

# Analysis of substrates for ADAMTS-1 metalloproteinase

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2019-09-27 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: Kuno, Koji メールアドレス: 所属:
URL	<a href="https://doi.org/10.24517/00055484">https://doi.org/10.24517/00055484</a>

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 International License.







# 炎症時に発現されるADAMTS-1 プロテアーゼに関する基質の検索

(研究課題番号 11670316)

平成11年度～平成12年度科学研究費補助金〔基盤研究(C)(2)〕

研究成果報告書

平成13年3月

研究代表者

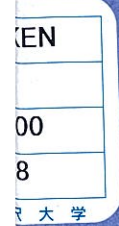
久野 耕嗣

(金沢大学がん研究所助手)

金沢大学附属図書館



8000-96485-6





はしがき

ADAM(a disintegrin and metalloproteinase)は、ヘビ毒メタロプロテアーゼおよびディスインテグリンと相同なドメインを持つ遺伝子群の総称である。ADAMはインテグリンリガンドとして細胞間相互作用に関わる接着因子として機能する一方、サイトカインの膜型前駆体や各種受容体等のプロセッシングを行うセクレターゼとして機能し、広く生体防御系や組織発生の制御に重要な役割を果たしていることが明らかにされつつある。

私は、ADAMファミリーと相同なメタロプロテアーゼドメインを持つが、典型的な膜型ADAMとは異なり、トロンボスポンジン(TSP)タイプIモチーフを持つ分泌型のADAMファミリー分子を初めて同定し、ADAMTS-1(ADAM family gene with TSP motifs)と命名した(Kuno K et al., 1997, J. Biol. Chem.)。その後、私はADAMTS-1が細胞外マトリックス局在性の活性型メタロプロテアーゼであることを確立し、同分子が細胞外マトリックスの動態を制御することにより機能することを示唆してきた。一方、プロコラーゲンI/II-Nプロテアーゼ(ADAMTS-2)、アグリカネース(ADAMTS-4, -5)などが、ADAMTS-1と同様にTSPタイプIモチーフを持つADAM分子として他のグループより報告され、現在ではこれらの分子を含め、“ADAMTS”という新しい遺伝子ファミリーとして世界的にも認知されるようになった。また最近のScience誌の“The Human Genome”特集号(Vol.291, No.5507, 2000)にも、ADAM/ADAMTSファミリーが細胞外マトリックス蛋白の代謝に関わる重要なファミリーとして位置づけられ、ADAM/ADAMTSファミリーの組織発生や疾患時の組織破壊における役割が注目されている。私はADAMTS-1にアグリカン分解活性があることを示し、ADAMTS-1がアグリカンのturnoverや関節炎における軟骨組織破壊に関わる可能性を示した。

我々はADAMTS-1の器官形成等における役割を明らかにするためにADAMTS-1遺伝子欠損マウスを作製し、同マウスが腎杯の拡張などヒト腎盂尿管移行部閉塞症に酷似した表現型を示すこと明らかにした。このことはADAMTS-1が腎盂尿管移行部組織の構築に重要な役割を果たしていることを示唆している。また同遺伝子欠損マウスの表現型からADAMTS-1が副腎髄質組織の構築や女性生殖器の機能にも必須であることを明らかにし、ADAMTS-1が細胞外マトリックスの動態を制御することにより器官の形成と機能に関わっていることを証明した。

我々のADAMTS-1遺伝子欠損マウスに関する報告は、The Journal of Clinical Investigation の”Commentary”中で取り上げられ、また私自身も”2<sup>nd</sup> International Meeting of the Biology of Thrombospondins and Other Modulatory ECM Proteins”(Madison, Wisconsin Univ, 2000)での招待講演を依頼されるなど、世界的に大きな反響を得ることができました。これも本研究補助金ならびに本研究に対する文部省の多大な理解と援助によるものと、ここに感謝の意を表わします。

平成13年3月

研究代表者

金沢大学がん研究所

久野 耕嗣

## 研究組織

研究代表者： 久野 耕嗣 (金沢大学がん研究所)

## 研究経費

平成11年度	180	千円
平成12年度	150	千円
計	330	千円

## 研究発表

### (1) 学会誌等

1. Kuno K., Terashima Y., Matsushima K.: ADAMTS-1 is an active metalloproteinase associated at the extracellular matrix. *J. Biol. Chem.* 274, 18821-18826. (1999).

2. Shido T.\*, Kurihara H.\*, Kuno K.\*, Yokoyama H., Wada T., Kurihara Y., Imai T., Wang Y., Ogata M., Nishimatsu H., Moriyama N., Oh-hashii Y., Morita H., Ishikawa T., Nagai R., Yazaki Y., Matsushima K. : ADAMTS-1: a metalloproteinase -disintegrin essential for growth, fertility, and organ morphology and function. *J. Clin. Invest.* 105, 1345-1352 (2000)  
(\*The first three authors contributed equally to this work.)

3. Kuno K., Okada Y., Kawashima H., Nakamura H., Miyasaka M., Ohno H., Matsushima K.: ADAMTS-1 cleaves a cartilage proteoglycan, aggrecan. *FEBS Letters* 478, 241-245 (2000) .

(2) 口頭発表

1. Kuno K. : The extracellular matrix-anchored metalloproteinase, ADAMTS-1. (Invited Speaker) at 2<sup>nd</sup> International Meeting of the Biology of Thrombospondins and other modulatory ECM proteins. June 4-8, 2000, Madison, Wisconsin Univ.
2. 久野耕嗣、松島綱治 「細胞外マトリックス結合性ADAMTS-1蛋白のプロテアーゼ活性の解析」  
第29回日本免疫学会年会 (平成11年12月1日-3日)
3. 久野耕嗣、岡田保典、川島博人、宮坂昌之、大野博司、松島綱治  
「ADAMTS-1におけるアグリカン分解活性の解析」  
第30回日本免疫学会年会 (平成12年11月14日-16日)
4. 久野耕嗣、馬場智恵、松島千恵子、松島綱治、細野隆次  
「線虫*C. elegans*におけるADAMTS-1ホモログ遺伝子の機能解析」  
第29回日本分子生物学会年会 (平成12年12月13日-16日)

(3) 出版物等

1. 久野耕嗣: 「細胞外マトリックス結合性ADAMTS-1プロテアーゼ」  
組織培養工学, 25, 20-23 (1999)
2. 久野耕嗣: 「新しいメタロプロテアーゼファミリー、ADAMTS」  
免疫・Immunology Frontier, 10, 23-30 (2000)
3. 久野耕嗣: ADAMとADAMTSファミリー. 「タンパク分解」(鈴木鉦一、木南英紀、田中啓二共編) シュプリンガー・フェアラーク東京, p. 81-92 (2000)

## 研究成果

(1) ADAMTS-1が活性型メタロプロテアーゼであることを確立した。

a) ADAMTS-1はヘビ毒メタロプロテアーゼと相同なメタロプロテアーゼドメインを持ち、そのメタロプロテアーゼドメインにはzinc結合モチーフ (HEXGHxxxxHD) を有しているが、そのプロテアーゼとしての機能については不明であった。プロテアーゼインヒビター、 $\alpha_2$ -マクログロブリン ( $\alpha_2$ M) は、さまざまなプロテアーゼと複合体を形成する。この複合体形成はそのプロテアーゼ活性に依存的であることから、 $\alpha_2$ Mとの複合体形成能からADAMTS-1のプロテアーゼ活性の有無を評価した。その結果、COS-7細胞で発現したADAMTS-1は、培地中および精製した $\alpha_2$ Mと200 kDa前後の高分子量の複合体を形成することがわかった。一方ADAMTS-1のZn結合モチーフ中のE(386)をQに置換した変異体では $\alpha_2$ Mとの複合体形成は見られなかった。これらの結果からADAMTS-1が活性型のメタロプロテアーゼドメインを有することが明らかとなった。

b) ADAMTS-1のN末端のプロドメインには、MMPの場合と同様に、メタロプロテアーゼドメインを潜在型に保つと予想されるCys残基が存在するので、そのプロドメインのプロセッシングにより除去される機構は同プロテアーゼの活性化機構を知る上で重要である。ADAMTS-1はCOS-7細胞等で発現した場合、プロドメインを持つ前駆体型 (潜在型) とプロドメインが除去された成熟型 (活性型) の両方が分泌される。この場合、成熟型 (活性型) のN末端アミノ酸配列はFVSSPRVYで、furin認識部位の直後に位置していた。そこでfurin活性を持たないLoVo細胞でADAMTS-1のプロセッシングを調べたところ、LoVo細胞ではADAMTS-1のプロドメインのプロセッシングは起らなかった。これらの結果より、ADAMTS-1は細胞内分泌過程でfurinエンドペプチダーゼでプロセッシングを受け、活性型のADAMTS-1分子が産生されることがわかった。

(2) ADAMTS-1によるアグリカンの分解活性の解析

ADAMTS-1は細胞外マトリックス (ECM) 結合性のメタロプロテアーゼであり、またECM中の硫酸化グリコサミノグリカンに結合する性質を有することから、同メタロプロテアーゼの、軟骨プロテオグリカンであるアグリカンに対する分解活性を調べた。HEK293細胞で発現し精製したADAMTS-1を軟骨プロテオグリカンであるアグリカンと反応させた後、コンドロイチナーゼおよびケラタナーゼで糖鎖を除去して、コア蛋白をウエスタンブロットにより調べたところ、100 kDaのアグリカンコア蛋白の断片が生成された。このことからADAMTS-1にはアグリカン切断活性があることが明らかとなった。次に生成した100 kDaアグリカン断片のN末端アミノ酸配列を決定し、ADAMTS-1がアグリカンのコンドロイチン硫酸鎖結合領域のE(1872)-L(1873)部位を切断することがわかった。アグリカンでは、IGDドメイン中のアグリカネース切断部位やコンドロイチン硫酸鎖結合領域のgap領域がそのin

vivoでの切断部位として知られ、関節炎患者の関節滑液中やインターロイキン1で刺激した軟骨組織培養上清にそれらのアグリカン断片が検出されている。

ADAMTS-1切断部位はこれらアグリカンのin vivo切断部位の一つに対応することから、ADAMTS-1がアグリカンのturnover や関節炎における軟骨組織破壊に関わる可能性が考えられる。またTSPタイプIモチーフおよびスパーサー領域からなるADAMTS-1のC末端側領域は硫酸化グリコサミノグリカンに結合するドメインであるが、このC末端側領域の大部分を欠損させたADAMTS-1の変異体ではアグリカン分解活性が消失することから、ADAMTS-1のC末端側領域とアグリカン糖鎖との結合がそのアグリカン分解活性に必要であることが示唆された。

### (3) ADAMTS-1遺伝子欠損マウスの解析

我々はADAMTS-1の器官形成など、生体における機能と役割を明らかにするためADAMTS1遺伝子欠損マウスを作製してその解析を行なった。

a) ADAMTS-1遺伝子欠損マウスでは、腎臓に顕著な変化が見られ、腎杯の拡張と腎髄質乳頭部の萎縮が観察された。また静脈腎盂造影(IVP)では、同遺伝子欠損マウスにおいて典型的な水腎症の像がみられ、腎杯部分における尿の貯流が観察された。この結果から、ADAMTS-1遺伝子欠損マウスでは腎盂尿管接合部において部分的な閉塞状態が生じており、これが腎杯拡張の原因であることがわかった。また同遺伝子欠損マウスの腎盂尿管移行部組織の電子顕微鏡による観察では、尿路上皮細胞下の線維性組織での過剰なコラーゲンの蓄積が認められた。このことからADAMTS-1遺伝子欠損マウスでは、腎盂尿管移行部組織の線維化によりペリスタルシスの機能低下が生じているものと推測される。これらADAMTS-1遺伝子欠損マウスで観察された表現型は、ヒトでの腎盂尿管移行部閉塞症のものとよく類似していることから、ADAMTS-1が腎盂尿管移行部閉塞症の原因遺伝子のひとつである可能性が示唆された。

b) 副腎髄質組織ではカテコールアミン産生する髄質細胞が細胞集団をなし、その周囲に豊富な毛細血管が存在している。ADAMTS-1遺伝子欠損マウスでは副腎髄質組織の構造が歪で、髄質に多くの空洞状の構造が認められた。このことからADAMTS-1は副腎髄質組織の構築にも必要であると考えられる。

c) ADAMTS-1遺伝子欠損の雌マウスでは、交尾後13%しか子を産まず、また産む場合にもその子数は平均2.5匹と少なく、強い不妊傾向を示した。一方、ADAMTS-1遺伝子欠損の雌マウスでは交尾後の着床数は減少しているものの、野性型マウスに比べて約50%は保持されていた。これらの結果からADAMTS-1が卵巣での卵胞成熟や排卵過程と、子宮内での発生過程の双方に必要であることが示唆された。

a)-c)のように、ADAMTS-1は、腎盂尿管移行部組織の構築と機能に重要な役割を果たしているばかりでなく、副腎髄質組織の構築や女性生殖器の機能にも必須な、多機能なメタロプロテアーゼであることが明らかとなった。