

って、NHEの基本的な機能を堅持しつつも、「必要以上の活性化をブロックする薬」が有効に違いない。NHE活性調節の分子メカニズムを解明す

ることによって、その先には制御機構を標的にした画期的な創薬が見えてくることが期待される。

## 用語解説

1. SLC9:SLC とは solute carrier の略称で、HUGO (The Human Genome Organization) が策定したトランスポーターを含む遺伝子分類の1つである。SLCには現在46ファミリー、360の遺伝子が登録されている。これらの輸送基質としては、無機イオン、アミノ酸、糖、薬物など様々であり、細胞の膜を隔てた物質輸送を担っている。Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 交換輸送体はSLC9ファミリーに属し、現在11のアイソフォームが登録されている。
2. pHセンサー：NHE分子自身には、細胞質のpHをモニターする「センサー」とも呼ぶべき部位が内在し、H<sup>+</sup>との相互作用の変化でNHE活性を増減させることによって酸性化からの速やかな回復や閾値以上のアルカリ化を shut-off する重要な役割を担うと考えられている。NHE活性はpHセンサーがプロトン化されると上昇するが、逆に脱プロトン化されると消失すると考えられる。NHEがイオノフォア・モネンシンのような単純なNa<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>交換促進分子ではない卓越したpH制御を行うことができるのは、pHセンサーという巧妙な分子的仕掛けの存在による。
3. 筋ジストロフィー：骨格筋の変性・壊死を主病変とし、臨床的には進行性の筋力低下をみる遺伝性の疾患。デュシェンヌ型は筋ジストロフィー疾患の中で患者数も多く、症状が重く、経過も悪くなる病型。人口10万人あたり3～5人、出生男児3500人につき1人の発生率。心筋症を伴う場合も多い。現時点で対症療法しかなく根本的治療法はない。
4. 心筋虚血・再灌流障害：心筋組織の血流が不足し必要とする酸素が欠乏する（虚血）と心臓のポンプ機能は著しく低下する。虚血の期間が比較的短時間で

解除され血流の再開が行われる（再灌流）と心機能は速やかに回復するが、虚血の期間がある一定時間を超えると再灌流を行ったにもかかわらず心筋細胞壊死が誘発され非可逆的な心機能障害、心不全に陥る。これを心筋虚血・再灌流障害という。再灌流時の細胞内Ca<sup>2+</sup>過負荷、フリーラジカル産生などが障害発症に重要である。

5. 心筋リモデリング：心臓に圧負荷・容量負荷や心筋障害などの物理的負荷（ストレス）がかかると心筋細胞はそれを感じ、増大する壁応力が低下するため、タンパク質合成が亢進し肥大する（心肥大）。この過程にはタンパク質合成の量的変化と形質転換（成人型から胎児型アイソフォーム）が伴う。上記ストレスが過大または長期間の場合、適応は破綻し心臓は拡大し心筋収縮力は低下する（心不全）。心機能障害が進行すると低心拍出量やうっ血という心不全症状が出る。このような心室の形態・容積・機能の変化を心筋リモデリングと呼び、心不全発症、進展の本態であると考えられている。
6. Ca<sup>2+</sup>依存性心肥大シグナル：細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度が上昇すると、Ca<sup>2+</sup>/カルモデュリン依存性酵素であるカルシニューリンおよびカルモデュリンキナーゼII (CaMKII) が活性化される。カルシニューリンは細胞質内にある転写因子NFATを脱リン酸化して核内に移行させることによりカルシニューリン/NFAT経路を活性化し、一方CaMKIIは核内に存在する転写制御因子ヒストン脱アセチル化酵素HDACをリン酸化して核外に移行させることによりCaMKII/HDAC経路を活性化し、結果的に心肥大遺伝子発現を促進することが知られている。

## 参考文献

- 1) 若林繁夫, 久光 隆, 他: 生化学 79, 579-587, 2007.
- 2) Wakabayashi S, Shigekawa M, et al: J Physiol Rev 77, 51-74, 1997.
- 3) Pang T, Su X, et al: J Biol Chem 276, 17367-17372, 2001.
- 4) Hisamitsu T, Ammar YB, et al: Biochemistry 45, 13346-13355, 2006.
- 5) Ammar YB, Takeda S, et al: EMBO J 25, 2315-2325, 2006.
- 6) Iwata Y, Katanosaka Y, et al: Am J Pathol 171, 1576-1587, 2007.
- 7) Beg AA, Ernstrom GG, et al: Cell 132, 149-160, 2008.
- 8) Cardone RA, Casavola V, et al: Nat Rev Cancer 5, 786-795, 2005.
- 9) Willoughby D, Cooper DM: Physiol Rev 87, 965-1010, 2007.
- 10) Karmazyn M, Sawyer M, et al: Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord 5, 323-335, 2005.
- 11) Wang Y, Meyer J W, et al: Circ Res 93, 776-782, 2003.
- 12) Kilic A, Velic A, et al: Circulation 112, 2307-2317, 2005.
- 13) Engelhardt S, Hein L, et al: Circ Res 90, 814-819, 2002.
- 14) Wakabayashi S, Bertrand B, et al: J Biol Chem 269, 13710-13715, 1994.
- 15) Nakamura TY, Iwata Y, et al: Circ Res 103, 891-899, 2008.

## 参考図書

\* シリーズ・ニューバイオフィジックス II-3, ポンプとトランスポーター, 平田 肇, 茂木立志 編, 共立出版, 2000.

\* 生化学 79, 特集: 膜輸送ナノマシンの構造・作動機構と制御, 山口明人, 金沢 浩 企画, 日本生化学会, 2007.



Contents lists available at ScienceDirect

Seminars in Cell & Developmental Biology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/semcdb](http://www.elsevier.com/locate/semcdb)



Review

## Three-dimensional domain architecture of the ADAM family proteinases

Soichi Takeda\*

Department of Cardiac Physiology, National Cardiovascular Center Research Institute, 5-7-1 Fujishirodai, Suita, Osaka 565-8565, Japan

### ARTICLE INFO

Article history:  
Available online xxx

Keywords:  
ADAM  
ADAMTS  
Disintegrin metalloproteinases  
MDC proteins  
Ectodomain shedding

### ABSTRACT

A disintegrin and metalloproteinase (ADAM) family of proteins constitutes a major class of mammalian membrane-bound sheddases that are responsible for the processing of cell-surface-protein ectodomains, including the latent forms of growth factors, cytokines and their receptors. However, the molecular mechanism by which ADAMs recognize and process their substrates is largely unknown. Recent crystallographic studies on phylogenically related snake venom metalloproteinases (SVMPs) and mammalian ADAM with thrombospondin type-1 motif (ADAMTS) family proteins have shed light on the structure-function properties of ADAMs. This review will highlight these recent structures, particularly the non-catalytic ancillary domains, which might be important for substrate recognition.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### Contents

|  |    |
|--|----|
| 1. Introduction  | 00 |
| 2. General architecture of ADAM family proteinases                                 | 00 |
| 2.1. Metalloproteinase (M) domain  | 00 |
| 2.2. Disintegrin-loop  | 00 |
| 2.3. Disintegrin-like (D) domain   | 00 |
| 2.4. Cysteine-rich "Hand" (C <sub>h</sub> ) domain and hyper-variable-region (HVR) | 00 |
| 2.5. D-domain of ADAMTSs   | 00 |
| 3. Adhesive functions of ADAMs   | 00 |
| 4. Roles of DC domains in shedding by ADAMs  | 00 |
| 5. Conclusion  | 00 |
| Acknowledgements   | 00 |
| References   | 00 |

### 1. Introduction

ADAM family proteins, also called metalloproteinase-disintegrins or metalloproteinase/disintegrin/cysteine-rich (MDC) proteins, are an emerging class of mammalian membrane-bound glycoproteins whose functions have been implicated in cell-cell and cell-matrix adhesion and signaling [1–3]. The best-characterized *in vivo* activity of ADAMs is their ectodomain shedding activity. ADAM17 (TNF- $\alpha$  converting enzyme, or TACE) was initially identified as the physiological convertase for TNF- $\alpha$  [4,5]. ADAMs have also been implicated in mitogenic events associated with EGF receptor transactivation by GPCRs [6,7]. ADAMs appear to play key roles in normal development and morpho-

genesis through their ability to function as sheddases [8] and are associated with several diseases, including rheumatoid arthritis, Alzheimer's disease, heart disease, and cancer [9–11]. As such, they have also become potential therapeutic targets for various disease conditions. Excluding pseudogenes, human and mouse ADAMs are encoded by 20 and 37 functional genes, respectively. ADAMs are mosaic proteins that generally possess, from N- to C-terminus, pro-peptide (P), metalloproteinase (M), disintegrin-like (D), cysteine-rich (C), epidermal growth factor (EGF), transmembrane (TM) and cytoplasmic (CT) domains, and are unique in that they exhibit both proteolytic and adhesive activities on the cell surface. ADAMs are members of the adamalysin/reprolysin family of the metzincin sub-clan of Zn-dependent metalloproteinases, which also includes the matrixins (matrix metalloproteinases, or MMPs), astacins and serralyins [12,13]. These metalloproteinases share a catalytic site architecture and, in part, an M-domain topology. However, they have distinct C-terminal non-catalytic ancillary

\* Tel.: +81 6 6833 5012; fax: +81 6 6872 7485.  
E-mail addresses: [stakeda@ri.ncvc.go.jp](mailto:stakeda@ri.ncvc.go.jp), [soichi@spring8.or.jp](mailto:soichi@spring8.or.jp).

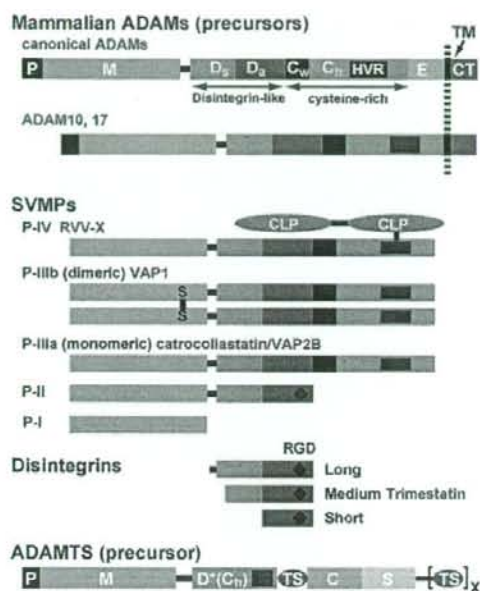


Fig. 1. Schematic representation of the domain structure of ADAM family of proteins. Each domain or segment is represented by a different color.

domains that may contribute to unique regulatory functions for each metalloproteinase. Adamalysin/reprolysin family proteins also include ADAMTS [14,15] family proteins and SVMPs, which constitute two groups of secreted proteinases. In contrast to SVMPs and ADAMTSs, all of which are predicted to be catalytically active enzymes, only ~60% of ADAMs contain a functional catalytic signature sequence (HEXXHXGXHD where X denotes any amino acid). The physiological roles of the protease inactive ADAMs remain largely unknown, however, several members of this group play important roles in development [16,17], which suggests that the adhesive activity of these proteins may be relevant to their function. The non-catalytic ancillary domains of ADAMs, particularly the D and C-domains, have been implicated in adhesive activity [18–21] and regulatory activity during proteolysis [22,23]. However, critical questions, such as how metalloproteinase activity is regulated and how substrates are recognized, remain to be answered. Recent crystallographic studies on the high molecular weight SVMPs [24–26] and related mammalian protein structures [27–29] have shown us the MDC domain architecture of ADAMs, as well as potential protein-protein interaction sites that may be important for substrate recognition. This review will summarize our current understanding of the structure of ADAM/adamalysin/reprolysin family proteins and discuss how structure relates to the shedding activity of the ADAM proteins.

## 2. General architecture of ADAM family proteinases

The mammalian ADAMs are most closely related to the P-III class of SVMPs. The SVMPs are classified into four groups (P-I to P-IV) according to their domain organization [30] (Fig. 1). The mature P-III SVMPs contain M, D and C domains. Vascular apoptosis-inducing protein-1 (VAP1) was the first P-III SVMP structure to be resolved by X-ray crystallography [24,31]. The structures of VAP1 revealed an MDC domain architecture, which is shared by mammalian

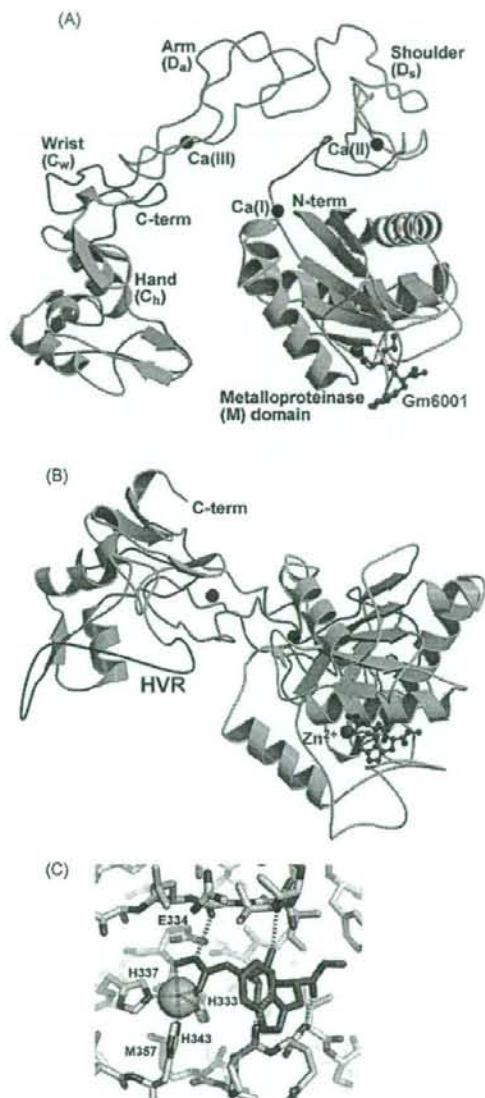


Fig. 2. ADAMs MDC domain architecture. (A and B) Two orthogonal views of the MDC domain of catrocollastatin/VAP2B. The M-domain, linker, D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub>, C<sub>w</sub> and C<sub>H</sub> segments and the HVR are shown in yellow, gray, cyan, pink, gray, light green and blue, respectively. Zinc and calcium ions are represented as red and black spheres, respectively. The hydroxamic inhibitor Gm6001 bound to the protein molecule is shown in ball-and-stick representation. (C) Close up view of the catalytic site of catrocollastatin/VAP2B. The residues involved in the coordination of the zinc ion, the catalytic base, and the Met-turn are indicated.

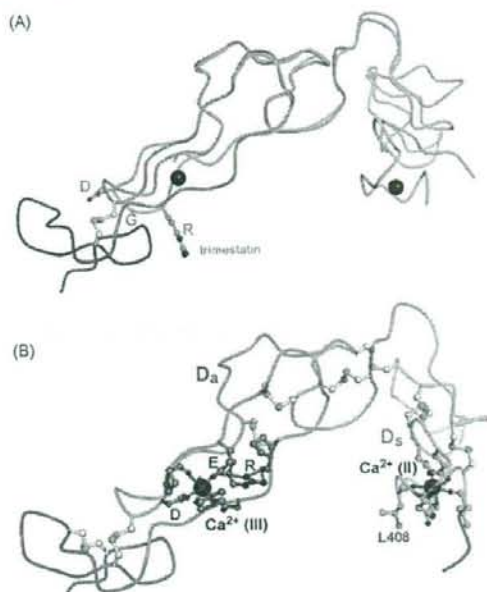
membrane-bound ADAMs. A comparison of the six catrocollastatin/VAP2B crystal structures and the structures of VAP1 revealed a dynamic property of the MDC domains that may be important for the function of ADAM family proteins [25].

Fig. 2 depicts the MDC domain architecture of catrocollastatin/VAP2B, a monomeric P-III SVMP that is the structural prototype of mammalian ADAMs [25]. The globular M-domain

is followed by the D-domain which is further divided into two structurally distinct sub-segments, the shoulder ( $D_s$ ) and the arm ( $D_a$ ) segments. These sub-segments are stabilized by a number of disulfide bonds and bound calcium ions (see Section 2.3.). The  $D_s$ -segment protrudes from the M-domain, and is opposed to the catalytic site and close to calcium-binding site I. This calcium-binding site is highly conserved among canonical ADAMs [24,31]. The D-domain, together with the C-domain, forms C-shaped arm with its concave surface toward the M-domain. Notably, the distal portion of the C-domain comes close to and faces toward the catalytic site in the M-domain. The residues that are important for stabilizing the MDC domain architecture (e.g. the number and spacing of cysteinyl residues and the residues that coordinate the calcium ions) are strictly conserved in the primary structures of all known ADAMs, with the exception of the atypical ADAMs (ADAM10 and 17, see Section 2.3.) [24,31]. The canonical membrane-bound ADAMs contain an EGF domain following the C-domain, however, no roles have been assigned to this domain. The EGF domain probably works as a rigid spacer connecting the MDC domain with and orienting it against the membrane-spanning region.

### 2.1. Metalloproteinase (M) domain

The structures of the M-domains of mammalian ADAM/ADAMTS family proteins determined to date can be superimposed, with variability only in the peripheral loop regions [28,29,32–34]. They can also be superimposed on SVMPs of different sub-classes [24–26,35]. The M-domain has an oblate ellipsoidal shape with a notch in its flat side that creates a relatively small “lower” domain and an “upper” main domain in the “standard” orientation [12] (Fig. 2B). The catalytic zinc ion is situated at the bottom of the cleft, and is tetrahedrally coordinated by the Nε2 atoms of the three histidines in the consensus sequence HEXXHXXGXXHD (Fig. 2C). The glutamic acid functions as a catalytic base that polarizes a water molecule involved in nucleophilic attack at the sessile peptide bond. The side-chain of the conserved methionine (called Met-turn) downstream of the catalytic consensus sequence provides a hydrophobic base beneath the three zinc-coordinating histidine side-chains. All of these structural features are hallmarks of the metzincin clan of metalloendopeptidases [12,13]. The upper domain has a central core consisting of a highly twisted five-stranded  $\beta$ -sheet and four  $\alpha$ -helices, while the C-terminal lower domain consists of a helix and an irregularly folded region (Fig. 2B). This irregularly folded region is important for substrate recognition because it forms, in part, the wall of the S1' crevice. Fig. 2C depicts a close-up view of the active site cleft of catrocollastatin/VAP2B in complex with a hydroxamic inhibitor GM6001 [25]. The peptidic portion of the inhibitor adopts an extended geometry and binds to the notched right-hand side of the active-site cleft of the M-domain, mimicking the C-terminal part of enzyme-bound substrate from left to right. The inhibitor forms hydrogen bonds with the adjacent strand and the loop region, in essence extending the central  $\beta$ -sheet by two strands. The mode of peptidic inhibitor binding to catrocollastatin/VAP2B is essentially the same as that of its mammalian counterparts [28,29,32–34]. Although the M-domain catalytic site should recognize the sequence flanking the substrate cleavage site, ADAMs cleave broader assemblies of sites in membrane-anchored substrates, which indicates that there are no strict peptide bond requirements for cleavage [36]. Rather, the accessibility and structure of the cleavage site (juxtamembrane region), the distance from the membrane, and interactions distal to the cleavage site (exosite) that are mediated by non-catalytic ancillary domains are believed to be important determinants, either alone or in combination, for recognition and processing by membrane-bound ADAMs. Therefore, knowledge of the three-dimensional structure of the entire



**Fig. 3.** D-domain structure. (A) Superimposition of the  $D_s$ -segments of catrocollastatin/VAP2B and trimestatin [41] (shown in light green). The Arg-Gly-Asp side chains in trimestatin and the disulfide bond between the  $D_a$  and  $C_s$  segments in catrocollastatin/VAP2B are shown in ball-and-stick representation. The  $D_s$ ,  $D_a$  and  $C_s$  domains of catrocollastatin/VAP2B are in cyan, pink and gray, respectively. (B) Calcium-coordinating residues and disulfide bonds in the D-domain of catrocollastatin/VAP2B, which are strictly conserved in the canonical ADAMs [24,25]. The charged residues (R, D and E) in the putative integrin-binding sequence, RX<sub>6</sub>DLPEF, and the pivotal L408 in the  $D_s$ /M joint are indicated.

extracellular domain is necessary in order to fully understand the molecular mechanism of target recognition by ADAMs.

### 2.2. Disintegrin-loop

The term “disintegrin” was initially used to describe a family of cysteine-rich, RGD-containing small (49–84 amino acids) proteins from viper venom that inhibited platelet aggregation and integrin-mediated cell-adhesion [37]. ADAMs are unique among non-venomous proteins in having a disintegrin-like sequence. The ability of venom disintegrins to bind integrins has been attributed to an extended loop (disintegrin-loop) containing a cell-adhesion sequence (e.g. RGD) [38]. Thus, the analogous region within the D-domain of ADAMs, which usually possesses EDC sequence instead of RGD, with the exception of human ADAM15, has been putatively assigned integrin binding function [16]. In support of this hypothesis, it has been widely reported that the disintegrin-loops of ADAMs interact with certain integrins (mostly non- $\alpha$ -domain integrins), thereby mediating cell–cell and cell–matrix interactions [1,39]. The RGD-type integrin ligands are proposed to bind to non- $\alpha$ -domain integrins by fitting into the crevice formed between the propeller and  $\beta$ A domains of the headpiece of the integrin [40]. The structures of SVMPs revealed that the D-domains of ADAMs have a similar structure as the RGD-containing disintegrin trimestatin [41], however, the disintegrin-loop is unavailable for protein–protein interactions due to steric hindrance [24–27,31] (Fig. 3A), which highlights a discrepancy in the hypothesis. The RX<sub>6</sub>DLPEF sequence that encompasses the disintegrin-loop is suggested to be a candidate for integrin-binding [42], however, the crystal structure

data suggest that all three charged residues in this sequence (R, D and E) act primarily as structural elements, and are not expected to provide a protein-binding interface (Fig. 3B). Although a number of studies have shown a direct interaction between ADAMs and integrins, the precise function of the ADAM disintegrin-loop is still controversial, and further studies are needed to elucidate whether and how the interactions with integrins observed in model systems relates to the physiological functions of ADAMs.

### 2.3. Disintegrin-like (D) domain

The D-domain is linked to the M-domain by a short linker that allows variability in the orientation of the M-domain and the D<sub>2</sub>-segment [24,31]. A conserved hydrophobic residue (L408 in catrocollastain/VAP2B) in the D<sub>3</sub> segment, which points toward a small hydrophobic pocket in the M-domain, functions as the pivotal point [25]. The D<sub>2</sub> and D<sub>3</sub> segments consist largely of a series of turns and two short regions of antiparallel  $\beta$ -sheet, and constitute a continuous C-shaped arm structure, together with the N-terminal region of the C-domain, which is designated as the "wrist" (C<sub>w</sub>) segment. The C<sub>w</sub>-segment consists of a pair of antiparallel  $\beta$ -sheets and loops and packs against the D<sub>2</sub>-segment on one side and against the C-terminal region of the "hand" (C<sub>h</sub>) segment on the other. There are three disulfide bonds in the D<sub>2</sub>-segment, three in the D<sub>3</sub>-segment and one in the C<sub>w</sub>-segment, and the segments are connected by single disulfide bonds (Fig. 3B). Both the D<sub>2</sub> and the D<sub>3</sub> segments contain structural calcium-binding sites, sites II and III, respectively, in which the conserved side-chain and the main-chain carboxyl oxygen atoms are involved in pentagonal bipyramidal coordination [24,25,31]. Because there are few secondary structural elements, bound calcium ions and the disulfide bonds are essential for the structural rigidity of the C-shaped arm structure of ADAMs.

ADAM10 and ADAM17 are atypical members of the mammalian ADAM family, as they lack calcium-binding sites I and III. Rather, ADAM10 and 17 have additional disulfide bonds in the M-domain and a shorter C<sub>h</sub>-segment compared to the canonical ADAMs. They also lack the EGF domain. The crystal structure of the DC-domain of bovine ADAM10 revealed a continuous D<sub>2</sub>/C<sub>w</sub> structure, however, the D<sub>3</sub>-segment was partially disordered and the bound calcium ion was not identified in the D<sub>3</sub>-segment [27], although calcium-binding is expected based on primary sequence.

### 2.4. Cysteine-rich "Hand" (C<sub>h</sub>) domain and hyper-variable-region (HVR)

The core of the C-terminal region of the C-domain, the C<sub>h</sub>-segment, has an  $\alpha/\beta$  fold structure that consists of the two antiparallel  $\beta$ -strands packed against two of the three  $\alpha$ -helices, and five disulfide bonds [24]. The C<sub>h</sub>-segment of VAP1 has a novel fold with no structural homology to currently known proteins, except for the corresponding segments of other SVMs [25,26], ADAM10 [27] and ADAMTSs (see Section 2.5.) [28,29]. The C<sub>h</sub>-domain is characterized by a core region that is stabilized by conserved disulfide bridges, and peripheral variable loops that protrude from the core, providing extended surface areas that are most likely involved in protein-binding.

The loop that encompasses residues 562–582 and extends across the central region of the C<sub>h</sub>-segment of VAP1 (blue regions in Fig. 2A, B and Fig. 4A, B, D) is the region in which the ADAM sequences are most divergent and variable in length (11–55 amino acids) (Fig. 4F). Therefore, this region has been designated as the hyper-variable region (HVR) [24]. The structures of the HVRs

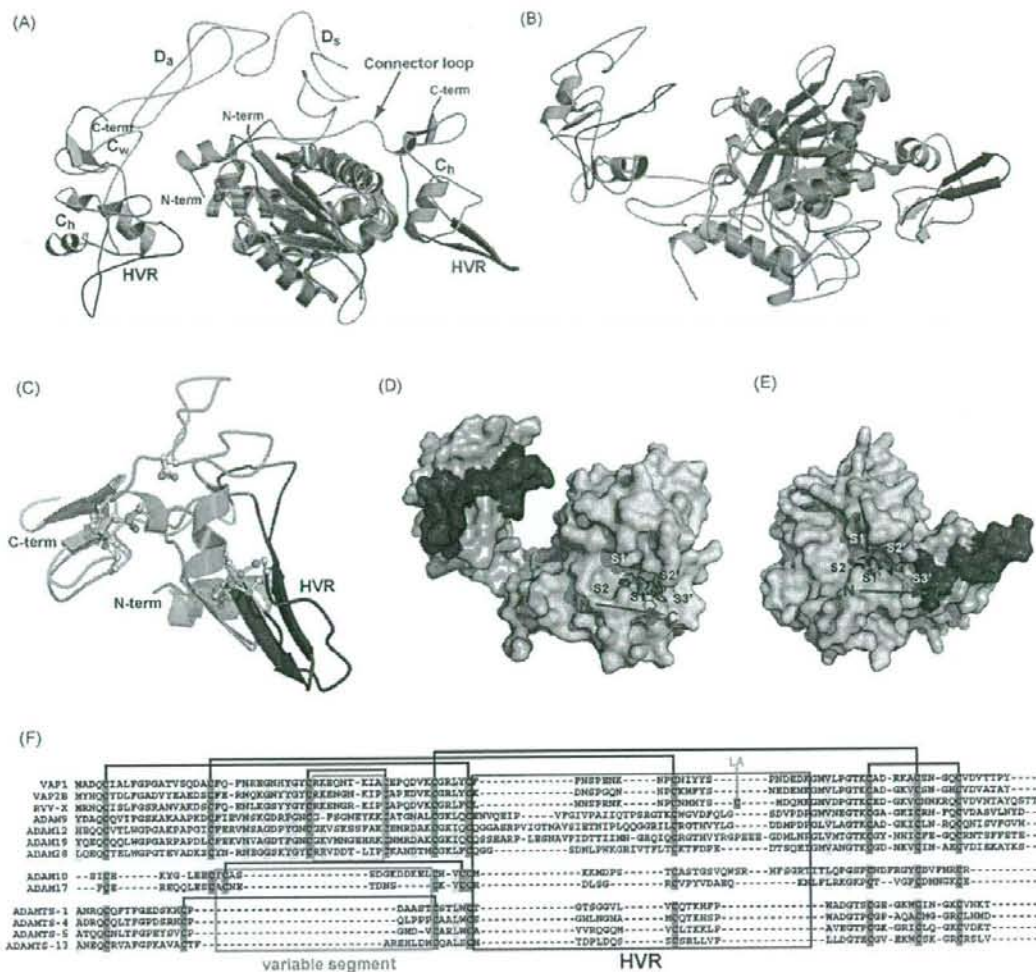
that have been determined to date are all in the crystal packing [24,25,27] or in the interface of the subunits [26], and show a relatively small number of direct interactions with the remaining core region, which suggests that they are flexible in solution. Because of its location within the molecule, opposed to the catalytic site, the HVR has been putatively assigned protein-binding functions [24] (see Section 4).

A helix-loop-helix segment found in VAP1 (residues 526–555), designated as the variable segment (shown in green color in Fig. 4C and boxed in green in Fig. 4F) is missing in the structures of ADAM10 [27] and ADAMTSs [28,29] (see below), replaced by a short loop. The residues in the variable segment seem to be rather mobile in solution because they have higher temperature factors [24,25,29] or are disordered in the crystal structures [27,28]. The variable segment is also characteristic of each ADAM and is located adjacent to the HVR. Thus, it might create an auxiliary protein-binding interface.

### 2.5. D-domain of ADAMTSs

The ADAMTS family is a branch of the ADAM family. Members of the ADAMTS family share a modular structure with the ADAMs, but have varying numbers of C-terminal thrombospondin type-1 (TSP1) repeats instead of a transmembrane segment. Thus, they constitute primarily secreted proteinases (Fig. 1). There are 19 ADAMTS proteins in humans, and they have been shown to function as aggrecanases, procollagen N-proteinases and von Willebrand factor (vWF) cleaving proteases [15]. Crystallographic studies on the MD fragments of ADAMTS-1, -4 and -5 revealed that the D-domains of ADAMTSs showed no structural homology to the D-domains of ADAMs, but were very similar in structure to the C<sub>h</sub>-segments of ADAMs and other related proteins [28,29]. Despite low sequence identity, the topology and the location of the four disulfide bonds in the C<sub>h</sub>-segments are conserved among these proteins (Fig. 4F). Thus, while the "disintegrin-like" nomenclature was used for ADAMTS family proteins due to sequence similarity [14], structural studies suggest that ADAMTS family proteins contain a C<sub>h</sub>-domain, rather than a D-domain, immediately following the M-domain. Thus, the term D-domain for ADAMTS proteins appears to be a misnomer [28].

ADAMTSs lack D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub>/C<sub>w</sub> segments, and the C<sub>h</sub>-segment (previously referred to as the D-domain) is connected to the M-domain by a connector loop (22 residues in ADAMTS-1) that wraps around the back of the M-domain, resulting in a drastically different position of the C<sub>h</sub>-segment relative to the M-domain as compared to VAP1 (Fig. 4A, B, D, and F). The structures of ADAMTS-4 and 5 [29] can be superimposed onto that of ADAMTS-1 [28] with slight differences in the relative orientations between the M-domain and the C<sub>h</sub>-segment. Interestingly, the C<sub>h</sub>-segments of ADAMTSs are located in close proximity to the active site and form, in part, the S3' pocket, thus potentially providing an auxiliary substrate-binding surface (Fig. 4E). Of note, the segment corresponding to the HVR in VAP1 runs across the middle of the C<sub>h</sub>-segment of the ADAMTSs (Fig. 4E). In this configuration, the region downstream of the P3' residues of the substrate can bind directly to the HVR (Fig. 4E). In agreement with this, deletion of the P4'–P18' residues of vWF has been shown to abolish cleavage by recombinant MD-domain-containing ADAMTS13 [43]. Similar to the HVRs of ADAMs, the HVR segments of ADAMTSs are variable among the 20 human ADAMTSs, which suggests that the HVR in the ADAMTS proteins also provides an auxiliary substrate-binding site. The structures of the ADAMTS proteins support the idea that the HVR creates a protein-protein interaction interface in the C<sub>h</sub>-segment, which is the newly identified adhesion module.

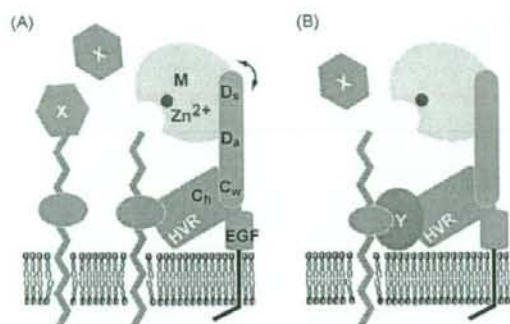


**Fig. 4.** Comparison of the structures of ADAMs and ADAMTSs. (A and B) Two orthogonal views of the superimposition of the M-domains of VAP1 (2ZRR, shown in cyan) and ADAMTS-5 (2RJQ, shown in pink). The C<sub>5</sub>-segments and the HVRs of each protein are shown in light green and blue, respectively. (C) Superimposition of the C<sub>5</sub>-segment of VAP1 (shown in cyan, green and blue) and ADAMTS-5 (shown in pink, green and red). Surface representations of the VAP1 monomer (D) and ADAMTS-5 (E). The M-domains, C<sub>5</sub>-segments, HVRs and bound peptidic inhibitors are shown in yellow, light green, blue and magenta, respectively. (F) Structure-based sequence alignment of SVMPs, human ADAMs and human ADAMTSs. The disulfide bonds are schematically indicated.

### 3. Adhesive functions of ADAMs

The D and C domains of ADAMs and related proteins have been suggested to be involved in protein-protein interactions. ADAM12 interacts with cell-surface syndecan through its C-domain and mediates integrin-dependent cell spreading [20]. The DC-domain of ADAM13 has been implicated in cell migration [44], and binds to the ECM proteins laminin and fibronectin [19]. ADAM13 C-domain was also found to be a major determinant for specific developmental events that are mediated by the proteolytic activity of ADAM13 [23]. Shedding of interleukin-1 receptor-II by ADAM17 requires the DC-domain [22]. Jararhagin-C and catrocollastatin-C, which are the DC domain-containing fragments of the P-III SVMPs jararhagin and catrocollastatin/VAP2B, respectively, inhibit collagen-induced platelet aggregation [45,46]. The C-domain of

atrolysin-A, another P-III SVMP, specifically binds collagen type I and vWF, and blocks collagen-vWF interactions [47,48] through binding to the vWF A-domain (VWA) [49]. It also binds to the VWA-containing ECM proteins collagen XII and XIV, and matrilins 1, 3 and 4 [50]. Two peptide sequences that are located on the surface of the C-domain of jararhagin have been shown to bind to vWF and block C-domain-binding to vWF [51], while another peptide that encompasses the HVR has been shown to interfere with the interaction between platelets and collagen [52]. It should be noted, however, that short peptides do not always mimic their counterparts in the folded protein, and most of the studies described above have not identified the specific regions of the C-domain that are involved. Thus, additional studies, including site directed mutagenesis based on crystal structures, will facilitate a better understanding of the adhesive mechanisms of ADAM family pro-



**Fig. 5.** Proposed models for shedding by ADAM family proteins. The membrane-bound ADAM molecule and a membrane-bound substrate molecule X are schematically drawn. (A) The substrate X is directly recognized by the HVR. (B) Substrate X is recognized by the HVR through an associated protein Y.

teins, and the interplay between their proteolytic and adhesive functions.

#### 4. Roles of DC domains in shedding by ADAMs

In the VAP1 structure, the HVR segment is present at the distal end of the C-shaped MDC-domain, and points toward the catalytic site of the M-domain. ADAMs have distinct HVR sequences, which result in distinct molecular surface features that could be involved in determining the specificity of binding counterparts. This raises the intriguing possibility that the HVR creates an exosite for binding substrate molecules [24] (Fig. 5). The D-domain is opposed to and apart from the M-domain catalytic site. Thus, it may function primarily as a scaffold that spatially coordinates two functional sites (the catalytic site and the exosite). Flexibility between the sub-segments may be important for fine-tuning substrate recognition and allow slight adjustments to the spatial alignment of the catalytic site and exosite during the catalytic cycle [25].

Although the model in which the HVR captures substrates directly (Fig. 5A), or via binding to an associated protein (Fig. 5B), is still hypothetical, the crystal structure of RVV-X and the substrate-docking model shed some light on this issue [26]. RVV-X is a member of the P-IV class of SVMPs, which consists of an MDC-containing heavy chain and two C-type lectin-like light chains (CLPs) [30,53] (Fig. 1). The RVV-X crystal structure revealed that the CLP portion of RVV-X forms a putative exosite for binding to substrate (coagulation factor X) on the one hand, and directly interacts with the HVR in the heavy chain on the other, consistent with the model in Fig. 5B. The RVV-X crystal structure is a good illustration of evolutionary gain of specificity of ADAMs, through HVR-mediated binding to other proteins to create an exosite for binding ligands.

The DC domain structure of ADAM10 revealed an acidic surface pocket, formed by the three glutamic acid residues in the C<sub>H</sub>-segment, that could serve as a binding site for the ephrin/Eph complex when ADAM10 cleaves ephrin-A2 *in trans* [27]. These three residues are not within the HVR, however, they face the catalytic site in the M-domain when the D<sub>2</sub>-segment of ADAM10 is superimposed with that of VAP1, because ADAM10 and VAP1 have different orientations between the C<sub>H</sub> and C<sub>H</sub>-segments [24]. The extensive molecular surface of the elongated DC domain arm of ADAMs could also provide protein-protein interaction sites, in addition to the HVR. The presence of multiple ligand-binding sites may help explain how the same ADAM can recognize multiple targets.

#### 5. Conclusion

Increasing evidences for a role of ADAMs as sheddases in important biological processes and in numerous disease conditions is rapidly accumulating. However, fundamental aspects of ADAM function such as how ADAMs select their substrates and how activity is regulated, remain to be elucidated. Crystallographic studies shed new light on the structures and functions of ADAM family proteins, revealing potentially novel protein-protein interaction sites, and providing intriguing data for the development of working hypotheses. Individual ADAMs shed a wide array of substrates that do not share common features for recognition by ADAMs. Therefore, a model in which the HVR directs substrate specificity by binding directly to substrates is not likely to be a general mechanism. Additional structural and biochemical studies of ADAM-substrate interactions are necessary to elucidate the molecular mechanism of target recognition, identify the key substrates of ADAMs during specific biological events, and importantly, to enable the design of selective inhibitors of this class of enzymes.

#### Acknowledgements

This work was supported in part by Grant-in-aid for Scientific Research B-19370047 from the Ministry of Education, Science, Sports and Culture, and Health and Labour Sciences Research Grants.

#### References

- [1] White JM, Bidges L, DeSimone DW, Tomczuk M, Wolfsberg TG. Introduction to the ADAM family. In: Hooper NM, Lendekel U, editors. The ADAM Family of Proteinases. Dordrecht, The Netherlands: Springer; 2005. p. 1–29.
- [2] Seals DF, Courtneidge SA. The ADAMs family of metalloproteinases: multidomain proteins with multiple functions. *Genes Dev* 2003;17(1):7–30.
- [3] Becherer JD, Blobel CP. Biochemical properties and functions of membrane-anchored metalloproteinase-disintegrin proteins (ADAMs). *Curr Top Dev Biol* 2003;54:101–23.
- [4] Moss ML, Jin SL, Milla ME, Bickert DM, Burkhart W, Carter HL, et al. Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor- $\alpha$ . *Nature* 1997;385(6618):733–6.
- [5] Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, Peschon JJ, Slack JL, Wolfson MF, et al. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- $\alpha$  from cells. *Nature* 1997;385(6618):729–33.
- [6] Blobel CP. ADAMs: key components in EGFR signalling and development. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005;6(1):32–43.
- [7] Prenzel N, Zwick E, Daub H, Leserer M, Abraham R, Wallasch C, et al. EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF. *Nature* 1999;402(6764):884–8.
- [8] Peschon JJ, Slack JL, Reddy P, Stocking KL, Sunnarborg SW, Lee DC, et al. An essential role for ectodomain shedding in mammalian development. *Science* 1998;282(5392):1281–4.
- [9] Moss ML, Bartsch JW. Therapeutic benefits from targeting of ADAM family members. *Biochemistry* 2004;43(23):7227–35.
- [10] Duffy MJ, Lynn DJ, Lloyd AT, O'Shea CM. The ADAMs family of proteins: from basic studies to potential clinical applications. *Thromb Haemost* 2003;89(4):622–31.
- [11] Mochizuki S, Okada Y. ADAMs in cancer cell proliferation and progression. *Cancer Sci* 2007;98(5):621–8.
- [12] Gomis-Ruth FX. Structural aspects of the metzincin clan of metalloendopeptidases. *Mol Biotechnol* 2003;24(2):157–202.
- [13] Bode W, Gomis-Ruth FX, Stockler W. Astacins, serralytins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the 'metzincins'. *FEBS Lett* 1993;331(1–2):134–40.
- [14] Kuno K, Kanada N, Nakashima E, Fujiki F, Ichimura F, Matsushima K. Molecular cloning of a gene encoding a new type of metalloproteinase-disintegrin family protein with thrombospondin motifs as an inflammation associated gene. *J Biol Chem* 1997;272(1):556–62.
- [15] Porter S, Clark IM, Revorkian L, Edwards DR. The ADAMs metalloproteinases. *Biochem J* 2005;386(Pt 1):15–27.
- [16] Blobel CP, Wolfsberg TG, Turck CW, Myles DG, Primakoff P, White JM. A potential fusion peptide and an integrin ligand domain in a protein active in sperm-egg fusion. *Nature* 1992;356(6366):248–52.
- [17] Cho C, Bunch DO, Faure JE, Goulding EH, Eddy EM, Primakoff P, et al. Fertilization defects in sperm from mice lacking fertilin beta. *Science* 1998;281(5384):1857–9.

- [18] Zolkiewska A. Disintegrin-like/cysteine-rich region of ADAM 12 is an active cell adhesion domain. *Exp Cell Res* 1999;252(2):423–31.
- [19] Gaultier A, Cousin H, Darribere T, Alfandari D. ADAM13 disintegrin and cysteine-rich domains bind to the second heparin-binding domain of fibronectin. *J Biol Chem* 2002;277(26):23336–44.
- [20] Iba K, Albrechtsen R, Gilpin B, Frohlich C, Loechel F, Zolkiewska A, et al. The cysteine-rich domain of human ADAM 12 supports cell adhesion through syndecans and triggers signaling events that lead to beta1 integrin-dependent cell spreading. *J Cell Biol* 2000;149(5):1143–56.
- [21] Zigrino P, Steiger J, Fox JW, Loffek S, Schild A, Nischt R, et al. Role of ADAM-9 disintegrin-cysteine-rich domains in human keratinocyte migration. *J Biol Chem* 2007;282(42):30785–93.
- [22] Reddy P, Slack JL, Davis R, Cerretti DP, Kozlosky CJ, Blanton RA, et al. Functional analysis of the domain structure of tumor necrosis factor-alpha converting enzyme. *J Biol Chem* 2000;275(19):14608–14.
- [23] Smith KM, Gaultier A, Cousin H, Alfandari D, White JM, DeSimone DW. The cysteine-rich domain regulates ADAM protease function in vivo. *J Cell Biol* 2002;159(5):893–902.
- [24] Takeda S, Igarashi T, Mori H, Araki S. Crystal structures of VAP1 reveal ADAMs' MDC domain architecture and its unique C-shaped scaffold. *EMBO J* 2006;25(11):2388–96.
- [25] Igarashi T, Araki S, Mori H, Takeda S. Crystal structures of catrocollastatin/VAP2B reveal a dynamic, modular architecture of ADAM/adamalysin/reprolysin family proteins. *FEBS Lett* 2007;581(13):2416–22.
- [26] Takeda S, Igarashi T, Mori H. Crystal structure of RVV-X: an example of evolutionary gain of specificity by ADAM proteinases. *FEBS Lett* 2007;581(30):5859–64.
- [27] Janes PW, Saha N, Barton WA, Kolev MV, Wimmer-Kleikamp SH, Nievergall E, et al. Adam Meets Eph: an ADAM substrate recognition module acts as a molecular switch for Ephrin cleavage in trans. *Cell* 2005;123(2):291–304.
- [28] Gerhardt S, Hassall G, Hawtin P, McCall E, Flavell L, Minshull C, et al. Crystal structures of human ADAMTS-1 reveal a conserved catalytic domain and a disintegrin-like domain with a fold homologous to cysteine-rich domains. *J Mol Biol* 2007;373(4):891–902.
- [29] Mosyak L, Georgiadis K, Shane T, Svenson K, Hebert T, McDonagh T, et al. Crystal structures of the two major aggrecan degrading enzymes, ADAMTS4 and ADAMTS5. *Protein Sci* 2008;17(1):16–21.
- [30] Fox JW, Serrano SM. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprolysin family of metalloproteinases. *Toxicon* 2005;45(8):969–85.
- [31] Takeda S. VAP1: snake venom homolog of mammalian ADAMs. In: Messerschmidt A (Ed.), *Handbook of Metalloproteins*. John Wiley & Sons, Inc.; 2008. doi:10.1002/047028637.met234.
- [32] Maskos K, Fernandez-Catalan C, Huber R, Bourenkov GP, Bartunik H, Ellestad GA, et al. Crystal structure of the catalytic domain of human tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(7):3408–12.
- [33] Orth P, Reichert P, Wang W, Prosser WW, Yarosh-Tomaine T, Hammond G, et al. Crystal structure of the catalytic domain of human ADAM33. *J Mol Biol* 2004;335(1):129–37.
- [34] Shieh HS, Mathis KJ, Williams JM, Hills RL, Wiese JF, Benson TE, et al. High resolution crystal structure of the catalytic domain of ADAMTS-5 (aggrecanase-2). *J Biol Chem* 2007.
- [35] Gomis-Ruth FX, Kress LF, Bode W. First structure of a snake venom metalloproteinase: a prototype for matrix metalloproteinases/collagenases. *EMBO J* 1993;12(11):4151–7.
- [36] Arribas J, Ruiz-Paz S. ADAM17: Regulation of ectodomain shedding. In: Hooper NM, Lendeckel U, editors. *The ADAM Family of Proteinases*. Dordrecht, The Netherlands: Springer; 2005. p. 171–97.
- [37] Gould RJ, Polokoff MA, Friedman PA, Huang TF, Holt JC, Cook JJ, et al. Disintegrins: a family of integrin inhibitory proteins from viper venoms. *Proc Soc Exp Biol Med* 1990;195(2):168–71.
- [38] Calvete JJ, Marcinkiewicz C, Monleon D, Esteve V, Celda B, Juarez P, et al. Snake venom disintegrins: evolution of structure and function. *Toxicon* 2005;45(8):1063–74.
- [39] Lu X, Lu D, Scully MF, Kakkar VV. Structure-activity relationship studies on ADAM protein-integrin interactions. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem* 2007;5(1):29–42.
- [40] Takagi J. Structural basis for ligand recognition by integrins. *Curr Opin Cell Biol* 2007;19(5):557–64.
- [41] Fujii Y, Okuda D, Fujimoto Z, Horii K, Morita T, Mizuno H. Crystal structure of trimetastatin, a disintegrin containing a cell adhesion recognition motif RGD. *J Mol Biol* 2003;332(5):1115–22.
- [42] Eto K, Huet C, Tarui T, Kupriyanov S, Liu HZ, Puzon-McLaughlin W, et al. Functional classification of ADAMs based on a conserved motif for binding to integrin alpha 9beta 1: implications for sperm-egg binding and other cell interactions. *J Biol Chem* 2002;277(20):17804–10.
- [43] Gao W, Anderson PJ, Sadler JE. Extensive contacts between ADAMTS13 exosites and von Willebrand factor domain A2 contribute to substrate specificity. *Blood* 2008.
- [44] Alfandari D, Cousin H, Gaultier A, Smith K, White JM, Darribere T, et al. Xenopus ADAM 13 is a metalloproteinase required for cranial neural crest-cell migration. *Curr Biol* 2001;11(12):918–30.
- [45] Usami Y, Fujimura Y, Miura S, Shima H, Yoshida E, Yoshioka A, et al. A 28 kDa-protein with disintegrin-like structure (jararhagin-C) purified from Bothrops jararaca venom inhibits collagen- and ADP-induced platelet aggregation. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;201(1):331–9.
- [46] Shimokawa K, Shannon JD, Jia LG, Fox JW. Sequence and biological activity of catrocollastatin-C: a disintegrin-like/cysteine-rich two-domain protein from *Crotalus atrox* venom. *Arch Biochem Biophys* 1997;343(1):35–43.
- [47] Jia LG, Wang XM, Shannon JD, Bjarnason JB, Fox JW. Inhibition of platelet aggregation by the recombinant cysteine-rich domain of the hemorrhagic snake venom metalloproteinase, atrolysin A. *Arch Biochem Biophys* 2000;373(1):281–6.
- [48] Serrano SM, Jia LG, Wang D, Shannon JD, Fox JW. Function of the cysteine-rich domain of the haemorrhagic metalloproteinase atrolysin A: targeting adhesion proteins collagen I and von Willebrand factor. *Biochem J* 2005;391(Pt 1):69–76.
- [49] Serrano SM, Wang D, Shannon JD, Pinto AF, Polanowska-Grabowska RK, Fox JW. Interaction of the cysteine-rich domain of snake venom metalloproteinases with the A1 domain of von Willebrand factor promotes site-specific proteolysis of von Willebrand factor and inhibition of von Willebrand factor-mediated platelet aggregation. *FEBS J* 2007;274(14):3611–21.
- [50] Serrano SM, Kim J, Wang D, Dragulev B, Shannon JD, Mann HH, et al. The cysteine-rich domain of snake venom metalloproteinases is a ligand for von Willebrand factor A domains: role in substrate targeting. *J Biol Chem* 2006;281(52):39746–56.
- [51] Pinto AF, Terra RM, Guimaraes JA, Fox JW. Mapping von Willebrand factor A domain binding sites on a snake venom metalloproteinase cysteine-rich domain. *Arch Biochem Biophys* 2007;457(1):41–6.
- [52] Kamiguti AS, Gallagher P, Marcinkiewicz C, Theakston RD, Zuzel M, Fox JW. Identification of sites in the cysteine-rich domain of the class P-III snake venom metalloproteinases responsible for inhibition of platelet function. *FEBS Lett* 2003;549(1–3):129–34.
- [53] Morita T. Structures and functions of snake venom CLPs (C-type lectin-like proteins) with anticoagulant-, procoagulant-, and platelet-modulating activities. *Toxicon* 2005;45(8):1099–114.



## 血管細胞の破壊毒素：明らかになった ADAM 型細胞表面プロテアーゼの構造\*

荒木 聡彦\*, 五十嵐 智子\*\*, 武田 壮一\*\*

### 1. はじめに

細胞と外界とのシグナルのやりとりは、多細胞生物である人間にとって、細胞間のシグナル伝達や、細胞と体液・間質との間のシグナル伝達などを含め、生物を成り立たせるための源であり、生物活動のための源でもある。細胞が外界とシグナルをやりとりする時には、シグナル分子タンパク質などの細胞表面のタンパク質が互いに結合、修飾、切断し合うことによって、シグナルの状態を確定し情報伝達する。この中で、細胞表面のタンパク質切断による情報伝達は、広く起こっているにもかかわらず、まだまだよく分かっていない分野である。しかし、生物で重要なシグナル伝達の分野であることに加え、アルツハイマー病やぜんそくなど様々な

病態への関与も明らかになりつつあり、医学的な重要性から非常にホットに研究が進められている<sup>1,2)</sup>。出血性ヘビ毒素も、細胞表面タンパク質切断酵素の一種である<sup>3)</sup>。今まで、細胞膜上にあるこれらの酵素は研究が難しかったが、ヘビ出血毒素を用いることで最近いくつかの研究の進展があった。マムシ、ハブ、ガラガラヘビなどの代表的な多くのヘビ毒が出血毒なのであるが、このような毒素がどのようにして出血に至らしめるかは実は全く未知である。それは一般的な細胞表面タンパク質分解機構とそれに伴うシグナル伝達の仕組みそのものが、そもそもまだまだあまり解っていないからである。ヘビ出血毒素による出血機構解明とともに細胞表面タンパク質の分解機構の解明が進むことによって、多くの細胞間シグナル伝達が関与する生物のしくみが飛躍的に明らかになるかもしれない。そこで今回進展があった ADAM 型の細胞表面タンパク質分解酵素について概説する。

### 2. 全く解っていない表面タンパク質切断機構

細胞膜上にあるシグナル受容タンパク質や接着タンパク質の切断や除去をになう細胞膜プロテアーゼは、細胞膜上のシグナル伝達制御に欠かすことができない。現在、ヒトを含め多くの

\* The crystal structure of the hemorrhagic snake venom toxin reveals the molecular architecture of the ADAM family cell-surface proteinases.

\*\* Satohiko ARAKI 名古屋大学大学院理学研究科附属臨海実験所  
Sugashima Marin Biological Laboratory, Graduate School of Science, Nagoya University  
(〒517-0004 三重県鳥羽市菅島町429-63)

\*\* Tomoko IGARASHI and Soichi TAKEDA 国立循環器病センター研究所心臓生理部  
Department of Cardiac Physiology, National Cardiovascular Center Research Institute  
(〒565-8565 大阪府吹田市藤白台 5-7-1)

Key words: Cell surface proteolysis, ADAM proteinase, snake venom toxin, apoptosis, vascular endothelial cell

生物において、そのような細胞膜タンパク質を切断するプロテアーゼとして、フリリン様プロテアーゼ、ADAM型プロテアーゼ、ガンマセクレターゼなどが知られている<sup>4)</sup>。中でもとくにADAM型プロテアーゼは、その活動がシグナル伝達過程に伴って起き、細胞表面で最初にかかる切断であることから(図1)、切断を伴うシグナル伝達機構解明に必須であると思われるが、どのように制御されており、どのように標的を認識するのか、全く解っていない<sup>5)</sup>。その理由の一つに、ADAM型プロテアーゼはジスルフィド結合を多く含み細胞外タンパク質独特の構築原理を持っているため大腸菌等によるリコンビナントタンパク質の合成が難しく、研究がしにくいことが挙げられる。そこで唯一、天然活性を持って大量に得て研究することのできるADAM型プロテアーゼが、ヒト分子も含めた多くのADAMの中で、出血性ヘビのADAM型毒素なのである。

### 3. ヘビ毒素による血管内皮細胞の破壊

#### 3.1 出血性ヘビ毒素

ヘビ毒液に含まれる多様な毒素は、細胞膜表面の種々の分子に作用し、細胞の機能を阻害・制御することが知られている<sup>6)</sup>。ヘビ毒はその特異性から、細胞膜機能や細胞膜分子の研究に大きな貢献をしてきた。コブラ毒などに含まれる神経作用ヘビ毒素は細胞膜イオンチャンネルに作用することからこれを用いてイオン輸送の研究が進んできた。他方、ガラガラヘビ毒、マムシ毒、ハブ毒などは出血性ヘビ毒であり、出血毒素や、止血阻害毒素を多く含有している。以前より止血阻害毒素の方は、血小板凝集レセプターや凝固因子(フィブリノーゲンなど)に作用することから血液凝固の研究や臨床に用いられてきた<sup>7)</sup>(図2)。一方、出血毒のほうは、あまり研究が進んでおらず、ADAM型プロテ

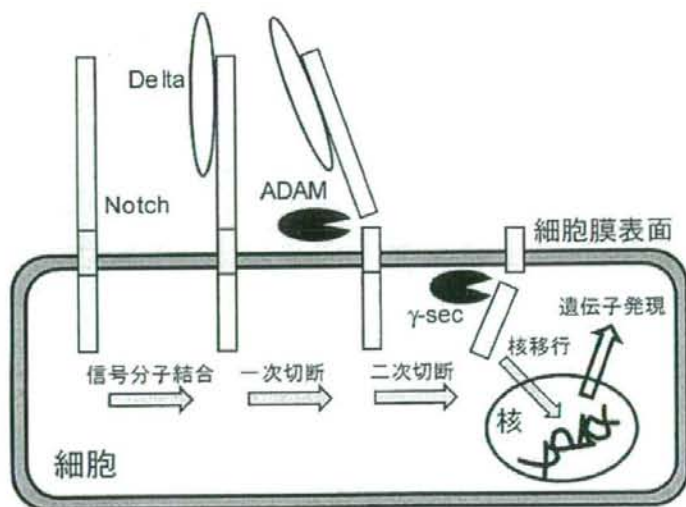


図1 細胞表面タンパク質の切断とシグナル伝達

細胞表面シグナル分子である Notch は、細胞シグナル分子 Delta と結合すると、ADAM による一次切断、 $\gamma$ セクレターゼによる二次切断の順に切断され、細胞内部分が核に移行して遺伝子発現を誘導する。同様に他の多くの細胞表面分子はシグナルに際して切断を受け、情報伝達に関与する。

ーゼであることが解っている程度で、その標的も、制御機構も現在解っていない。

### 3.2 出血毒素の標的

出血毒素の標的については、ADAM型プロテアーゼがメタロプロテアーゼの仲間であるため、コラーゲンを分解できる仲間も多いことから、血管の基底膜を構成するコラーゲンを標的としてこれを分解することが出血に至る主因ではないかとも考えられているが、いまだに確証は得られていない(図2)。また、コラーゲン分解が目標なら、なぜコラーゲン分解酵素であるマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)型ではなく、細胞表面タンパク質分解酵素のADAM型であるのかも不思議で、議論になっている<sup>9)</sup>。確証が得られないのは、多くの出血プロテアーゼは一度に色々なタンパク質を切る能力を持っ

ており特異性が低いため、主因の標的が特定しづらいということにも因る。その中で、VAPIという出血毒素は、基質特異性が高く、他の出血毒素が分解する多くのタンパク質を分解しないため、副作用が少なく出血の標的研究に用いやすい<sup>9), 10)</sup>。興味深いことは、VAPIはコラーゲン分解活性がないのに出血活性があることである。

### 3.3 アポトーシス誘導毒素

VAPIを含むVAP(Vascular Apoptosis-Inducing Protein)ファミリーの毒素は、アポトーシス誘導毒素として見出されたもので、血管内皮細胞に強力なアポトーシス(能動的細胞死)を引き起こす性質をもっている<sup>9)</sup>(図3)。言い換えれば、これらの毒素は、血管内皮細胞に対して自殺のスイッチを外から起動させて、血管細胞を殺す

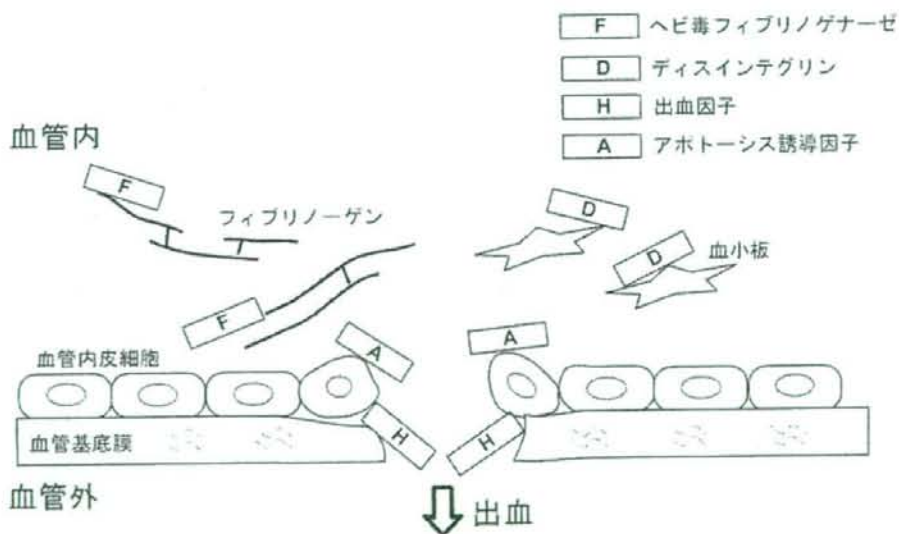


図2 ヘビ毒素群と出血機構のモデル図

ヘビ毒は複数の毒素から構成されており、止血障害毒素としては、ヘビ毒フィブリノゲナーゼがフィブリノゲンを無力化したり、ディスインテグリンが血小板レセプターを阻害したりして血液凝固による止血を障害する。出血性プロテアーゼなどの出血毒素の標的はまだあまり分かっておらず、基底膜コラーゲンや血管内皮細胞などが候補として上がっている。

ことができる。これらは、繊維芽細胞や平滑筋細胞などは殺さず血管内皮細胞を殺す特異性を持っている。またこのような毒素が引き起こすアポトーシスは非常に特徴的で、他のアポトーシスよりも強く細胞を粉々に分裂させる特徴(細胞断片化作用)をもっている<sup>11), 12)</sup>(図3C, E)。

### 3.4 ヘビ毒素による強い細胞断片化

細胞断片化は、細胞膜表面が胞子状に突出してつぶつぶを作り、最後には細胞全体が葡萄状になって粉々に分裂するものである。この作用はアポトーシスの実行因子である細胞内プロテアーゼ(カスパーゼ)に依存的で、カスパーゼを阻害すると毒素による細胞死は起こるものの強い細胞断片化は起こらない<sup>11)</sup>(図3D)。したがって強い細胞断片化はヘビ毒プロテアーゼによる直接分解によるものではなく、ヘビ毒の引き起こすアポトーシスシグナルがカスパーゼ

を活性化することによって生じるものであり、特別なアポトーシスの一形態であると考えられる。このヘビ毒素は、このような特異な現象を血管細胞に引き起こす、シグナル誘導タンパク質であると言える。この特異なシグナル誘導タンパク質はといったいどのようにして、細胞に働きかけるのだろうか。この毒素タンパク質の構造が、そのヒントを与えてくれると考えられるが、この毒素は ADAM 型といわれるドメイン構造を持っている<sup>13), 14)</sup>。

## 4. ADAM 型プロテアーゼ

### 4.1 ADAM

ADAM 型プロテアーゼの「ADAM」とは A Disintegrin And Metalloprotease の頭文字をとったもので、「ディスインテグリンドメインとメタ

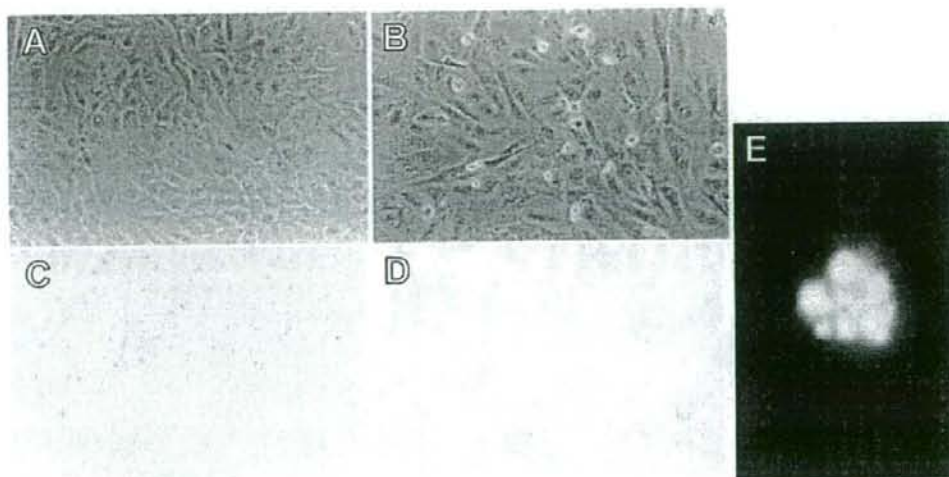


図3 血管細胞アポトーシス誘導毒素 VAPI による細胞死

A は通常の培養血管内皮細胞。血清除去などによる血管細胞死(B)は細胞が丸い状態になり、あまり細胞断片化は起こらないが、VAPIによる細胞死(C, E)は強い細胞断片化が起こる。この断片化はカスパーゼ阻害剤によって阻止され、その結果Bと似た形態の細胞死が生じる(D)。(A~D: 位相差顕微鏡像(×100), E: 核染色による蛍光顕微鏡像(×400))

ロプロテアーゼドメインを持ったタンパク質ファミリー」のことを指している<sup>13)</sup>。ADAMファミリーは、ヒトでは24種類のADAMがある。しかし、それぞれがどのような標的を切断するのか、どのような機能を担っているのかはよく分かっていない<sup>9)</sup>。ADAMタンパク質は、ヒトにおいて多くの病気との関係が研究されている。ADAM33はぜんそくの関連遺伝子と推定され、ADAM12は心臓疾患に関与するが、どのような関わりで関わるのか詳細は分かっていない<sup>14)</sup>。

アミノ酸配列から推定される構造は図のように、メタロプロテアーゼドメイン、ディスインテグリンドメイン、システインリッチドメインが順に並んでいる(図4)。ディスインテグリンドメインとは、細胞接着因子であるインテグリンを阻害するヘビ毒素であるディスインテグリンに由来している(図4)。ADAMというネーミングはしたがって、「インテグリン阻害タンパク質に似たドメインを持つメタロプロテアーゼ」

という意味合いになっている。そこでADAMが、本当にディスインテグリンと同様なインテグリン結合活性および結合様式をもつのかどうか、興味もたれていた。

システインリッチドメインは名前の通りシステイン残基を多く含み、これらはほとんどジスルフィド結合の形成に寄与していると考えられるが、機知のアミノ酸配列との相同性が無く、どのような機能をするかよく分かっていない。

#### 4.2 ADAMの4つの謎

細胞表面タンパク質切断酵素ADAMは、まず①標的認識機構が分からない。別の表面タンパク質切断酵素であるフリンは、標的タンパク質中の連続した塩基性アミノ酸部位を認識してその近傍を切断する。しかし、ADAMは、標的タンパク質群に共通したアミノ酸配列などが見つからない。どのような基準で標的を選んでいるのかが分からないのである<sup>9)</sup>。第二に②活

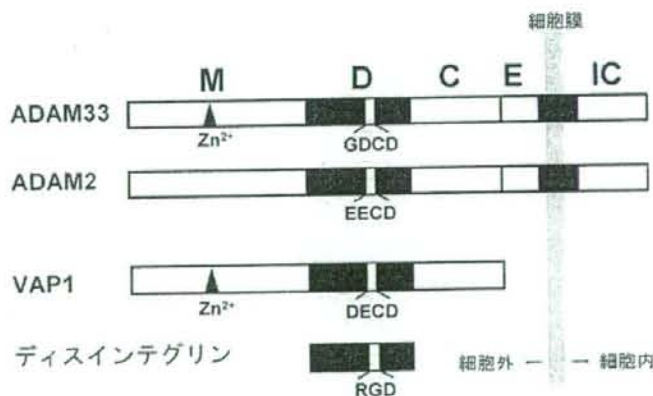


図4 ADAMの一次構造

ADAMファミリーはメタロプロテアーゼ(M)ドメイン、ディスインテグリン(D)ドメイン、システインリッチ(C)ドメインの基本構造を持ち、細胞膜結合型はその後EGF(E)ドメイン、細胞膜貫通領域、細胞内(IC)ドメインを持っている。Mドメインには亜鉛結合によるプロテアーゼ活性を持つものと持たないものがある。ディスインテグリンは細胞接着タンパク質であるインテグリンに結合しうるRGD配列を有する。ADAMはディスインテグリンに類似のDドメインを持つが、RGDとは異なるアミノ酸配列をもつ。この異なる配列を持つADAMのディスインテグリンループ部が、インテグリン類に直接結合するかどうか興味もたれていた。

性化機構が分からない。フリンは、細胞表面に出てきた候補タンパク質を全て分解するため、主にタンパク質を最終形に成熟させるためのタンパク質分解に用いられると考えられている。それに対し ADAM は細胞シグナルが働いたときや細胞刺激が与えられたときにタンパク質分解を引き起こすと考えられているが、どのような機序で切断が引き起こされるのか、制御方式が分からないのである (図 1)。さらに第三に、③ ADAM のうちの半数は活性部位のアミノ酸が置換しているためプロテアーゼ活性を原理的に持たないのに、形だけメタロプロテアーゼの形を持っている (図 4, ADAM2)。この、活性を持たないメタロプロテアーゼ様構造が何の役に立っているかが分からないのである。そして第 4 に、④ ADAM のディスインテグリンループ (ADAM ではさまざまな配列を持つ: GDCC や

DECD など (図 3)) が、ディスインテグリンの RGD 配列のようにインテグリンを標的として結合するのかなど、であり、そしてそれが ADAM の主標的や副標的のかなど、という点である。

## 5. 明らかになった ADAM の基本構造

### 5.1 VAP1 の構造

このような細胞表面タンパク質分解酵素 ADAM がどのように基質を見分け切断するかを解明するために、ガラガラヘビ由来アボトシス毒素 VAP1 を用いて X 線結晶解析をし、ADAM の立体構造を初めて解明することができた<sup>16,17)</sup>。

VAP1 の構造は図 4 のようになっていた。VAP1 は 2 量体であるが、これは 1 量体部分を表

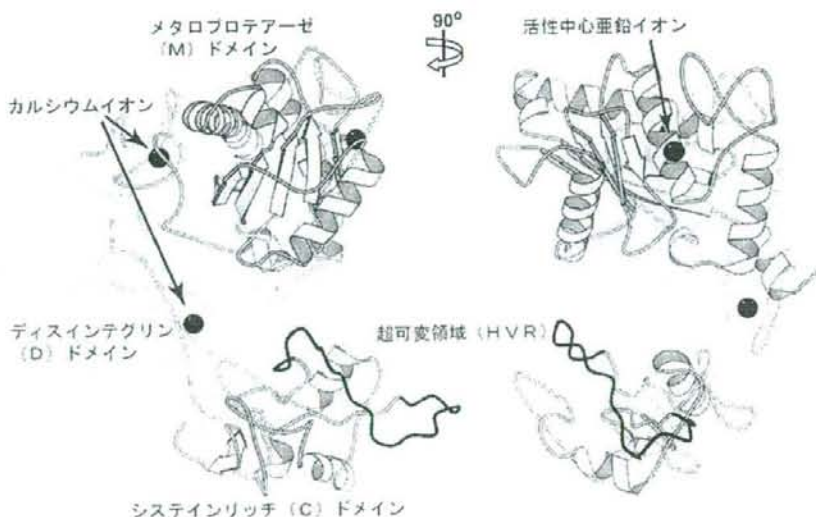


図 5 VAP1 の立体構造

ADAM の基本骨格構造が VAP1 の結晶解析によって初めて解かれた。右は 90° 横から見た図。メタロプロテアーゼドメイン、ディスインテグリンドメイン、システインリッチドメインはアルファベットの C 型の配置をしている。C 型のアーム部分である D ドメインはカルシウムイオンと多数のジスルフィド結合によって堅い構造になっている。濃線の超可変領域 (HVR) は、プロテアーゼ活性中心である亜鉛イオン部と相対している。

している。また他の1量体ADAM型毒素VAP2も同様な構造をしていることが分かった<sup>18)</sup>。VAPIはADAMの基本構造であるメタロプロテアーゼドメイン(M)、ディスインテグリンドメイン(D)、システインリッチドメイン(C)から成っており、図のようにMDC各ドメインがアルファベットのC型に湾曲した配置をとる構造をしていた。

C末端はC・Dドメインの境界にあり、ADAMにおいては細胞膜に連結している箇所である。ここを基準にすると、C型構造の構造の両末端は、一つはDドメインを経由してメタロプロテアーゼの $Zn^{2+}$ を配位した触媒活性中心であり、もう一方はCドメインの頂点の超可変領域(HVR)と記した部分(図5濃線)になる。この時、プロテアーゼ活性中心亜鉛イオン( $Zn^{2+}$ )部とHVRは対面した形となる。このHVR部は、

各ADAMを比較してアミノ酸配列の保存性が低く、また、長さや予測される立体構造においてもバリエーションが特別に高い部分であることから、超可変領域(Hyper Variable Region: HVR)と名付けた。各ADAMを特徴付けるHVRと、切断活性部分が対面していることは、切断標的の選択に寄与していることを強く示唆している。

## 5.2 ディスインテグリンループ

ディスインテグリンドメインは、ディスインテグリン単体分子とは違って、2個の $Ca^{2+}$ を配位して堅いアーム構造を作っており、ADAM全体のC型構造の支柱を成している(図5)。ディスインテグリン単体分子では、先端のディスインテグリンループにあるアミノ酸配列RGD(図6トリメスタチンの濃線)が細胞接着分子インテ

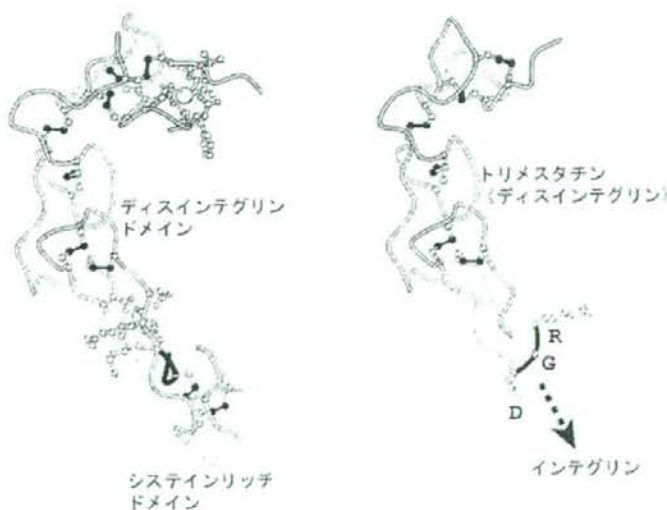


図6 ディスインテグリンドメイン  
ADAMのディスインテグリンドメインは、既に立体構造が判明していたディスインテグリン単体分子(トリメスタチンなど)を内包する形になっている。しかし、濃線のディスインテグリンループは、ADAMではシステインリッチドメインに埋め込まれ、インテグリン結合には寄与できない。

グリンに結合する部位である。これに対し ADAM のディスインテグリンドメインは RGDCD や DECD など異なる配列を持つ。しかし、この部分のペプチドのみを合成するとインテグリンと結合可能であることなどから、やはりインテグリンとの結合部位ではないかと期待されていた<sup>9)</sup>。しかし今回明らかにされた立体構造では、ADAM のディスインテグリンループ (図 6 ディスインテグリンドメインの濃線の部分) は C ドメインを配置するのに用いられており、タンパク質表面に露出していないため、残念ながら標的分子への結合には関与しないことが示唆された。

### 5.3 ADAM ファミリーの各分子の構造比較

ぜんそくや心臓疾患に関与するとされた ADAM33 や ADAM12 も含め、今回の立体構造解明で明らかになった構造的に重要な部分の配列は、全ての ADAM ファミリー分子間で一致していた。したがって、他の ADAM も、今回明らかになった VAPI の構造と同じ構築原理を有していると考えられる。このことはプロテアーゼ活性配列を失っている半数の ADAM についても同様で、ディスインテグリンアームの Ca 配位を始めとして構造は全く等しいと考えられた。ADAM でそれぞれ違っている部分は、Zn 結合部近くの触媒部付近が少し異なること以外は、超可変領域 HVR の部分だけであった。そしてこのバリエーションが特別に高い HVR 部位が ADAM 構造の C 型構造先端にあることから、各 ADAM の役割の違いを最も決定付けるものは、そこに結合する分子によってなされていると考えられた。

### 5.4 表面タンパク質切断のしくみへ

立体構造が分かったことで、いくつかの ADAM の謎の間から、表面タンパク質切断のしくみ解明へ近づくことができた。① ADAM 標

的については、ADAM ファミリーの中で各 ADAM を特徴付ける部分が、突出部位である HVR であることが分かったため、ここに結合するものが切断を受ける標的か標的選択に重要な分子であることが予想された (図 7)。② 活性化機構については、HVR が標的選択に関するものであれば、その結合分子が各 ADAM の活性化に関与するであろう。また、特徴的な構造であることから、C 型湾曲構造も活性化に関与しそうなことが伺われる。③ メタロプロテアーゼ活性を持たない ADAM は、成熟の過程で M ドメイン・D ドメインが切り出されることも多い<sup>9)</sup>。したがって M、D を失ったあと、立体構造の頂点である HVR 部位が、特定蛋白質結合のレセプターとして機能を発揮することが予想された。

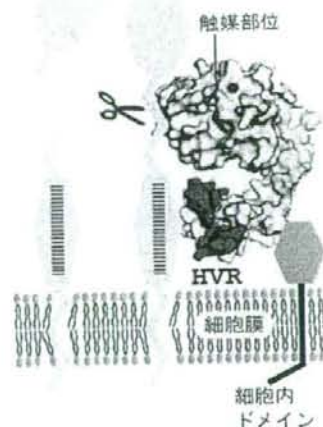


図 7 ADAM による表面タンパク質切断モデル  
今回判明した ADAM の基本構造から、ADAM は細胞表面においてこのモデルのような分子形態で細胞膜上に存在していると考えられる。各 ADAM の違いは超可変領域 (HVR) であることから、ここに結合する分子によって、切断をする標的が選別される可能性が強く示唆される。



しかし、だとしても、なぜ不活性の M ドメイン・D ドメインが未成熟の ADAM に必要なかは分からない。特徴的な湾曲構造全体が成熟の過程に必要な可能性が考えられる。④従来関与が期待されていた ADAM のディスインテグリンループは、タンパク質表面に無いため、標的結合には関与しないことが強く示唆された。しかし、このディスインテグリンドメイン全体のアーム構造は、特徴的な C 型構造の支柱部分を形成しており、活性化に重要な役割を果たすことが期待される。

## 6. おわりに

今回、出血毒素 VAPI の立体構造が解明されることによって、細胞表面タンパク質切断酵素 ADAM ファミリー全体の基本構造が明らかになった。今後、HVR の標的分子などが見つけ出されることによって、出血機構のみならず、一般的な表面タンパク質切断のしくみが徐々に明らかにされていくことが期待される。それらは、ぜんそくやアルツハイマー病などのしくみの解明などにつながり、また細胞表面のしくみの解明から生物への理解と応用が一段と進むかもしれない。

生命科学の領域はタンパク 3000 プロジェクトに代表される網羅的タンパク質構造解析の著しい進展により新たな局面を迎えている。すなわち、さまざまな生命現象にかかわる高分子の立体構造と機能の相関が当たり前のように原子レベルの分解能で議論できる時代になってきた。本稿はその一例でもある。タンパク質の立体構造の知見が基礎生物学・医学領域への貢献に留まらず、今後は材料化学など異分野との融合によりさまざまな境界領域のサイエンスを生み出していく可能性が期待される。

## 参考文献

- 1) P. Van Eerdewegh, R. D. Little, J. Dupuis, R. G. Del Mastro, K. Falls, J. Simon, D. Torrey, S. Pandit, J. McKenny, K. Braunschweiger, A. Walsh, Z. Liu, B. Hayward, C. Folz, S. P. Manng, A. Bawa, L. Saracino, M. Thackston, Y. Benchekroun, N. Capparell, M. Wang, R. Adair, Y. Feng, J. Dubois, M. G. FitzGerald, H. Huang, R. Gibson, K. M. Allen, A. Pedan, M. R. Danzig, S. P. Umland, R. W. Egan, F. M. Cuss, S. Rorke, J. B. Clough, J. W. Holloway, S. T. Holgate and T. P. Keith, Association of the ADAM33 gene with asthma and bronchial hyperresponsiveness, *Nature*, **418**, 426-430 (2002).
- 2) T. M. Allinson, E. T. Parkin, A. J. Turner and N. M. Hooper, ADAMs family members as amyloid precursor protein alpha-secretases, *J. Neurosci. Res.*, **74**, 342-352 (2003).
- 3) L. A. Hite, L. G. Jia, J. B. Bjarnason and J. W. Fox, cDNA sequences for four snake venom metalloproteinases: structure, classification, and their relationship to mammalian reproductive proteins, *Arch. Biochem. Biophys.*, **308**, 182-191 (1994).
- 4) M. E. Carlson and I. M. Conboy, Regulating the Notch pathway in embryonic, adult and old stem cells, *Curr. Opin. Pharmacol.*, **7**, 303-309 (2007).
- 5) S. Mochizuki and Y. Okada, ADAMs in cancer cell proliferation and progression, *Cancer. Sci.*, **98**, 621-628, (2007).
- 6) Q. Lu, J. M. Clemetson and K. J. Clemetson, Snake venoms and hemostasis, *J. Thromb. Haemost.*, **3**, 1791-1799 (2005).
- 7) J. White, Snake venoms and coagulopathy, *Toxicon*, **45**, 951-967 (2005).
- 8) J. W. Fox and S. M. Serrano, Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprolysin family of metalloproteinases, *Toxicon*, **45**, 969-985 (2005).

- 9) S. Araki, T. Ishida, T. Yamamoto, K. Kaji and H. Hayashi, Induction of apoptosis by hemorrhagic snake venom in vascular endothelial cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **190**, 148-153 (1993).
- 10) S. Araki, S. Masuda, H. Maeda, J. Y. Miao and H. Hayashi, Involvement of specific integrins in apoptosis induced by vascular apoptosis-inducing protein 1, *Toxicon*, **40**, 535-42 (2002).
- 11) J. Maruyama, H. Hayashi, J. Y. Miao, H. Sawada and S. Araki, Severe cell fragmentation in the endothelial cell apoptosis induced by snake apoptosis toxin VAP1 is an apoptotic characteristic controlled by caspases, *Toxicon*, **46**, 1-6 (2005).
- 12) S. Araki, Y. Shimada, K. Kaji and H. Hayashi, Apoptosis of vascular endothelial cells by fibroblast growth factor deprivation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **168**, 1194-1200 (1990).
- 13) S. Masuda, T. Ohta, K. Kaji, J. W. Fox, H. Hayashi and S. Araki, cDNA cloning and characterization of vascular apoptosis-inducing protein 1, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **278**, 197-204 (2000).
- 14) S. Masuda, H. Hayashi, H. Atoda, T. Morita and S. Araki, Purification, cDNA cloning and characterization of the vascular apoptosis-inducing protein, HV1, from *Trimeresurus flavoviridis*, *Eur. J. Biochem.*, **268**, 3339-3345 (2001).
- 15) T. G. Wolfsberg, P. Primakoff, D. G. Myles and J. M. White, ADAM, a novel family of membrane proteins containing A Disintegrin And Metalloprotease domain : multipotential functions in cell-cell and cell-matrix interactions, *J. Cell Biol.*, **131**, 275-278 (1995).
- 16) T. Igarashi, Y. Oishi, S. Araki, H. Mori and S. Takeda, Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of the two vascular apoptosis-inducing proteins (VAPs) from *Crotalus atrox* venom, *Acta Cryst. F*, **62**, 688-691 (2006).
- 17) S. Takeda, T. Igarashi, H. Mori and S. Araki, Crystal structures of VAP1 reveal ADAMs' MDC domain architecture and its unique C-shaped scaffold, *EMBO J*, **25**, 2388-2396 (2006).
- 18) T. Igarashi, S. Araki, H. Mori and S. Takeda, Crystal structures of catrocollastatin/VAP2B reveal a dynamic, modular architecture of ADAM/adamalysin/reprolysin family proteins, *FEBS Lett.*, **581**, 2416-2422 (2007).