1) J. W. Fox and S. M. Serrano: *Toxicon* **45**, 969 (2005).
- 2) R. A. Black, C. T. Rauch, C. J. Kozlosky, J. J. Peschon, J. L. Slack, M. F. Wolfson, B. J. Castner, K. L. Stocking, P. Reddy, S. Srinivasan, N. Nelson, N. Boiani, K. A. Schooley, M. Gerhart, R. Davis, J. N. Fitzner, R. S. Johnson, R. J. Paxton, C. J. March and D. P. Cerretti: *Nature* **385**, 729 (1997).
- 3) M. L. Moss, S. L. Jin, M. E. Milla, D. M. Bickett, W. Burkhardt, H. L. Carter, W. J. Chen, W. C. Clay, J. R. Didsbury, D. Hassler, C. R. Hoffman, T. A. Kost, M. H. Lambert, M. A. Leesnitzer, P. McCauley, G. McGeehan, J. Mitchell, M. Moyer, G. Pahel, W. Rocque, L. K. Overton, F. Schoenen, T. Seaton, J. L. Su, J. D. Becherer, et al.: *Nature* **385**, 733 (1997).
- 4) J. M. White: *Curr. Opin. Cell Biol.* **15**, 598 (2003).
- 5) D. F. Seals and S. A. Courtneidge: *Genes Dev.* **17**, 7 (2003).
- 6) C. P. Blobel, T. G. Wolfsberg, C. W. Turck, D. G. Myles, P. Primakoff and J. M. White: *Nature* **356**, 248 (1992).
- 7) S. Takeda, T. Igarashi, H. Mori and S. Araki: *Embo J.* **25**, 2388 (2006).
- 8) S. Araki, T. Ishida, T. Yamamoto, K. Kaji and H. Hayashi: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **190**, 148 (1993).
- 9) S. Masuda, T. Ohta, K. Kaji, J. W. Fox, H. Hayashi and S. Araki: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **278**, 197 (2000).
- 10) S. Masuda, S. Araki, T. Yamamoto, K. Kaji and H. Hayashi: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **235**, 59 (1997).
- 11) T. Igarashi, Y. Oishi, S. Araki, H. Mori and S. Takeda: *Acta Crystallograph. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **62**, 688 (2006).
- 12) F. X. Gomis-Ruth: *Mol. Biotechnol.* **24**, 157 (2003).
- 13) P. Orth, P. Reichert, W. Wang, W. W. Prosser, T. Yarosh-Tomaine, G. Hammond, R. N. Ingram, L. Xiao, U. A. Mirza, J. Zou, C. Strickland, S. S. Taremi, H. V. Le and V. Madison: *J. Mol. Biol.* **335**, 129 (2004).
- 14) Y. Fujii, D. Okuda, Z. Fujimoto, K. Horii, T. Morita and H. Mizuno: *J. Mol. Biol.* **332**, 1115 (2003).
- 15) P. W. Janes, N. Saha, W. A. Barton, M. V. Kolev, S. H. Wimmer-Kleikamp, E. Nievergall, C. P. Blobel, J. P. Himanen, M. Lackmann and D. B. Nikolov: *Cell* **123**, 291 (2005).
- 16) T. Igarashi, S. Araki, H. Mori and S. Takeda: *FEBS Lett.* **581**, 2416 (2007).

プロフィール

武田 壮一 Soichi TAKEDA

国立循環器病センター研究所

National Cardiovascular Center Research Institute

〒565-8565 大阪府吹田市藤白台 5-7-1

5-7-1 Fujishirodai, Suita, Osaka 565-8565, Japan

e-mail: stakeda@ri.ncvc.go.jp

最終学歴：名古屋大学大学院理学研究科博士課程

後期課程修了

専門分野：構造生物学

現在の研究テーマ：循環器疾患にかかわるタンパク質の構造解析