

platforms for endocytosis and signaling.²¹ The caveolae-mediated pathway is prominent and ubiquitous endocytic mechanisms in vascular endothelial cells.⁸ Figure 3c and d show fluorescence images of HAECs that incorporated fluorescein-labeled polysiloxane nanoparticles (green) and were immunostained for caveolin-1 (primary antibody against caveolin-1, TRITC-labeled secondary antibody against rabbit; red), which comprises the caveolae. Fluorescence image taken at 3 h of incubation time (Figure 3c) demonstrates that some of the green emissions from nanoparticles (left image in Figure 3c) are overlapped with red emissions from caveolin-1 (middle image in Figure 3c) to make yellow area (right image in Figure 3c). The yellow overlaps suggest that nanoparticles are localized at the caveolae. At 24 h of incubation time, nanoparticles (left image in Figure 3d) were localized as ring-like patterns of overlapped area around nucleuses of HAECs (right image in Figure 3d). This indicates that the nanoparticles of Flu-Am-PAPS were trapped into caveolae in plasma membrane and transported into cytosol of HAECs by 24 h of incubation. The peri-nuclear localization of the nanoparticles (Figure 3f) was also observed when HAECs were exposed to the nanoparticles for 6 h (Figure 3e) and incubated for 18 h after the medium containing nanoparticles was changed to growth medium containing no nanoparticles. The fluorescence imaging data indicate the following process for the uptake of the nanoparticles: (i) the nanoparticles are trapped at caveolae in plasma membrane, (ii) the nanoparticles are internalized into cytosol, and (iii) the nanoparticles are localized at peri-nuclear region. Furthermore, internalization of the nanoparticles into the cytosol of HAECs was confirmed by confocal laser scanning microscopy. The X-Y plane images of HAECs were taken as optical slices with 0.2 μm thick along Z-axis by confocal laser scanning microscope. Figure 4a shows fluorescence intensity profiles of Flu-Am-PAPS along the Z-direction in HAECs. The intensity profiles were obtained by integrating the brightness at each pixel over the whole area of each image, normalizing the intensity to the intensity at basal position ($Z = 0 \mu\text{m}$) and plotting the normalized intensity as a function of depth in a cell. The intensity maximum was confirmed in each profile (arrow heads in the graph) and indicates the spatio and temporal position of the nanoparticles in HAECs. Although each profile has two maxima at $Z = 0 \mu\text{m}$ and at other position in Z-axis respectively, the intensity maximum that we are discussing here is located above the basal level. The position of the intensity maximum shifted gradually from the apical side ($Z = 3 \mu\text{m}$) to the basal side ($Z = 0-1 \mu\text{m}$) of HAECs; $Z = 2.4-2.6 \mu\text{m}$ at 1 h, $Z = 1.1-1.9 \mu\text{m}$ at 3 h, $Z = 0.5-1.6 \mu\text{m}$ at 6 h, and $Z = 0.4-1.2 \mu\text{m}$ at 24 h. Thus, the peak shift clearly shows that the nanoparticles were trapped at the plasma membrane and internalized into the cytosol of HAECs.

The nanoparticles of the amphiphilic polysiloxane can fit into caveolae in the plasma membrane of HAECs, because the histogram of the particle size (Figure 2 (a)) for the nanoparticles of Flu-Am-PAPS indicates that at least 48% of the total population of the nanoparticles have diameters in the range of 10–100 nm, that is comparable to the dimension of caveolae (50–100 nm in both opening diameter and depth). Fluorescence microscope observation demonstrated the colocalization of the nanoparticles and caveolae (Figure 3c and d). To specify the endocytic pathway for the uptake of the nanoparticles we attempted to observe caveolae in HAECs by TEM. Specimens for TEM were prepared by the methods described in the materials and methods after HAECs were incubated with nanoparticles of gold nanoparticle labeled Am-PAPS (Au-Am-

PAPS) or Flu-Am-PAPS at 37 °C for 3 h. The nanoparticles (Flu-Am-PAPS) uptaken by HAECs were detected by immunolabeling using anti-fluorescein IgG as a primary antibody and a secondary antibody attached to a gold nanoparticle (diameter: 5 nm). Here we observed TEM specimens by following the two different methods: conventional ultrathin section and rapid-freeze deep-etch immunoreplication.²² The ultrathin section image (Figure 4b) shows that caveolae (round-shape structures with diameters of about 100 nm: indicated by a square in Figure 4b) are incorporated into cytosol and that dark dots (5–10 nm in diameter) of gold nanoparticles attached to polysiloxane are confirmed in the inner perimeter of caveolae vesicles (indicated by arrows in the inset of Figure 4b). Figure 4c shows the ultrathin section image of cytosol of the intact HAECs (not treated with the nanoparticles of Au-Am-PAPS), showing caveolae in cytosol of HAECs. Caveolae in cytosol of HAECs were detected by immunostaining of caveolin-1 using rabbit anti-caveolin-1 IgG and gold nanoparticles (10 nm of diameter) conjugated anti-rabbit IgG. Gold nanoparticles with 10 nm of diameter were specifically accumulated around the outer perimeter of round-shape structures with diameters of about 100 nm (Figure 4c). The result of immunodetection of caveolae indicates that the round shape structures in cytosol of HAECs are caveolae and provides an evidence that nanoparticles of Au-Am-PAPS are trapped in caveolae. Thus, the ultrathin section image of HAECs indicates that the nanoparticles of Au-Am-PAPS are trapped in caveolae at the plasma membrane of HAECs and are internalized into cytosol of HAECs. In addition to the nanoparticles trapped in caveolae, dark spots with a diameter of 5–10 nm (surrounded by circle in Figure 4b) were confirmed in cytosol of HAECs (Figure 4b). These spots are assigned to gold nanoparticles attached to amphiphilic polysiloxane (Au-Am-PAPS). The different localization of polysiloxane nanoparticles in cytosol of HAECs suggests that there are at least two different pathways in the cellular uptake of polysiloxane nanoparticles: caveolae and the other pathways, including clathrin-coated pits and macropinocytosis. Furthermore, we observed the undercoat structure on the cytoplasmic surface of the upper cell membrane using rapid-freeze deep-etch immunoreplication so as to obtain a detailed view of the cellular uptake of the nanoparticles via caveolae as main endocytic pathways for the uptake of polysiloxane nanoparticles. Fine structures of plasma membrane such as filamentous netlike structure of actin filaments, clathrin coated pits, and caveolae can be preserved by rapid freezing at the cooling speed of 10⁵ °C/sec in specimen preparation. The extreme cooling speed does not cause any ice nucleation that can damage the organized structure of the membrane skeleton. In a recent study by Morone and Kusumi,²² they applied the rapid-freeze replication method to the electron microscopy observation of the membrane skeleton and succeeded in viewing the fine structure of the membrane skeleton with nanometer scale resolution and demonstrating that the membrane skeleton mesh corresponds to the membrane compartment model that was suggested by the study of the diffusion of membrane molecules. Figure 4d and e are TEM images of the undercoat structure of the bottom cell membrane of HAECs before and after the exposure to the nanoparticles of Flu-Am-PAPS. The images were taken using a specimen that was processed by the rapid-freeze and deep-etch method. Caveolae (the characteristic striated round structures: 50–100 nm in diameter), clathrin-coated pits (the characteristic basket-like structures: 100–200 nm in diameter), and actin filaments were confirmed in the upper cell membrane of the intact HAECs (Figure 4d). The nanoparticles of Flu-Am-PAPS endocytosed

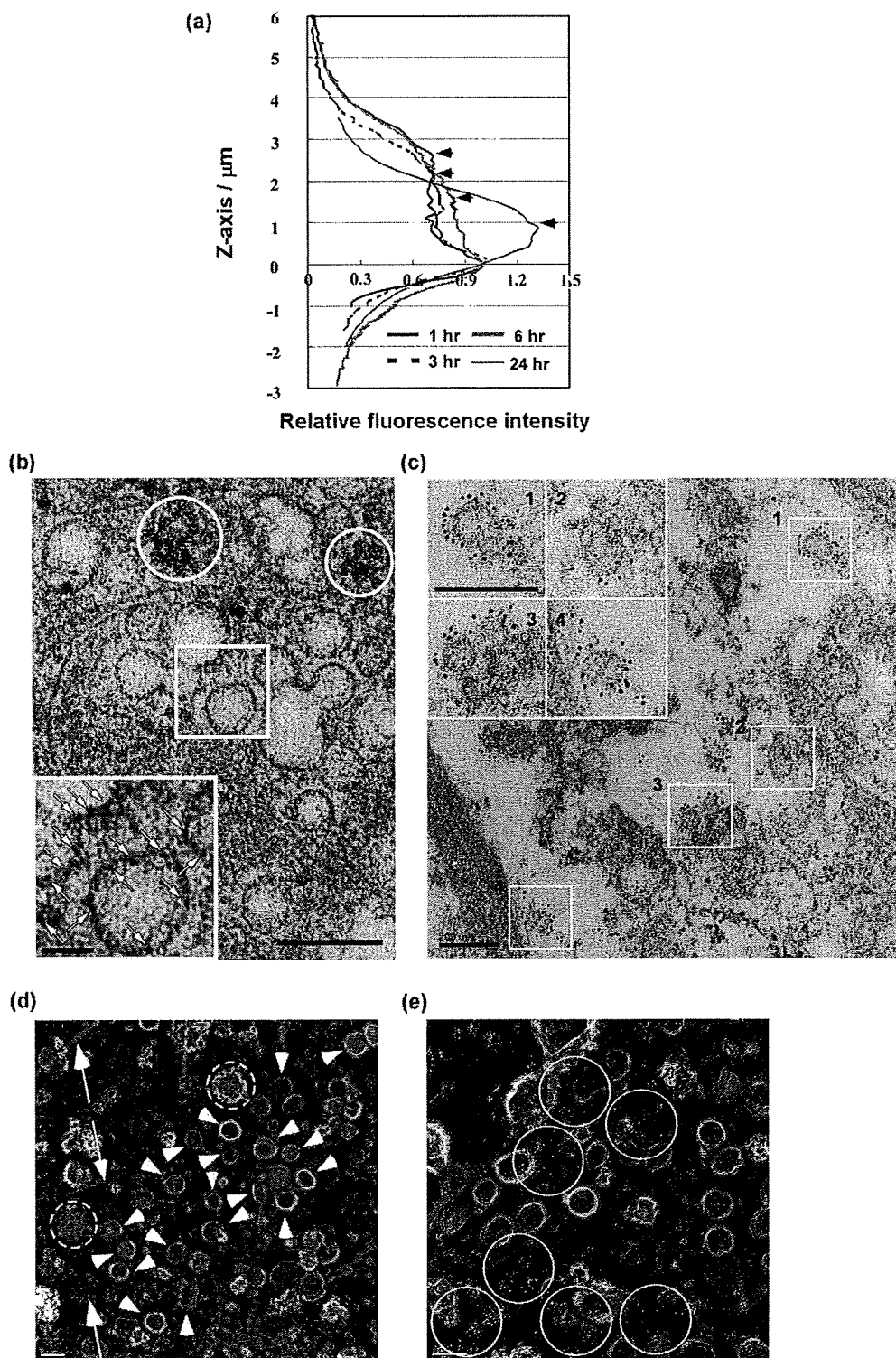


Figure 4. Internalization of nanoparticles of Flu-Am-PAPS in HAECs. (a) F.I. profiles of Flu-Am-PAPS in HAECs. F.I. was calculated by integrating brightness at each pixel over an optical section of confocal fluorescence image. The F.I. is plotted against the Z-axis position of each optical section in a confocal fluorescence image. Arrow heads indicates the intensity maximum in the profiles. The intensity maximum can reflect the most probable location of nanoparticles of Flu-Am-PAPS in HAECs at each incubation time. TEM observation of caveolae-mediated endocytosis in HAECs. Ultrathin sections were cut out from embedded HAECs in the direction parallel to the culture dish surface. In the ultrathin section image (b) the nanoparticles of Au-Am-PAPS were incorporated into cytosol of HAECs. Small black dots derived from gold nanoparticles attached to the amphiphilic polysiloxane with diameter of 5–10 nm are confirmed in the inner perimeter of caveolae (indicated by square). The inset is a two-times magnified image of the area indicated by square and shows clearly the small black dots in caveolae (indicated by arrows); (c) immunodetection of caveolae structures in cytosol of HAECs. Caveolae were confirmed by specific accumulation of 10 nm gold nanoparticles of secondary IgG (dark black dots) around the round structures with diameters of 100 nm in cytosol. Scale bars in Figure (b) and (c) represent 200 nm. Scale bars in the insets are 100 nm in (a) and 200 nm in (b). Rapid-freeze, deep-etch immunoreplication TEM images ((d) and (e)) show the undercoat structure of the upper cell membrane enriched in caveolae (indicated by arrow heads), (d), and the gold nanoparticles (white spots in circles) indicating the existence of the Flu-Am-PAPS in the caveolae-enriched area, (e). Other fine structures in (d) are clathrin coated pits (indicated by circle with broken line) and filamentous actin (indicated by arrow). Scale bar: 100 nm.

by HAECs were detected by indirect immunolabeling method with 5 nm diameter colloidal gold particles. Figure 4e shows that the gold particles for immunolabeling of Flu-Am-PAPS that were identified as the dispersed white spots in the TEM image appeared on the internal face of the upper cell membrane and that the gold particles were localized in the area where caveolae were densely accumulated (Figure 4e). The localization of gold particles in cell membrane means that the nanoparticles of Flu-Am-PAPS are localized in the caveolae accumulated area of the upper cell membrane and strongly suggests that caveolae can function as pathways in endocytosis when the nanoparticles of Flu-Am-PAPS are endocytosed into HAECs.

As for the particle size of the endocytosed nanoparticles, we extracted the endocytosed nanoparticles (Flu-Am-PAPS) from HAECs by using a surfactant free protein extraction method and measured the size of the extracted nanoparticles by DLS. According to the histogram of the particle size of the extracted nanoparticles in cytoplasmic fraction of HAECs (the histogram data are attached to Supporting Information as Figure S2), the histogram peak corresponding to the intact nanoparticles of Flu-Am-PAPS (the histogram peak at 150 nm in Figure S2b) shifted to smaller particle size (the histogram peak at 100 nm in Figure S2a) after the endocytosis into HAECs. This suggests that the nanoparticles of Flu-Am-PAPS comparable to the caveolae size are preferentially endocytosed by HAECs. Furthermore, we performed a DLS measurement of the collected sample including serum proteins of growth medium, nanoparticles of Flu-Am-PAPS, and cell debris after the incubation with HAECs and found that the histogram peak of the polysiloxane nanoparticles shifted from 150 nm (before incubation) to 250 nm (the histogram peak in Figure S2c) after the incubation with HAECs. This suggests that the polysiloxane nanoparticles that are larger than the caveolae size are more difficult to be endocytosed and remain after the incubation with HAECs. From the above experiment data of immunofluorescence microscopy, electron microscopy, and particle size measurement, it can be concluded that nanoparticles of amphiphilic polysiloxanes comparable to caveolae size are endocytosed via caveolae in plasma membrane of HAECs.

NO Release in HAECs. NO is a vasodilator synthesized in endothelial cells and plays important physiological roles such as the regulation of blood pressure and the inhibition of platelet adhesion.⁷ As we mentioned the endocytic pathways for the uptake of the nanoparticles, caveolae are main routes in endocytosis and gateways to signal-transducing domain where inactive eNOS molecules are localized. It is an intriguing question whether the uptake of the nanoparticles can work in the activation of eNOS, if so, how it does. To study the influence of the nanoparticles on the expression of cell function, nitric oxide release of HAECs was monitored by using diaminohodamine-4 acetoxymethyl ester (DAR-4 M AM), a fluorescent indicator for NO.¹⁸ DAR-4 M AM can permeate through plasma membrane, be distributed to cytosol, specifically react with NO, and form a fluorescent triazole compound. HAECs were exposed to Dulbecco's modified Eagle medium containing 50 μ M DAR-4 M AM for 10 min after the 6 h incubation with nanoparticles of Am-PAPS (0.1 mg/mL). NO release followed by the cellular uptake of polysiloxane nanoparticles could be detected by fluorescence microscope observation of the fluorescence intensity change that results from the triazole compound formation. Figure 5 shows the time profiles of fluorescence intensity of the reaction product derived from NO release after the incubation with nanoparticles (closed triangle), the treatment with bradykinin, endogenous eNOS activator (open circle), the incubation

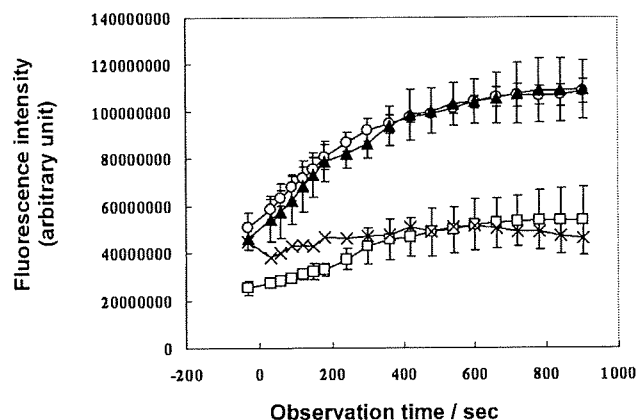


Figure 5. NO release in HAECs. Time profiles of NO release of HAECs. NO was detected by fluorescent indicator, diaminohodamine-4 acetoxymethyl ester (DAR-4 M AM). The profile represented by open circles shows the NO release after the stimulation with bradykinin ($n = 4$). The profile represented by closed triangles shows the NO release after the cellular uptake of the nanoparticles of amphiphilic polysiloxane ($n = 4$). The profile represented by open squares shows the NO release after the cellular uptake of the sugar conjugated water-soluble polysiloxane ($n = 3$). The NO release profile in resting HAECs was indicated by cross ($n = 3$). The error bar in each data point is represented by standard deviation.

with water-soluble polysiloxane for positive control (open square), and the incubation in DMEM for negative control (cross symbol). After the uptake of nanoparticles, NO release of HAECs was enhanced up to the same release level that was observed when endothelial cells were stimulated by bradykinin. As a preliminary study about the effect of other nanomaterials on NO release in HAECs, we tested NO release level using commercially available polystyrene nanoparticles, micromer (Micromod, Rostock, Germany) in comparison with that using our polysiloxane nanoparticles. A similar trend in NO release was observed when HAECs were incubated with a growth medium containing 1 mg/mL of the polystyrene nanoparticles with 50 nm of diameter (time profile of NO release represented by open squares of Figure S3 in Supporting Information). However, the polystyrene nanoparticles with 200 nm of diameter did not enhance NO release level (time profile of NO release represented by closed squares of Figure S3 in Supporting Information). This suggests that nanoparticles with caveolae size could enhance NO release in HAECs. Furthermore, NO release followed by 6 h incubation with a nonassociative water-soluble sugar conjugated polysiloxane (Figure 1b; concentration, 1 mg/mL) was less than half of the NO release level induced by the amphiphilic polysiloxane nanoparticles and exhibited a time profile that was quite similar to that without stimulation (negative control: cross symbols in Figure 5). As a result of these data, the enhanced release of NO after the incubation with polysiloxane nanoparticles suggests that signal transduction leading to NO release is activated upon the cellular uptake of the nanoparticles via caveolae.

Activation of Endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS) Coupled to Nanoparticle Uptake. In resting endothelial cells, some of the eNOS molecules are inhibited by protein complex formation with caveolin-1, a constituent protein of caveolae. Cell stimulation with Ca^{2+} -mobilizing agonists such as bradykinin promotes calmodulin binding to eNOS and dissociation of eNOS from caveolin-1. The dissociated eNOS molecules can be detected in intracellular sites close to nucleus.²³ Such a subcellular migration of signaling proteins followed by their activation is known as translocation. The translocation of eNOS

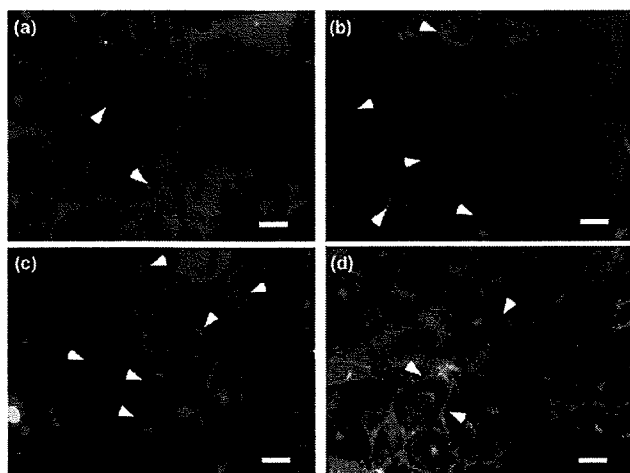


Figure 6. Translocation of eNOS in HAECs in response to bradykinin and upon cellular uptake of the nanoparticles of Am-PAPS. (a) Representative image of eNOS localization in resting HAECs (arrowhead). eNOS was redistributed from the cell periphery to intracellular sites near the nucleus (arrowheads in (b) and (c)) when HAECs were treated with 1 μ M bradykinin for 5 min, (b), or were incubated with the nanoparticles of Am-PAPS (0.1 mg/mL) for 6 h, (c). eNOS did not translocate to peri-nuclear region of HAECs when HAECs were exposed to sugar conjugated water-soluble polysiloxane (1 mg/mL) for 6 h, (d). Scale bar in each image is 20 μ m.

is followed by the activation of eNOS in endothelial cells.²³ Phosphorylation of eNOS on Ser¹¹⁷⁷ occurs concomitantly in the activation process of eNOS.²⁴ Here we studied the influence of nanoparticle uptake of HAECs on the eNOS activation with respect to the intracellular translocation and the phosphorylation of eNOS. Immunofluorescence imaging of HAECs using monoclonal antibody to eNOS demonstrated that eNOS bound to cell membrane (cell periphery: Figure 6a) translocate to the cell cytosol and the peri-nuclear region upon 5 min stimulation with 1 μ M of bradykinin (Figure 6b). The translocation of eNOS was confirmed as ring-like patterns around nucleuses after the HAECs were exposed to nanoparticles of Am-PAPS for 6 h (Figure 6c). This suggests that caveolae-mediated endocytosis of nanoparticles in HAECs can be coupled to the eNOS activation and can work as an external stimuli in a signal transduction where membrane-bound eNOS are activated. Phosphorylation of eNOS at Ser¹¹⁷⁷ (P-eNOS) was detected by Western blot analysis. Figure 7a shows that phosphorylation of eNOS occurred when HAECs were incubated with the nanoparticles of Am-PAPS. The target proteins (eNOS and P-eNOS) transferred to PVDF membranes were detected by colorimetric reaction of TMB substrate. The protein levels of the target proteins were evaluated by measuring the intensity of the reaction product stained on the blotted bands. In Figure 7b the target protein levels were plotted against time of the incubation with nanoparticles. The total amount of eNOS gradually decreased to 65% of the initial amount of eNOS at 6 h of incubation while HAECs were incubated with polysiloxane nanoparticles (the time profile of eNOS: closed squares in Figure 7b). β -Tubulin, a loading control for Western blot analysis, exhibited a slight decrease in expression level during the incubation with polysiloxane nanoparticles (the time profile of β -tubulin: closed circles in Figure 7b), although the same amount of extracted proteins (2 μ g) was applied to each lane in SDS-PAGE. This indicates that incubation with polysiloxane nanoparticles influences the expression level of eNOS in HAECs. On the other hand, the P-eNOS (Ser¹¹⁷⁷) level gradually increased by 1.3 fold at 1 h of incubation and by 1.6-fold at

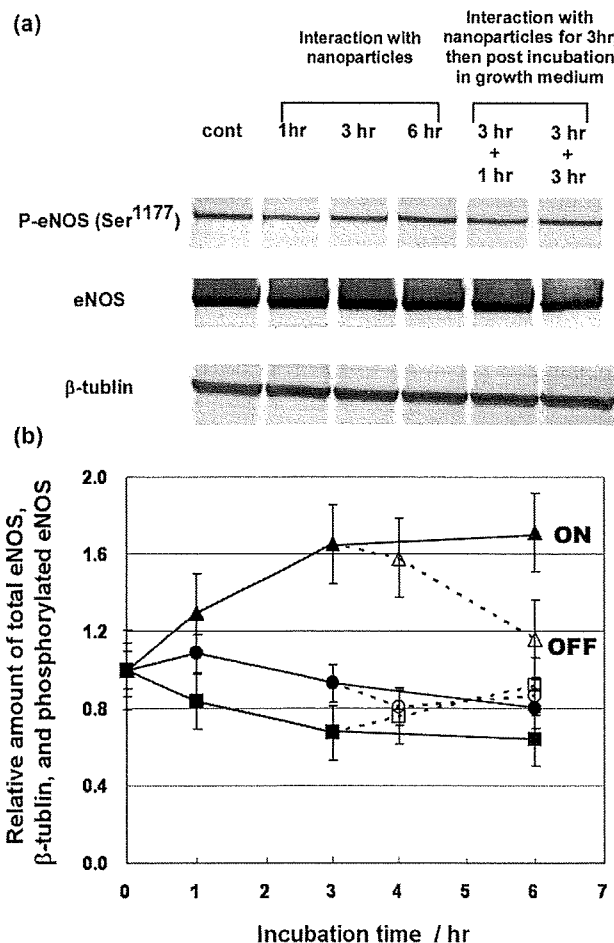


Figure 7. Nanoparticles of amphiphilic polysiloxane (Am-PAPS) stimulate phosphorylation of eNOS. HAECs were incubated with nanoparticles of Am-PAPS for the time period indicated. (a) Cell lysates were analyzed by Western blot with antibodies for phosphorylated eNOS-Ser1177, eNOS, and β -tubulin. (b) The bands of target proteins were quantified by measuring the colorimetric intensity. The graph shows the time course of the expression level of the target proteins (\blacktriangle , \triangle : P-eNOS, \blacksquare , \square : e-NOS, and \bullet , \circ : β -tubulin). The time courses represented by closed symbols demonstrate the expression level of the proteins of interest during the incubation with polysiloxane nanoparticles. The time course of the proteins of interest after the removal of polysiloxane nanoparticles at 3 h of incubation are depicted by open symbols and dotted lines. Each data point represents the means \pm SE ($n = 3$).

3 h from the initial phosphorylation level of eNOS (the time profile of P-eNOS: closed triangles in Figure 7b). The expression level of P-eNOS reached saturation point at 6 h of incubation with polysiloxane nanoparticles. Thus, the activation of eNOS was followed by the cellular uptake of polysiloxane nanoparticles and the expression level of P-eNOS was maintained as long as HAECs were exposed to the nanoparticles. Furthermore, the expression levels of target proteins (eNOS, P-eNOS, and β -tubulin) were back to the initial level of each protein (time profiles (from 3 to 6 h of incubation time) indicated by open symbols and dotted lines in Figure 7b) when polysiloxane nanoparticles were removed from culture medium and HAECs were incubated in a fresh growth medium for 3 h after the removal of nanoparticles. These data suggest that phosphorylation of eNOS at Ser¹¹⁷⁷ is stimulated by interaction with nanoparticles and the enhanced level of phosphorylation is maintained transiently during the interaction with polysiloxane nanoparticles. Meanwhile, any eNOS translocation was not

observed at all when HAECs were exposed to the water-soluble sugar conjugated polysiloxane (concentration: 1 mg/mL) for 24 h (Figure 6d). According to the result of fluorescence image analysis for the estimation of the amount of the endocytosed polymers, the amount of the incorporated water-soluble polysiloxane at 24 h of the incubation was approximately 15% of that of the incorporated fluorescein-labeled nanoparticles (Flu-Am-PAPS) at 6 h of the incubation time (Figure S4 is available at Supporting Information). The water-soluble polysiloxane was certainly endocytosed by HAECs; however, the eNOS activation did not occur. These results suggest that the types of the polymers (nonassociative polymer chains or nanoparticles of amphiphilic polymers) exposed to cells and the pathways (caveolae or clathrin coated pits) selected in endocytosis are important factors that can influence the signal transduction in the regulation of cell function. Thus, we assume that the delivery of the nanoparticles targeted to caveolae facilitates eNOS activation (subcellular translocation and phosphorylation at Ser¹¹⁷⁷) and the activated eNOS promotes NO release. The details of the mechanism underlying the eNOS activation upon the caveolae-mediated endocytosis of our polysiloxane nanoparticles is still under investigation and will be reported elsewhere.

Conclusion

In conclusion, the nanoparticles of amphiphilic polysiloxane were endocytosed via caveolae in human aortic endothelial cells and the uptake of the nanoparticles promoted nitric oxide release in HAECs. Caveolae is a membrane microdomain where various signal transduction molecules are accumulated and external stimuli are processed. Endothelial nitric oxide synthase is one of the constituent molecules in signal transduction and plays a significant role in regulation of vasorelaxation by synthesizing nitric oxide. Some of eNOS molecules are bound to caveolin-1 and deactivated in caveolae. Activation of eNOS is triggered in vivo by binding of physiological active molecules such as bradykinin, angiotensin-II, and estrogen to their corresponding receptors in endothelial cells. According to the recent study by Maniatis et al., eNOS-dependent NO production is coupled to caveolae-mediated endocytosis induced by albumin binding protein gp60 (albumin receptor).²⁵ In their case, NO release started just after gp60 activation by adding BSA and lasted up to 20 min. Phosphorylation of eNOS accompanied by gp60 activation was confirmed at just 30 s after the addition of BSA. This means that BSA uptake via caveolae in rat lung microvascular endothelial cells is quickly processed as an external signal and leads to NO release. In our study, a delay of 15–60 min between the beginning of the nanoparticle uptake and the onset of the induced phosphorylation of eNOS was observed. This kind of delay was rather observed in the phosphorylation of eNOS that was stimulated by shear stress to bovine aortic endothelial cells.²⁶ Sustained phosphorylation of eNOS is another feature of eNOS activation that is followed by nanoparticle uptake of HAECs. We found that the phosphorylation of eNOS lasted while HAECs were exposed to nanoparticles for 6 h. The phosphorylation of eNOS induced by gp60 activation lasted at most for 30 min. Furthermore, there was considerable difference in the working concentration of stimulants for the activation of eNOS between BSA (5 mg/mL) and our nanoparticles (0.1 mg/mL or less). We think that there are some different mechanisms in the activation of eNOS induced by caveolae-mediated endocytosis between former study using BSA and our current study using artificial nanoparticles. In any case, nanoparticle uptake by HAECs stimulates the activation

of eNOS and raises the NO production. This means that nanoparticles can be regarded as extracellular signals. Concerning the influence of the interaction between nanomaterials with cells on the expression of cell function, a study on the behavior of bovine carotid arterial endothelial cells cultured on polyurethane nanocomposites demonstrated that cell migration could be regulated by the surface morphological change induced by blending gold nanoparticles with polyurethane and revealed that the promoted migration was associated with up-regulation of eNOS expression via the activation of PI3K/Akt signaling pathway.²⁷ The key phenomena explaining the promoted cell migration is signal transduction associated with the interaction between cells and the nanostructured surface and concomitant rearrangement of cytoskeleton. Meanwhile, our study deals with signal transduction associated with endocytosis of nanoparticles that are targeted to membrane microdomains of cells. As far as we know, this is the first demonstration that nitric oxide release in HAECs can be induced by the caveolae-mediated cellular uptake of artificial nano materials of synthetic polymer and that the uptake itself can work as external stimuli leading to the expression of a cell function. Thus, nanoparticle can work as an artificial signal substance whose signaling characteristics may be tuned by molecular design of constituting amphiphilic polymers as well as the nanoparticles can be used as nanocarriers in drug delivery system. In the drug delivery system the nanocarrier itself should be inert to targeted cells and tissues. However, as we demonstrated in this study, nanoparticles can influence cell functions; nanoparticles may not only promote the pharmacological effects of delivered drugs but also cause undesirable effects in the target tissues or cells. The molecular design of constituent molecules for nanoparticles and the interaction between nanoparticles and cells should be considered more carefully in terms of the activation of cell functions. Nevertheless, we expect that targeting delivery of nanoparticles including our polysiloxane nanoparticles to caveolae is a potential and novel medication to hypertension based on the regulation of NO release by switching of eNOS activation in a single cell.

Acknowledgment. T.N. thanks Professor Mitsuru Akashi and Dr. Takami Akagi of Osaka University for allocating instrument time of dynamic light scattering measurement, Dr. Tetsuji Yamaoka and Dr. Atsushi Mahara of National Cardiovascular Center Research Institute for allocating instrument time of fluorescence spectroscopy measurement, Dr. Tsutomu Furuzono of National Cardiovascular Center Research Institute for allocating instrument time of microplate reader in protein assay, and Mrs. Mina Kaneko for technical work in cell culture experiments. Part of this research was financially supported by Terumo Life Science Foundation in fiscal year of 2008.

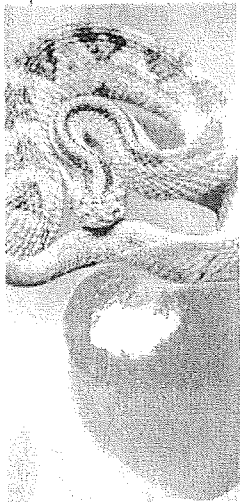
Supporting Information Available. Supplementary data of nanoparticle size change in physiological condition, size of nanoparticles endocytosed, and cellular uptake of water-soluble polysiloxane. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

References and Notes

- (1) Simons, K.; Ikonen, E. *Nature* **1997**, *387*, 569–572.
- (2) Minshall, R. D.; Sessa, W. C.; Stan, R. V.; Anderson, R. G. W.; Malik, A. B. *Am. J. Physiol.* **2003**, *285*, L1179–L1183.
- (3) Gratton, J.-P.; Bernatchez, P.; Sessa, W. C. *Circ. Res.* **2004**, *94*, 1408–1417.
- (4) Wyatt, A. W.; Steinert, J. R.; Mann, G. E. *Biochem. Soc. Symp.* **2004**, *71*, 143–156.

- (5) Vallance, P.; Chan, N. *Heart* **2001**, *85*, 342–350.
- (6) McIntosh, D. P.; Tan, X.-Y.; Oh, P.; Schnitzer, J. E. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, *99*, 1996–2001.
- (7) Michel, T. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **1999**, *32*, 1361–1366.
- (8) Muro, S.; Koval, M.; Muzykantov, V. *Curr. Vasc. Pharmacol.* **2004**, *2*, 281–299.
- (9) Sanvicens, N.; Marco, M. P. *Trends Biotechnol.* **2008**, *26*, 425–433.
- (10) Conner, S.; Schmid, S. L. *Nature* **2003**, *422*, 37–44.
- (11) Cruz, T.; Gaspar, R.; Donato, A.; Lopes, C. *Pharm. Res.* **1997**, *14*, 73–79.
- (12) Mark, J. E.; Allcock, H. R.; West, R. In *Inorganic Polymers*, 2nd ed.; Oxford University Press: New York, 2005; pp 154–199.
- (13) Kichler, A.; Sabourault, N.; Décor, R.; Leborgne, C.; Schmutz, M.; Valleix, A.; Danos, O.; Wagner, A.; Mioskowski, C. *J. Controlled Release* **2003**, *93*, 403–414.
- (14) Moghimi, S. M.; Hunter, A. C.; Murray, J. C. *Pharmacol. Rev.* **2001**, *53*, 283–318.
- (15) Beppu, K.; Kaneko, Y.; Kadokawa, J.; Mori, H.; Nishikawa, T. *Polym. J.* **2007**, *39*, 1065–1070.
- (16) Tominaga, H.; Ishiyama, M.; Ohseto, F.; Sasamoto, K.; Hamamoto, T.; Suzuki, K.; Watanabe, M. *Anal. Commun.* **1999**, *36*, 47–50.
- (17) Heuser, J. *Traffic* **2000**, *1*, 545–552.
- (18) Kojima, H.; Hirotsu, M.; Nakatsubo, N.; Kikuchi, K.; Urano, Y.; Higuchi, T.; Hirata, Y.; Nagano, T. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 1967–1973.
- (19) Kaneko, Y.; Iyi, N.; Kurashima, K.; Matsumoto, T.; Fujita, T.; Kitamura, K. *Chem. Mater.* **2004**, *16*, 3417–3423.
- (20) Durin, G.; Cottin, S.; Blanc, E.; Rees, A. R.; Tamsamani, J. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 31192–31201.
- (21) Drab, M.; Verkade, P.; Elger, M.; Kasper, M.; Lohn, M.; Lauterbach, B.; Menne, J.; Lindschau, C.; Mende, F.; Luft, F. C.; Schedl, A.; Haller, H.; Kurzchalia, T. V. *Science* **2001**, *293*, 2449–2452.
- (22) Morone, N.; Fujiwara, T.; Murase, K.; Kasai, R.; Ike, H.; Yuasa, S.; Usukura, J.; Kusumi, A. *J. Cell Biol.* **2006**, *174*, 851–862.
- (23) Prabhakar, P.; Thatte, H. S.; Goetz, R. M.; Cho, M. R.; Golan, D. E.; Michel, T. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 27383–27388.
- (24) Fleming, I.; Busse, R. *Am. J. Physiol.* **2003**, *284*, R1–R12.
- (25) Maniatis, N.; Brovkovich, V.; Allen, S. E.; John, T. A.; Shajahan, A. N.; Tirupathi, C.; Vogel, S. M.; Skidgel, R. A.; Malik, A. B.; Minshall, R. D. *Circ. Res.* **2006**, *99*, 870–877.
- (26) Boo, Y. C.; Sorescu, G.; Boyd, N.; Shiojima, I.; Walsh, K.; Du, J.; Jo, H. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 3388–3396.
- (27) Hung, H. S.; Wu, C. C.; Chien, S.; Hsu, S. H. *Biomaterials* **2009**, *30*, 1502–1511.

BM900128X



特集 膜蛋白質のシェディングとその制御機構を探る

ADAMファミリー蛋白質の立体構造と作用機構

Three-dimensional domain architecture of the ADAM family proteinases

武田壮一

ADAMファミリー蛋白質は、メタロプロテアーゼドメインと蛇毒ディスインテグリン様のDドメインをもち、蛋白質分解と細胞-細胞間の結合という異なる2つの機能をもつ蛋白質として注目されてきた。しかし、X線結晶解析の結果から、ADAMファミリー蛋白質のDドメインは、当初の想定と異なり、インテグリンとの相互作用には適した構造をもたないことが判明した。一方で、Dドメインの下流のシステイン残基に富む領域は、新規のフォールドをもつ蛋白質間相互作用モチーフであることが判明した。ここでは、ADAMファミリー蛋白質について、最近の構造生物学的な知見を紹介する。

Key words

●メタロプロテアーゼ ●ディスインテグリン ●蛋白質間相互作用 ●X線結晶構造解析

はじめに

1992年、受精における膜融合にかかわる精子表面蛋白質として報告されたファーティリン (Fertilin) は、出血蛇毒に由来する血小板凝集阻害蛋白質ディスインテグリンと非常に似た配列 (以降、Dドメインとよぶ) と、ウイルスの融合ペプチド様の配列、および、膜貫通領域をもち、膜融合やインテグリンを介した細胞間相互作用 (ここでは、精子-卵相互作用) の新しい担い手となる蛋白質として注目された¹⁾。ファーティリンの膜融合への関与はいまだ明確ではないが、前駆体がDドメインの上流に蛇毒メタロプロテアーゼ様の配列 (以降、Mドメインとよぶ) をもつことがわかり、そののち、ファーティリンと同様に、MドメインとDドメインとを含む遺伝子産物がつぎつぎとみつかるとなった。これら一群の蛋白質は、2つの特徴的な機能ドメインをもつことと蛋白質の由来から、ADAM (a disintegrin and metalloproteinase) ファミリー蛋白質と命名された^{2,3)}。

1997年、TNF α のエクトドメインシェディング (ectodomain shedding, 以下、単にシェディングとよぶ) にかかわる酵素TACE (TNF α converting enzyme, TNF α 変換酵素) が17番目のADAMファミリー蛋白質ADAM17

として報告され、ADAMファミリー蛋白質が細胞表層蛋白質のシェディング酵素として注目されるようになった^{4,5)}。シェディング酵素としてのADAMファミリー蛋白質の役割については、本特集の他項を参照されたい。ADAMファミリー蛋白質は多様な細胞表層蛋白質の切断を行なうが、これらの切断部位の周辺に共通した認識配列はみられず、どのように標的を認識しているかは不明である。また、20個あるヒトADAMファミリー遺伝子のうち、12個は触媒部位のZn²⁺結合コンセンサス配列 (後述) をもつが、ほかはこの配列に変異があり、プロテアーゼ活性の消失しているものと考えられる。前述のファーティリン (Fertilin β , ADAM2) もそのひとつである。

シェディング酵素として注目される一方で、酵素活性を消失したADAMファミリー蛋白質がどのように機能しているかについてはほとんど理解が進んでいない。Dドメインについては、インテグリンとの相互作用を示唆する結果が多数、報告されている。また、Dドメインの下流にはシステイン残基に富む領域 (システインリッチドメイン、以降、Cドメインとよぶ) があり、基質の認識や蛋白質間相互作用にかかわると報告がなされているが、これらDドメインとほかの蛋白質との具体的な相互作用の様式はほとんどわかっていない。組換え蛋白質の大量発現がむずかしいためにADAMファミリー蛋白質に関する構造生物学的な研究は立ち遅れていたが、筆者らは、蛇毒に含まれるADAMファミリーホモログ蛋白質に着目してX線結晶構造解析を進めてきた。本稿では、これらの結晶構造などから明らかにな

Soichi Takeda

国立循環器病センター研究所 心臓生理部

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

URL: http://www.ncvc.go.jp/res/shinzo/shinzoj_01.html

ってきた、ADAMファミリー蛋白質の立体構造とその機能について紹介したい。

ADAMファミリー蛋白質のドメイン構造

ADAMファミリー蛋白質はN末端側から、シグナル配列、プロペプチド配列について、前述のMドメイン、Dドメイン、Cドメインをもち、その下流に約60アミノ酸残基からなるEGF様ドメインと膜貫通領域をもつ、I型膜貫通蛋白質である²⁶⁾(図1)。ADAM10およびADAM17はほかのADAMファミリー蛋白質と異なり、EGF様ドメインをもたずCドメインのすぐ下流が膜貫通領域となる。細胞外領域はADAMファミリー蛋白質のあいだで比較的アミノ酸配列の保存性が高いのに対し、細胞内領域は長さ、配列ともに非常に多様である。アダプター蛋白質との結合に関与するSH3ドメイン結合配列やリン酸化部位が存在し、細胞内から細胞外へのシグナル伝達に関与しているものと考えられるが、その作用機序はほとんどわかっていない。膜型ADAMファミリー蛋白質以外に、スプライズバリエーションとしてMドメイン、Dドメイン、Cドメインを含む遊離型ADAMファミリー蛋白質も発現しているが、その生理的な役割はよくわかっていない。

1. 蛇毒ADAMファミリーホモログ蛋白質

ガラガラヘビ、ハブやマムシなどクサリヘビ科の蛇毒は、さまざまな分子量の蛇毒メタロプロテアーゼ (snake venom metalloproteinase ; SVMP) を、種によっては総蛋白質の30%以上も含む。これらはおもに獲物の体内で血管壁を破壊する出血因子としてはたらき、また、血液凝固因子や血小板糖蛋白質などにも作用することが知られている⁷⁾。膜型ADAMファミリー蛋白質と異なり、みつがっているすべての蛇毒メタロプロテアーゼはプロテアーゼ活性をもっているものと考えられる。蛇毒メタロプロテアーゼはドメイン構成により、MドメインのみをもつP-I型から、後述のRVV-Xに代表されるヘテロ3量体のP-IV型にまで、分類されている(図1)。研究材料としての蛇毒の有用性は、本誌2009年6月号にて、山崎・森田により紹介されているが⁸⁾、ADAMファミリー蛋白質の研究においても蛇毒が一役買っている。北米生息のニシダイヤガラガラヘビ (*Crotalus atrox*) 由来のホモ2量体P-III型蛇毒メタロプロテアーゼのVAP1 (vascular apoptosis-inducing protein-1)、および、

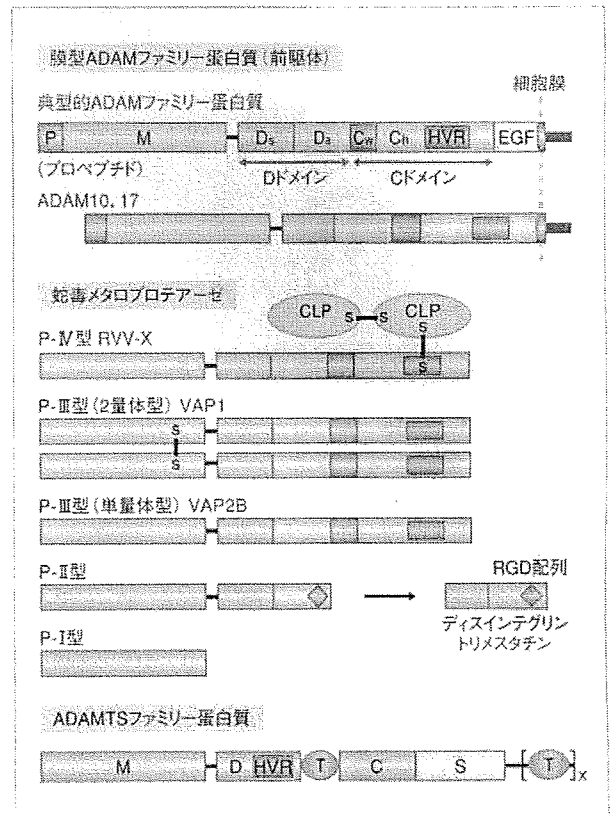


図1 ADAMファミリー蛋白質のドメイン構造

ADAM10およびADAM17以外のすべての膜型ADAMファミリー蛋白質は、Mドメイン、Dドメイン、Cドメインと膜貫通領域とのあいだにEGF様ドメインをもつ。P-II型蛇毒メタロプロテアーゼはおもにトランスゴルジネットワークでプロセッシングされディスインテグリンとなる⁹⁾。P-IV型蛇毒メタロプロテアーゼはジスルフィド結合した2本のC型レクチン様サブユニット(CLP)の経鎖をもつ。
HVR: 超可変領域。

単量体P-III型蛇毒メタロプロテアーゼのVAP2Bは、連続したMドメイン、Dドメイン、Cドメインの立体構造が最初に決定された蛇毒ADAMファミリーホモログ蛋白質である。これら蛇毒メタロプロテアーゼはヒトADAMファミリー蛋白質の細胞外ドメインとおおよそ40%のアミノ酸の同一性を示し、また、立体構造の基本骨格を形成するアミノ酸残基(ジスルフィド結合や後述のCa²⁺結合にかかわるアミノ酸残基など)は、ほぼすべて保存されている^{6,9,10)}。

2. Mドメイン、Dドメイン、Cドメイン

P-III型蛇毒メタロプロテアーゼのX線結晶構造解析から、膜型ADAMファミリー蛋白質のMドメイン、Dドメイン、Cドメインの立体構造とその構築原理が明らかになった^{6,9,10)}。この3つのドメインは全体としてC字型の構造

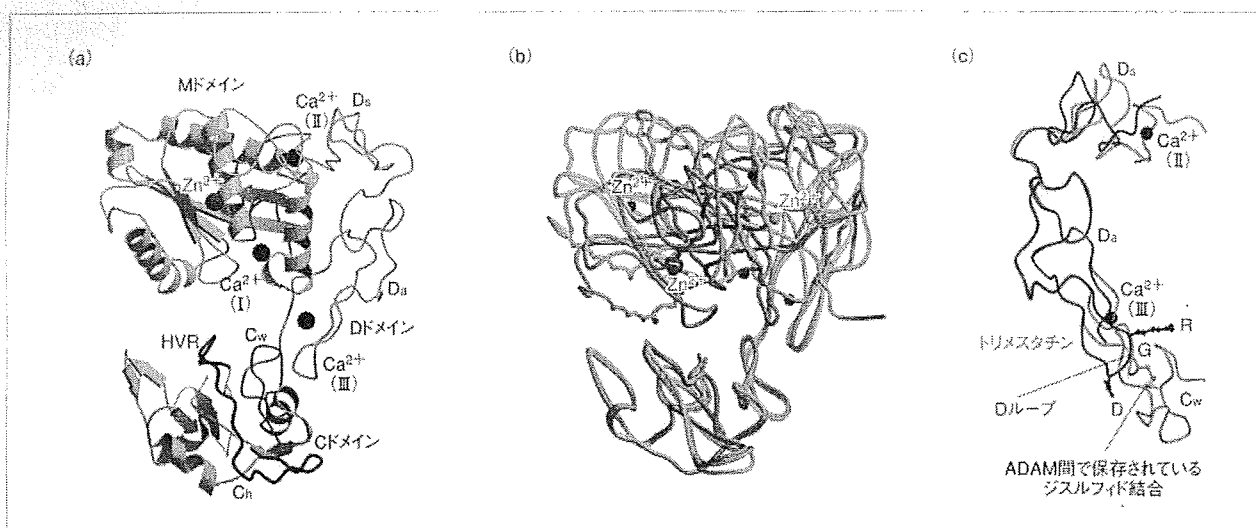


図2 Mドメイン、Dドメイン、Cドメインの立体構造

(a) VAP2Bの結晶構造。ADAMファミリー蛋白質のMドメイン、Dドメイン、Cドメインは全体としてC字型の構造をなし、Zn²⁺の結合した触媒部位がCドメイン内の超可変領域(HVR)と対面する。Mドメイン、Dドメイン、Cドメインには3箇所(I~III)のCa²⁺結合部位が存在する。

(b) Mドメイン、Dドメイン、Cドメインの内部の可動性。VAP1(青色)、VAP2B(黄色)、およびRVV-X(ピンク色)のC_wサブドメインでの重ね合わせ、それぞれに結合したZn²⁺を、青色、緑色、赤色で示す。C_wサブドメインに対するMドメインの相対位置の違いは、蛋白質の違いというよりはむしろ結晶のパッキングの差に由来し、サブドメインのあいだに可動部のあることがわかった。

(c) VAP2BのD_sサブドメイン/D_aサブドメイン/C_wサブドメインとトリメスタチンとの重ね合わせ。ディスインテグリンにおいてRGD配列を含むDループ(青色で示す)はフレキシブルな構造をもちインテグリン鎖部と結合するが、ADAMファミリー蛋白質ではつづくC_wサブドメインとジスルフィド結合を含む連続構造を形成するため、インテグリンとの結合にはかかわらないものと考えられた。

をもっていた(図2a)。約200アミノ酸残基からなるMドメインは5本の α ヘリックスと5本のストランドからなる β シートの骨格をもち、さきにも述べたP-I型蛇毒メタロプロテアーゼやヒトADAM33のMドメインのみの構造と非常に高い類似性を示した。コンセンサス配列(HEXXHXXGXXHD)の3つのヒスチジン残基にZn²⁺が配位し、グルタミン酸残基が活性基として機能していた。この触媒部位のちょうど正反対の位置にDドメインとの境界があった。DドメインはつづくCドメインと連続した構造をとり、この2つのドメイン全体としてMドメイン側に湾曲した構造をもつため、Cドメインの末端の部分はMドメインの触媒部位に近い位置にあった。DドメインおよびCドメインはそれぞれサブドメインに分かれ、D_s(ショルダー)、D_a(アーム)、およびC_w(リスト)、C_h(ハンド)と名づけられた。D_sサブドメインおよびD_aサブドメインはほとんど2次構造のない連続したヘアピンループからなっていたが、それぞれ3つのジスルフィド結合にくわえ、Ca²⁺をコアにもつ強固な構造を形成していた。複数の結晶構造の比較から、各サブドメインのあいだには、程度の差はあるが、可動性のあることがわかった(図2b)。

3. Dループ

ディスインテグリンは蛇毒から単離された血小板凝集阻害因子の総称で、49~84アミノ酸残基からなるポリペプチドであり、多くはP-II型蛇毒メタロプロテアーゼから翻訳後プロセッシングにより生じるものと考えられている⁷⁾(図1)。その構造は4~7個のジスルフィド結合により保持され、末端に突出したディスインテグリンループ(Dループ)を提示する。この部分にRGD配列をもつものは、血小板膜のフィブリノーゲン/フォンビルブランド因子受容体であるインテグリン α _{IIb} β ₃の頭部の2つのサブユニットのあいだに形成される溝に拮抗的に結合し、血小板凝集を阻害する^{11,12)}。また、 α _{IIb} β ₃以外のインテグリンにも結合し、それらを発現する細胞と接着因子との結合を拮抗して阻害することが知られている。

ADAMファミリー蛋白質のD_aサブドメインは、RGD配列をもつディスインテグリン、トリメスタチン¹³⁾と非常に類似した構造をもつ(図2c)。しかし、ADAMファミリー蛋白質のDループは例外的なヒトADAM15を除いてRGD配列をもたず、結晶構造ではつづくC_wサブドメインとの境界面を形成し、その中心のジスルフィド結合によりD_sサブ

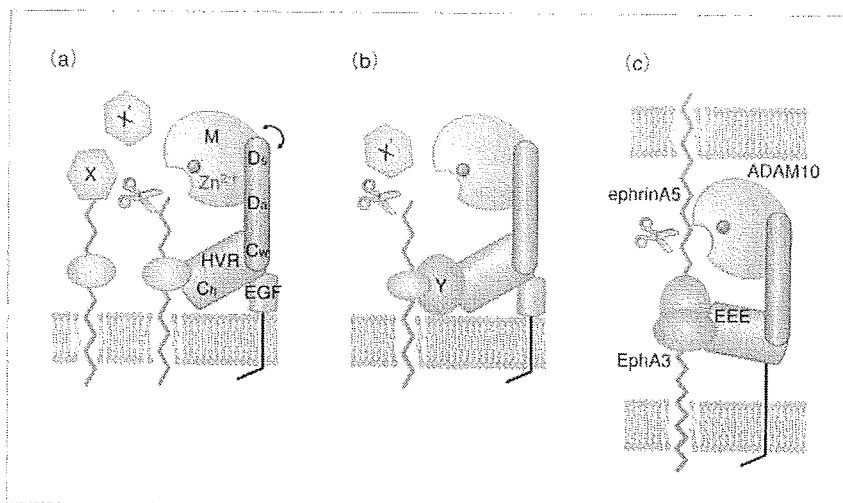


図3 膜型ADAMファミリー蛋白質による基質切断のモデル

(a) 基質蛋白質Xが超可変領域(HVR)により直接に認識され切断されるモデル。
 (b) 基質蛋白質Xが結合蛋白質Yを介して超可変領域により間接的に認識され切断されるモデル。
 (c) Jonesらによって提案された、ADAM10によるephrinA5切断機構のモデル¹³⁾。受容体型チロシンキナーゼEphA3は、隣接する細胞に発現する膜型リガンドであるephrinA5に結合する。ADAM10は、C₆サブドメインにある3つのグルタミン酸残基からなる負電荷クラスター(EEEで示す)でEphA3-ephrinA5複合体を認識し、ephrinA5をtransに切断する。ADAM10ではC_wサブドメインとC₆サブドメインとの相対位置がP-III型蛇毒メタロプロテアーゼと異なり、超可変領域ではなく負電荷クラスターが触媒部位の方向を向くことが想定された。

ドメインとC_wサブドメインは一体として機能することがわかった^{9,10)} (図2c)。同様なD₆サブドメインとC_wサブドメインとの一体構造は、ウシADAM10のDドメイン、Cドメインの結晶構造からも明らかになっている¹³⁾。さらに、ADAM10およびADAM17以外のすべてのADAMファミリー蛋白質において、P-III型蛇毒メタロプロテアーゼと同様に、Dループ部位はCa²⁺結合によるしっかりとした裏打ち構造が形成されているものと考えられる^{6,9)}。この点は、ディスインテグリンのDループが誘導適合による蛋白質間相互作用に適した比較的フレキシブルな構造をもつと対照的である。

これまで、Dループ部の短い合成ペプチドや大腸菌組換え蛋白質で調製したDドメインを用いてインテグリンとの相互作用があるとした結果が数多く報告されているが、多数のジスルフィド結合やCa²⁺結合をもつADAMファミリー蛋白質のDドメインの機能が正確に検証されているとはいえない。結晶構造解析の結果は、ADAMファミリー蛋白質のDループは従来型のインテグリンリガンドとして機能する可能性が非常に低いことを示唆していた。

4. 超可変領域

ADAMファミリー蛋白質のC₆サブドメインにはアミノ酸配列だけでなく立体構造からも既知の構造モチーフとの類似性は見いだせず、新規のフォールドであることがわかった^{9,13)}。Dループ部位がインテグリンとの相互作用に適した構造をもたない一方、C₆サブドメインはC字型のMドメイン、Dドメイン、Cドメインの構造のなかで触媒部位と対面する位置関係にあり、基質認識への関与が示唆された。

とくに、触媒部位と対面するC₆サブドメインの末端ループ部位は、ADAMファミリー蛋白質のあいだでもっともアミノ酸配列が可変で長さも多様な領域と一致し、筆者らは、これを超可変領域(hyper-variable region; HVR)と名づけた⁹⁾。

興味深いことに、解析したすべてのP-III型蛇毒メタロプロテアーゼの結晶において、超可変領域はとなりの蛋白質分子とのパッキングにかかわっており、また、その構造は誘導適合により形成され、逆に、溶液中では超可変領域はフレキシブルな構造をもつものと考えられた。筆者らは、蛋白質内での立体配置や蛋白質間相互作用に適した構造的な特徴から、超可変領域が基質を直接あるいは間接的に結合・認識するエキソサイトである可能性を提案した(図3)。ADAM10のDドメイン、Cドメインの結晶構造においては、C_wサブドメインとC₆サブドメインとのあいだの向きがP-III型蛇毒メタロプロテアーゼとは異なり、その結果、ADAM10の超可変領域は触媒部位とは対面しないものと考えられた^{9,13)}。しかし、その一方で、触媒部位の側に向くと考えられる3つのグルタミン酸残基からなる負電荷クラスターが、EphA3-ephrinA5複合体を認識しephrinA5をtransに切断するのに関与すると報告されている¹³⁾ (図3c)。

超可変領域が基質認識のエキソサイトであるという仮説は膜型ADAMファミリー蛋白質においてまだ検証されていないが、ADAMファミリー蛋白質と類縁のADAMTS(ADAM with thrombospondin motif)ファミリー蛋白質の部分結晶構造から、非常に興味深いことがわかってきた¹⁴⁾。当初、ディスインテグリン様の構造をもつと考えられていたADAMTSファミリー蛋白質のDドメインは、ADAMフ

ファミリー蛋白質のDドメインではなくCドメインのC_hサブドメインと同じ構造をもつこと、さらに興味深いことに、そのC_hサブドメインのMドメインとの相対位置が、ADAMファミリー蛋白質とはまったく異なることがわかったのである(図4a)。さらに、ADAMTSファミリー蛋白質では超可変領域が触媒部位に結合する基質に対して切断部位のすぐC末端側の下流に連続して位置し、エキソサイトとしての機能が強く示唆された^{6,14)}(図4b)。最近、フォンビルブランド因子切断プロテアーゼであるADAMTS13において、超可変領域のアミノ酸残基の変異により基質の切断活性が低下することが示され、超可変領域が基質認識に直接に関与することがはじめて実験的に示された¹⁵⁾。

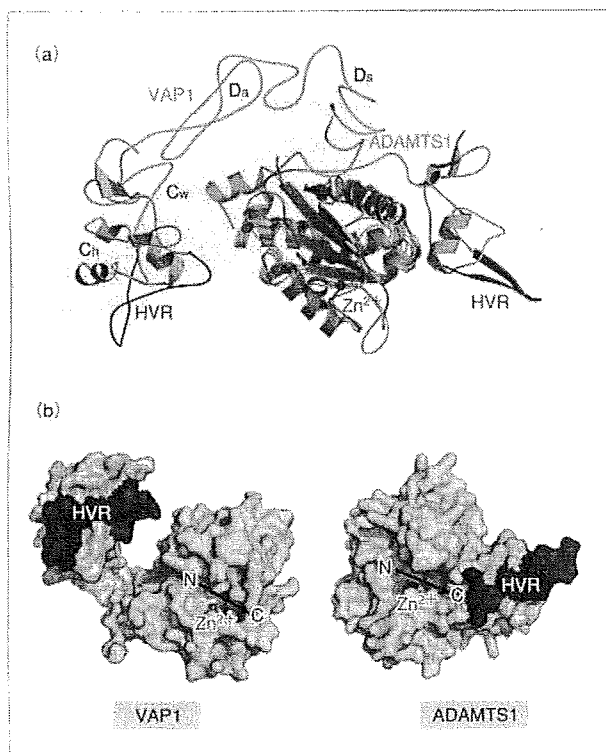


図4 ADAMTS1とVAP1の結晶構造の比較。

(a) ADAMTS1 (ピンク色)とVAP1 (水色)のMドメインとを重ね合わせた図。ADAMTSのMドメインにつづくDドメイン(黄緑色)は、ADAMファミリー蛋白質のDドメインではなくC_hサブドメインと同じ基本骨格をもつが、ADAMファミリー蛋白質のC_hサブドメインとはMドメインに対する相対位置がまったく異なっていた。

(b) VAP1とADAMTS1の表面モデル。超可変領域を青色、Zn²⁺を赤色の球で、基質のポリペプチド鎖の結合の向きをN→Cの矢印で示す。ADAMファミリー蛋白質では結合基質のN末端側に、ADAMTSファミリー蛋白質ではC末端側に、超可変領域があった。ADAMTSファミリー蛋白質において、超可変領域は基質切断部位のC末端側を認識するエキソサイトである可能性が示唆された。

HVR: 超可変領域。

II RVV-Xの結晶構造と基質認識機構

インドや東南アジアに生息するラッセルクサリヘビ(*Daboia russelli*)の毒は強力な血栓形成作用をもつ。その作用は、この蛇毒に含まれるRVV-X(Russell's viper venom factor X activator)が血液凝固第X因子を活性化することで血中に大量のトロンビンを産生し、宿主が制御不能な速度で血栓形成を進行させることによる。RVV-Xの結晶構造は、ADAMファミリー蛋白質がどのように基質を認識し切断するか、という問題に興味深い示唆をあたえた¹⁶⁾。

RVV-XはP-IV型蛇毒メタロプロテアーゼであり、Mドメイン、Dドメイン、Cドメインをもつ重鎖と、2つのC型レクチン様構造をもつ軽鎖からなる(図1、および、図5a)。軽鎖Aの末端システイン残基は重鎖Cドメインの超可変領域にあるシステイン残基とジスルフィド結合を形成し、超可変領域が軽鎖との接触面を形成していた。軽鎖はハブ(*Trimeresurus flavoviridis*)などの毒に含まれる血液凝固因子結合蛋白質⁸⁾と非常に似た構造をもつ。これらの血液凝固因子結合蛋白質は、IX因子あるいはX因子のN末端部位にあるγ-カルボキシルグルタミン酸残基に富むGlaドメインに結合し、それらのリン脂質膜への結合を拮抗的に阻害することで凝固カスケードの増幅を阻止する^{8,17)}。

構造の類似性から、RVV-Xは2つの軽鎖のあいだのくほみでX因子のGlaドメインをエキソサイトとして認識する可能性が強く示唆された。X因子は、トリプシンなどほかのセリンプロテアーゼと同様にプロテアーゼによる切断を受け、新たに生じるN末端(ここでは、Ile195)のアミノ基が蛋白質の内部にたたまこまれることで触媒活性中心が形成され、活性化状態に遷移する(図5b)。RVV-Xは生理的な凝固カスケードでの活性化と同じ部位(Arg194-Ile195結合)を認識・切断しX因子を活性化する。それぞれの蛋白質がもつ可動性を考慮すると、Xa因子の立体構造はRVV-Xの立体構造の凹凸にうまくドッキングし、触媒部位と6.5 nm離れて存在するエキソサイトの存在がRVV-Xに非常に高い基質特異性をあたえると解釈することができた¹⁶⁾(図5c)。このモデルは、これまで得られている知見をすべて説明することができた。RVV-Xの軽鎖は、ほかの蛇毒類似蛋白質と同様にドメインスワッピング⁹⁾によりGlaドメイン結合性を獲得したと考えられるが、さらに、Mドメイン、Dドメイン、Cドメインをもつメタロプロテアーゼの超可変領域と結合することで高い基質特異性をもつ酵素として分子進化

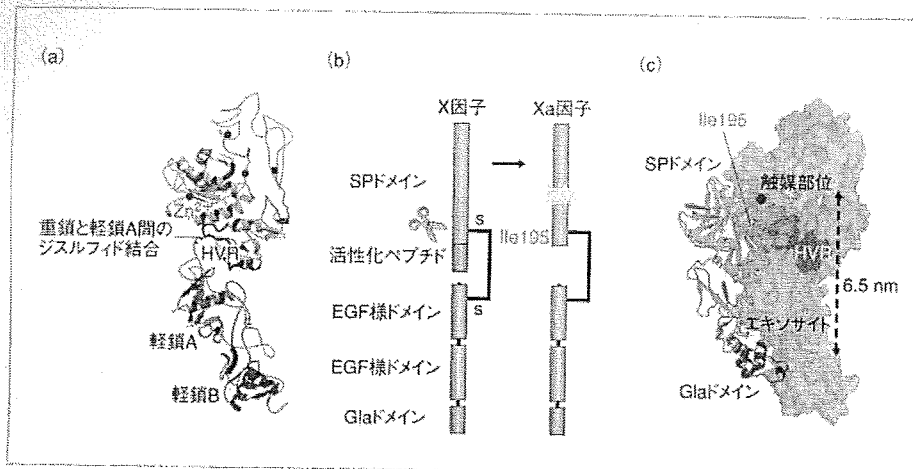


図5 RVV-Xの結晶構造とX因子の活性化機構。

(a) RVV-Xの結晶構造。超可変領域(HVR)が軽鎖Aとのジスルフィド結合を含む接触面を形成していた。
 (b) X因子の活性化機構の模式図。生理的な凝固カスケードあるいはRVV-Xの作用によってX因子の活性化ペプチドは切断され、活性化したXa因子となる。
 (c) RVV-X(表面表示)とXa因子(リボンモデル)とのドッキングモデル。RVV-Xでは、接触部位と6.5 nm 離れて存在する2つの軽鎖のあいだのくぼみがエキソサイトとしてX因子のGlaドメインを認識し、高い基質認識性を発揮しているものと考えられた。
 SPドメイン：セリンプロテアーゼドメイン。

したと考えられた。RVV-XによるX因子の切断機構は、膜型ADAMファミリー蛋白質においても、図3(b)に示すような、第3の蛋白質を介した基質認識機構の存在する可能性を示唆した。

おわりに

本稿では、筆者らの蛇毒ホモログ蛋白質の構造解析の結果を中心に、ADAMファミリー蛋白質について、最近、得られている構造生物学的な知見を紹介した。ADAMファミリー蛋白質はさまざまな膜蛋白質のシェディングに関与するが、多くの場合において、生理的な基質が何であるか、それがどのように識別されているか、というような基本的なことからわかっていないのが現状である。研究のむずかしさの理由のひとつには、膜構造に組み込まれた酵素と基質との反応である点があげられる。筆者らは、材料が比較的入手しやすく、安定で結晶化に適している点以外に、可溶性プロテアーゼとして機能する点において蛇毒ホモログに注目し研究を行ってきた。すなわち、RVV-Xのように基質が明確で溶液中で酵素反応が速度論的に進む系から、膜型ADAMファミリー蛋白質の基質認識機構の手掛かりを得られるのでは、との期待である。しかし、膜型ADAMファミリー蛋白質と基質とのそれぞれの可溶性部位どうしの反応では切断の再現されないことが多く、細胞膜での反応の理解には、ADAMファミリー蛋白質および基質の双方の、脂質ラフトへの集積、細胞内での局在化など、別の要因の検討も必要であることが指摘されている。また、ADAMファミリー蛋白質と基質とを仲介する蛋白質の候補があがっているが、今後、そのような蛋白質との複合体の構造が解明されることなどより、ADAMファミリー蛋白質

の基質認識機構の理解が飛躍的に進むことを期待したい。

文献

- 1) Blobel, C. P. *et al.* *Nature*, 356, 248-252 (1992)
- 2) Edwards, D. R., Handsley, M. M., Pennington, C. J. *Mol. Aspects Med.* 29, 258-289 (2009)
- 3) Wolfsberg, T. G. *et al.* *Dev. Biol.* 169, 378-383 (1995)
- 4) Black, R. A. *et al.* *Nature*, 385, 729-733 (1997)
- 5) Moss, M. L. *et al.* *Nature*, 385, 733-736 (1997)
- 6) Takeda, S. *Semin. Cell Dev. Biol.* 20, 146-152 (2009)
- 7) Fox, J. W., Serrano, S. M. *FEBS J.* 275, 3016-3030 (2008)
- 8) 山崎泰男・森田隆司: 蛋白質 核酸 酵素, 54, 628-634 (2009)
- 9) Takeda, S., Igarashi, T., Mori, H., Araki, S. *EMBO J.* 25, 2388-2396 (2006)
- 10) Igarashi, T., Araki, S., Mori, H., Takeda, S. *FEBS Lett.* 581, 2416-2422 (2007)
- 11) Fujii, Y. *et al.* *J. Mol. Biol.* 332, 1115-1122 (2003)
- 12) Takagi, J. *Curr. Opin. Cell Biol.* 19, 557-564 (2007)
- 13) Janes, P. W. *et al.* *Cell*, 123, 291-304 (2005)
- 14) Gerhardt, S. *et al.* *J. Mol. Biol.* 373, 891-902 (2007)
- 15) de Groot, R. *et al.* *Blood*, 113, 5609-5616 (2009)
- 16) Takeda, S., Igarashi, T., Mori, H. *FEBS Lett.* 581, 5859-5864 (2007)
- 17) Mizuno, H., Fujimoto, Z., Atoda, H., Morita, T. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 7230-7234 (2001)

武田 壮一

略歴：1996年名古屋大学大学院理学研究科博士課程 満期修了、同年 松下電器国際研究所 リサーチアソシエイト、1997年 博士(理学)、1998年 科学技術振興事業団 さきがけ研究員、2000年 理化学研究所 研究員を経て、2003年より国立循環器病センター 研究所 室長。
 研究テーマ：モジュラー蛋白質、蛋白質複合体の立体構造と作用機構の解明。

◆ 総 説 ◆

蛇毒メタロプロテアーゼの立体構造とラッセルクサリヘビ毒素によるX因子活性化機構

武田 壮一



武田 壮一

Crystal structures of snake venom metalloproteinases and the molecular mechanism of factor X activation by Russell's viper venom

Soichi TAKEDA

1991年3月 名古屋大学理学部生物学科卒業
 1996年7月 名古屋大学大学院理学研究科博士課程満期修了
 1996年8月 松下電器産業(株)国際研究所リサーチアシリエイト博士(理学)取得
 1998年10月 科学技術振興事業団さきがけ研究「形とはたらき」領域研究員
 2000年1月 理化学研究所構造生物化学研究室研究員
 2003年1月 国立循環器病センター研究所心臓生理研究室長現在に至る

Key words: snake venom metalloproteinase, crystal structure, ADAM/ADAMTS proteinase, factor X activator

1. はじめに

クサリヘビ科 (Viperidae) に属する毒蛇の毒液には様々なタンパク性の生理活性成分が含まれ、これらは獲物の体内で標的タンパク質と相互作用し、出血、壊死、浮腫、血栓形成、血圧降下などを引き起こし致死的な危害を与える。蛇毒からは血小板フィブリノーゲン/VWF 受容体 α IIb/33 インテグリンに結合するディスインテグリン、血漿タンパク質や血小板膜糖タンパク質などに結合するC型レクチン様タンパク質 (CLP)、トロンビン様セリンプロテアーゼ、など血液凝固阻害あるいは活性化因子として働く様々なタンパク質が単離され、その標的タンパク質に対する特異性の高さからこれまで血栓止血研究において大きな貢献をしてきた。これら蛇毒分子のいくつかについては本誌を含め既に詳しく解説されているので参照して頂きたい^{1)~6)}。トロンピンをはじめ生理的な凝固カスケードに関わる血漿因子群が総じて触媒活性基としてセリンを有するセリンプロテアーゼであるのに対し、出血性蛇毒には触媒部位に亜鉛イオンを含むメタロプロテアー

ゼ (snake venom metalloproteinase : SVMP) を多く含むのが特徴である。特に高分子量 (分子量約4万ダルトン以上) で複数のドメインを有するSVMPは高い出血活性や、高い基質特異性を持つものが多く、また一方でヒトを含む哺乳動物の膜結合プロテアーゼや von Willebrand 因子 (VWF) 切断酵素 ADAMTS13 などとの相同性を示すことから興味を持たれている。本稿ではこれら高分子量SVMPについて最近得られた構造生物学的知見、特に哺乳動物プロテアーゼ ADAM および ADAMTS との関係の前半で、後半で高分子量SVMPの中でも特にユニークな立体構造と作用機構を有するラッセルクサリヘビ由来X因子活性化酵素 (RVV-X) について紹介したい。

2. 蛇毒メタロプロテアーゼと哺乳動物 ADAM・ADAMTS

マムシやハブの毒成分の内、末梢血管を破壊し赤血球を血管外に漏出させる出血因子の正体がSVMPであり、致死因子の本体と考えられてい

国立循環器病センター研究所心臓生理部 [〒 565-8565 大阪府吹田市藤白台 5-7-1]
 Department of Cardiac Physiology, National Cardiovascular Center Research Institute
 [5-7-1 Fujishiro-dai, Suita, Osaka 565-8565, Japan]
 Tel: 06-6833-5012 Fax: 06-6835-5416 E-mail: stakeda@ri.ncvc.go.jp

る。SVMPには様々な分子量のものが存在するが、そのドメイン構造に基づき、P-IからP-IV型に分類されている(図1)⁷⁾。P-I型は約200アミノ酸残基のメタロプロテアーゼ(M)ドメインのみから成るSVMPである。P-II型はMドメインに続きディスインテグリン(D)ドメインを有する遺伝子構造を持つが、タンパク質レベルでの存在が明確でないことから、主に翻訳後に切断を受けてディスインテグリンを生じる前駆体としての機能を担っていると考えられている。P-III型SVMPはMDドメインおよびそれに続く約100アミノ酸から成るシステイン残基に富むシステインリッチ(C)ドメインを持つ。Cドメインのアミノ酸配列は既知構造モチーフとの相見が見られない。P-IV型はP-III型と同様のMDCドメインから成る長鎖とCLP様構造を持つ軽鎖2本から成るヘテロ三量体型のSVMPで、後で紹介するRVV-Xがその代表例である。これらSVMPのアミノ酸配列あるいはcDNA配列は1990年前後から相次いで決定されたが、これには岩永貞昭先生(現化血研顧問)らの研究グループ貢献が大きい。その後哺乳動物にもP-III型SVMPと類似のMDCドメイン構造を持つメタロプロテアーゼが見つかり、新規のメタロプロテアーゼファミリーとして注目された。ADAM(a disintegrin and metalloproteinase)はその構成ドメインやタンパク質の由来などに基づいて命名された⁸⁾。adamalysin, repolysinあるいはMDC proteinなどとも呼ばれるが、現在では特に哺乳動物由来のものについてはADAMが広く用いられている。ファーティリン(ADAM1, 2)は受精時の膜融合に関わる精子表面タンパク質として、メルトリン(ADAM9, 12および19)は筋管形成時の膜融合に関わる分子として報告された⁹⁾¹⁰⁾。いずれも当初想定された膜融合への直接関与は示されていないが、その後tumor necrosis factor- α (TNF- α)の切断遊離酵素(TNF- α converting enzyme, TACE)が17番目のADAM分子として報告され¹¹⁾¹²⁾、ADAMの生体内での重要な役割が認識されるようになった。現在までに約40種のADAMが報告され、ヒトの生体内では20のADAM遺伝子が機能していることが分かっている⁸⁾。哺乳動物ADAMの多くはMDC

ドメインの後にEGFドメインを介して一回膜貫通領域を持つI型膜タンパク質であるが、スプライスバリエーションとしてSVMPの様に可溶性プロテアーゼとして機能するものも報告されている。ADAMは各種増殖因子やサイトカインの前駆体、その受容体やカドヘリンなどの細胞接着分子などの切断遊離(ectodomain shedding)に関与し、リウマチ等の炎症性疾患、アルツハイマー病やがんなど、様々な疾患に関与することが知られている⁸⁾。1997年にADAMと相見があるが、膜貫通領域を持たず、反復したトロンボスポンジン・タイプIモチーフ構造を有するメタロプロテアーゼが報告された¹³⁾。同様のタンパク質はヒトでは19存在し、ADAMTS(ADAM with thrombospondin type1 motif)ファミリーと呼ばれる¹⁴⁾。VWF切断酵素ADAMTS13は13番目に報告されたADAMTS分子である。

3. ADAMの基本立体構造

1993年にP-I型SVMPであるadamalysinIIの結晶構造が解明され¹⁵⁾、その後複数のP-I型SMVPやヒトADAMのMドメインの結晶構造が報告されている¹⁶⁾¹⁷⁾。Mドメインは亜鉛イオンに配位する3つのヒスチジン残基と活性基として機能するグルタミン酸残基を含むコンセンサス配列(HEXXHXXGXXHD)とその下流にMetターンと呼ばれる3つのヒスチジン残基を底部で支える保存されたメチオニン残基を持つ。Mドメインの詳細な構造が明らかになっている一方、P-III型SVMPあるいはADAMのMDCドメイン全体の立体構造は長らく不明であった。著者らは北米に生息するガラガラヘビ(*Crotalus atrox*)由来のP-III型SVMPであるVAP1(vascular apoptosis-inducing protein-1)およびVAP2のX線結晶構造解析を行い、哺乳動物ADAMと共通した立体構造をはじめて明らかにした(図2A)。詳細な構造は原著¹⁸⁾¹⁹⁾あるいは総説等²⁰⁾²²⁾を参照して頂くとして、ここではエッセンスのみを紹介したい。P-III型SVMPとヒトADAMは分子全体で約40%程度のホモロジーを持つが、17あるSS結合や構造的なカルシウムイオン結合などMDCドメインの立体構造保持に関わるアミノ

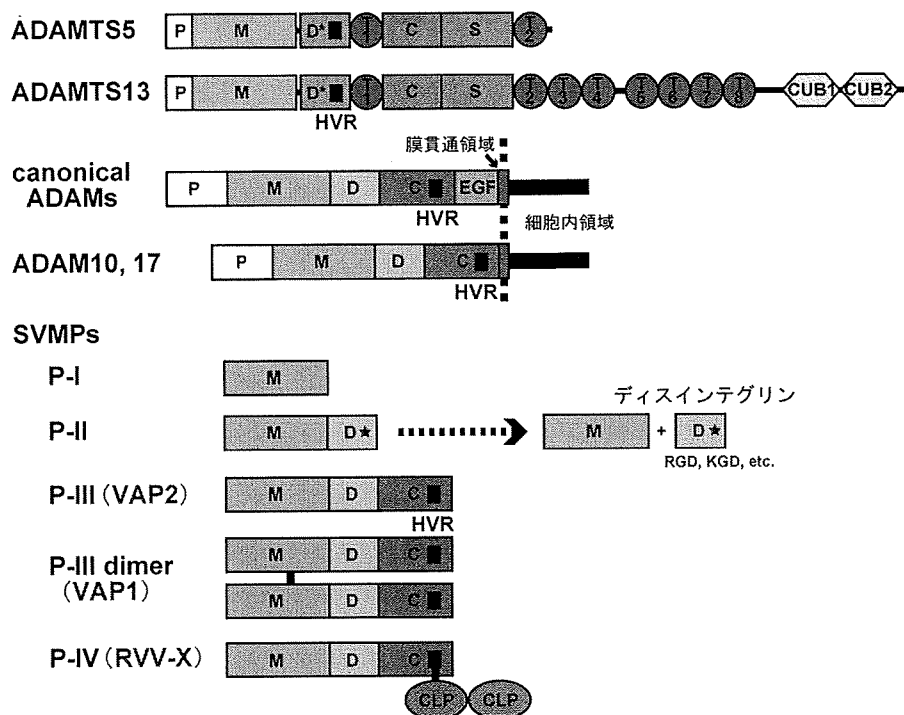


図1 SVMP, ADAMおよびADAMTSファミリープロテアーゼのドメイン構造の模式図. 各ドメインを色分けして模式的に示す.

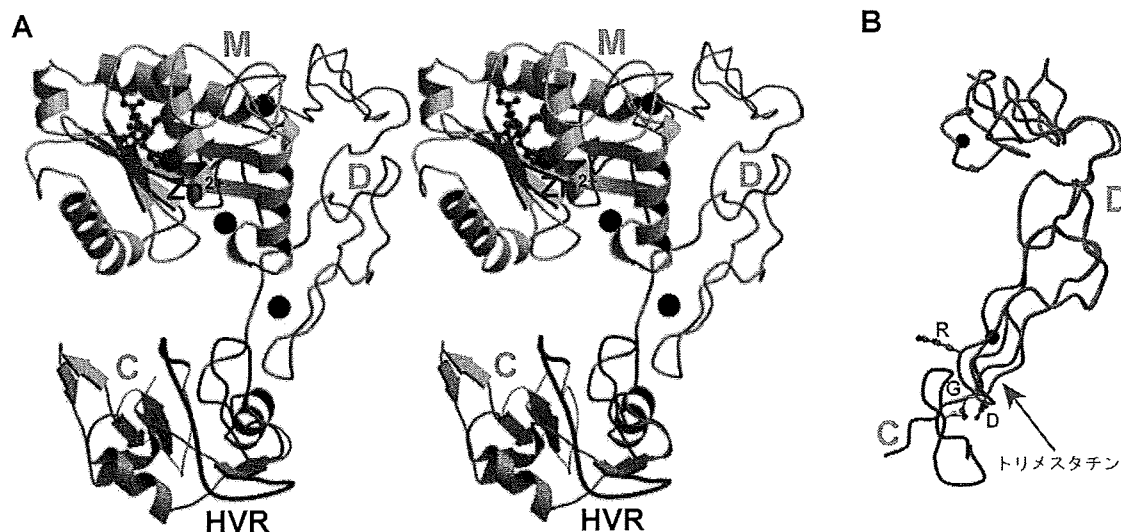


図2 ADAMのMDCドメイン部の立体構造. (A) VAP2の結晶構造 (PDBID: 2DW0) のステレオ図. 亜鉛イオン, カルシウムイオンをそれぞれ赤, 黒の球で示す. 阻害剤GM6001をマゼンタ, HVRを青で示す. Mドメイン (黄), Dドメイン (シアン+ピンク), Cドメイン (グレー+黄緑) を示す. (B) VAP2のDドメイン (Aと同色で示す) とRGDディスインテグリン・トリメスタチン (黄緑色) の結晶構造の重ね合わせ. ADAMではディスインテグリンのRGD配列に相当する部分が続くCドメインとのインターフェースとして用いられ, SS結合を含む連続構造をなしている.

酸残基はほぼ全て保存されていることが明らかになった。MDCドメインは全体としてアルファベットのC字型の形状を持ち、両末端部が近接していた。Cドメインは新規のフォールディングを持つことが分かった。興味深いことにインテグリンに作用するディスインテグリンとADAMのDドメインは全体の形状は非常に良く似ているものの、RGD配列に相当する領域がADAMのDドメインでは続くCドメインとの境界に位置し、SS結合を含む連続した構造となっていた(図2B)。すなわちADAMあるいはP-III型SVMPはRGD配列を含むディスインテグリンと同様な機序でのインテグリン結合活性を持たないことが示唆された。一方でC字型の分子構造で触媒部位に対面するCドメイン内の領域が非常に興味深い性質を持つことが判明した。我々は超過変領域(hyper variable region: HVR)と名づけたが、SVMP間あるいはADAM間で最もアミノ酸配列の保存性が低く、長さも多様な領域である。HVRは分子構造的にも溶媒露出度が高く柔軟なループ構造を持ち、インデュードフィットによるタンパク質間相互作用に適した構造を持つ。また、C字型のMDCドメイン構造の中で触媒部と対面する位置に存在する(図2A)。これらのことから著者らはHVRが基質そのもの、あるいは基質と相互作用するタンパク質と結合する部位である、即ち異なるADAMあるいはP-III型SVMPは異なるHVRを持ち異なるターゲットを認識する、という作業仮説を提案した^{19) 20)}。

P-III型SVMPの多くはP-I型に比べて高い出血活性を持つが、多くの場合実際のターゲット分子が不明で、またその作用メカニズムも良く分かっていない。一方、膜型ADAMについても基質の切断部位にコンセンサス配列が無く、どのように基質を識別しているかが不明である。構造的知見を基に、今後基質の同定や作用機序の解明が進むことを期待したい。

4. ADAMTSプロテアーゼの部分立体構造

当初ADAMTSファミリーに属するプロテアーゼはADAMと同様にMおよびDドメインを持ち、そのC末端側に最初のTSR(T1)ドメインが挿

入され、Cドメインが続くと考えられていた(図1)。しかし、最近ADAMTS1, 4および5の部分結晶構造が解明され、これまでDドメインとされていた領域(今後D*と呼ぶ)がディスインテグリン様の立体構造を持たず、実はADAMのCドメインと相同の構造を持つことが明らかになった^{23) 24)}。そのADAMTSのD*ドメインの立体配置であるが、Mドメイン部分でADAMと重ね合わせると非常に興味深い(図3A)。先に述べたようにADAMのCドメインはC字型のMDCドメイン構造により切断基質の上流側で(図では左側より)触媒部と対面する。しかし、ADAMTSではMドメインのC末端側はADAMと反対側に伸びたループ構造であり、続くD*ドメインはMドメインと直接接触し、基質切断部位の下流側(図で右側)に位置している。即ち、ADAMとADAMTSではMドメインに対するC末端側のドメインの相対的位置が全く異なる。さらに興味深いことにD*ドメインのHVRはMドメインの基質が結合する溝からそのまま続く領域に位置し、切断基質のC末端側領域を直接認識する可能性が強く示唆されている(図3B)²⁰⁾。最近、ADAMTS13のD*ドメインHVR内のアミノ酸残基がVWFの切断に重要であることが示され、HVRが基質認識に直接関与することがはじめて実験的に示された²⁵⁾。

5. ラッセルクサリヘビ毒X因子活性化酵素

インド、東南アジア地区に広く生息するラッセルクサリヘビ(*Daboia russelli russelli* および *Daboia russelli siamensis*)の毒は古くより非常に強い血栓形成作用を持つことが知られている。この蛇毒にはX因子およびIX因子に特異的に作用して活性化する酵素RVV-X(Russell's viper venom factor X activator)が含まれ、その基質特異性の厳密さから注目されてきた²⁶⁾。RVV-XによるX因子の水解には生理的な活性化とは異なりリン脂質膜や他のタンパク質との複合体形成が必要ない。また触媒部の立体構造が全く異なるため、血液中に存在するセリンプロテアーゼインヒビター(セルピン)が作用しない点の特徴である。先に述べたようにRVV-XはP-IV型SVMP

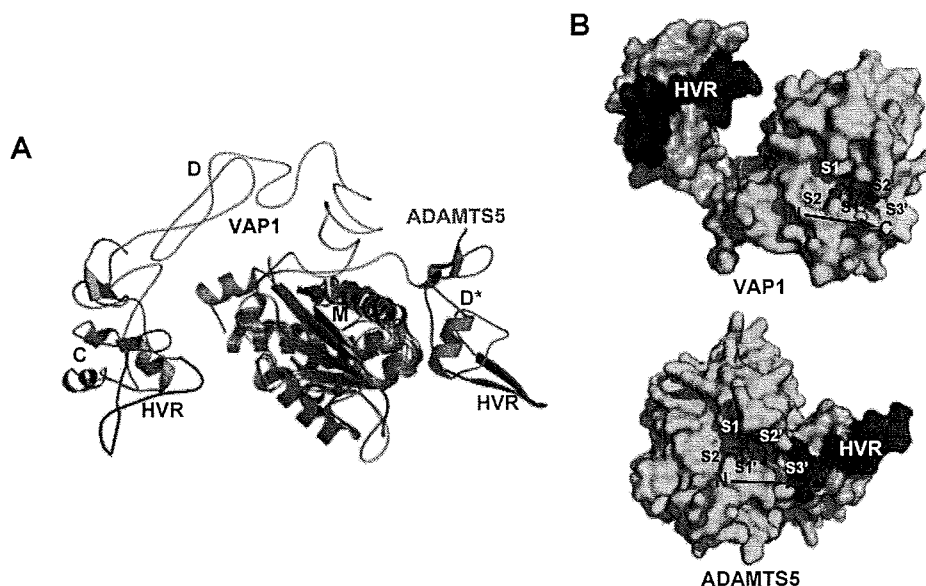


図3 ADAM (VAP1) と ADAMTS (ADAMTS5) の構造比較. (A) VAP1 (PDBID:2ERP) と ADAMTS5 (PDBID:2RJQ) の M ドメインの重ね合わせを示す. M ドメインの構造は非常に保存されているが、続く C 末側ドメインの位置関係は VAP1 と ADAMTS5 で大きく異なる. (B) VAP1 (左) および ADAMTS5 (右) の触媒部位と HVR の関係をそれぞれ分子表面モデルで示す. M ドメインを黄色, C (D*) ドメインを黄緑色, HVR を青色, その他の部分をグレーで示す. それぞれ, 阻害剤 (マゼンタ) の結合様式から基質の認識様式 (結合部位 S2-S2') が推測されている.

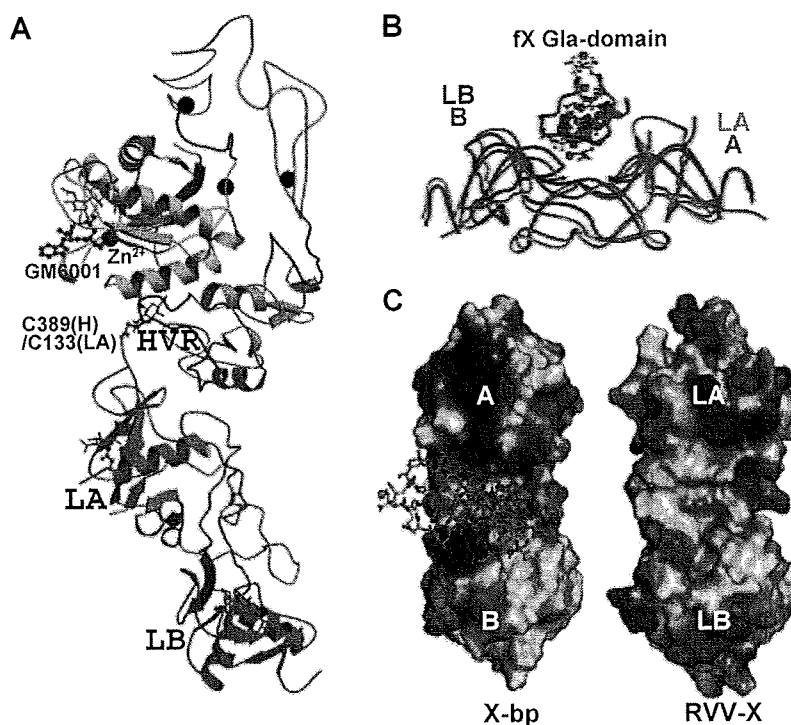


図4 RVV-X の結晶構造. (A) 重鎖の各サブドメインは図2に準じた色で, 軽鎖はオレンジ (LA) 及びマゼンタ (LB) で示す. 結合する亜鉛イオン (赤), カルシウムイオン (黒) は球で示す. (B) X-bp/GLA ドメイン複合体 (PDBID:1HOD, CLP 部分をグレー, GLA ドメインをピンク, 結合したカルシウムイオンを緑色で示す) と RVV-X 軽鎖部 (オレンジおよびマゼンタ) の重ね合わせ. (C) X-BP (左) と RVV-X 軽鎖部 (右) の表面形状および電荷分布の比較.

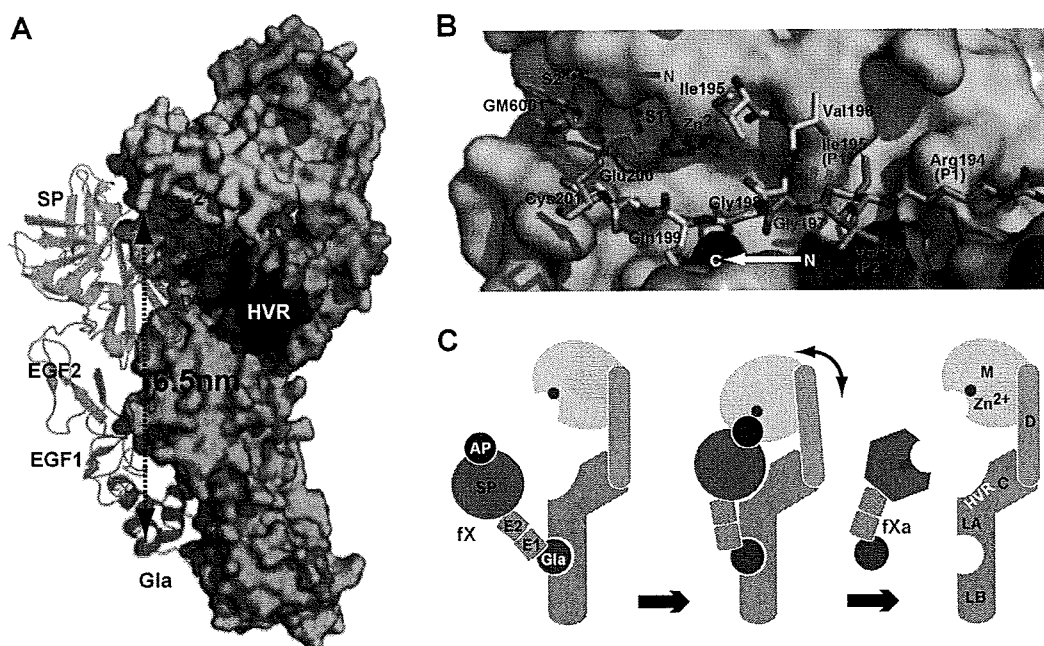


図5 RVV-XによるX因子活性化機構。(A)ドッキングモデル。RVV-Xは図4に準じて色付けた分子表面を示し、Xa因子はリボンモデルで示す。Xa因子はセリンプロテアーゼ(SP)、EGFドメインを鎌田らの結晶構造(PDBID:1XKA)、GLAドメインを水野らの結晶構造(PDBID:1IOD)を基にドメインの可動性を考慮してモデルを作成した。(B)X因子側より見たドッキングモデルを示す。活性化したXa因子(グレー)では切断端のIle195のアミノ基は分子内部に潜り込んでいるが、前駆体の活性化ペプチド(AP)はピンクで示すように分子表面に露出した構造を持つと推測される。この時切断されるペプチド鎖の向きは阻害剤GM6001(緑色)の結合様式から推測される基質の触媒部位への結合の向きと一致する。(C)RVV-XによるX因子活性化機構の模式図。

であり、分子内にADAM型の長鎖とCLP型の軽鎖2本を含むヘテロ三量体であり、軽鎖同士および一つの軽鎖と長鎖はSS結合で結ばれている。このラッセルクサリヘビ毒にはRVV-Xとは別にV因子に作用し活性化する酵素RVV-Vの存在が知られるが、こちらはトロンピン様のセリンプロテアーゼである。

6. RVV-Xの立体構造

著者らはRVV-Xの結晶構造を2.9 Åの分解能で決定した(図4)²⁷⁾。アミノ酸配列からの予想通り、分子はP-III型SVMPやADAMのC字型のMDCドメイン構造を持つ長鎖部とCLP構造を持つ軽鎖(LAおよびLB)から成っていた(図4A)。長鎖のHVR領域にあるシステイン残基C389とLAのC末端システイン残基(C133)間のSS結合が確認された。また、HVRとLA

はSS結合のみならず、複数の疎水性残基同士の相互作用を形成し、その結果長鎖のCドメインと軽鎖部は一体として機能することが示唆された。軽鎖部は凝固因子結合タンパク質群(X-bp, IX-bpおよびIX/X-bp³⁾²⁹⁾と表面電荷分布を含め、非常に類似した構造を持つ(図4B, C)。X-bpはX因子のGlaドメインに非常に高い親和性で結合し無力化する毒素である。構造の類似性からRVV-Xが2本の軽鎖の中央部で形成する窪みがGlaドメインを認識するエクソサイトである可能性が示唆された。HVR内のシステイン残基C389は他のSVMPやADAMには見られず、またLAのC133はX-bpなど凝固因子Glaドメインに結合する蛇毒CLPでは保存されていない。血小板GPI bに作用するフラボセチンAのαサブユニットはRVV-XのLAと同じ箇所にシステイン残基を有している。フラボセチンAではもう一方のβサブユニットがN末端に余分なシステイン残

基を有し、これらが互い違いに SS 結合を成して環状 4 量体構造を形成している²⁹⁾。

7. RVV-X による X 因子活性化機構

得られた RVV-X の結晶構造と既に報告されている Xa 因子 (PDB: 1XKA)^{30) 31)} および X-bp と X 因子 Gla ドメイン複合体の結晶構造^{29) 32)} (PDB: 1IOD) を基にドッキングモデルを作成した²⁷⁾。これまでの知見から X 因子の二つの EGF ドメイン間および Gla ドメインと FGF1 の間は溶液中で高い自由度を持つことが示されている。Gla ドメインが X-bp と同様に RVV-X 軽鎖の中央部に結合すると仮定すると、想定されるドメイン間の可動範囲で RVV-X 分子の表面に分子構造の凹凸を基に Xa 因子の分子構造をうまく合わせることが出来た (図 5)。前駆体である X 因子の結晶解析はなされていないが、他のセリンプロテアーゼ同様に前駆体では切断部位 (Arg194-Ile195 結合) が分子表面に露出していると考えられる (図 5B)。このドッキングモデルでは想定される切断部のポリペプチド鎖の向きがちょうど RVV-X の活性クレフトに結合できる向きと一致し、また MDC 部に内在する可動性で十分結合可能な近傍に位置している。

RVV-X は触媒部と立体構造的に約 6.5nm 離れて存在するエクソサイトで X 因子の Gla ドメインを認識することで高い基質特異性を発揮すると考えられる (図 5C)。このモデルは RVV-X が Gla ドメインを欠損した X 因子を活性化出来ない事、また活性化に Gla ドメインのフォールディングに必要な mM オーダーのカルシウムイオンの存在が必要な事など²⁶⁾、これまでの知見をよく説明する。

8. おわりに

著者らは ADAM において HVR が基質あるいは基質と結合するタンパク質を認識する部位であるとの仮説を提案した。RVV-X は X 因子の Gla ドメインを認識するエクソサイトを軽鎖として持ち、HVR はその軽鎖とのインターフェースとして機能している点で大変興味深い。RVV-X 軽鎖

は X-bp 等と同様にドメインスワッピング^{1) 3)}により Gla ドメイン結合性を獲得したと考えられるが、さらに MDC ドメイン構造を有するメタロプロテアーゼの HVR 部と結合することで、RVV-X は基質特異性の非常に高い酵素として進化したと考えられる。RVV-X の立体構造とそれから見出される作用規序は、蛇毒素と生体分子の相互作用の理解に留まらず、ADAM および ADAMTS プロテアーゼの基質認識機構にも重要な示唆を与えるものである。

文 献

- 1) 山崎泰男, 森田隆司: 毒ヘビによってつくりだされる血液毒蛋白質の構造と機能〜トキシン研究はいまなお有効か?。蛋白質・核酸・酵素 54, 628-634, 2009.
- 2) 千谷晃一, 松井太衛: 蛇毒と血栓止血学。血栓止血誌 16, 233-235, 2005.
- 3) 森田隆司, 水野洋: Factor IX/Factor X-binding protein の立体構造と機能—3D ドメインスワッピング機構で新しい機能を獲得した血液凝固因子結合タンパク質—。血栓止血誌 10, 305-309, 1999.
- 4) 武谷浩之: ディスインテグリンの構造・機能相関。血栓止血誌 11, 211-217, 2000.
- 5) 松井太衛, 広津晶子, 水野洋: フォン・ビルブランド因子のモジュレータータンパク質であるボトロセチンの立体構造と機能。血栓止血誌 12, 240-245, 2001.
- 6) 井上克枝: Snakes know everything about human hemostasis. 血栓止血誌 19, 826-832, 2008.
- 7) Fox JW, Serrano SM: Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprotolysin family of metalloproteinases. Toxicon 45, 969-985, 2005.
- 8) Edwards DR, Handsley MM, Pennington CJ: The ADAM metalloproteinases. Mol Aspects Med 29, 258-289, 2009.
- 9) 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 356, 248-252, 1992.
- 10) Yagami-Hiromasa T, Sato T, Kurisaki T, Kamijo K, Nabeshima Y, Fujisawa-Sehara A: A metalloproteinase-disintegrin participating in myoblast fusion. Nature 377, 652-656, 1995.
- 11) Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, Peschon JJ, Slack JL, Wolfson MF, Castner BJ, Stocking KL, Reddy P, Srinivasan S, Nelson N, Boiani N, Schooley KA, Gerhart M, Davis R, Fitzner JN, Johnson RS, Paxton RJ, March CJ, Cerretti DP: A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- α from cells. Nature 385, 729-733, 1997.
- 12) Moss ML, Jin SL, Milla ME, Bickett DM, Burkhart W, Carter HL, Chen WJ, Clay WC, Didsbury JR, Hassler D, Hoffman CR, Kost TA, Lambert MH, Leesnitzer MA, McCauley P, McGeehan G, Mitchell J, Moyer M, Pabel G, Rocque W, Overton LK, Schoenen F, Seaton T, Su JL, Warner J, Willard D, Becherer JD: Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor- α . Nature 385, 733-736, 1997.
- 13) 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 272, 556-562, 1997.

- 14) Porter S, Clark IM, Kevorkian L, Edwards DR : The ADAMTS metalloproteinases. *Biochem J* **386**, 15-27, 2005.
- 15) Gomis-Ruth FX, Kress LF, Bode W : First structure of a snake venom metalloproteinase : a prototype for matrix metalloproteinases/collagenases. *EMBO J* **12**, 4151-4157, 1993.
- 16) Maskos K, Fernandez-Catalan C, Huber R, Bourenkov GP, Bartunik H, Ellestad GA, Reddy P, Wolfson MF, Rauch CT, Castner BJ, Davis R, Clarke HR, Petersen M, Fitzner JN, Cerretti DP, March CJ, Paxton RJ, Black RA, Bode W : Crystal structure of the catalytic domain of human tumor necrosis factor- α -converting enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 3408-3412, 1998.
- 17) Orth P, Reichert P, Wang W, Prosser WW, Yarosh-Tomaine T, Hammond G, Ingram RN, Xiao L, Mirza UA, Zou J, Strickland C, Taremi SS, Le HV, Madison V : Crystal structure of the catalytic domain of human ADAM33. *J Mol Biol* **335**, 129-137, 2004.
- 18) 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* **25**, 2388-2396, 2006.
- 19) 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* **581**, 2416-2422, 2007.
- 20) Takeda S : Three-dimensional domain architecture of the ADAM family proteinases. *Semin Cell Dev Biol*, **20**, 146-152, 2009.
- 21) Takeda S : VAP1 : snake venom homolog of mammalian ADAMs. in *Handbook of Metalloproteins* (ed. Messerschmidt, A.) John Wiley & Sons, Inc., 2008.
- 22) 武田社一 : ADAM フェミリータンパク質のドメイン構造. *生化学* **79**, 1051-1055, 2007.
- 23) Gerhardt S, Hassall G, Hawtin P, McCall E, Flavell L, Minshull C, Hargreaves D, Ting A, Pauptit RA, Parker AE, Abbott WM : 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* **373**, 891-902, 2007.
- 24) Mosyak L, Georgiadis K, Shane T, Svenson K, Hebert T, McDonagh T, Mackie S, Olland S, Lin L, Zhong X, Kriz R, Reifenberg EL, Collins-Racie LA, Corcoran C, Freeman B, Zollner R, Marvell T, Vera M, Sum PE, Lavallie ER, Stahl M, Somers W : Crystal structures of the two major aggrecan degrading enzymes, ADAMTS4 and ADAMTS5. *Protein Sci* **17**, 16-21, 2008.
- 25) de Groot R, Bardhan A, Ramroop N, Lane DA, Crawley JT : Essential role of the disintegrin-like domain in ADAMTS13 function. *Blood*, 2009.
- 26) Morita T : Proteases which activate factor X, 179-208 (Alaken, Colorado, 1998).
- 27) Takeda S, Igarashi T, Mori H : Crystal structure of RVV-X : An example of evolutionary gain of specificity by ADAM proteinases. *FEBS Lett* **581**, 5859-5864, 2007.
- 28) Mizuno H, Fujimoto Z, Atoda H, Morita T : Crystal structure of an anticoagulant protein in complex with the Gla domain of factor X. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 7230-7234, 2001.
- 29) Fukuda K, Mizuno H, Atoda H, Morita T : Crystal structure of flavocetin-A, a platelet glycoprotein Ib-binding protein, reveals a novel cyclic tetramer of C-type lectin-like heterodimers. *Biochemistry* **39**, 1915-1923, 2000.
- 30) Kamata K, Kawamoto H, Honma T, Iwama T, Kim SH : Structural basis for chemical inhibition of human blood coagulation factor Xa. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 6630-6635, 1998.
- 31) 鎌田健司, 宮田敏行 : 凝固第Xa因子の立体構造. *血栓止血誌* **10**, 181-188, 1999.
- 32) 森田隆司, 水野洋 : Glaドメインの立体構造と機能. *血栓止血誌* **11**, 391-396, 2000.