

ADAMTS13 の構造と機能 —いかにして血流中で von Willebrand 因子を 認識し切断するか—

Structure and function of ADAMTS13, the recognition and cleavage of von Willebrand factor under blood flow

森木隆典*
Takanori MORIKI



森木隆典

1988年 慶應義塾大学医学部卒業、慶應義塾大学医学部内科研修医
1990年 静岡赤十字病院内科専修医
1992年 慶應義塾大学医学部内科助手（血液・感染・リウマチ内科）
1997年 米国スクリプス研究所細胞生物学部門研究員
2000年 慶應義塾大学保健管理センター専任講師
2009年 慶應義塾大学保健管理センター准教授、医学部臨床検査医学兼任、現在に至る。

Key words: ADAMTS13, von Willebrand factor, shear stress, conformational activation

Points

- ① ADAMTS13 は、ずり応力下で von Willebrand 因子 (VWF) を切断することにより、生体内での血栓形成反応を制御している。
- ② ADAMTS13 の酵素活性は、VWF が血管内皮細胞から分泌される際や、ずり応力下での血栓形成時に発揮されるものである。
- ③ ADAMTS13 は常に活性化した状態にあるのではなく、構造変化によって適切なタイミングで VWF を切断することが分かってきた。

1. はじめに

血管内皮細胞が損傷を受け内皮下組織が露出されると、血液中の von Willebrand 因子 (VWF) が露出部のコラーゲンに結合する。この VWF に血小板膜蛋白 GPIb/IX 複合体が結合することにより、血栓形成反応の第 1 ステップである血管損傷部位への血小板の粘着反応が開始される。その後、第 2 ステップとして血小板の活性化が起こり、血小板の内皮下組織

への強い結合、VWF とフィブリノーゲンを介しての血小板凝集反応、活性化した血小板リン脂質膜上での凝固カスケードの動員、等々を通して強固な血栓が形成される¹⁾。

血管内皮細胞で合成された VWF は、200 個以上の分子が結合した超巨大分子 (マルチマー) として血流中に分泌されている。この超巨大分子は適切な長さに切断されないと、血小板膜蛋白 GPIb/IX 複合体との反応性が高いため、血流中で血小板血栓が形成され、細血管塞栓を生じ臓器障害を引き起こしてしまう。この病態は、血栓性血小板減少性紫斑病 (Thrombotic thrombocytopenic purpura; TTP) として理解されている疾患であるが、この発症機序が、VWF マルチマーの切断酵素である ADAMTS13 の活性低

*責任者連絡先:

慶應義塾大学 保健管理センター
〒160-8582 東京都新宿区信濃町 35
Tel: 03-5363-3634, Fax: 03-5363-3635
E-mail: TakaMoriki@aol.com

下であることが近年明らかにされた²⁾。その後、ADAMTS13がVWFをどのように認識し切断するのかについての知見が発表され続けているが、この分野におけるわが国の研究者の業績は大きく、ADAMTS13のクローニング、産生部位の同定、活性測定法、疾患との関連、等々、多岐にわたっている。これらの経過については、「ADAMTS13物語」³⁾として、また、結晶構造解析⁴⁾についても本誌のバックナンバーに総説が収録されているので、ぜひとも参照していただければ幸いである。本小論では、最近明らかになったADAMTS13の構造変化による活性化機構を中心に紹介する。

2. ADAMTS13の生理的役割

生体内においてVWFの機能は精緻にコントロールされている。一番の特徴は、VWFが血流によって引き起こされるずり応力にさらされた時、または内皮下組織へ結合し固相化された時に初めて分子構造変化が起こり、血小板膜蛋白 GPIb/IX 複合体と結合して血栓形成反応が開始されるという仕組みである⁵⁾。即ち、VWFは血液中を定常状態で流れている状況では血小板と結合することはない。

血管が損傷を受け血管内皮細胞が脱落すると、血液中を流れているVWFは内皮下組織にあるコラーゲンに結合し伸展した構造へと変化する。この構造を血小板膜蛋白 GPIb/IX 複合体が認識すると、血小板が内皮下組織に粘着し血栓形成が開始される。ADAMTS13は、この伸展した構造となったVWFを認識し切断することにより、血小板粘着反応が行き過ぎないように制御していると考えられる(図1a)。また、血管の狭窄などにより血流速度が増加し、大きなずり応力が生じているような場合にもVWFは伸展した構造になり血小板と結合しやすい状態になっていると考えられるが、ADAMTS13は、この状態のVWFを認識し切断することにより、血管内での血栓形成を抑制していると考えられる。

VWFはマルチマー構造を取って血管内皮細胞から分泌されるが、ADAMTS13活性が低下すると、分泌中の長いマルチマー構造に血小板が接着することが報告されている⁶⁾。このことより、ADAMTS13は、分泌直後の長いVWFマルチマーを適切な長さ

に切断して血小板膜蛋白 GPIb/IX 複合体との反応性を低下させることにより、血流中でVWFマルチマーが血小板と結合するのを防ぐ役割があると予想される(図1b)。

3. ADAMTS13の構造とVWF認識機構

ADAMTS13はADAMTSファミリーに属する亜鉛メタロプロテアーゼであり、多数のドメインが連結した構造を取っている(図2a)。N末端側から、メタロプロテアーゼ(M)ドメイン、ディスインテグリン様(D)ドメイン、トロンボスポンジン1型モチーフ(T or T1)、システインリッチ(C)ドメイン、スパーサー(S)ドメイン、連続した7個のTSP-1ドメイン(T2-T8 or TSP1 repeat)および2個のCUB1-2ドメインから構成される。生体内におけるADAMTS13の基質として同定されているのはVWFのみであり、VWFのA2ドメインに存在するTyr¹⁶⁰⁵-Met¹⁶⁰⁶を切断する(図2b)。

ADAMTS13の様々な領域を除去した変異体と、VWF-A2ドメインの切断部位を含むペプチド基質を用いた実験により、*in vitro*の静止系においてADAMTS13の切断活性と関連するのはMドメインからSドメイン(MDTCS)までが必要かつ十分な領域であり、T2-8、CUB1-2ドメインが存在しなくても活性に影響を及ぼさないことが判明している。基質の結合に関しては、CS領域が重要であり、TTP患者においてはとくにSドメインを認識する自己抗体が病態と強く関わっている可能性が報告されている⁷⁻¹⁵⁾。

さらに、ADAMTS13のVWF認識機構として結晶構造解析からの知見が明らかとなっている。VWF-A2ドメインは、定常状態では折りたたまれた球状構造となっておりADAMTS13切断部位は内部に埋もれているが、ずり応力によってC末側が引き延ばされると線状構造なり、切断部位とエキソサイト結合領域が露出しADAMTS13との相互作用が可能になる。Dドメイン、Cドメイン、Sドメインの3カ所にVWF結合エキソサイトが存在している¹⁶⁾。

また、生体内におけるADAMTS13によるVWF切断は血流中で起こる反応であることより、*in vitro*でのフローの系やマウスを用いた検討が報告されて

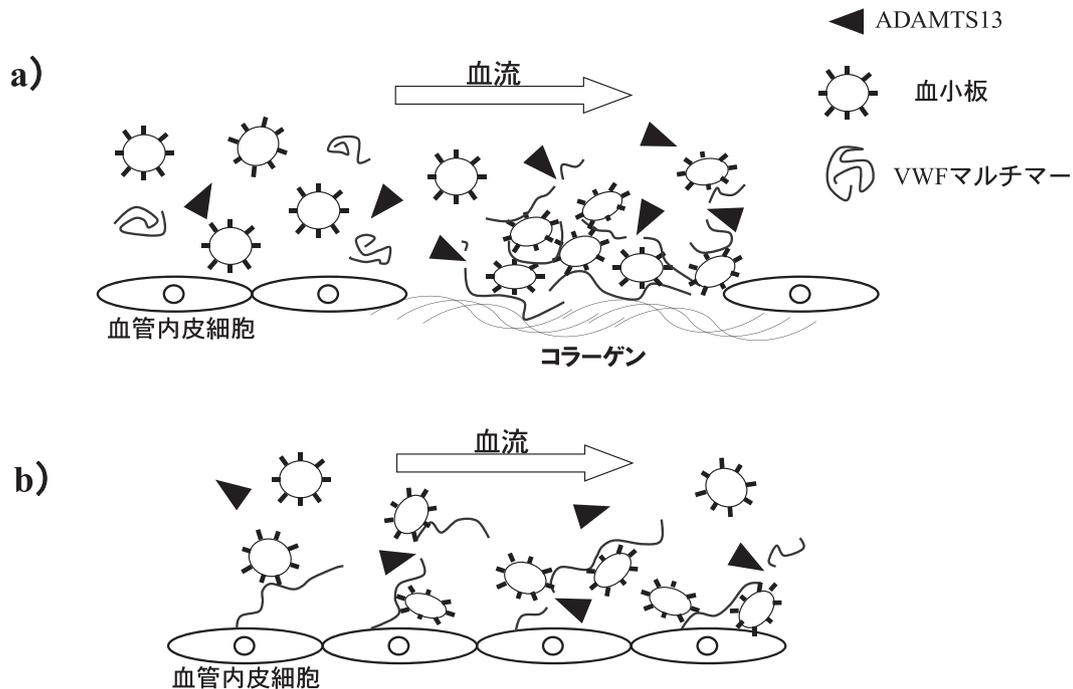


図1 ADAMTS13の生体内における役割

a) 速い血流下で血小板血栓が形成される初期段階

血管内皮細胞が損傷すると、血液中のVWFマルチマーは内皮下組織にあるコラーゲンに結合し伸展した構造へと変化する。この構造を血小板膜蛋白GPIIb/IX複合体が認識すると、血小板が内皮下組織に粘着し血栓形成が開始される。ADAMTS13は、この伸展した構造となったVWFを認識し切断することにより、血小板粘着反応が行き過ぎないように制御している。

b) VWFマルチマーが血管内皮細胞から分泌される時

ADAMTS13は、分泌直後の長いVWFマルチマーを適切な長さに切断し、血流中で血小板血栓が形成されないように制御している。

いる^{17,18)}。フローの系においても活性を發揮するための最小領域がMDTCSであることは静止系と同様であるが、C末側のT2-8, CUB1-2が欠損すると活性が低下すること等より、生体内においてはC末側のT2-8, CUB1-2に生理的な機能が存在することが示唆されてきた。

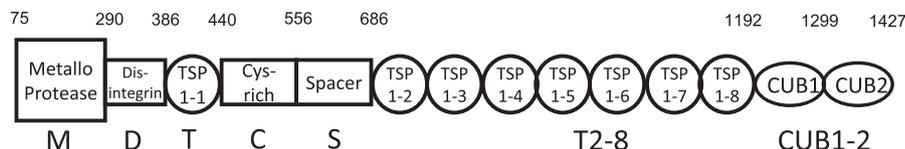
以上をまとめると、1)ADAMTS13は、ずり応力下に伸展したVWF-A2領域を、MDTCS領域を介して認識し切断しており、2)生体内においてはT2-8, CUB1-2の生理的作用が存在し活性に関与している、となる。MDTCSの活性は、*in vitro*でも*in vivo*でも変わらないことより、C末側T2-8, CUB1-2が生体内での活性を調節している可能性が高い。これまでも、*in vitro*静止系において、C末側T2-8, CUB1-2を有しないMDTCSが、全長ADAMTS13よりもわずかに活性が高いこと¹⁹⁾、TSP1 repeat領域

がVWF-D4領域に結合すること^{20,21)}、T2-8, CUB1-2を認識するモノクローナル抗体が活性に影響を及ぼす可能性等が報告されてきた²²⁾。また、フローの系においても、CUB-1ドメインに由来するペプチドがVWFの切断を阻害すること等が報告されている²³⁾。これらのC末側ドメインの活性調整機構については不明な点が多かったが、最近になって包括的なモデルが提唱されたので以下に紹介したい。

4. ADAMTS13の血流中におけるVWFの認識と切断機構

South²⁴⁾らは、活性上昇を呈するADAMTS13のS領域変異体(gain of function mutant: GoF)R568K/F592Y/R660K/Y661F/Y665F²⁵⁾と野生型(wild type: WT)に関して、GoFはWTが構造変化により活性化し

a) ADAMTS13



b) VWF

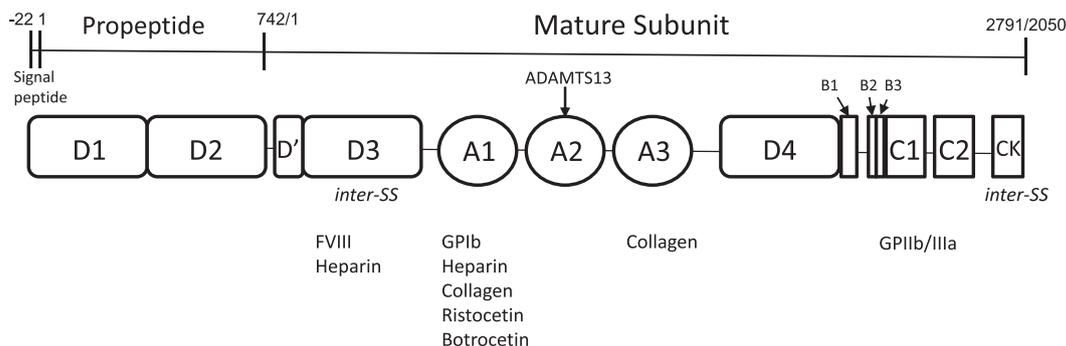


図2 ドメイン構造

数字はアミノ酸番号を示す。

a) ADAMTS13

N末端側から、メタロプロテアーゼ(M)ドメイン、ディスインテグリン様(D)ドメイン、トロンボスポンジン1型モチーフ(T or T1)、システインリッチ(C)ドメイン、スペーサー(S)ドメイン、連続した7個のTドメイン(T2-T8 or TSP1 repeat)、2個のCUB1-2ドメイン。

b) von Willebrand 因子(VWF)

プロペプチドはFurinによって切断され成熟サブユニット(2050アミノ酸)となる。ADAMTS13による切断部位はA2ドメインに存在するTyr¹⁶⁰⁵-Met¹⁶⁰⁶である。

たものという見通しを立て、そのトリガーはVWF-D4CK領域への結合と予想した。WTにD4CKを添加したところ、予想通り酵素活性は上昇したが、GoFにD4CKを添加しても変化は認められなかった。また、CUB2ドメインを認識するモノクローナル抗体20E9を添加したところ、WTでは酵素活性の上昇が観察されたが、GoFの酵素活性は不変であった。このことより、WTにおいてはCUBドメインがS領域に結合して酵素活性を抑制する構造を取っており、VWF-D4CK領域への結合によってCUBドメインの結合が解除され活性化するというモデルが考えられた。GoFではS領域の変異によりCUBドメインがS領域に結合できない伸展型の構造を取っており、常に活性型を呈していると予想される。これらの構造上の相違は、透過型電顕でも観察された。

Muia²⁶⁾らは、TTP患者由来の自己抗体の中に

ADAMTS13活性を上昇させるものがあることを見出し、C末側のT2-8/CUBを有しないMDTCSでは、この効果が認められないことを示した。さらにモノクローナル抗体をスクリーニングしたところ、ADAMTS13活性を上昇させるものがT8からCUB領域にかけて複数存在することを示した。さらに、Southらと同様、VWF-D4を添加するとADAMTS13活性が上昇することを確認した。これらの結果より、C末側のT8-CUBがVWF-D4に結合すると、不活性型の状態から活性型に変化するアロステリックな機構を有することが考えられる。

以上の報告をもとに、ADAMTS13の構造変化による活性化モデルを図3に示す。定常状態の血流中では、ADAMTS13のC末側にあるTSP1 repeat領域は折りたたまれており、CUBドメインがSドメインに結合することによって、基質であるVWFと

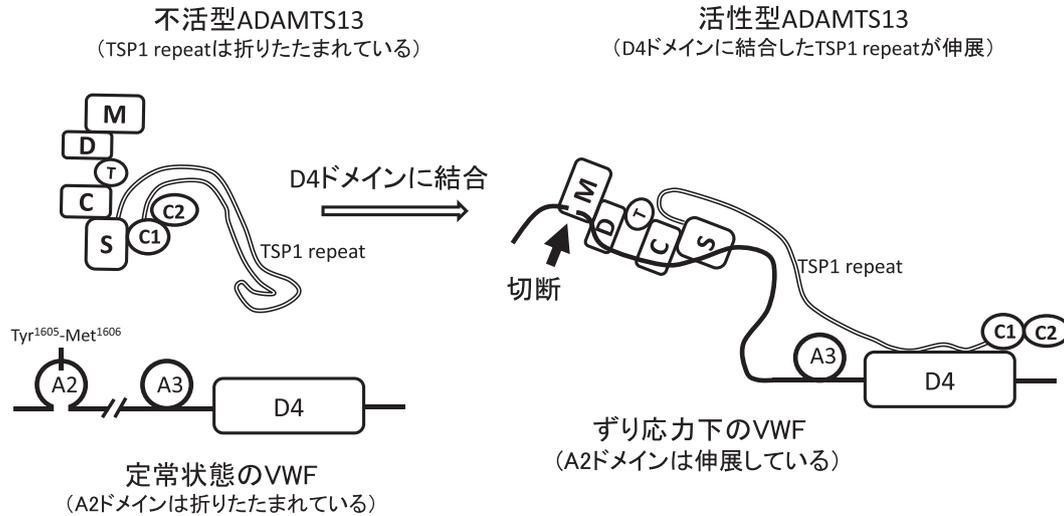


図3 ADAMTS13の活性化モデル

定常状態の血流中ではC末側のTSP1 repeat領域(2重線部分)は折りたたまれておりCUBドメインがSドメインに結合しているため不活型となっている。TSP1 repeat領域がVWF-D4ドメインに結合するとアロステリックな構造変化が起こり、CUBドメインがSドメインから離れて基質と結合できる構造となると考えられているが、この部分の詳細な機序は未だ不明である。ずり応力や固相化によりVWF-A2ドメインが伸展すると、S、C、Dドメインに存在するエキソサイトを介して結合し、Mドメインが、露出したTyr¹⁶⁰⁵-Met¹⁶⁰⁶を切断する。

の接触を阻害しているため不活型となっている。一方VWFのA2ドメインも折りたたまれており、ADAMTS13切断部位であるTyr¹⁶⁰⁵-Met¹⁶⁰⁶は埋もれた状態となっているため、ADAMTS13のMDTCS領域に接触することはない。不活型のADAMTS13のTSP1 repeat領域がVWF-D4ドメインに結合するとアロステリックな構造変化が起こり、CUBドメインがSドメインから離れて基質と結合できる構造となると考えられるが、この部分の詳細な機序は不明な点も多く、今後の検討が待たれるところである。この構造変化の後に、ずり応力下にVWF-A2ドメインが伸展すると、MDTCSは、Sドメイン、Cドメイン、Dドメインに存在するエキソサイトを介して伸展したVWF-A2内の領域と結合し、Mドメインが、露出したTyr¹⁶⁰⁵-Met¹⁶⁰⁶を切断する、という機序が考えられる。

5. おわりに

血流中におけるADAMTS13のVWF切断反応の制御機構は不明な点が多かったが、基質への結合をトリガーにしたアロステリックな構造変化による活

性化であることが分かってきた。ADAMTS13は、血小板のVWFへの粘着という血栓形成反応の初期段階において、唯一の基質であるVWFを切断することにより血栓形成を抑制するというユニークな生理的機能を有していると考えられる。このことは、何らかの方法でADAMTS13活性を上昇させることにより、血栓性疾患の新たな治療法につながる可能性があり、リコンビナント製剤や薬剤の開発など、今後の展開が期待される。

著者の利益相反(COI)の開示：

本論文発表内容に関連して開示すべき企業との利益相反なし

文献

- 1) 森木隆典：血栓形成の分子機構—総論 脈管専門医のための臨床脈管学。日本脈管学会編，東京，メディカルトリビューン，2010，28-30.
- 2) Sadler JE: Von Willebrand factor, ADAMTS13, and thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* **112**: 11-18, 2008.
- 3) 副島見事, 小亀浩市, 松本雅則：ADAMTS13物語。血栓止血誌 **20**: 377-397, 2009.
- 4) 秋山正志：ADAMTS13のフォンビルブランド因子認識機構の構造学的基盤。血栓止血誌 **21**: 319-326, 2010.

- 5) Mendolicchio GL, Ruggeri ZM: New perspectives on von Willebrand factor functions in hemostasis and thrombosis. *Semin Hematol* **42**: 5–14, 2005.
- 6) Dong JF: Cleavage of ultra-large von Willebrand factor by ADAMTS-13 under flow conditions. *J Thromb Haemost* **3**: 1710–1716, 2005.
- 7) Zheng X, Nishio K, Majerus EM, Sadler JE: Cleavage of von Willebrand factor requires the spacer domain of the metalloprotease ADAMTS13. *J Biol Chem* **278**: 30136–30141, 2003.
- 8) Soejima K, Matsumoto M, Kokame K, Yagi H, Ishizashi H, Maeda H, Nozaki C, Miyata T, Fujimura Y, Nakagaki T: ADAMTS-13 cysteine-rich/spacer domains are functionally essential for von Willebrand factor cleavage. *Blood* **102**: 3232–3237, 2003.
- 9) Majerus EM, Anderson PJ, Sadler JE: Binding of ADAMTS13 to von Willebrand factor. *J Biol Chem* **280**: 21773–21778, 2005.
- 10) Ai J, Smith P, Wang S, Zhang P, Zheng XL: The proximal carboxyl-terminal domains of ADAMTS13 determine substrate specificity and are all required for cleavage of von Willebrand factor. *J Biol Chem* **280**: 29428–29434, 2005.
- 11) Moriki T, Maruyama IN, Igari A, Ikeda Y, Murata M: Identification of ADAMTS13 peptide sequences binding to von Willebrand factor. *Biochem Biophys Res Commun* **391**: 783–788, 2010.
- 12) Jin SY, Skipwith CG, Zheng XL: Amino acid residues Arg(659), Arg(660), and Tyr(661) in the spacer domain of ADAMTS13 are critical for cleavage of von Willebrand factor. *Blood* **115**: 2300–2310, 2010.
- 13) Luken BM, Turenhout EA, Hulstein JJ, Van Mourik JA, Fijnheer R, Voorberg J: The spacer domain of ADAMTS13 contains a major binding site for antibodies in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Thromb Haemost* **93**: 267–274, 2005.
- 14) Yamaguchi Y, Moriki T, Igari A, Nakagawa T, Wada H, Matsumoto M, Fujimura Y, Murata M: Epitope analysis of autoantibodies to ADAMTS13 in patients with acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *Thromb Res* **128**: 169–173, 2011.
- 15) Pos W, Crawley JT, Fijnheer R, Voorberg J, Lane DA, Luken BM: An autoantibody epitope comprising residues R660, Y661, and Y665 in the ADAMTS13 spacer domain identifies a binding site for the A2 domain of VWF. *Blood* **115**: 1640–1649, 2010.
- 16) Akiyama M, Takeda S, Kokame K, Takagi J, Miyata T: Crystal structures of the noncatalytic domains of ADAMTS13 reveal multiple discontinuous exosites for von Willebrand factor. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**: 19274–19279, 2009.
- 17) Tao Z, Wang Y, Choi H, Bernardo A, Nishio K, Sadler JE, López JA, Dong JF: Cleavage of ultralarge multimers of von Willebrand factor by C-terminal-truncated mutants of ADAMTS-13 under flow. *Blood* **106**: 141–143, 2005.
- 18) Zhang P, Pan W, Rux AH, Sachais BS, Zheng XL: The cooperative activity between the carboxyl-terminal TSP1 repeats and the CUB domains of ADAMTS13 is crucial for recognition of von Willebrand factor under flow. *Blood* **110**: 1887–1894, 2007.
- 19) Gao W, Anderson PJ, Majerus EM, Tuley EA, Sadler JE: Exosite interactions contribute to tension-induced cleavage of von Willebrand factor by the antithrombotic ADAMTS13 metalloprotease. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 19099–19104, 2006.
- 20) Feys HB, Anderson PJ, Vanhoorelbeke K, Majerus EM, Sadler JE: Multi-step binding of ADAMTS-13 to von Willebrand factor. *J Thromb Haemost* **7**: 2088–2095, 2009.
- 21) Zanardelli S, Chion AC, Groot E, Lenting PJ, McKinnon TA, Laffan MA, Tseng M, Lane DA: A novel binding site for ADAMTS13 constitutively exposed on the surface of globular VWF. *Blood* **114**: 2819–2828, 2009.
- 22) Igari A, Nakagawa T, Moriki T, Yamaguchi Y, Matsumoto M, Fujimura Y, Soejima K, Murata M: Identification of epitopes on ADAMTS13 recognized by a panel of monoclonal antibodies with functional or non-functional effects on catalytic activity. *Thromb Res* **130**: e79–83, 2012.
- 23) Tao Z, Peng Y, Nolasco L, Cal S, Lopez-Otin C, Li R, Moake JL, López JA, Dong JF: Recombinant CUB-1 domain polypeptide inhibits the cleavage of ULVWF strings by ADAMTS13 under flow conditions. *Blood* **106**: 4139–4145, 2005.
- 24) South K, Luken BM, Crawley JT, Phillips R, Thomas M, Collins RF, Deforche L, Vanhoorelbeke K, Lane DA: Conformational activation of ADAMTS13. *Proc Natl Acad Sci USA* **111**: 18578–18583, 2014.
- 25) Jian C, Xiao J, Gong L, Skipwith CG, Jin SY, Kwaan HC, Zheng XL: Gain-of-function ADAMTS13 variants that are resistant to autoantibodies against ADAMTS13 in patients with acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* **119**: 3836–3843, 2012.
- 26) Muia J, Zhu J, Gupta G, Haberichter SL, Friedman KD, Feys HB, Deforche L, Vanhoorelbeke K, Westfield LA, Roth R, Tolia NH, Heuser JE, Sadler JE: Allosteric activation of ADAMTS13 by von Willebrand factor. *Proc Natl Acad Sci USA* **111**: 18584–18589, 2014.