

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

秋山正志^{*1}, 武田壮一^{*2}, 宮田敏行^{*1}

Structural and functional analysis of an ADAMTS13 mutant with the
East Asian-specific P475S polymorphism

Masashi AKIYAMA^{*1}, Soichi TAKEDA^{*2}, Toshiyuki MIYATA^{*1}

Key words: ADAMTS13, von Willebrand factor, thrombotic thrombocytopenic purpura

❖ Points ❖

- ①日本人のおよそ 10 人に 1 人がヘテロで持つ ADAMTS13 遺伝子の P475S 変異は、VWF 切断活性の低下を引き起こす。その分子機構の理解を目的として、P475S 変異型 ADAMTS13-DTCS ドメインの結晶構造を決定した。
- ②P475S 変異は C_A ドメイン内にある VWF が結合するエキソサイトと考えられる V ループに局所的な構造変化をもたらし、正常型に比べてループ構造が不安定となっていた。
- ③P475S 変異型 ADAMTS13-MDTCS のペプチド基質の切断速度は正常型とほぼ等しかったが、基質に対する親和性は正常型のほぼ半分に低下しており、P475S 変異により 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。
- ④P475S 変異型 ADAMTS13-MDTCS のずり応力下の VWF マルチマー切断活性は正常型の 70% 程度を示し、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良く一致した。

1. はじめに

血漿糖タンパク質の von Willebrand 因子 (VWF) は主に血管内皮細胞で 250kDa の単量体として合成されたあとに重合し、約 30,000kDa の超高分子量 (UL-VWF) マルチマーとして Weibel-Palade body 中に蓄積し、血中へ分泌される¹⁾。高い血小板凝集能を持つ UL-VWF マルチマーの一部は、内皮細胞表面に結合し血小板凝集の足場として働く。マルチドメインからなる分泌型メタロプロテ

アーゼ ADAMTS13 (a disintegrin-like and metalloprotease with thrombospondin type 1 motif-13) は、VWF の A2 ドメイン内の Tyr¹⁶⁰⁵-Met¹⁶⁰⁶ 結合を特異的に切断することで、UL-VWF マルチマーの分子量を 500~20,000kDa 程度の適度な大きさに保ち、過剰な血小板凝集を防いでいる。静止状態では、切断部位は球状構造をとる VWF A2 ドメイン内部に埋もれている。細小血管内などの血流が非常に速くずり応力が高い部位では、高ずり応力により VWF の A2 ドメインは球状構造か

^{*1} 国立循環器病研究センター 研究所 分子病態部 [〒565-8565 大阪府吹田市藤白台 5-7-1]
Department of Molecular Pathogenesis; National Cerebral and Cardiovascular Center Research Institute
[5-7-1 Fujishirodai, Suita, Osaka 565-8565, Japan]
Tel: 06-6833-5012 (ext. 2477) Fax: 06-6835-1176 e-mail: akiyamam@nccv.go.jp

^{*2} 国立循環器病研究センター 研究所 心臓生理機能部
Department of Cardiac Physiology; National Cerebral and Cardiovascular Center Research Institute

ら伸展構造に変化し、切断部位が露出して ADAMTS13 によって切断される。

ADAMTS13 の VWF 切断活性が遺伝子変異もしくは中和抗体の出現により著減すると、血中に UL-VWF マルチマーが蓄積し、細小血管内で過剰な血小板凝集が起こる。その結果、血小板血栓形成による血小板数の減少、および赤血球の機械的な破壊による溶血性貧血が見られる。これが血栓性血小板減少性紫斑病 (thrombotic thrombocytopenic purpura, TTP) であり、加えて精神神経症状、腎障害、発熱を示す場合もある²⁾。血小板減少、溶血性貧血、腎障害は溶血性尿毒症症候群 (hemolytic uremic syndrome, HUS) と共通しているため、TTP と HUS の鑑別は臨床的には困難であることがあり、血栓性細小血管障害症 (thrombotic microangiopathy, TMA) という診断名が用いられる場合がある³⁾。TTP と HUS の鑑別には ADAMTS13 の活性測定が必要である。

2. ADAMTS13 遺伝子上の TTP 病因変異と一塩基多型

これまでに 100 以上の先天性 TTP (Upshaw-Schulman syndrome) の原因変異が ADAMTS13 遺伝子上に同定されている⁴⁾。変異の種類はミスセンス変異や終止コドンの挿入、スプライシング異常など様々であるが、これらの多くで ADAMTS13 の細胞外への分泌が障害され、活性がほぼ完全に消失すると考えられる。一般集団において、ADAMTS13 遺伝子の一塩基多型が同定されている。その中で、日本人集団で比較的多く見られるミスセンス変異を表 1 に示す⁵⁾。こ

のうち P475S 変異は白人には存在せず日本人 (対立遺伝子頻度 5.0%)、韓国人 (4.0%)、中国人 (1.5%) などの東アジア人特有の変異である⁵⁾。動物細胞で発現させた P475S 変異型 ADAMTS13 は VWF マルチマー解析 (1.5M 尿素存在下で測定) では 10% 以下の VWF 切断活性しか示さなかった⁶⁾。一方、蛍光ペプチド基質である FRETS-VWF73 測定法では 70% の活性を示した⁷⁾。日本人一般住民を対象に ADAMTS13 活性を FRETS-VWF73 測定法で測定した研究では、P475S 変異のヘテロ接合体およびホモ接合体の ADAMTS13 活性は約 87% および約 73% に低下していた⁸⁾。P475S 変異型 ADAMTS13 が測定法によって著しく異なる切断活性を示すことから、本研究ではより本来の生理的条件下での活性について調べた (後述)。

3. ADAMTS13 の立体構造と VWF に結合するエキソサイト

ADAMTS13 はヒトでは 19 個の遺伝子からなる ADAMTS ファミリーに属する⁹⁾ (図 1)。成熟 ADAMTS タンパク質は N 末側のメタロプロテアーゼ (M)、ディスインテグリン様 (D)、トロンボスポンジン-1 (T)、システインリッチ (C_A-C_B)、スペーサー (S) ドメインからなる領域を共通に持ち、これらの領域がそれぞれの ADAMTS プロテアーゼの基質特異性に必須である。さらにその C 末側には T ドメインと各 ADAMTS 特有のドメインが存在する。ADAMTS13 においては、7 つの T ドメイン (T2-8) と 2 つの CUB ドメインが並ぶ。我々はこのうち DTCS

表 1 日本人集団における ADAMTS13 遺伝子の主要なミスセンス変異⁵⁾

変異	ドメイン	マイナー対立遺伝子頻度
T339R (c.1016C>G)*	D	0.027
Q448E (c.1342C>G)	C _A	0.192
P475S (c.1423C>T)	C _A	0.050
P618A (c.1852C>G)*	S	0.027
S903L (c.2708C>T)	T5	0.048
G1181R (c.3541G>A)	T8-CUB1 間	0.022

*T339R と P618A は連鎖不均衡 ($r^2=0.97$) を示す。

ドメイン領域の構造を決定し, 変異実験の結果から, (1) D ドメインはディスインテグリン様の立体構造ではなく, C_A ドメインの立体構造と相同であること, (2) S ドメインは 10 本の β ストランドからなる β サンドイッチ構造であること, (3) ADAMTS13 は空間的に隔たりながらも直線状に並んだ 3 カ所の VWF 結合エキソサイトを通して, ずり応力などでほどけた VWFA2 ドメインを広範囲で認識することを明らかにした¹⁰⁾. これらの結果は以前に本誌において詳細に紹介した¹¹⁾. 興味深いことに, 正常型 DTCS の立体構造において Pro475 はシス型の立体配座をとることで, 我々が V ループと命名した C_A ドメイン内のループ (Val474-Ala481) の折れ曲がりに寄与していた. V ループへの変異導入によって ADAMTS13 の VWF 切断活性が大きく減少することから, V ループは VWF が結合するエキソサイトであると考えた. 我々は P475S 変異ではプロリンからシス型構造をとれないセリンへの置換により立体構造が変化し活性の低下がもたらされると考え, P475S 変異型 DTCS ドメインの構造決定と変異型 ADAMTS13 の酵素学的解析を行った¹²⁾ ので紹介する.

4. DTCS-P475S の構造

動物細胞分泌培養系を用いて精製した P475S 変異型 DTCS を結晶化し, その全体構造を 2.8Å の分解能で決定した (PDB ID: 3VN4) (図 1A). P475S 変異型 DTCS の骨格構造は正常型とほぼ一致したが, P475S 変異が存在する V ループの立体構造は正常型とかなり異なっていた (図 1B). 正常型 DTCS の 2 つの構造モデル (PDB ID: 3GHM, 3GHN) では, Pro475 は Ser477 および Gln478 の側鎖とそれぞれ 3.5/3.8Å および 3.1/3.5Å の距離で水素結合を形成していたが, P475S 変異型ではそれぞれの距離は 5.0Å および 8.3Å であ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が, P475S 変異型 DTCS の構造ではそれらの相互作用が見られなかった. P475S 変異型 DTCS における

Ser475 の C_A および S ドメイン内の他の残基との明確な相互作用の欠如は, V ループの構造が変異型 DTCS において正常型よりも不安定である可能性を示唆した.

5. P475S 変異の ADAMTS13 切断活性への影響

そこで上記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 ADAMTS13-MDTCS を発現・精製し, 酵素学的パラメーターを FRET-S-VWF73 を用いて決定した. その結果, 正常型と P475S 変異型 MDTCS は V_{max} および k_{cat} はほぼ等しいが, K_m 値は変異型が正常型よりもほぼ 2 倍高いことを明らかにした (表 2). これらの結果は, 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を示しており, 変異によって影響を受ける C_A ドメインの V ループが基質との相互作用に関与するエキソサイトであるという考えと一致した.

In vitro での VWF マルチマーを基質にした実験では, 切断部位の Tyr¹⁶⁰⁵-Met¹⁶⁰⁶ 結合を露出させるために, 尿素を用いる必要があった. しかしながら, P475S 変異型 ADAMTS13 は尿素存在下では正常型よりも低い活性を示した⁷⁾. ボルテックスはタンパク質にずり応力をかけることができる. そこで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 VWF マルチマーにずり応力をかけ, 正常型と変異型の切断活性を比較した (図 3). 切断によって生じる約 150kDa の VWF 断片をウエスタンブロッティングで定量したところ, P475S 変異型の反応 2 時間後の VWF 切断効率

表 2 正常型および P475S 変異型 ADAMTS13-MDTCS による FRET-S-VWF73 切断の酵素学的パラメーター¹²⁾

	MDTCS	MDTCS-P475S
K _m (μM)	0.37±0.06	0.82±0.12
k _{cat} (sec ⁻¹)	1.94±0.08	1.90±0.11
k _{cat} /K _m (μM ⁻¹ sec ⁻¹)	5.26	2.32
V _{max} (nM sec ⁻¹)	0.35	0.35

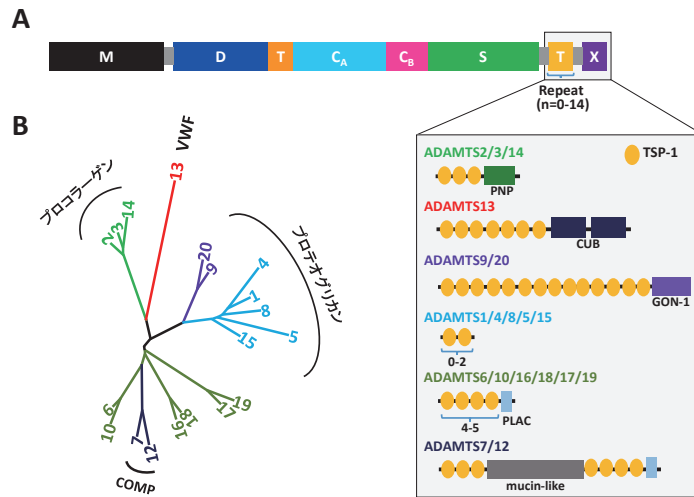


図1 ADAMTS プロテアーゼファミリーのドメイン構造と進化系統樹

A. 成熟ADAMTSタンパク質のドメイン構造. N末側には、プロテアーゼ活性に必要とされるM, D, T, C (構造的にC_AとC_Bに分かれる), Sの各ドメインが存在する. さらにそのC末側にTドメインおよび各ADAMTS特有のドメイン群(X)が存在する. **B.** ADAMTSファミリーの全長配列に基づいた無限系統樹. 外側の黒字は基質を示す. COMP: cartilage oligomeric matrix protein

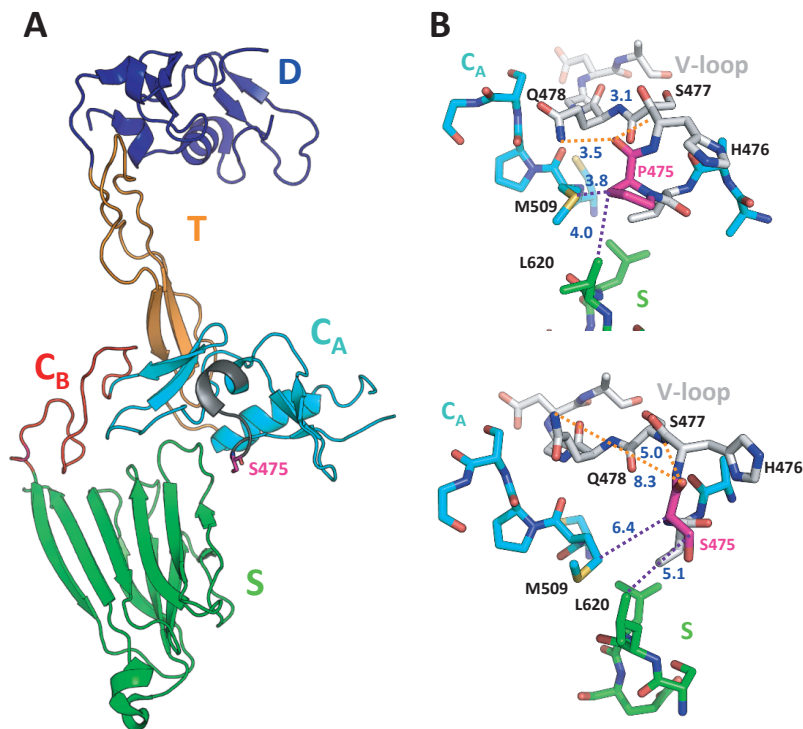


図2 正常型とP475S変異型ADAMTS13-DTCS立体構造の比較

A. P475S変異型ADAMTS13-DTCSの全体構造. D, T, C_A, C_B, S各ドメインを色分けし, C_Aドメイン内のVループ(Val474-Ala481)を灰色で, Ser475を球棒モデルで表示した. **B.** 変異部位周辺の構造比較. 上図: 正常型DTCS (PDB: 3GHN), 下図: P475S変異型DTCS (PDB: 3VN4). 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し, 下図の破線はP475S変異型DTCS構造において対応する原子を結んだもの. 数字は距離を示す(単位: Å).

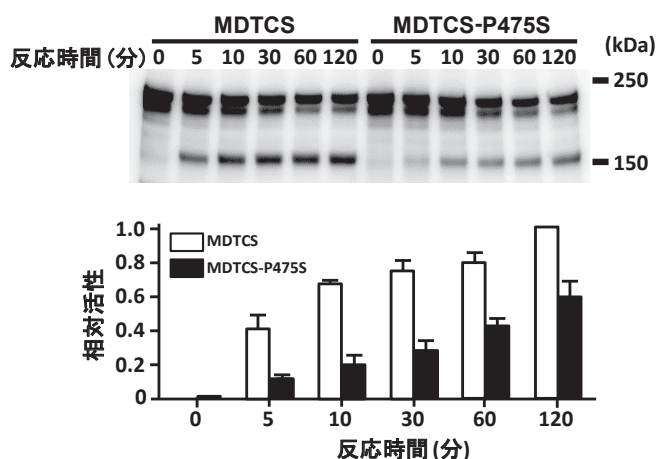


図3 ずり応力をかけた VWF マルチマーの正常型および P475S 変異型 MDTCS による切断
 (上図) ボルテックス処理 (2,500rpm, 3分) した VWF マルチマー (100nM VWF モノマー相当) に 1nM の正常型および P475S 変異型 ADAMTS13-MDTCS を加えて 0 分~120 分処理して, ADAMTS13 による VWF の切断を抗 VWF 抗体を用いたウエスタンブロッティングによって検出した. (下図) 切断によって生じる 150kDa バンドの濃度を定量し, 正常型 MDTCS の 120 分後のバンドの濃度を 1 としてプロットしたもの (n=3).

のおよそ 60% で, 活性が 10% 以下にまで減少する尿素を変性剤に用いた切断アッセイとは対照的に, FRET-S-VWF73 を用いた測定による活性値に近いことが判明した. すなわち, これら尿素を用いない測定では, 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これまでの結果と良く一致した.

6. P475S 変異の ADAMTS13 切断活性への変性剤と温度の影響

FRET-S-VWF73 を用いた切断活性の定量において, P475S 変異型 MDTCS は尿素やグアニジンなどの変性剤の存在下で, 正常型に比べ活性が大きく低下した. 高温下でも P475S 変異型 MDTCS の活性低下は正常型よりも大きかった. タンパク質の熱安定性を見る thermal shift assay において, 正常型と P475S 変異型 MDTCS の間で T_m 値に差は見られなかったことから, 変異型 MDTCS ではタンパク質の全体構造は正常型とほぼ同一であり, C_A ドメインの V ループ周辺のみが変性剤や高温により局所的に大きな構造変化する結果, 活性が大きく低下する可能性が示唆された.

7. 終わりに

ずり応力で引き伸ばされた VWF は, 異なるドメイン上の複数のエキソサイトを介して ADAMTS13 と相互作用することで VWF が特異的に認識され切断される. 血漿中では, 約 3% の ADAMTS13 は CUB ドメインを含む C 末端領域を介して, VWF の C 末端領域に位置する D4-CK ドメインに結合している¹³⁾. これらの結果から, ADAMTS13 の N 末端に位置する触媒 M ドメインが VWF を切断するには, 分子全体にわたって存在する複数のエキソサイトを使って VWF を認識し結合することが明らかとなった. ADAMTS13 (0.5-1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) の血漿中のモル濃度 (3.5-7nM) は, 凝固第 VII 因子より低い. 低濃度の ADAMTS13 が, 血漿タンパク質 (約 80mg/mL) のうちのわずか 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ にしか過ぎない VWF の 1 カ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. エキソサイトを介した基質認識は, 他の ADAMTS プロテアーゼにおいても同様であると考えられる. 変形関節症の発症に関与している ADAMTS4 ならびに ADAMTS5 においても, M ドメインに隣接した DTCS ドメ

ンのエキソサイトがそれらの基質であるアグリカンの切断に必要である¹⁴⁾。様々な病態に参与している他のADAMTSプロテアーゼの特異的な基質認識の解明も期待される。最近マウスモデルにおいて、組み換えADAMTS13の投与がTTP¹⁵⁾だけでなく、急性心筋梗塞後の心筋^{16) 17)}、脳卒中でのtPA投与後出血¹⁸⁾など様々な病態の症状を改善することや、ADAMTS13ノックアウトマウスで動脈硬化が促進される¹⁹⁾ことが報告され、従来の役割を超えたADAMTS13の機能とADAMTS13タンパク質による新規治療の可能性が示唆されている。今後のADAMTS13研究の発展が期待される。

Disclosure of Conflict of Interests

The authors indicated no potential conflict of interest.

文 献

- 1) De Ceunynck K, De Meyer SF, Vanhoorelbeke K : Unwinding the von Willebrand factor strings puzzle. *Blood* **121** : 270-277, 2013.
- 2) Kremer Hovinga JA, Lammle B : Role of ADAMTS13 in the pathogenesis, diagnosis, and treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* **2012** : 610-616, 2012.
- 3) Chapman K, Seldon M, Richards R : Thrombotic microangiopathies, thrombotic thrombocytopenic purpura, and ADAMTS-13. *Semin Thromb Hemost* **38** : 47-54, 2012.
- 4) Fujimura Y, Matsumoto M, Isonishi A, Yagi H, Kokame K, Soejima K, et al. : Natural history of Upshaw-Schulman syndrome based on ADAMTS13 gene analysis in Japan. *J Thromb Haemost* **9** Suppl 1 : 283-301, 2011.
- 5) Kokame K, Kokubo Y, Miyata T : Polymorphisms and mutations of ADAMTS13 in the Japanese population and estimation of the number of patients with Upshaw-Schulman syndrome. *J Thromb Haemost* **9** : 1654-1656, 2011.
- 6) Kokame K, Matsumoto M, Soejima K, Yagi H, Ishizashi H, Funato M, et al. : Mutations and common polymorphisms in ADAMTS13 gene responsible for von Willebrand factor-cleaving protease activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99** : 11902-11907, 2002.
- 7) Akiyama M, Kokame K, Miyata T : ADAMTS13 P475S polymorphism causes a lowered enzymatic activity and urea lability in vitro. *J Thromb Haemost* **6** : 1830-1832, 2008.
- 8) Miyata T, Kokame K, Matsumoto M, Fujimura Y : ADAMTS13 activity and genetic mutations in Japan. *Hamostaseologie* **33** : 131-137, 2013.
- 9) Le Goff C, Cormier-Daire V : The ADAMTS (L) family and human genetic disorders. *Hum Mol Genet* **20** : R163-167, 2011.
- 10) Akiyama M, Takeda S, Kokame K, Takagi J, Miyata T : Crystal structures of the noncatalytic domains of ADAMTS13 reveal multiple discontinuous exosites for von Willebrand factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106** : 19274-19279, 2009.
- 11) 秋山正志 : ADAMTS13のフォンビルブランド因子認識機構の構造学的基盤. *日本血栓止血学会誌* **21** : 319-326, 2010.
- 12) 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.
- 13) Zanardelli S, Chion AC, Groot E, Lenting PJ, McKinnon TA, Laffan MA, et al. : A novel binding site for ADAMTS13 constitutively exposed on the surface of globular VWF. *Blood* **114** : 2819-2828, 2009.
- 14) Huang K, Wu LD : Aggrecanase and aggrecan degradation in osteoarthritis : a review. *J Int Med Res* **36** : 1149-1160, 2008.
- 15) Schiviz A, Wuersch K, Piskernik C, Dietrich B, Hoellriegel W, Rottensteiner H, et al. : A new mouse model mimicking thrombotic thrombocytopenic purpura : correction of symptoms by recombinant human ADAMTS13. *Blood* **119** : 6128-6135, 2012.
- 16) De Meyer SF, Savchenko AS, Haas MS, Schatzberg D, Carroll MC, Schiviz A, et al. : Protective anti-inflammatory effect of ADAMTS13 on myocardial ischemia/reperfusion injury in mice. *Blood* **120** : 5217-5223, 2012.
- 17) Doi M, Matsui H, Takeda H, Saito Y, Takeda M, Matsunari Y, et al. : ADAMTS13 safeguards the myocardium in a mouse model of acute myocardial infarction. *Thromb Haemost* **108** : 1236-1238, 2012.
- 18) Wang L, Fan W, Cai P, Fan M, Zhu X, Dai Y, et al. : Recombinant ADAMTS13 reduces tissue plasminogen activator-induced hemorrhage after stroke in mice. *Ann Neurol* **73** : 189-198, 2013.
- 19) Jin SY, Tohyama J, Bauer RC, Cao NN, Rader DJ, Zheng XL : Genetic ablation of Adamts13 gene dramatically accelerates the formation of early atherosclerosis in a murine model. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **32** : 1817-1823, 2012.