

博士論文

ADAM による細胞間解離の分子機構に関する研究

平成 29 年 12 月

名古屋大学大学院 理学研究科 生命理学専攻

海洋発生生化学グループ

瀬尾 忠彦

目次

略語集	4
要旨	5
1. 序論	8
2. 材料と方法	12
3. 結果	16
3-1. へび毒 ADAM が VE-cadherin と γ -catenin の局在変化を誘導する	16
3-2. へび毒 ADAM は LRP6 を活性化部位で切断する	17
3-3. へび毒 ADAM による LRP6 の切断は細胞間解離と出血に必要である	19
3-4. へび毒出血耐性動物は LRP5/6 の切断活性化に関わる部位の変異がある	20
3-5. ラット大動脈内皮細胞に対するへび毒 ADAM の作用の解析	21
3-6. ADAM8 と ADAM12 は VAP1 と同様の部位で LRP6 を切断する	22
4. 考察	24
4-1. ADAM による LRP5/6 活性化機構	24
4-2. へび毒出血耐性機構に関する考察	24
4-3. へび毒による出血機構	25
4-4. LRP5/6 切断部位と VAP1 の基質特異性	26
4-5. ADAM による細胞間解離のシグナル伝達	27
4-6. ADAM による細胞間解離の機構	27

結語	29
謝辞	30
参考文献	31

略語一覽

ADAM	a disintegrin and metalloproteinase
CM	carboxymethyl
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride
DMSO	dimethyl sulfoxide
DTT	dithiothreitol
ECM	extracellular matrix
EMT	epithelial mesenchymal transition
FBS	fetal bovine serum
FGF	fibroblast growth factor
HUVEC	human umbilical vein endothelial cell
LDLa	low-density lipoprotein receptor class A domain
LRP	low-density lipoprotein receptor-related protein
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	phosphate buffered saline
RAOEC	rat aortic endothelial cell
SDS	sodium dodecyl sulfate
SVMP	snake venom metalloproteinase
Tris	tris (hydroxymethyl) aminomethane
VAP1	vascular apoptosis-inducing protein 1
vWFa	von Willebrand factor type A

要 旨

ADAM (A Disintegrin and Metalloprotease) ファミリータンパク質は、がんの浸潤転移や喘息など様々な疾患に関係している事が知られているが、ヒト内在性 ADAM の生理的基質や作用機序に関する知見は乏しい。例えば、ヒト ADAM8, 9, 12, 15, 19, 28, 33 は、がんや白血球の浸潤に関わることが示唆されているが、その標的分子や浸潤機構は明らかにされていない。また多くのヒト内在性 ADAM は不活性型前駆体として存在しており、活性型分子の単離やそれを用いた解析は容易ではない。

そこで本研究では、ADAM ファミリータンパク質の中で生理活性を有する活性型のヘビ毒 ADAM (VAPs: Vascular Apoptosis-inducing Proteins) に着目した。このヘビ毒 ADAM は出血性のヘビ毒中に存在しており、出血や血管内皮細胞の細胞間解離を引き起こす。また、ヘビ毒 ADAM は白血球やがんの浸潤に関与するヒト内在性 ADAM と相同性が高く、特に ADAM8 や ADAM28 との相同性が高い。細胞が浸潤するためには細胞間接着を破壊する必要があるが、浸潤に関わるヒト内在性 ADAM とヘビ毒 ADAM はいずれも細胞間接着を破壊し細胞を解離させるという点においても、共通の性質を示す。これらの知見は、ヘビ毒 ADAM の標的分子と細胞間解離の機構解明が、ヒト内在性 ADAM によるがん細胞浸潤の作用機構の解明に繋がる可能性を示唆している。

本研究では、ヘビ毒 ADAM による出血機構と細胞間解離機構の解明を目指して、ヘビ毒 ADAM による細胞応答や出血を引き起こす標的分子の探索を行った。またヒト内在性 ADAM においても同一分子を標的とするか否かについて検討した。まず、ヘビ毒 ADAM により血管内皮細胞に引き起こされる細胞間接着分子の変化について解析した。細胞間接着分子として細胞膜貫通タンパク質 VE-cadherin に着目し、これがヘビ毒 ADAM により分解されるか否かを検討した。その結果、VE-cadherin はヘビ毒 ADAM で分解されないが、細胞接着領域から細胞質に局在性を変化させること、また VE-cadherin と結合し、細胞間接着に働く γ -catenin も細胞接着領域から細胞質に局在性を変化させることが観察された。このことは、ヘビ毒 ADAM が VE-cadherin を直接切断するのでは

なく、なんらかの信号伝達経路を介して VE-cadherin と γ -catenin の局在性を変化させることを示唆している。

β/γ -catenin の細胞質への局在変化を引き起こす信号伝達経路として Wnt シグナルが知られている。Wnt シグナルには古典的シグナルと非古典的シグナルと呼ばれる信号伝達経路があるが、そのうち Wnt シグナルの古典的経路では、Wnt がその共受容体である LRP5 または LRP6 に結合する事により、 β/γ -catenin の細胞質への局在変化を引き起こす。一方で、LRP5/6 はその細胞外ドメインの一部を欠失させた分子を発現させると、Wnt 非存在下でも Wnt シグナルが活性化され、 β -catenin の細胞質への移行を引き起こすことが報告されている。そこで、LRP5/6 がヘビ毒 ADAM により特異的切断を受け、それにより Wnt シグナルの活性化が起こるのではないかと考え検討を行った。その結果、LRP5/6 は Wnt シグナルを活性化しうる部位で、ヘビ毒 ADAM により切断を受けることが、LC/MS を用いた解析により判明した。

そこで次に、この切断が細胞間接着や出血に関与するか否かを調べる目的で、LRP6 の切断を阻害する抗体 (LRP6 切断部位ペプチドに対する抗体) を用いて解析したところ、ヘビ毒 ADAM による細胞間解離と出血がこの抗体で抑制されることが判明した。このことは、ヘビ毒 ADAM による LRP6 の特異的切断が細胞間解離と出血を引き起こすことを示唆している。

もし、ヘビ毒 ADAM が LRP5/6 の活性化部位で切断することにより出血を引き起こすのであれば、切断部位に変異または欠失を有する LRP5/6 を持つ動物では、ヘビ毒 ADAM による出血が抑制されることが予想される。そこで、実際にヘビ毒により出血する動物と出血耐性を示す動物を取り上げ、LRP5/6 の切断部位配列と出血耐性との相関性について調べた。その結果、多くの出血耐性動物の LRP5 か LRP6 のいずれかに、ヘビ毒 ADAM による切断部位や、活性化に重要な LDLa ドメインに、変異が生じていることが判明した。多くの出血耐性動物において、LRP5/6 の切断部位に変異が見られるという事実は、出血において LRP5/6 の特異的切断が重要であるという考えを支持している。

次に、ヘビ毒 ADAM と同様に細胞間解離に関わる、浸潤関連ヒト内在性 ADAM である ADAM8 と ADAM12 を取り上げ、それらが LRP6 を切断するか

否かを検討した。その結果、これらのヒト ADAM も、ヘビ毒 ADAM が切断する LRP6 切断部位と同一部位を切断することが、LC/MS を用いた消化断片解析で明らかとなった。

本研究により、ヘビ毒 ADAM とヒト内在性 ADAM である ADAM8,12 が LRP5/6 を活性化部位で切断することが示された。そして、その部位での切断は血管内皮細胞の細胞間解離と出血に関与することが示唆された。また本研究により、LRP5/6 の切断活性化を担う酵素を初めて同定することができた。ヒト内在性 ADAM が細胞間解離や細胞浸潤に関与する機構に関しても新しいモデルを提供することができた。これらの発見は、ヘビ毒 ADAM による出血のみならず、白血球やがん細胞の浸潤機構に関しても新しいパラダイムを提供するものであり、ADAM が関わる疾患の診断治療を考える上での一つの突破口となることが期待される。

1. 序論

ADAM (A Disintegrin and Metalloprotease) ファミリータンパク質はがんや喘息などの様々な疾患に関係することが知られている (Edwards et al., 2008)。しかし、多くのヒト ADAM において、その生理的基質や作用機構は明らかになっていない。

ヒト内在性 ADAM ファミリータンパク質の中で機能が知られているものとして ADAM10 と ADAM17 が挙げられる (Edwards et al., 2008)。これらの ADAM は膜タンパク質の一部を切断し遊離させるシェダーゼとして機能すると考えられているが、基質選択性が広く、分子系統解析からも他のヒト内在性 ADAM からかけ離れている (Edwards et al., 2008)。したがって、これらを用いてヒト内在性 ADAM の一般的な機能を類推することは難しい。また、多くのヒト内在性 ADAM は不活性型前駆体として存在しており、活性化させるためには他のプロテアーゼを加える必要があることから、純化した活性型 ADAM を用いた機能解析は容易ではない。

そこで本研究では、ADAM ファミリータンパク質の中で生理活性を持つ活性型のヘビ毒 ADAM (SVMP: snake venom metalloproteinase と呼ばれる) に着目した。このヘビ毒 ADAM は出血性のヘビ毒中に出血因子として存在しており、出血活性という生理活性を持った状態で精製することができる (Takehashi and Osaka, 1970; Takeya et al., 1990)。ヘビ毒 ADAM のいくつかは細胞外マトリックスタンパク質であるコラーゲンやラミニンを切断する活性を有することから、それらの活性が出血の主因である可能性も考えられる。しかし、これらの切断活性と出血活性との間には必ずしも相関が見られず (Bjarnason and Fox, 1994; Ownby, 1990; Escalante et al., 2006)、出血の主因となる、ヘビ毒 ADAM の標的タンパク質とは考えにくい。一方、細胞膜タンパク質である血小板のインテグリン $\alpha 2 \beta 1$ や線維芽細胞の annexin V などがヘビ毒 ADAM によって切断されるという報告もあるが、これらに関しても、出血との因果関係は明確ではない (Kamiguti et al., 1996; Pinto et al., 2007)。

当研究室の荒木らは、出血性ヘビ毒が、血管を構成する血管内皮細胞にアポトーシスを引き起こすことを報告している (Araki et al., 1993)。荒木らは、この血管内皮細胞にアポトーシスを引き起こすタンパク質を精製し、VAPs (Vascular

Apoptosis-inducing Proteins)と命名した (Masuda et al., 1997; Masuda et al., 1998)。VAPs は、ADAM ファミリータンパク質に属し、血管内皮細胞に作用して、細胞の断片化や細胞接着の破壊 (細胞間解離) などを引き起こす (Masuda et al., 2000; Maruyama et al., 2005)。この VAPs はコラーゲンやラミニンなどの ECM (extracellular matrix) タンパク質をほとんど分解せずに出血活性を示すことから (Araki et al., 2002)、少なくとも VAPs による出血においては、ECM の分解というよりは、血管内皮細胞に対する何らかの作用が重要であると考えられる。また、この VAPs は、出血性のヘビであるニシダイヤガラガラヘビの粗毒において、ヘビ毒 ADAM 中の約 6 割を占めており (Fox et al., 2006)、VAPs の血管内皮細胞に対する活性が出血において重要であるという考えを支持している。先行研究において、血管内皮細胞表面の VAP 標的分子の探索や作用機序に関する研究が進められてきた。そして、VAPs によるアポトーシス誘導が、インテグリン $\alpha 3$, $\alpha 6$, $\beta 1$ に対する抗体により抑制されること、また VAPs の作用により p53 が活性化されること等が明らかになっている (Araki et al., 2002; Zhao et al., 2004)。また、VAPs の結晶化や X 線構造解析が武田らにより進められ、VAP1 の立体構造も明らかになっている (Takeda et al., 2006)。しかし、VAPs の作用機構を知る上で重要な、標的分子の同定には至っていない。そこで本研究ではヘビ毒 ADAM である VAPs による出血機構の解明を目指して、まずヘビ毒の標的分子の探索から検討を行った。

また、本研究はヘビ毒 ADAM (VAPs) に加えて、ヒト内在性 ADAM についても研究を行った。ヒト内在性 ADAM とヘビ毒 ADAM の関係を以下に述べる。ADAM の中では、ヘビ毒 ADAM と ADAM8, 9, 12, 15, 19, 28, 33 との相同性が高く、特に ADAM8 や ADAM28 はヘビ毒 ADAM と相同性が高い (Casewell, 2012)。ADAM8, 9, 12, 15, 19, 28, 33 は白血球やがんの浸潤に関わることが発現解析などから報告されている (Shintani et al., 2004; Wildeboer et al., 2006; Rao et al., 2012)。また、ADAM12 が、浸潤突起や浸潤に関係しているアクチンリッチ仮足の先端に局在することが報告されている (Abram et al., 2003; Stautz et al., 2010)。ADAM15 と ADAM19 も同様に浸潤突起への局在が示唆されている (Abram et al., 2003)。細胞が浸潤するためには血管の細胞間接着を破壊する必要がある。ヘビ毒 ADAM と浸潤に関わるヒト内在性 ADAM は、いずれも細胞間接着破壊 (細胞間解離) を誘導するという点で、共通の性質を持つ (Fig. 1)。ヘビ毒 ADAM が浸潤に関連するヒト内在性 ADAM と高い相同性を持つことや、ヘビ毒 ADAM

と浸潤に関連するヒト内在性 ADAM が細胞間解離という共通の生理活性を示すことから、ヘビ毒 ADAM による細胞間解離機構を調べることは、ヒト内在性 ADAM の浸潤機構の解明に繋がる可能性がある (Fig. 1)。

本研究は、細胞間接着と Wnt シグナルの関わりについても検討した。Wnt シグナルは発生、分化、がん化に関わることがよく知られている (Dickinson et al., 1992; Nusse et al., 1992)。このシグナル経路は、細胞間接着活性を低下させ、細胞の移動性を上げることで、細胞に間葉細胞様の性質を獲得させ、増殖や EMT (上皮間葉転換) を誘導すると考えられている。この Wnt シグナル経路のうち古典的 Wnt 経路では、シグナルが活性化されると、 β -catenin の分解が阻害され、 β -catenin が細胞質に蓄積し、 β -catenin 依存的な転写が活性化される (Papkoff et al., 1996; Fig. 2A)。上皮細胞と血管内皮細胞のような細胞間接着がしっかりできている細胞では、 β -catenin は cadherin と共に細胞間接着領域に局在しており、 β -catenin の Wnt シグナルへの関与は不明であった。最近の研究で、Wnt シグナルにより、細胞間接着領域に存在する β -catenin とそのパラログである γ -catenin が cadherin から離脱して、細胞間接着領域から細胞質に移行することが報告された (Lai et al., 2011; Grossmann et al., 2013; Pellon et al., 2013)。すなわち、Wnt シグナルの活性化には、 β -catenin の分解阻害だけではなく、細胞間接着領域に存在する β -catenin の細胞質への移行も関わっていると考えられる。

Wnt シグナルの受容体とその活性化については以下の様なことが報告されている。Wnt の共受容体である LRP5 と LRP6 (LRP5/6) は Wnt シグナルにおいて、Wnt と結合し、 β -catenin の分解を抑えることで、Wnt シグナルを活性化する。LRP5/6 は cadherin と共局在し、Wnt シグナルにおいて、 β/γ -catenin の cadherin からの離脱に関わることが知られている (Hay et al., 2009; Casagolda et al., 2010)。このように LRP5/6 は Wnt と結合することで Wnt シグナルを活性化することが知られているが、一方で LRP5/6 の細胞外に存在している β プロペラドメインを欠失させた変異体は Wnt 非存在下でも Wnt シグナルを活性化することできると報告されている (Mao et al., 2001; Brennan et al., 2004 Fig. 2B)。さらに、この変異体は E-cadherin からの β -catenin の離脱を誘導することが報告されている (Vinyoles et al., 2014)。しかし、このような β プロペラドメインを除去できる部位で LRP5/6 を切断する酵素は見つかっていない。本研究では、ヘビ毒 ADAM やヒト内在性 ADAM の LRP5/6 切断部位を同定し、これらの酵素が、LRP5/6 の活性化に関わるか否かも検討した。

様々な疾患に関わるヒト内在性 ADAM の生理的基質と作用機構を解明する第一歩として、ヒト内在性 ADAM と相同性を示す活性型へビ毒 ADAM の標的分子を探索し、その作用機構を明らかにすることは、新しい治療法を考える上でも重要である。そこで本研究では、まずへビ毒 ADAM による細胞応答を引き起こす標的分子の同定と出血メカニズムの解明を目指し、それを足がかりにしてヒト内在性 ADAM の標的分子や作用機構の解明を目指すという戦略をとった。

本研究ではまずへビ毒 ADAM が血管内皮細胞に引き起こす細胞間結合の変化について解析した。その結果、VE-cadherin が細胞間接着領域から細胞質に分解されることなく移動すること、また γ -catenin も細胞間接着領域から細胞質に移行することが示唆された。上述のように、LRP5/6 が細胞外ドメインの一部を失うと γ -catenin を移動させる可能性があるため、LRP5 と LRP6 がへビ毒 ADAM により切断されるかどうか、またどの部位で切断されるかを調べた。その結果、LRP5 と LRP6 が、細胞間結合に変化を引き起こしうる部位で切断を受けて、Wnt シグナルを活性化していることが示された。

この切断を、阻害抗体を用いて阻害することで、実際にこの切断が細胞間結合の変化と出血に関わることが示唆された。さらに興味深いことに、出血耐性動物として知られている動物においては LRP5、LRP6 のへビ毒 ADAM による切断活性化に関わる部位に変異が生じていることが明らかになった。本研究により、へビ毒 ADAM による LRP5、LRP6 の切断活性化が、細胞間解離と出血を引き起こしているという全く新しい出血モデルを提唱することができた。

さらに、浸潤に関わる ADAM8、ADAM12 がへビ毒 ADAM と同一位置で LRP6 切断することが明らかとなり、新しい細胞の浸潤機構を提示することができた。

2. 材料と方法

2-1. 実験材料

ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) は Becton Dickinson (Franklin Lakes, NJ, USA) で購入した。ラット大動脈血管内皮細胞 (RAOEC) は IWAKI (Shizuoka, Japan) で購入した。HeLa 細胞、A431 細胞は理研セルバンク (Tsukuba, Japan) から提供された。

組換えヒト LRP6、ヒト ADAM8、ヒト ADAM12、ヒト VE-cadherin、マウス LRP6、マウス LRP5、ヒト LRP8 は R&D Systems, Inc (Minneapolis, MN, USA) から購入した。LRP6 は Fc タグ付きの組換えタンパク質を、その他のものは His タグ付きの組換えタンパク質を購入した。ニシダイヤガラガラヘビ (*Crotalus atrox*) 粗毒、およびその他の試薬は Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA) から購入した。

2-2. 細胞の培養

ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) の培養では、MCDB105 培養液にウシ胎児血清を 10%、ウシの脳より Lobb and Fett (1984)の方法に従って精製した FGF を 70 ng/ml、ヘパリンを 100 ng/ml の最終濃度で加えた物を培養液として用いた。細胞は 0.1% ゼラチンでコートしたプラスチック培養皿にまき、37°C で培養を行った。

HeLa 細胞、A431 細胞、ラット大動脈血管内皮細胞 (RAOEC) は、MCDB105 培養液 (Sigma-Aldrich) にウシ胎児血清を 10%加えて、37°C で培養を行った。

2-3. VAP1 の精製

VAP1 は Masuda ら の方法 (Masuda et al., 1998) に従ってガラガラヘビ粗毒から 2 段階のクロマトグラフィーを行うことにより精製した。まずガラガラヘビ粗毒 60 mg を 5 ml の 25 mM NaCl、10 mM Tris-HCl (pH 7.0)、1 mM CaCl₂ に溶かし、同緩衝液で平衡化した CM-Sephadex C-25 カラム (1.5 cm x 9 cm) に添加した。洗浄後、NaCl による直線濃度勾配 (25 mM-500 mM) により溶出を行った。各画分を非還元条件下で SDS-PAGE し、後銀染色を行った。110 kDa のバンドを

多く含む画分を等量の 25 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) と混合した。Hydroxyapatite カラム (1.5 cm x 9 cm) に添加し、リン酸ナトリウムの直線濃度勾配 (25 mM-500 mM) により溶出を行った。各画分を用いて非還元条件下で SDS-PAGE を行い、後銀染色を行った。110 kDa のバンドが単一で見られる画分を Amicon Ultra-15 (UFC9 030 24, Merck Millipore) で濃縮し、VAP1 として用いた。VAP1 を細胞に作用させる際には MCDB105 培養液 (Sigma-Aldrich) で希釈した後、細胞が培養してあるシャーレに加え、37°C でインキュベートした。

2-4. 免疫染色

細胞を培養しているディッシュから培養液を取り除き、固定液 1 ml (40 mg パラホルムアルデヒド, 900 μ l DW, 3 μ l 1 N NaOH, 95°C で 3 分, 65°C で 10 分インキュベート, 10×TBS を 100 μ l 加える) を加え、室温で 30 分静置し、TBS で 3 回洗浄した。サポニンブロッキング溶液 (0.1% サポニン, 0.2% スキムミルク, TBS) を 2 ml 加え、室温で 30 分静置した。抗 VE-cadherin 抗体 (Beckman Coulter Inc.) または抗 γ -catenin 抗体 (Novus Biologicals, Minneapolis, MN, USA) , 抗 β -catenin 抗体 (Novus Biologicals) をサポニンブロッキング溶液で 200 倍希釈した溶液で 4°C、5 時間インキュベートした。TBS で 3 回洗浄した後、Alexa Fluor 488 または Alexa Fluor 568 で標識された抗マウス IgG 抗体 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を TBS で 3000 倍希釈した 2 次抗体溶液を用いて反応を行った (室温、遮光条件下、1 時間)。次いで TBS で 3 回洗浄し、倒立型蛍光顕微鏡 (IX83, Olympus, Tokyo, Japan) で検鏡した。

2-5. LC/MS/MS 解析

酵素消化断片 (LRP5/6 に ADAM を混合し反応させた溶液) とコントロール (ADAM と LRP5/6 をそれぞれ単独で同条件で反応させた溶液) を SDS-PAGE にかけた。泳動後、SilverQuestTM Silver Staining Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いて、銀染色を行った。切断断片を含むバンドを切り出し、DTT と iodoacetamide で処理をした後、0.01 μ g/mL のトリプシン、50 mM 炭酸水素アンモニウム中で、37°C overnight でインキュベートした。分解産物を Ultimate3000 liquid chromatogram (Thermo Fisher Scientific) と LTQ-XL mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific) を用いて LC/MS 解析を行った。トリプシ

ン消化、LC/MS 解析は Nakazawa らの方法に従って行った (Nakazawa et al., 2015)。

2-6. ウェスタンブロッティング

細胞を回収し、SDS-PAGE にかき、その後 PVDF 膜に転写した。転写は、陽極側から転写溶液 A (300 mM Tris, 5% メタノール in DW) に浸したろ紙 2 枚、転写溶液 B (25 mM Tris, 5% メタノール in DW) に浸したろ紙 1 枚、PVDF 膜、ポリアクリルアミドゲル、転写溶液 C (25 mM Tris, 40 mM 6-アミノカプロン酸, 5% メタノール in DW) に浸したろ紙 3 枚の順に重ね、ろ紙の面積 1 cm² ごとに 2 mA の電流で 30 分間通電した。PVDF 膜を 5% スキムミルクでブロッキングした後、抗 VE-cadherin マウスモノクローナル抗体 (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) あるいは抗ヒト LRP6 ヤギポリクローナル抗体 (R&D Systems, Inc.) を加え、1 時間震盪した。PVDF 膜を TBS-T で 3 回洗浄した後、2 次抗体を加え、1 時間震盪させた。その後、TBS-T で 3 回洗浄を行い、ECL prime (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) で発色させ、ライトキャプチャーで検出した。

2-7. 抗体の作製と切断阻害活性の検討

LRP6 の VAP1 による切断部付近の配列を元にして作製したペプチドを抗原とし、ウサギに免疫する事で抗血清を作製した。ペプチド合成、抗血清の作成は Sigma-Aldrich に依頼した。ウェスタンブロット法により、抗血清の組換えヒト LRP6 への反応性を確かめた。プロテイン A セファロース (Sigma-Aldrich) を用いて抗血清から抗体 (IgG) を精製した。

この抗体が、VAP1 による LRP6 の切断を阻害するか否かを調べた。組換えヒト LRP6 (30 µg/ml) とコントロールウサギ抗体 (終濃度 : 2 mg/ml)、もしくは組換えヒト LRP6 (30 µg/ml) と今回作製した抗体 (終濃度 : 2 mg/ml) を混合し、PBS 中 25°C で 1 時間インキュベートした。そこに VAP1 (30 ng/ml) を加え、37°C で 1 時間インキュベートした。その試料を用い、SDS-PAGE を行い、銀染色でタンパク質を染色し、LRP6 の VAP1 による切断断片の濃さを比較する事で VAP1 の切断活性を調べた。この抗血清を「切断阻害抗血清」、抗体を「切断阻害抗体」と記述する。

2-8. 抗体による中和実験

HUVEC を 1.35 mg/ml の切断阻害抗体もしくはコントロールウサギ抗体と 1 時間 37°C でインキュベートし、その後に 140 ng/ml の VAP1 を 1 時間 37°C で作用させた。

2-9. マウスによる出血実験

5 µg の VAP1 と 20 µl の切断部抗血清もしくはウサギ血清を混合し、オスマウスの背中に左右対称の箇所皮内に注射した。1 時間後にマウスを頸椎脱臼させ、皮膚を慎重に摘出し、皮膚の出血斑を撮影した。出血斑の大きさと赤色の濃さをデンストメトリー (CS Analyzer, ATTO) を用いて測定した。

2-10. ドッキングシミュレーション

NCBI から VAP1 (2ERP) と LRP6 (3S8Z) の立体構造を得た。ZDOCK3.0.2 (Pierce et al., 2014) を用いてドッキングシミュレーションを行った。ICM-BROWSER (Molsoft, San Diego, CA, USA) を用いて可視化した。

2-11. ADAM12 の血管内皮細胞に対する作用実験

HUVEC を 10 µg/ml の ADAM12 の存在下もしくは非存在下で 40 時間、37°C でインキュベートした。固定した後、抗 VE-cadherin 抗体で免疫染色を行なった。

2-12. 統計解析

正規性は R(R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) を用い、検定した。等分散性の確認は F 検定を用いて行った。切断阻害抗体による *in vitro* の組み換え LRP6 の切断の阻害実験では正規性は確認できなかったが、等分散性の確認はできたため、マン・ホイットニーの U 検定を行なった。切断阻害抗体による細胞間解離への影響を調べた実験では正規性の確認はできたが、等分散性は確認できなかったため、ウェルチの t-検定を行った。切断阻害抗血清によるマウスの出血への影響を調べた実験では、正規性は見られなかったため、Wilcoxon の符号付順位和検定を行った。p 値が 0.05 未満であるものを統計的に有意と見なした。

3. 結果

3-1. ヘビ毒 ADAM は VE-cadherin と γ -catenin の局在変化を誘導する

ヘビ毒 ADAM である VAP1 が血管内皮細胞の細胞間接着を解離させる事が先行研究で示されている (Masuda et al., 2000)。そこで、この細胞間接着の解離のメカニズムを解明するために、VAP1 を作用させることで細胞間接着因子がどのように変化するかを解析した。血管内皮細胞の細胞間接着に関わる因子として、VE-cadherin、 β -catenin、 γ -catenin を取り上げ、それらの局在性を調べた。

まず細胞膜貫通型タンパク質である VE-cadherin の局在性について調べた。免疫染色を行ったところ、VAP1 を作用させた血管内皮細胞では、VE-cadherin の局在性が細胞間接着領域から細胞質に移行することが示された (Fig. 3)。そこで、VAP1 が VE-cadherin を直接的あるいは間接的に分解するか否かについて調べた。まず *in vitro* の切断実験として、組換えヒト VE-cadherin を VAP1 が直接分解するかどうかを調べたが、VAP1 による分解は見られなかった (Fig. 4A)。次に細胞で VE-cadherin が VAP1 によって直接あるいは間接的に分解されているかどうかを、VAP1 を加えた細胞と加えていない細胞における VE-cadherin の量を比較することで調べた。その結果、VAP1 を加えた細胞と加えていない細胞では VE-cadherin の量に変化は見られなかった (Fig. 4B)。この結果から、VE-cadherin が VAP1 の標的分子ではないとは言えないが、VAP1 が VE-cadherin を切断せずに細胞質側に移行させる可能性を支持している。

次に β -catenin の局在性について調べるため、 β -catenin 抗体による免疫染色を行なった。ポジティブコントロールの、細胞間接着領域での β -catenin の局在が報告されている A431 細胞では、局在が報告されている細胞間接着領域で染色が確認された (Fig. 5)。一方、目的の血管内皮細胞では β -catenin の細胞間接着領域における局在は確認されなかった (Fig. 6)。また、核周辺部に局在が見られたが、VAP1 を作用させた細胞でも同じ部位に局在が見られた。この結果は、今回用いた血管内皮細胞の細胞間接着領域には、 β -catenin が存在しないことを示唆している。また、VAP1 による局在性変化も確認されなかった。

次に γ -catenin の局在性について調べた。免疫染色の結果、 γ -catenin は VAP1 を作用させなかった細胞では細胞間接着領域に認められたが、VAP1 を作用させた細胞では細胞間接着領域の局在が消失し、細胞質に移動することが示された

(Fig. 7)。

これらの結果により、VAP1 が VE-cadherin を分解せずに細胞間隙を開く機能を持つ可能性が初めて示唆された。さらに、VAP1 を作用させることにより、血管内皮細胞において、VE-cadherin と γ -catenin が細胞間接着領域から細胞質に局在変化することが明らかになった。

3-2. ヘビ毒 ADAM は LRP6 を活性化部位で切断する

3-1 で γ -catenin がヘビ毒 ADAM である VAP1 により、細胞間接着領域から細胞質へ移行していることが示唆されたが、 β/γ -catenin の局在変化を引き起こすシグナルとして、Wnt シグナルが知られている (Lai et al., 2011; Grossmann et al., 2013; Pellon et al., 2013)。序論で述べたように、Wnt の共受容体として知られる LRP5 と LRP6 の β プロペラドメインを取り除いた変異体を細胞に発現させると、Wnt シグナルの常時活性化を引き起こす事が報告されている (Mao et al., 2001; Brennan et al., 2004; Mao et al., 2001)。そこで、ヘビ毒 ADAM が LRP5 と LRP6 を活性化することで γ -catenin の局在変化を引き起こす可能性を考え、VAP1 が LRP5 と LRP6 を活性化部位で切断するかどうかを調べた。

まず細胞に VAP1 を作用させることにより、LRP6 が分解されるかどうかを調べた。その結果、VAP1 を加えた細胞では VAP1 を加えていない細胞に比べ、LRP6 の量が 44%に減少していた (Fig. 8)。この結果は、直接か間接かは不明であるが、VAP1 により LRP6 が切断されることを示唆している。

そこで、組換えヒト LRP6 と組換えマウス LRP5 が VAP1 により直接切断されるか否かを調べた。その結果、組換え LRP6 が VAP1 により切断され、140 kDa と 60 kDa の切断断片を与えることが確認された。VAP1 による LRP6 の分解は、これまでヘビ毒 ADAM で 1 番効率よく切断される基質として知られていた Fibrinogen α 鎖 (Takeya and Iwanaga, 1998) よりも速やかであった (Fig. 9A)。一方で LRP5 はこの実験条件では切断断片は認められなかった (Fig. 9A)。LRP6 がこれまで知られていたどの基質より効率よく VAP1 により切断されたことは、LRP6 が VAP1 の良い基質であることを示唆している。

次に、ここで見られた LRP6 の切断が活性化部位で切断されるかどうかを調べるため、LRP6 の VAP1 による切断部位を同定した。切断部位の同定には、VAP1 による LRP6 の切断断片の質量分析を行うことで行った。VAP1 による LRP6 の

140 kDa、60 kDa の切断断片を、還元アルキル化後、トリプシンでゲル内消化を行い、LC/MS/MS 解析を行った。トリプシンによって切断されるペプチドは C 末端がリジンかアルギニンであるので、まずその部位以外で切断されているペプチドがあるかどうかを解析した。その結果、140 kDa の切断断片からは、1196 番目のグルタミン酸残基と 1197 番目のロイシン残基の間で切断されていると考えられる IAQLSDIHAVKE (1185-1196) というペプチドが、60 kDa の切断断片からは、同じく 1196 番目のグルタミン酸残基と 1197 番目のロイシン残基の間で切断されていると考えられる LNQEYR (1197-1202) というペプチドが検出された (Fig. 9B)。なお、この切断断片の LC/MS/MS 解析は左近健人と中澤志織特任助教の協力を得て行なった。この結果から LRP6 は VAP1 により、4 番目のβプロペラドメインの C 末端付近で切断されていることが示された (Fig. 9B)。

また、組換えマウス LRP6 が VAP1 により同様に切断されるか否かも解析した。その結果、組換えヒト LRP6 と同様に、140 kDa 付近に切断断片が見られた (Fig. 10)。このことは、マウスの LRP6 においても VAP1 が同様の箇所で切断している可能性が高い。VAP1 の LRP6 切断部位に関しては、ヒトのみならずマウスにおいても同様であると考えられる。

次に、この VAP1 による LRP6 の切断が、LRP ファミリータンパク質の持つ共通の性質であるかどうかを調べた。LRP6 と非常に相同性が高く、細胞外ドメイン欠失による Wnt シグナル活性化機能を持つ LRP5 と、LRP ファミリーの中で、血管内皮細胞に存在し、なおかつβプロペラドメインを持つ LRP8 について VAP1 による切断を調べた。

その結果、Fig. 9A の実験条件では LRP5 の切断は見られなかったが、VAP1 の濃度を 3 μg/ml まで上げることで LRP5 の切断断片が見られ、その切断断片を解析することにより、LRP5 は VAP1 によって LRP6 と構造的に同じ位置で切断されている事が示唆された (Fig. 9B) (西岡明日香：修士論文参照)。一方で、LRP8 は LRP5 に作用させた 10 倍量の VAP1 を作用させてもほとんど切断は見られなかった (Fig. 11)。これらの結果は、VAP1 によって切断されるのは少なくとも LRP ファミリー全体の性質ではないことがわかる。一方で、LRP5 と LRP6 が共通の性質として VAP1 に切断されることが明らかになった。

VAP1 により LRP5 と LRP6 は、LRP5 と LRP6 から、シグナル伝達に阻害的に働くという報告があるβプロペラドメインを除去し、シグナルを亢進させるという報告がある LDLa ドメインを残す箇所で切断されることが示唆された (Mao et

al., 2001; Brennan et al., 2004; Chen et al., 2014)。言い換えると、VAP1 は Wnt シグナルを活性化し得る箇所、LRP5/6 を特異的に切断していることが示唆された。

3-3. ヘビ毒 ADAM による LRP6 の切断は細胞間解離と出血に必要である

3-2 で LRP6 が VAP1 により *in vitro* において活性化部位で切断されることが明らかになったが、このような切断が VAP1 によって引き起こされる細胞間解離と出血に実際に関わるかどうかを調べた。

VAP1 による細胞間解離やマウスの出血に、VAP1 による LRP6 の特異的切断が真に関わるか否かを調べることを目的として、LRP6 切断箇所のペプチドに対する抗体を作製し、その阻害活性を調べた。まず、この抗体によって LRP6 の VAP1 による切断が阻害されるか否かを検討した。LRP6 にこの抗体を加えてインキュベートした後に VAP1 を加えると、コントロール抗体と比べ、140 kDa の切断断片の生成が抑制される ($p<0.01$) ことがわかった(Fig. 12A, B)。このことは、本ペプチド抗体が LRP6 の VAP1 による切断を阻害することを示している。以下、この抗体を「切断阻害抗体」、精製前の抗血清を「切断阻害抗血清」という。

次に、LRP6 の VAP1 による切断を切断阻害抗体によって阻害させることによって、VAP1 による細胞間解離が抑制されるか否かを検討した。その結果、切断阻害抗体でプレインキュベーションした細胞では、コントロール抗体とプレインキュベーションした細胞と比べて、VAP1 を作用させても細胞間に VE-cadherin が残っており、細胞間解離が抑制されることが示唆された (Fig. 13、矢印)。さらに、VE-cadherin が細胞間に残っている細胞の割合を計測した結果、その割合が切断阻害抗体を加えたものではコントロール抗体を加えたものに比べ、有意に ($p<0.05$) 増加していた (Fig13、グラフ)。このことは、LRP6 の切断阻害により、VAP1 による細胞応答が抑制されることが示唆している。

次に、LRP6 の切断阻害によって、VAP1 による出血が抑えられるかどうかを調べた。マウスの皮内に切断阻害抗血清もしくはコントロール抗血清を VAP1 と同時に注射したところ、切断阻害抗血清を注射した箇所では、コントロール抗血清を注射した箇所と比較して出血が有意に ($P<0.05$) 抑えられていた (Fig. 14 A, B)。従って、LRP6 の切断阻害により、出血が抑えられることが示唆された。

本研究により、LRP6 の切断阻害により、VAP1 による細胞間解離と出血が抑

えられる事が示唆された。LRP6 の VAP1 切断部位での切断が、ヘビ毒 ADAM の細胞に対する作用や出血に関与する事が初めて示唆された。

3-4. ヘビ毒出血耐性動物は LRP5/6 の切断活性化に関わる部位の欠損がある

3-3 で、LRP6 の切断を阻害することで、VAP1 による出血が抑えられる事が示唆された。その場合、VAP1 による切断耐性を示す変異をもった LRP5/6 をもつ動物においては、出血性ヘビ毒による出血が抑制されるかもしれない。そこで、実際に出血性ヘビ毒に耐性のある動物を含む様々な動物を取り上げ、LRP5/6 変異と出血耐性との間に相関関係が見られるか否かを検討した。

出血性ヘビ毒に対し出血耐性をもつ動物として、コブラ、オポッサム、マングース、ヘッジホッグ、ジリス、ラット、ラクダ、ヤギが知られている (Noguchi, 1909; Galán et al., 2004; Madsen and Noguchi, 1907; Harrison et al., 2006; Chanhom et al., 2003)。NCBI データベースで様々な動物の LRP6 と LRP5 のゲノムからの推定アミノ酸配列を調べた。

その結果、出血耐性の有無に関わらず、1 番目や 2 番目のβプロペラドメインを失っている LRP5 と LRP6 を持つ動物がしばしば見られた (Fig. 15)。LRP5/6 の 1 番目のβプロペラドメインは様々な Wnt に結合することが知られているが、3 番目のβプロペラドメインは Wnt3, Wnt3a, DKK1 に結合することが知られている (Ettenberg et al., 2010; Gong et al., 2010)。そのため、これらの部位の欠失は、Wnt アイソフォームの選択性に関わっているのかもしれない。これらの欠失は、出血耐性の有無に関わらず共通に持っていることから、これらの変異は、目的の出血耐性と相関のある変異ではない。

次に、出血耐性を持たない動物では見られず、出血耐性動物で見られる変異に注目した。すると、出血耐性動物であるキングコブラでは LRP6 に、ジュウサンセンジリス、ハリネズミでは LRP5 に、VAP1 による切断部位に欠失を持つアイソフォームが存在していた (Fig. 15 赤枠, Fig. 16)。また、キングコブラ、オポッサム、ヤギでは LRP6 に、ラット、ヒトコブラクダでは LRP5 に、常時活性化型の LRP6 の活性に関わる LDLa ドメインに欠失や置換を持つアイソフォームが存在していた (Fig. 15 赤枠, 橙枠, Fig. 16)。一方で、出血耐性を持たないヒト、マウス、ギニアピッグなどではそのような部位の変異は見られなかった (Fig. 15, 16)。

ヘビ毒 ADAM を持つキングコブラで LRP6 の変異が見られたため、他の爬虫類を調べる事で、このような性質が爬虫類全体の共通の性質なのかどうか調べるため、ヘビ毒 ADAM を持っていない爬虫類であるパイソンとグリーンアノールを調べた。その結果、パイソンとグリーンアノールは欠失を持つ LRP5, LRP6 を持たなかった (Fig. 15, 16)。また、出血耐性を持つオポッサムと同じ有袋類であるタスマニアンデビルを調べたところ、欠失をもつ LRP5, LRP6 を持たなかった (Fig. 15, 16)。この様に出血耐性動物のキングコブラ、オポッサム、ジュウサンセンジリス、ラット、ヒトコブラクダでは共通の変異として、LRP5/6 いずれかの VAP1 切断部位や LDLa ドメインに変異を持っており、出血に耐性を持たない動物ではこの様な部位の変異を持たなかった。即ち、出血と LRP5/6 の変異に相関があることが見出された。さらに、その出血と相関のある変異部位は、VAP1 切断部位と、常時活性化型の LRP6 の活性に寄与する LDLa ドメインであり、LRP5/6 の切断活性化に関与する部位であった。このことは、LRP5 と LRP6 の切断活性化の、出血における重要性を示唆しているのかもしれない。さらに、これらの LRP5/6 の変異が様々な種の多くの出血耐性動物で見られたことは、それぞれの出血耐性動物が独立に共通の変異を獲得したことを示唆しており、このことは出血耐性における LRP5/6 の重要性を示唆しているのかもしれない。興味深い。また、出血耐性が調べられていないトラ、クマ、オラウータンでも LRP5 の LDLa ドメインに欠失を持つアイソフォームが存在していた (Fig. 15 緑枠)。これらの変異を持っているこれらの動物は耐性を持っている可能性があり、興味深い。

3-5. ラット大動脈内皮細胞に対するヘビ毒 ADAM の作用の解析

これまでの結果により、LRP5/6 が VAP1 により活性化部位で切断されること、VAP1 を加えることで細胞間接着が開くこと、VAP1 による出血が引き起こされることが示された (Fig. 17A)。一方で、LRP6 の切断阻害抗体は、LRP6 の活性化部位での切断を抑えること、VAP1 による血管内皮細胞の細胞間解離を抑えること、VAP1 による出血を抑えられることが示された (Fig. 17B)。これらの結果は、LRP5/6 の切断と細胞間解離、また細胞間解離と出血とが、それぞれ密接な関係にあることを示唆している。

ここで、3-4 で示された様に、出血耐性動物では LRP5/6 の切断活性化に関与する部位に変異が見られた。ヘビ毒耐性動物は出血耐性を持つが、血管内皮細

胞において細胞間解離の耐性を持つかどうかは不明である (Fig. 17C)。出血耐性動物は LRP5/6 の切断活性化に関与する部位に変異を持っているため、LRP6 切断阻害抗体が細胞間解離を阻害したことを考えると、出血耐性動物の血管内皮細胞は細胞間解離に耐性を持つことが推測される。そこで、LRP5 の切断活性化に関与する部位に変異を持つラットに着目し、その血管内皮細胞のヘビ毒 ADAM による細胞応答について調べた。まず、ラット大動脈内皮細胞 (RAOEC) に VAP1 を作用させ、その形態的な変化を観察した。その結果、RAOEC では HUVEC において細胞間解離を起こす濃度の 4 倍の濃度の VAP1 を作用させても細胞間の解離は観察できなかった (Fig. 18)。ヒトの肺動脈細胞がヒト臍帯静脈血管内皮細胞と比べてほぼ変わらないガラガラヘビ毒感受性を持つことを考え合わせると (Araki et al., 1993)、ラットでは血管内皮細胞においてもヘビ毒 ADAM に耐性を示すことが示唆された。この事実は、血管内皮細胞のヘビ毒 ADAM に対する感受性が出血に深く関わるという仮説を強く支持している。また、LRP5 の切断活性化部位での変異と細胞応答性との関わりにおいても、本研究で得られた仮説を支持している。

3-6. ADAM8 と ADAM12 は VAP1 と同様の部位で LRP6 を切断する

これまでの結果により、VAP1 により LRP6 が切断され、またその切断が細胞間隙の解離と出血を引き起こすことが示唆された。序論で述べたように、ヒト内在性 ADAM ファミリータンパク質のいくつかは、がんや白血球の浸潤に関与することが知られているが、そのほとんどの生理的な基質が不明である (Shintani et al., 2004; Wildeboer et al., 2006; Rao et al., 2012; McGinn et al., 2011)。浸潤を行うためには細胞間解離を引き起こす必要があることを考えると、ヒト内在性 ADAM も VAP1 と同様な部位で LRP6 を切断しているかもしれない。そこで、VAP1 と比較的相同性の高い組換えヒト ADAM8 と組換えヒト ADAM12 を用いて、LRP6 の切断活性と切断部位について検討した。

まず ADAM8 が LRP6 を切断できるかどうかを調べた。その結果、組換えヒト LRP6 は ADAM8 により切断され、140 kDa の切断断片が検出された (Fig. 19)。その切断断片をトリプシン消化した後 LC/MS/MS で解析したところ、VAP1 による 140 kDa の切断断片で見られたものと同じ IAQLSDIHAVKE というペプチドが検出された (Fig. 21)。この結果は、ADAM8 が LRP6 を VAP1 と同一部位で切断することを示している。

次に ADAM12 が LRP6 を切断できるかどうかを検討した。その結果、組換えヒト LRP6 は ADAM12 により切断され、140 kDa と 60 kDa 付近に切断断片が検出された (Fig. 20)。その切断断片をトリプシンで消化した後 LC/MS/MS で解析したところ、140 kDa の切断断片からは VAP1 による 140 kDa の切断断片で見られたものと同じ IAQLSDIHAVKE というペプチドが検出された。一方、60 kDa の切断断片からは VAP1 による 60 kDa の切断断片で見られたものと同じ LNLQEYR というペプチドが検出された (Fig. 21)。この結果は、ADAM12 も LRP6 を VAP1 と同一部位で切断することを示している。

これらの結果は、少なくともヒト内在性 ADAM8 と ADAM12 が、LRP6 の特定部位を切断し、Wnt シグナルを活性化しうることを示唆している。細胞間解離を引き起こすヘビ毒 ADAM と共通の切断部位を持つことは、細胞浸潤における細胞間解離で、ADAM8 と ADAM12 が LRP6 の切断活性化を引き起こしている可能性が考えられ、非常に興味深い。

4. 考察

4-1. ADAM による LRP5/6 活性化機構

本研究ではヘビ毒 ADAM とヒト ADAM が LRP5/6 を Wnt シグナル活性化部位で切断することを示した (Fig. 9, 19-21)。さらに、LRP6 のその部位での切断を阻害することで、ヘビ毒 ADAM の一つである VAP1 によって誘導される培養細胞の細胞間の解離とマウスでの出血を抑制することが示唆された (Fig. 13, 14)。これらの結果は、ヘビ毒 ADAM が LRP5/6 を切断活性化し、細胞間の解離と出血を引き起こすことを示唆している。

これに関して、背景で記述したようにこれまでの研究で、 β プロペラドメインを取り除いた LRP5/6 変異体が Wnt シグナルを常時活性化することが報告されていた (Mao et al., 2001; Brennan et al., 2004)。しかし β プロペラドメインを取り除く部分で切断されるのではないが、補体の因子である C1q が LRP6 を 3 番目の β プロペラドメインの中央付近で切断することと、Wnt シグナルを活性化することが報告されている (Naito et al., 2012; Sumida et al., 2015)。しかし 3 番目までの β プロペラドメインを欠失させた LRP6 変異体では Wnt シグナルの活性化は観察されないという報告もあり (Mao et al., 2001)、この部位での切断が Wnt シグナルの活性化に使われているかどうかは議論の余地がある。また、この現象は、人の老化や組織の機能障害と関係があると考えられており (Naito et al., 2012; Sumida et al., 2015)、正常な生体内での切断活性化酵素は不明であった。また、PKC と Wnt3a の活性化は LRP6 を膜近傍部位で切断するが、その切断酵素は不明である (Mi and Johnson, 2007)。このように、LRP5/6 の常時活性化部位での切断酵素や生理的な意義は不明であった。

本研究により、ADAM ファミリータンパク質が LRP5/6 の常時活性化部位を切断し、Wnt シグナルを活性化することが示唆された (Fig. 9, 19-21)。さらにその切断が、出血や細胞間解離といった生理活性を引き起こすことが示唆された。

4-2. ヘビ毒出血耐性機構に関する考察

これまで、毒ヘビやオポッサムなどの出血耐性動物では出血耐性機構として、血清中のプロテアーゼ阻害因子、ヘビ毒結合因子、抗凝固因子などを含む様々な因子が報告されてきた (Catanese and Kress, 1992; Valente et al., 2001; Aoki et al.,

2007; Jansa and Voss, 2011)。本研究では、多くのヘビ毒耐性動物が VAP1 切断部位あるいは LDLa ドメインに欠失、置換などを持つ LRP5/6 を持ち、ヘビ毒非耐性動物ではこれらの欠失、置換を持つ LRP5/6 を持たないことを示した (Fig.15, 16)。この結果は、VAP1 切断活性化に耐性を持つと考えられる LRP5/6 を持つ動物は出血耐性を持つことを示している。さらに、様々な種の出血耐性動物が共通して切断活性化部位の欠失や置換を持っていることは、LRP5/6 の変異は出血耐性のメカニズムとして広く使われていると考えられる。このことは出血における LRP5/6 の切断活性化の重要性を示している。また、興味深いことに、出血耐性動物では LRP5 と LRP6 のいずれかに変異を持っていたものの、その両方に変異を持っている動物はいなかった (Fig. 15)。つまり、出血耐性の獲得には LRP5、LRP6 のいずれかの変異で十分であるのかもしれない。言い換えれば、出血を起こすのには LRP5、LRP6 の片方だけの切断では不十分で、両方の切断が必要なのかもしれない。これに関連して、Wnt のシグナル伝達に関して、Wnt3a においては LRP6 のみが必要であるのに対して、Wnt1, 9b, 10b においては、LRP5、LRP6 の両方が必要であるという報告がある (Goel et al., 2012)。この報告では、生理的な LRP5/6 の量では単独で Wnt シグナルを活性化できず、LRP5/6 がヘテロダイマーを作ることによってシグナルを活性化するというモデルが提唱されている。ヘビ毒による出血においても同じように、LRP5/6 がヘテロダイマーを作ることによって細胞内にシグナルを伝えているのかもしれない、興味深い。

また本研究により、ヘビ毒耐性動物であるラットにおいて、その血管内皮細胞にヘビ毒 ADAM である VAP1 を作用させても細胞間の解離が起きないことが示された (Fig. 18)。この結果は、LRP5 の切断活性化部位に欠失を持つラットでは血管内皮細胞において耐性を持つことを示している。さらにこの結果は、ラットの出血耐性機構における血管内皮細胞のヘビ毒に対する抵抗性の寄与を示しているのかもしれない、興味深い。

4-3. ヘビ毒による出血機構

これまでヘビ毒 ADAM による出血機構として、ECM の分解や、細胞間接着タンパク質の直接的な分解等、様々な仮説が提唱されてきた (Escalante et al., 2006; Collares et al., 2002; Wu and Huang, 2003; Escalante et al., 2011)。ヘビ毒中には様々なヘビ毒 ADAM が存在しており、その基質選択性が広いものと厳密なものがある。出血を引き起こすためには ECM 障壁を開くことと、細胞障壁を開く

ことが必要である。従って広い基質選択性を持つヘビ毒 ADAM は出血において ECM タンパク質の分解を行なっているのかもしれない。このような広い選択性を持つヘビ毒 ADAM の ECM における標的候補として Collagen α 1 と perlecan が挙げられている (Escalante et al., 2011)。一方で、細胞障壁の崩壊に関しては、ヘビ毒 ADAM の 1 つである graminelysin により、細胞がアポトーシスするとともに数時間で VE-cadherin が分解されることが報告されている (Wu and Huang, 2003)。これに対し、本研究ではヘビ毒 ADAM である VAP1 を作用させることで、1 時間で細胞障壁の崩壊や出血が観察され (Fig. 3)、またこの条件では VE-cadherin が直接もしくは間接的に分解されないことを示した (Fig. 4)。このことは、基質選択性が高く、なおかつ出血活性を持つヘビ毒 ADAM が、何らかの信号伝達を引き起こすことで細胞間接着を開くことを示唆している。さらに 4-1 で示したように、これまでの仮説とは対照的に、本研究の結果は、出血にも関わる細胞間接着解離を起こすヘビ毒 ADAM の標的が LRP5/6 であることを明らかにした。他のヘビ毒 ADAM による ECM 障壁の崩壊や細胞間接着崩壊と、出血への協調的な関わりは不明ではあるが、本研究により、ヘビ毒 ADAM による細胞間解離とそれによる出血誘導との関連、さらに出血機構の理解に向けた新しいパラダイムを得ることができた。

4-4. LRP5/6 切断部位と VAP1 の基質特異性

これまでの研究で、VAP1 の基質として Fibrinogen や Fibronectin などが見つかっている。その切断部位の解析から、VAP1 切断部の P1' 部位が疎水性残基である傾向があった (Fig. 23 A) (松本佳央理: 修士論文)。タンパク質—タンパク質ドッキング推定プログラムによるドッキングシミュレーションから (Pierce et al., 2014)、LRP6 の切断部から C 末端側の部分が VAP1 の酵素部位近傍の溝にフィットすることが示された (Fig. 23 B)。VAP1 の基質として、P1' と P3' が疎水性の残基が好まれていることは、VAP1 の触媒部位の S1' ポケットと S3' ポケットが疎水性の残基であることと一致しているのかもしれない。これまでヘビ毒 ADAM を含め、ADAM 全体の基質選択機構は不明であったが、最も良く切断される基質である LRP6 が明らかになった事により、その基質認識機構についての示唆が得られた。

一方で、ヘビ毒 ADAM に関しては、vWFa ドメインや Collagen と結合する、

ヘビ毒 ADAM 中のディスインテグリンドメインやシステインリッチドメインが、ADAM の基質特異性に関与することが報告されている (Serrano et al., 2006; Baldo et al., 2015)。LRP6 は、内皮細胞において、vWFa ドメインを持つ tumor endothelial marker 8 と capillary morphogenesis protein 2 と複合体を作ることが報告されている (Abrami et al., 2008)。したがって、生体内ではこれらのタンパク質が LRP6 と相互作用し、そこにヘビ毒 ADAM が vWFa を介して接近して LRP6 を切断しているかもしれない。生体内での出血機構を理解するために、今後はそのような結合に関する研究を進めていく必要がある。

4-5. ADAM による細胞間解離のシグナル伝達

本研究において、VE-cadherin の細胞間から細胞質への移行に LRP6 の切断が関与することを示したが (Fig. 13)、ヘビ毒 ADAM により局在変化が観察された γ -catenin は、 β -catenin と比べ、転写活性が低いことが報告されている (Williams et al., 2000; Winn et al., 2002)。従って、ヘビ毒 ADAM によって誘導される γ -catenin の局在変化は、転写産物の変化による EndoMT (endothelial mesenchymal transition) の誘導というよりは、細胞間接着の崩壊に関わっている可能性がある。また、興味深いことに、白血球の浸潤では、血管内皮細胞のトリセルラージェンクションが浸潤の通り道として使われていることが報告されているが、トリセルラージェンクションでは β -catenin よりむしろ γ -catenin が存在していることが報告されている (Burns et al., 1997)。したがって、浸潤におけるヒト内在性 ADAM による LRP6 の切断は、 β -catenin の移行というよりはむしろ γ -catenin の移行に働いているのかもしれない。一方で、 β プロペラドメインを除いた LRP6 は β -catenin の移行を引き起こすため (Vinyoles et al., 2014)、ヘビ毒 ADAM やヒト内在性 ADAM は β -catenin も移行させることができるかもしれない。

今後は ADAM による LRP5/6 の切断がどのように γ -catenin や VE-cadherin の局在変化を引き起こしているかを研究していく必要がある。

4-6. ADAM による細胞間解離の機構

ADAM8 や ADAM12 を含むいくつかのヒト内在性 ADAM は白血球やがんの浸潤に関与することが報告されている (Shintani et al., 2004; Wildeboer et al., 2006; Rao et al., 2012)。それに加えて、ヒト内在性 ADAM が、浸潤に用いられる仮足

の先端に局在することが報告されている (Abram et al., 2003; Stautz et al., 2010)。しかしながら、HB-EGF や Delta-like 1 のような細胞を活性化させるヒト内在性 ADAM の基質は報告されていたが (Asakura et al., 2002; Dyczynska et al., 2007)、浸潤におけるヒト内在性 ADAM の役割や浸潤においてヒト内在性 ADAM により分解される基質は不明であった。本研究では、ADAM8 と ADAM12 が LRP6 を、細胞間接着の解離を引き起こすような切断活性化部位で、切断することを示した (Fig. 19-21)。白血球やがん細胞の浸潤性の仮足の先端に局在しているヒト内在性 ADAM は LRP5/6 を切断することで、細胞間の解離を引き起こしているのかもしれない。そこで、組換えヒト ADAM12 を血管内皮細胞に直接作用させる実験を行なったが、血管内皮細胞の細胞間接着の崩壊は見られなかった (Fig. 22)。この実験において細胞間接着の崩壊が見られなかったことは、LRP6 切断活性を持つ組換えヒト ADAM12 の量が少なく、LRP6 を切断できなかったことによるものであることも考えられるが、ADAM8 や ADAM12 のような膜結合 ADAM は、可溶性のヘビ毒 ADAM と違い、血管内皮細胞の全体ではなく仮足が接している部位でのみ作用している可能性も考えられる。これまで、がんの浸潤と白血球の血管外遊出における走化性、細胞接着、ECM 分解に関するたくさんの報告があるが (Vestweber, 2015; Roy et al., 2004)、がんが細胞障壁を開けることにおける細胞間接着の崩壊のメカニズムはこれまでほとんどわかっていなかった。ADAM による LRP5/6 の切断を介した細胞間接着解離機構を研究することは、がん細胞の浸潤や白血球の血管外遊走の研究における新たな突破口になることが期待される。

結語

本研究から示唆されたヘビ毒 ADAM による出血機構、ヒト内在性 ADAM の作用機構について以下にまとめる (Fig. 24)。

ヘビ毒 ADAM を作用させることにより、血管内皮細胞において VE-cadherin が細胞間から細胞質に分解されることなく局在変化し、また γ -catenin も細胞質に移行することが示唆された。ヘビ毒 ADAM により、LRP5/6 が活性化部位で切断されることが示された。さらに LRP6 その部位での切断を抑えることにより、ヘビ毒 ADAM による細胞間解離と出血を抑えることが示唆された。出血耐性動物の LRP5/6 の推定アミノ酸配列解析から、多くの出血耐性動物では切断活性化に関わる部位に変異のある LRP5/6 のいずれかを持つことが示された。また、出血耐性動物であるラットの血管内皮細胞がヘビ毒 ADAM による細胞間解離に対して抵抗性を持つことが示された。

このように、ヘビ毒による出血において、その出血因子であるヘビ毒 ADAM は血管内皮細胞上に存在している LRP5/6 を切断、活性化することにより、 γ -catenin の細胞質移行、VE-cadherin の細胞質移行を引き起こし、細胞間接着を解離させ、出血を引き起こすことが示唆された (Fig. 24)。

一方で、ヘビ毒 ADAM と相同性が高く浸潤に関わるヒト内在性 ADAM である ADAM8、ADAM12 がヘビ毒 ADAM と同様に、LRP6 を活性化部位で切断していることが示された。このように、がんや白血球の浸潤においては、浸潤に関わるヒト内在性 ADAM が LRP5/6 を切断、活性化することにより、細胞間接着を解離させ、浸潤を行うという、内在性 ADAM 機能の新しい仮説を提唱することができた (Fig. 24)。

本研究により、ヘビ毒 ADAM による細胞間解離による出血機構という新しい機構のモデルを提示することができた。また、これまで不明であったヒト内在性 ADAM の生理的な基質とその作用機構について重要な示唆を得た。さらに、ADAM による Wnt シグナル活性化による細胞間解離機構という全く新しい細胞間解離機構モデルを提示することができた。これらの発見は新たなヘビ毒出血の阻害剤の開発や、がん転移阻害剤、炎症阻害剤の開発にも繋がる。今後は ADAM による LRP5/6 の切断から伝わる細胞内シグナル、ヒト内在性 ADAM による細胞応答の解析に加え、本仮説のさらなる多角的な検証が求められる。

謝辞

本研究を行うにあたり、その機会と環境を与えてくださり、多大なるご指導、ご助言をいただきました名古屋大学理学研究科附属臨海実験所 澤田均教授に厚く御礼申し上げます。

本研究において、直接指導していただき、熱心にご指導してくださった名古屋大学理学研究科附属臨海実験所 荒木聡彦講師に心より御礼申し上げます。

本研究を行うにあたり、プロテオーム解析に協力して頂き、有益なご助言を頂きました名古屋大学理学研究科附属臨海実験所 中澤志織特任助教に厚く御礼申し上げます。

本研究を行うにあたり、様々なご助言を頂きました福岡大学理学部 塩井成留美助教に深く感謝いたします。

本研究を行うにあたり、指導をして頂き、公私ともに有益な助言をくださった本学 大隅圭太教授、木下専教授に厚く御礼申し上げます。

いつも温かく見守ってくださり、的確なご助言を頂きました名古屋大学理学研究科附属臨海実験所 原田淑人助教、伊勢優史特任助教に感謝申し上げます。

本研究を行うにあたり、臨海実験所での生活を支えてくださった名古屋大学理学研究科附属臨海実験所 砂川昌彦氏、福岡雅史氏、上村由貴代氏、白江麻貴氏に深く感謝申し上げます。

本研究を行うにあたり、共に取り組み、多くのご協力の下さいました名古屋大学理学研究科生命理学専攻海洋発生生化学研究室の皆様に深く感謝いたします。

最後に、常に支えてくださった家族に深く感謝いたします。

参考文献

- Abram CL, Seals DF, Pass I, Salinsky D, Maurer L, Roth TM & Courtneidge SA** (2003) The adaptor protein fish associates with members of the ADAMs family and localizes to podosomes of Src-transformed cells. *J Biol Chem* 278, 16844-16851.
- Abrami L, Kunz B, Deuquet J, Bafico A, Davidson G & van der Goot FG** (2008) Functional interactions between anthrax toxin receptors and the WNT signalling protein LRP6. *Cell Microbiol* 10, 2509-2519.
- Aoki N, Sakiyama A, Deshimaru M & Terada S** (2007) Identification of novel serum proteins in a Japanese viper: homologs of mammalian PSP94. *Biochem Biophys Res Commun* 359, 330-334.
- Araki S, Ishida T, Yamamoto T, Kazuhiko K & Hayashi H** (1993) Induction of apoptosis by hemorrhagic snake venom in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 190, 148-153.
- Araki S, Masuda S, Maeda H, Ying MJ & Hayashi H** (2002) Involvement of specific integrins in apoptosis induced by vascular apoptosis-inducing protein 1. *Toxicon* 40, 535-542.
- Asakura M, Kitakaze M, Takashima S, Liao Y, Ishikura F, Yoshinaka T, Ohmoto H, Node K, Yoshino K, Ishiguro H, Asanuma H, Sanada S, Matsumura Y, Takeda H, Beppu S, Tada M, Hori M & Higashiyama S** (2002) Cardiac hypertrophy is inhibited by antagonism of ADAM12 processing of HB-EGF: metalloproteinase inhibitors as a new therapy. *Nat Med* 8, 35-40.
- Baldo C, Lopes DS, Faquim-Mauro EL, Jacysyn JF, Niland S, Eble JA, Clissa PB & Moura-da-Silva AM** (2015) Jararhagin disruption of endothelial cell anchorage is enhanced in collagen enriched matrices. *Toxicon* 108, 240–248.
- Bjarnason JB & Fox JW** (1994) Hemorrhagic toxins from snake venoms. *Pharm Therap* 62, 325-372.
- Brennan K, Gonzalez-Sancho JM, Castelo-Soccio LA, Howe LR & Brown AM** (2004) Truncated mutants of the putative Wnt receptor LRP6/Arrow can stabilize beta-catenin independently of Frizzled proteins. *Oncogene* 23, 4873-4884.

- Burns AR, Walker DC, Brown ES, Thurmon LT, Bowden RA, Keese CR, Simon SI, Entman ML & Smith CW** (1997) Neutrophil transendothelial migration is independent of tight junctions and occurs preferentially at tricellular corners. *J Immunol* 159, 2893-2903.
- Casagolda D, Del Valle-Pérez B, Valls G, Lugilde E, Vinyoles M, Casado-Vela J, Solanas G, Batlle E, Reynolds AB, Casal JI, de Herreros AG & Duñach M** (2010) p120-catenin-CK1epsilon complex regulates Wnt signaling. *J Cell Sci* 123, 2621-2631.
- Casewell NR** (2012) On the ancestral recruitment of metalloproteinases into the venom of snakes. *Toxicon* 60, 449-454.
- Catanese JJ & Kress LF** (1992) Isolation from opossum serum of a metalloproteinase inhibitor homologous to human alpha 1B-glycoprotein. *Biochemistry* 31, 410-418.
- Chanhom L, Khoo O, Omori-Satoh T & Sitprija V** (2003) Antihemorrhagin in the blood serum of king cobra (*Ophiophagus hannah*): purification and characterization. *Toxicon* 41, 1013-1019.
- Chen J, Yan H, Ren DN, Yin Y, Li Z, He Q, Wo D, Ho MS, Chen Y, Liu Z, Yang J, Liu S & Zhu W** (2014) LRP6 dimerization through its LDLR domain is required for robust canonical Wnt pathway activation. *Cell Signal* 26, 1068-1074.
- Collares-Buzato CB, de Paula Le Sueur L & da Cruz-Höfling MA** (2002) Impairment of the cell-to-matrix adhesion and cytotoxicity induced by Bothrops moojeni snake venom in cultured renal tubular epithelia. *Tox Appl Pharm* 181, 124-132.
- Dyczynska E, Sun D, Yi H, Sehara-Fujisawa A, Blobel CP & Zolkiewska A** (2007) Proteolytic processing of delta-like 1 by ADAM proteases. *J Biol Chem* 282, 436-444.
- Edwards DR, Handsley MM and Pennington CJ** (2008) The ADAM metalloproteinases. *Mol Aspects Med* 29, 258-289.
- Escalante T, Rucavado A, Fox JW & Gutiérrez JM** (2011) Key events in microvascular damage induced by snake venom hemorrhagic metalloproteinases. *J Proteomics* 74, 1781-1794.
- Escalante T, Shannon J, Moura-da-Silva AM, Gutiérrez JM & Fox JW** (2006)

Novel insights into capillary vessel basement membrane damage by snake venom hemorrhagic metalloproteinases: a biochemical and immunohistochemical study. Arch Biochem Biophys 455, 144-153.

- Ettenberg SA, Charlat O, Daley MP, Liu S, Vincent KJ, Stuart DD, Schuller AG, Yuan J, Ospina B, Green J, Yu Q, Walsh R, Li S, Schmitz R, Heine H, Bilic S, Ostrom L, Mosher R, Hartlepp KF, Zhu Z, Fawell S, Yao YM, Stover D, Finan PM, Porter JA, Sellers WR, Klagge IM & Cong F** (2010) Inhibition of tumorigenesis driven by different Wnt proteins requires blockade of distinct ligand-binding regions by LRP6 antibodies. Proc Natl Acad Sci USA 107, 15473–15478.
- Dickinson ME & McMahon AP** (1992) The role of Wnt genes in vertebrate development. Curr Opin Genet Dev 2, 562-566.
- Fox JW, Ma L, Nelson K, Sherman NE & Serrano SM** (2006) Comparison of indirect and direct approaches using ion-trap and Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry for exploring viperid venom proteomes. Toxicon 47, 700-714.
- Galán JA, Sánchez EE, Rodríguez-Acosta A & Pérez JC** (2004) Neutralization of venoms from two Southern Pacific Rattlesnakes (*Crotalus helleri*) with commercial antivenoms and endothermic animal sera. Toxicon 43, 791-799.
- Goel S, Chin EN, Fakhraldeen SA, Berry SM, Beebe DJ & Alexander CM** (2012) Both LRP5 and LRP6 receptors are required to respond to physiological Wnt ligands in mammary epithelial cells and fibroblasts. J Biol Chem 287, 16454-16466.
- Gong Y, Bourhis E, Chiu C, Stawicki S, DeAlmeida VI, Liu BY, Phamluong K, Cao TC, Carano RA, Ernst JA, Solloway M, Rubinfeld B, Hannoush RN, Wu Y, Polakis P & Costa M** (2010) Wnt isoform-specific interactions with coreceptor specify inhibition or potentiation of signaling by LRP6 antibodies. PLoS One 5, e12682.
- Grossmann AH, Yoo JH, Clancy J, Sorensen LK, Sedgwick A, Tong Z, Ostanin K, Rogers A, Grossmann KF, Tripp SR, Thomas KR, D'Souza-Schorey C, Odelberg SJ & Li DY** (2013) The small GTPase ARF6 stimulates β -catenin

transcriptional activity during WNT5A-mediated melanoma invasion and metastasis. *Sci Signal* 265, ra14.

Harrison RA, Hasson SS, Harmsen M, Laing GD, Conrath K & Theakston RD (2006) Neutralisation of venom-induced haemorrhage by IgG from camels and llamas immunised with viper venom and also by endogenous, non-IgG components in camelid sera. *Toxicon* 47, 364-368.

Haÿ E, Laplantine E, Geoffroy V, Frain M, Kohler T, Müller R & Marie PJ (2009) N-cadherin interacts with axin and LRP5 to negatively regulate Wnt/beta-catenin signaling, osteoblast function, and bone formation. *Mol Cell Biol* 29, 953-964.

Jansa SA & Voss RS (2011) Adaptive evolution of the venom-targeted vWF protein in opossums that eat pitvipers. *PLoS One* 6, e20997.

Kamiguti AS, Hay CR & Zuzel M (1996) Inhibition of collagen-induced platelet aggregation as the result of cleavage of alpha 2 beta 1-integrin by the snake venom metalloproteinase jararhagin. *Biochem J* 320 (Pt 2), 635–641.

Lai YH, Cheng J, Cheng D, Feasel ME, Beste KD, Peng J, Nusrat A & Moreno CS (2011) SOX4 interacts with plakoglobin in a Wnt3a-dependent manner in prostate cancer cells. *BMC Cell Biol* 12, 50.

Lobb RR & Fett JW (1984) Purification of two distinct growth factors from bovine neural tissue by heparin affinity chromatography. *Biochemistry* 23, 6295-6299.

Madsen T & Noguchi H (1907) TOXINS AND ANTITOXINS--SNAKE VENOMS AND ANTIVENINS. *J Exp Med* 9, 18-50.

Mao J, Wang J, Liu B, Pan W, Farr GH 3rd, Flynn C, Yuan H, Takada S, Kimelman D, Li L & Wu D (2001) Low-density lipoprotein receptor-related protein-5 binds to Axin and regulates the canonical Wnt signaling pathway. *Mol Cell* 7, 801-809.

Mao B, Wu W, Li Y, Hoppe D, Stannek P, Glinka A & Niehrs C (2001) LDL-receptor-related protein 6 is a receptor for Dickkopf proteins. *Nature* 411, 321-325.

Maruyama J, Hayashi H, Miao J, Sawada H & Araki S (2005) 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.

- Masuda S, Araki S, Kaji K & Hayashi H** (1997) Purification of a vascular apoptosis-inducing factor from hemorrhagic snake venom. *Biochem Biophys Res Commun* 235, 59-63.
- Masuda S, Hayashi H & Araki S** (1998) Two vascular apoptosis-inducing proteins from snake venom are members of the metalloprotease/disintegrin family. *Eur J Biochem* 253, 36-41.
- Masuda S, Ohta T, Kaji K, Fox JW, Hayashi H & Araki S** (2000) cDNA cloning and characterization of vascular apoptosis-inducing protein 1. *Biochem Biophys Res Commun* 278, 197-204.
- McGinn OJ, English WR, Roberts S, Ager A, Newham P & Murphy G** (2011) Modulation of integrin $\alpha 4\beta 1$ by ADAM28 promotes lymphocyte adhesion and transendothelial migration. *Cell Biol Int* 35, 1043-1053.
- Mi K & Johnson GV** (2007) Regulated proteolytic processing of LRP6 results in release of its intracellular domain. *J Neurochem* 101, 517-29.
- Naito AT, Sumida T, Nomura S, Liu ML, Higo T, Nakagawa A, Okada K, Sakai T, Hashimoto A, Hara Y, Shimizu I, Zhu W, Toko H, Katada A, Akazawa H, Oka T, Lee JK, Minamino T, Nagai T, Walsh K, Kikuchi A, Matsumoto M, Botto M, Shiojima I & Komuro I** (2012) Complement C1q activates canonical Wnt signaling and promotes aging-related phenotypes. *Cell* 149, 1298-1313.
- Nakazawa S, Shirae-Kurabayashi M, Otsuka K & Sawada H** (2015) Proteomics of ionomycin-induced ascidian sperm reaction: Release and exposed sperm proteins in the ascidian *Ciona intestinalis*. *Proteomics* 15, 4064-4079.
- Noguchi H** (1909) Natural immunity of certain animals from snake venom. In *Snake Venoms*, p. 268. Carnegie Institute, Washington, D.C..
- Nusse R & Varmus HE.** (1992) Wnt genes. *Cell* 69, 1073-1087.
- Ownby CL** (1990) Locally acting agents: myotoxins, hemorrhagic toxins and dermonecrotic factors. In *Handbook of Toxicology* (Shierand WT, Mebs D, eds) , pp. 602-654. Marcel Dekker, NY.
- Ozawa, M., Baribault, H. & Kemler, R.** (1989) . The cytoplasmic domain of the cell adhesion molecule uvomorulin associates with three independent proteins structurally related in different species. *EMBO J.* 8, 1711- 1717.

- Papkoff J, Rubinfeld B, Schryver B & Polakis P** (1996) Wnt-1 regulates free pools of catenins and stabilizes APC-catenin complexes. *Mol Cell Biol* 16, 2128-2134.
- Pellon-Cardenas O, Clancy J, Uwimpuhwe H & D'Souza-Schorey C** (2013) ARF6-Regulated Endocytosis of Growth Factor Receptors Links Cadherin-Based Adhesion to Canonical Wnt Signaling in Epithelia. *Mol Cell Biol* 33, 2963–2975.
- Pierce BG, Wiehe K, Hwang H, Kim BH, Vreven T & Weng Z** (2014) ZDOCK server: interactive docking prediction of protein-protein complexes and symmetric multimers. *Bioinformatics* 30, 1771-1773.
- Pinto AFM, Ma L, Dragulev B, Guimaraes JA & Fox JW** (2007) Use of SILAC for exploring sheddase and matrix degradation of fibroblasts in culture by the PIII SVMP atrolysin A: Identification of two novel substrates with functional relevance. *Arch Biochem Biophys* 465, 11–15.
- Rao VH, Kandel A, Lynch D, Pena Z, Marwaha N, Deng C, Watson P & Hansen LA** (2012) A positive feedback loop between HER2 and ADAM12 in human head and neck cancer cells increases migration and invasion. *Oncogene* 31, 2888-2898.
- Roy R, Wewer UM, Zurakowski D, Pories SE & Moses MA** (2004) ADAM12 cleaves extracellular matrix proteins and correlates with cancer status and stage. *J Biol Chem* 279, 51323–51330.
- Serrano SM, Kim J, Wang D, Dragulev B, Shannon JD, Mann HH, Veit G, Wagener R, Koch M & Fox JW** (2006) The cysteine-rich domain of snake venom metalloproteinases is a ligand for von Willebrand factor A domains: role in substrate targeting. *J Biol Chem* 281, 39746–39756.
- Shintani Y, Higashiyama S, Ohta M, Hirabayashi H, Yamamoto S, Yoshimasu T, Matsuda H & Matsuura N** (2004) Overexpression of ADAM9 in non-small cell lung cancer correlates with brain metastasis. *Cancer Res* 64, 4190-4196.
- Stautz D, Sanjay A, Hansen MT, Albrechtsen R, Wewer UM & Kveiborg M** (2010) ADAM12 localizes with c-Src to actin-rich structures at the cell periphery and regulates Src kinase activity. *Exp Cell Res* 316, 55-67.
- Sumida T, Naito AT, Nomura S, Nakagawa A, Higo T, Hashimoto A, Okada K, Sakai T, Ito M, Yamaguchi T, Oka T, Akazawa H, Lee JK, Minamino T, Offermanns S, Noda T, Botto M, Kobayashi Y, Morita H, Manabe I, Nagai T,**

- Shiojima I & Komuro I** (2015) Complement C1q-induced activation of β -catenin signalling causes hypertensive arterial remodelling. *Nat Commun* 6, 6241.
- Takahashi T & Osaka A** (1970) Purification and some properties of two hemorrhagic principles (HR2a and HR2b) in the venom of *Trimeresurus flavoviridis*; complete separation of the principles from proteolytic activity. *Biochim Biophys Acta* 207, 65-75.
- Takeda S, Igarashi T, Mori H & Araki S** (2006) Crystal structures of VAP1 reveal ADAMs' MDC domain architecture and its unique C-shaped scaffold. *EMBO J* 25, 2388-2396.
- Takeya H, Oda K, Miyata T, Omori-Satoh T & Iwanaga S** (1990) The complete amino acid sequence of the high molecular mass hemorrhagic protein HR1B isolated from the venom of *Trimeresurus flavoviridis*. *J Biol Chem* 265, 16068-16073.
- Takeya H & Iwanaga S** (1998) Proteases that induce hemorrhage. In *Enzyme from Snake Venom* (Bailey GS, ed), pp. 11-38. Alaken, Inc., Fort Collins, CO.
- Valente RH, Dragulev B, Perales J, Fox JW & Domont GB** (2001) BJ46a, a snake venom metalloproteinase inhibitor. Isolation, characterization, cloning and insights into its mechanism of action. *Eur J Biochem* 268, 3042-3052.
- Vestweber D** (2015) How leukocytes cross the vascular endothelium. *Nat Rev Immunol* 15, 692-704.
- Vinyoles M, Del Valle-Pérez B, Curto J, Viñas-Castells R, Alba-Castellón L, García de Herreros A & Duñach M** (2014) Multivesicular GSK3 sequestration upon Wnt signaling is controlled by p120-catenin/cadherin interaction with LRP5/6. *Mol Cell* 53, 444-457.
- Wildeboer D, Naus S, Amy Sang QX, Bartsch JW & Pagenstecher A** (2006) Metalloproteinase disintegrins ADAM8 and ADAM19 are highly regulated in human primary brain tumors and their expression levels and activities are associated with invasiveness. *J Neuropath Exp Neurol* 65, 516-527.
- Williams BO, Barish GD, Klymkowsky MW & Varmus HE** (2000) A comparative evaluation of beta-catenin and plakoglobin signaling activity. *Oncogene* 19, 5720-5728.

- Winn RA, Bremnes RM, Bemis L, Franklin WA, Miller YE, Cool C & Heasley LE** (2002) Gamma-Catenin expression is reduced or absent in a subset of human lung cancers and re-expression inhibits transformed cell growth. *Oncogene* 21, 7497-7506.
- Wu WB & Huang TF** (2003) Activation of MMP-2, cleavage of matrix proteins, and adherens junctions during a snake venom metalloproteinase-induced endothelial cell apoptosis. *Exp Cell Res* 288, 143-157.
- Zhao Q, Araki S, Zhang S & Miao J** (2004) Rattlesnake venom induces apoptosis by stimulating PC-PLC and upregulating the expression of integrin beta4, P53 in vascular endothelial cells. *Toxicon* 44, 161-168.
- 西岡 明日香, (2016) VAP1 の標的分子としての LRP5 の研究 (名古屋大学 修士論文)
- 松本 佳央理, (2010) 血管内皮細胞アポトーシス誘導因子 VAP1, VAP2 の基質特異性の解析 (名古屋大学 修士論文)

・ヘビ毒ADAMによる出血

・内在性ADAMによる浸潤

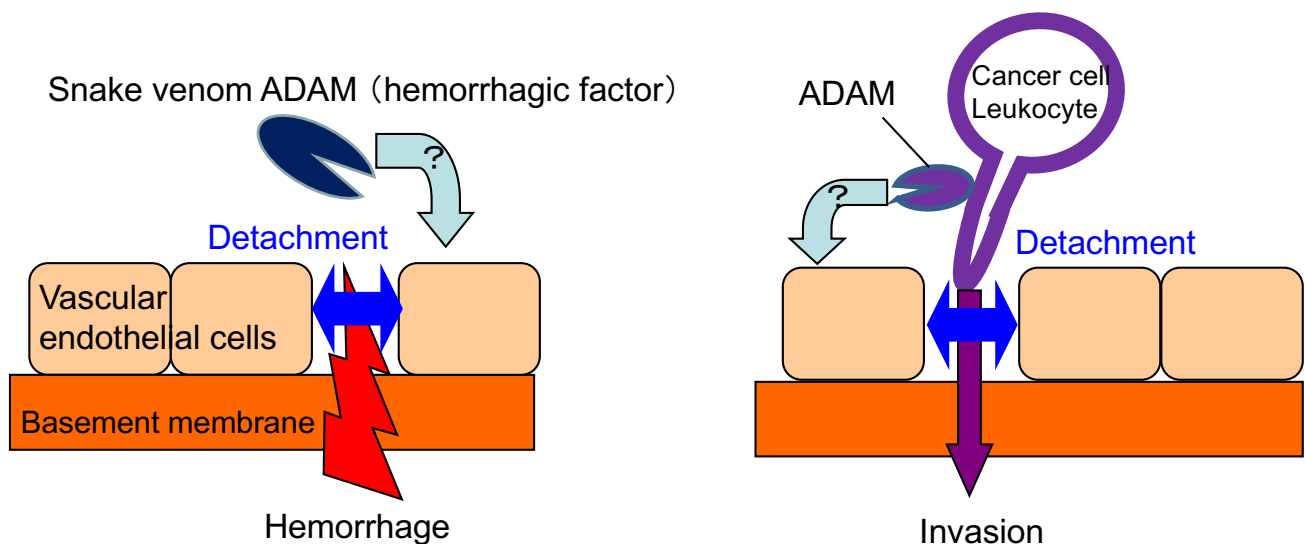
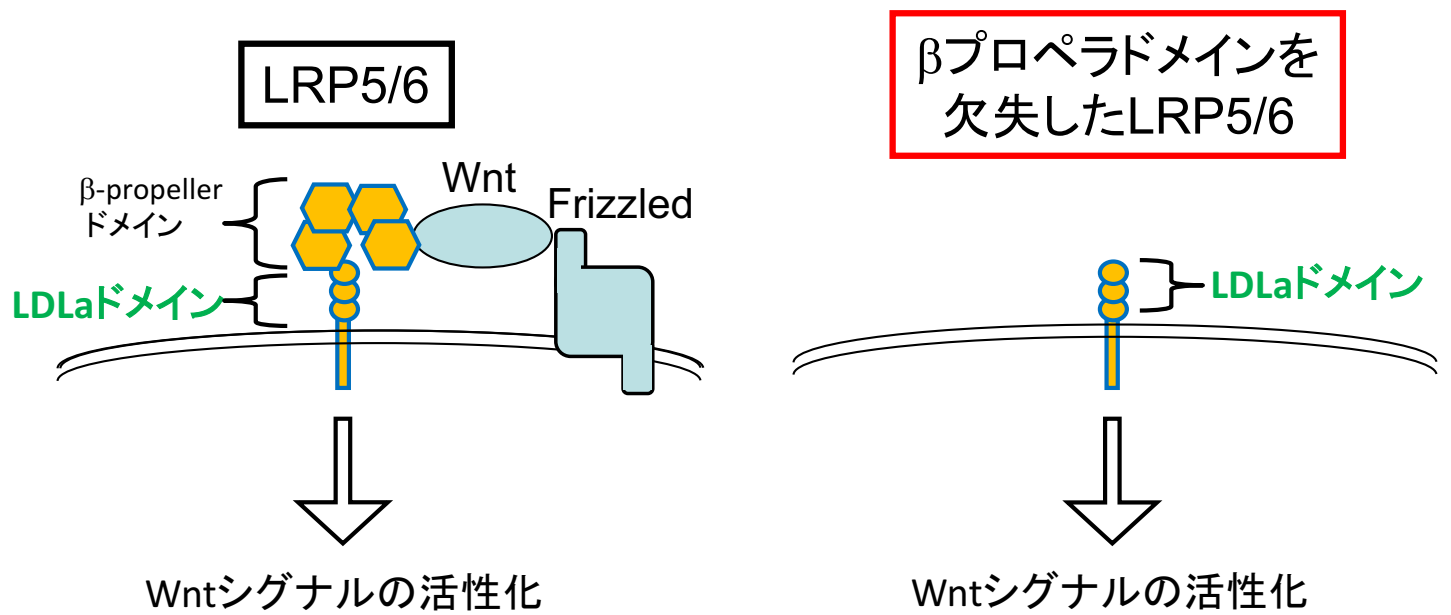


Fig. 1. ヘビ毒ADAMによる出血と内在性ADAMによる浸潤の共通点

ヘビ毒ADAMによる出血では、ヘビ毒ADAMが血管内皮細胞に作用することで、細胞間の解離を引き起こし、出血を起こすことが考えられる。一方で、がんや白血球における浸潤では、がん細胞や白血球の細胞膜に局在するADAMが血管内皮細胞に何らかの作用をすることで、細胞間の解離を引き起こしている可能性が考えられている。このように、ヘビ毒ADAMと、浸潤に関係するヒト内在性ADAMには、細胞間解離を引き起こすという点で共通性が見られる。



A: LRP5/6はWntと結合することにより、Wntシグナルを活性化する

B: LRP5/6の細胞外ドメインを人工的に欠失させるとWnt, FrizzledなしでもWntシグナルを常時活性化する

Fig. 2. 細胞外βプロペラドメインを欠失させたLRP5/6はWntシグナルを活性化する

Wnt共受容体であるLRP5/6にWntが結合することにより活性化される。一方で細胞外ドメインのβプロペラドメインを除いたLRP5/6は、WntなしでもWntシグナルを常時活性化できる。

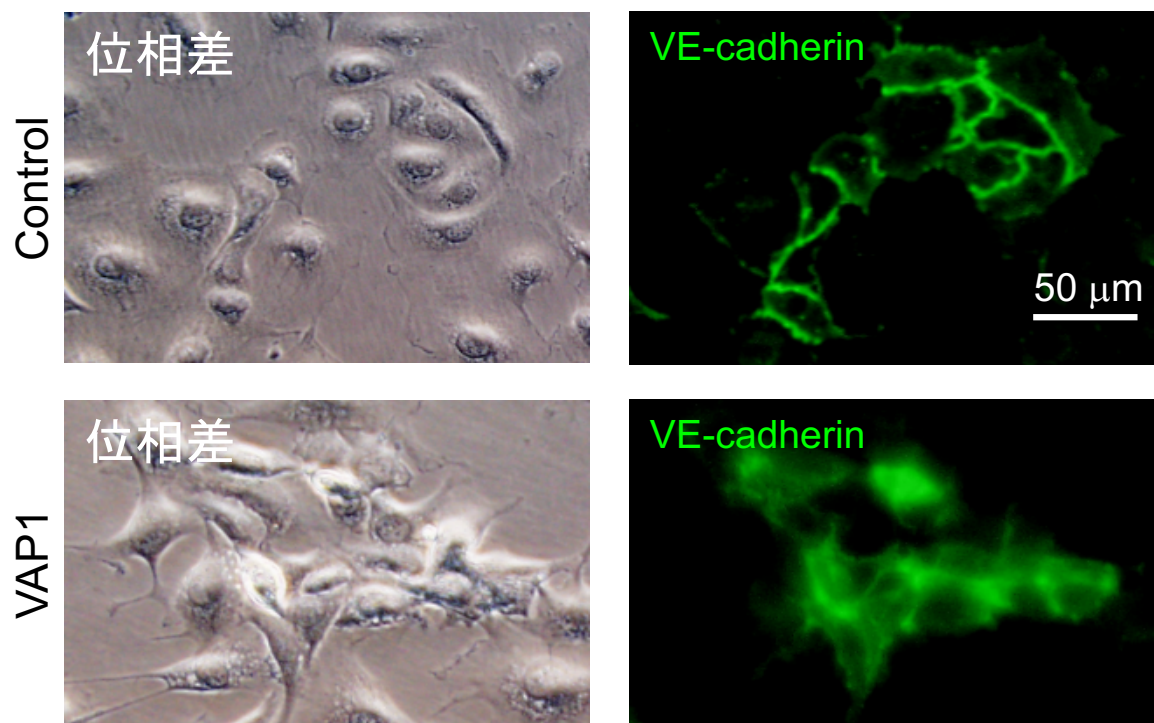


Fig. 3. ヘビ毒ADAM (VAP1) で処理した細胞におけるVE-cadherinの局在性の変化

HUVECに140 ng/mlのVAP1を添加し、1時間、37℃、無血清培地中でインキュベーションした。固定後、抗VE-cadherin抗体を用いて免疫染色を行なった。

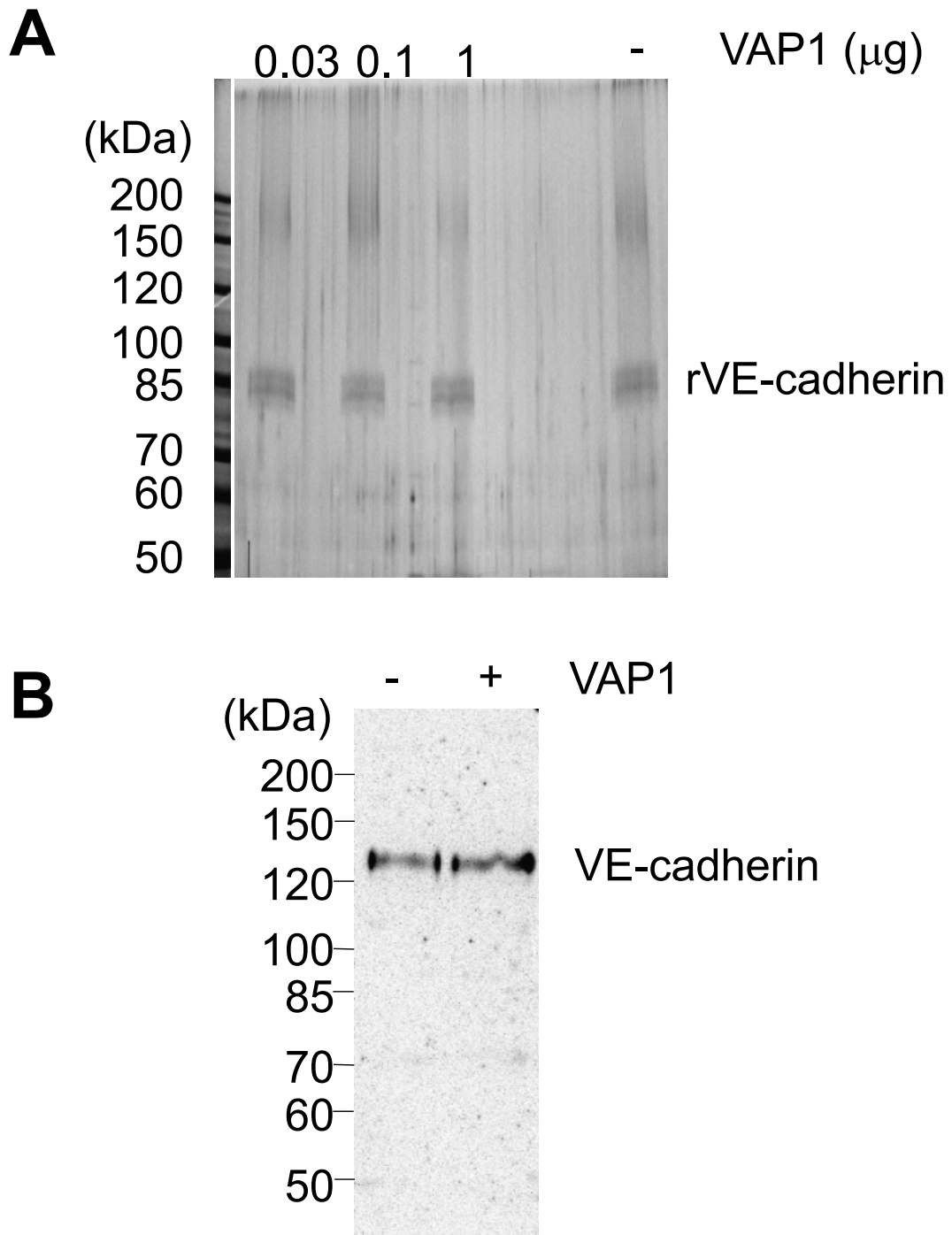
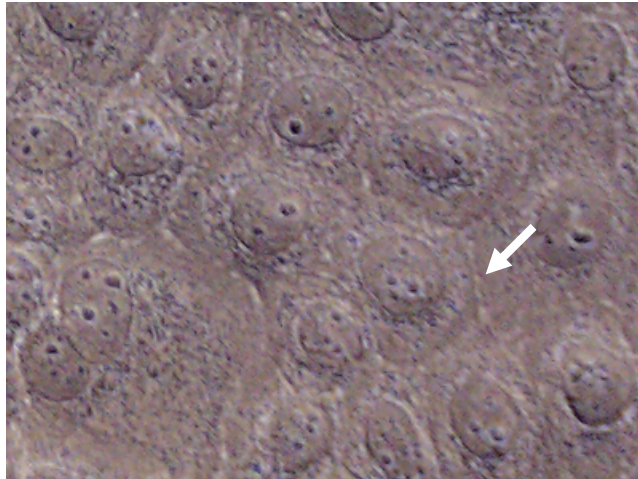


Fig. 4. VE-cadherinのVAP1による切断の検討

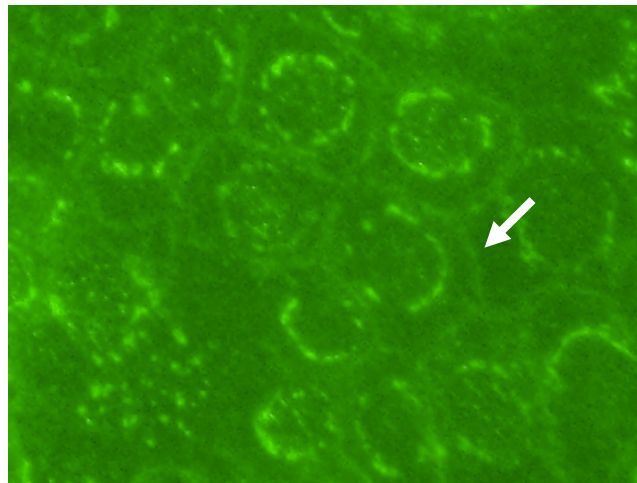
A: *in vitro*におけるVE-cadherin切断実験。23 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のヒトの細胞外ドメインの組換えVE-cadherinをそれぞれ0.03, 0.1, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のVAP1とともにPBS中で37°C、1時間でインキュベートを行なった。それぞれの資料を10% アクリルアミドゲルを用いてSDS-PAGEで分離し、銀染色によりタンパク質を検出した。

B: HUVECを140 ng/mlのVAP1存在下または非存在下で1時間、37°C、無血清培地中でインキュベートを行った。細胞 (3×10^6) を溶解バッファー (5% 2-mercaptoethanol, 2% SDS, 5% sucrose, 0.005% bromophenol blue, 63 mM Tris/HCl, pH 6.8) で回収し、10% アクリルアミドゲルを用いてSDS-PAGEで分離し、転写を行った。抗VE-cadherin抗体を用いてWestern blot解析を行なった。

位相差



β -catenin



Merge

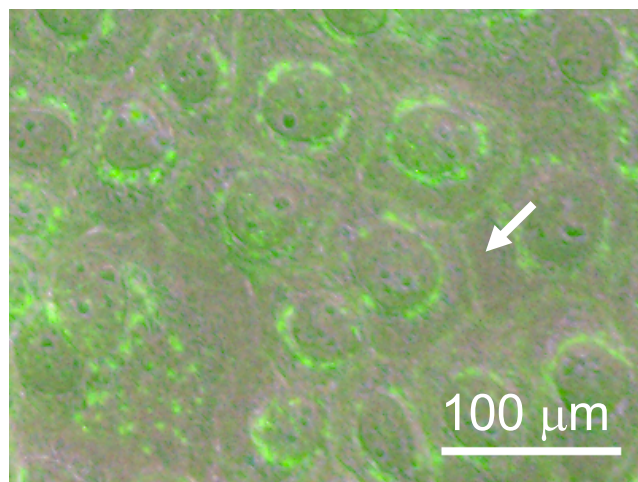


Fig. 5. 抗 β -catenin抗体を用いたA431細胞の免疫染色

A431細胞を固定し、抗 β -catenin抗体による免疫染色を行なった。矢印は細胞間における β -cateninの局在を示している。

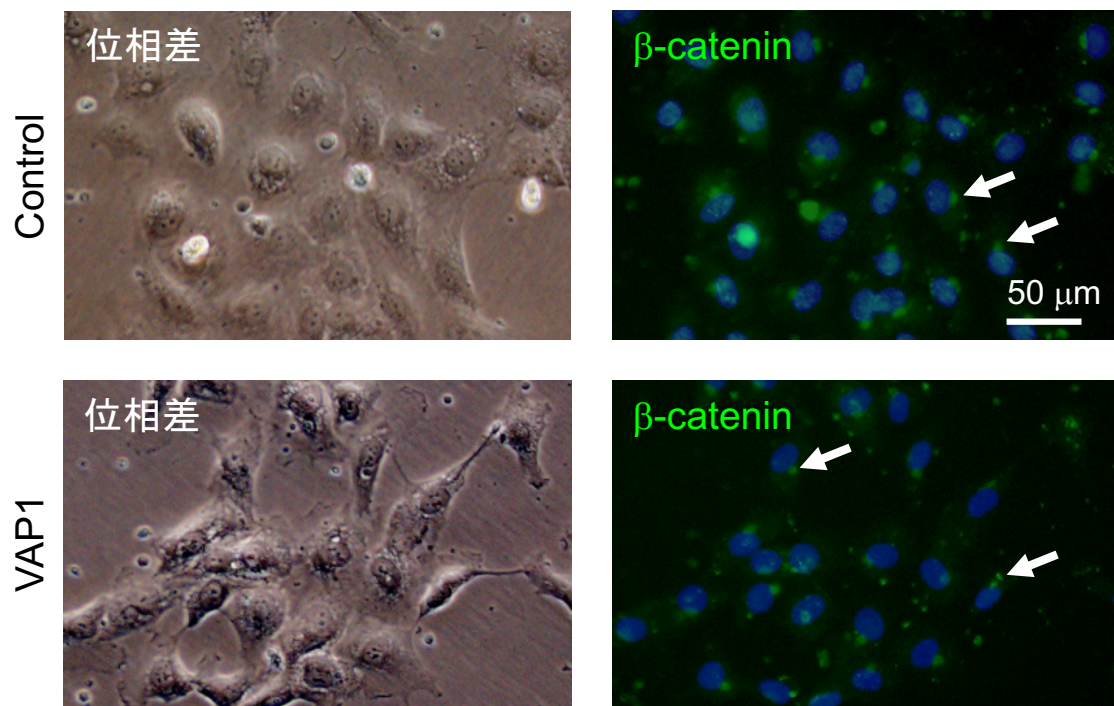


Fig. 6. ヘビ毒ADAM (VAP1) で処理した細胞における β -cateninの局在性

HUVECを70 ng/mlのVAP1存在下または非存在下で37°C、1時間、無血清培地中でインキュベートを行なった。固定した後、抗 β -catenin抗体 (緑)により免疫染色を行なった。また、核をHoechst 33342 (青)で染色した。矢印は β -cateninの核周辺部位での局在を示している。

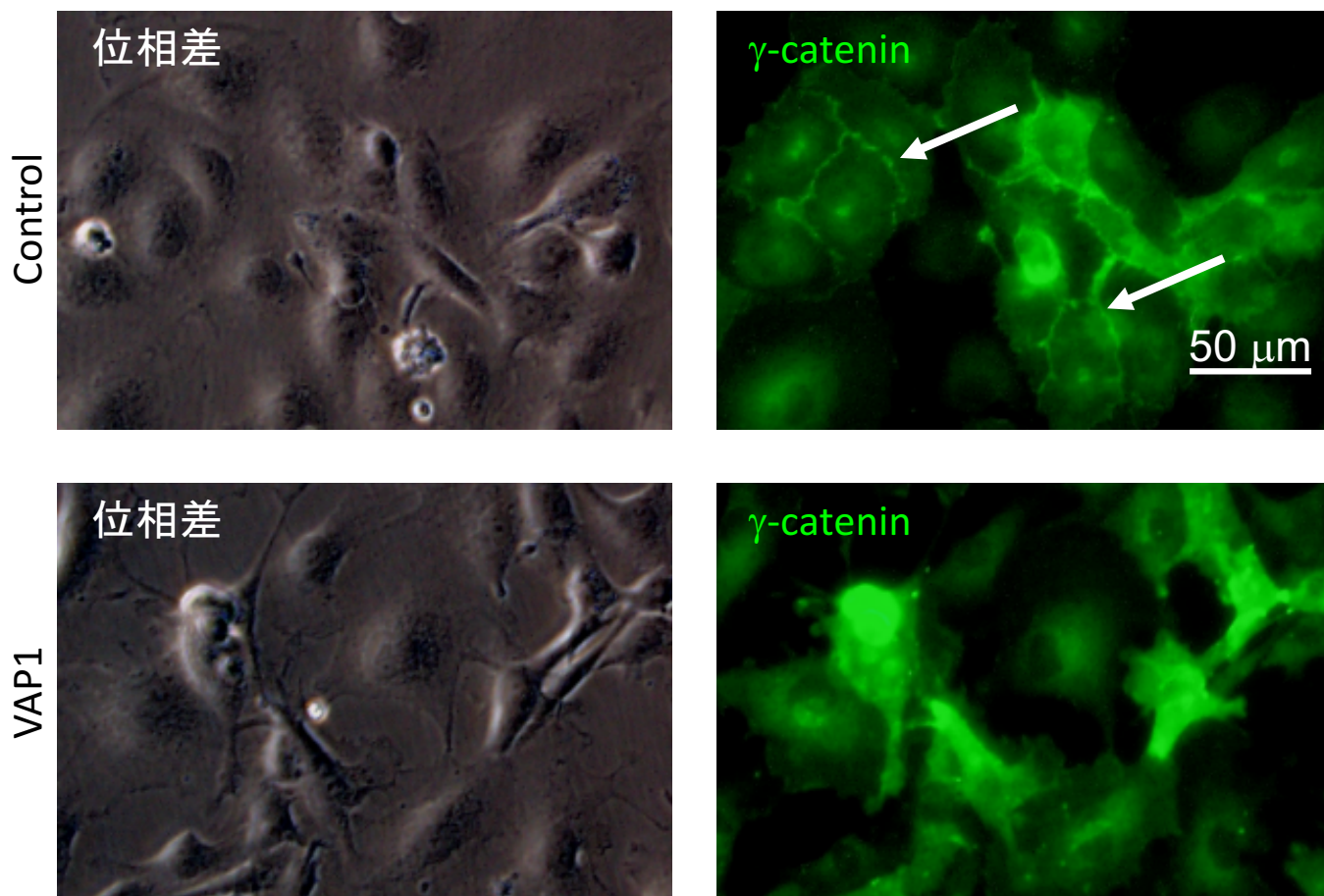


Fig. 7. ヘビ毒ADAM (VAP1) で処理した細胞における γ -cateninの局在性

HUVECを70 ng/mlのVAP1存在下または非存在下で37℃、1時間、無血清培地中でインキュベートを行なった。固定した後、抗 γ -catenin抗体 (緑) により免疫染色を行なった。矢印は γ -cateninの細胞間での局在を示している。

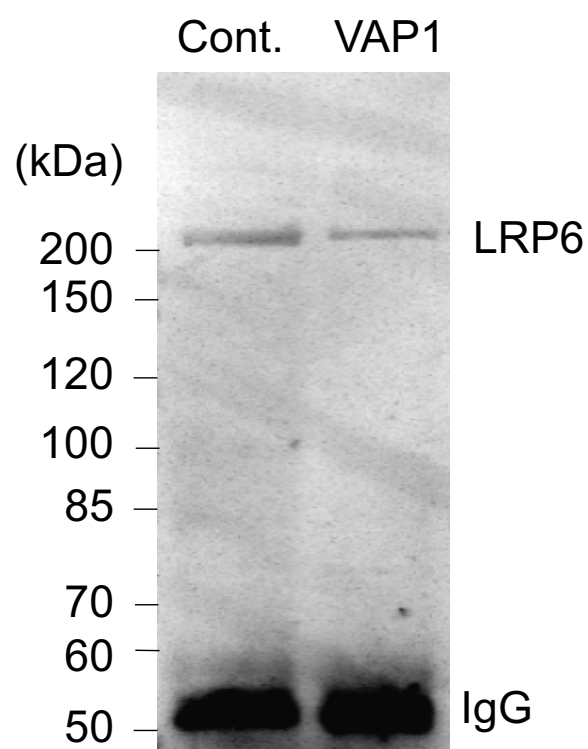


Fig. 8. ヘビ毒ADAM (VAP1) で処理した細胞におけるLRP6のWestern blot解析

HeLa細胞を0.4 $\mu\text{g/ml}$ のVAP1の存在下と非存在下で37°C、2時間、無血清培地中でインキュベートを行い、細胞 (1.5×10^7) を溶解バッファー (25 mM Tris/HCl, pH 7.4, 300 mM NaCl, 1.5 mM MgCl_2 , 0.5% Triton X-100, 1 mM PMSF, 4 mM EDTA)で溶解した。抗LRP6抗体を用い免疫沈降を行なった後、10% アクリルアミドゲルを用いてSDS-PAGEで分離し、転写を行った。抗LRP6抗体を用いWestern blot解析を行なった。

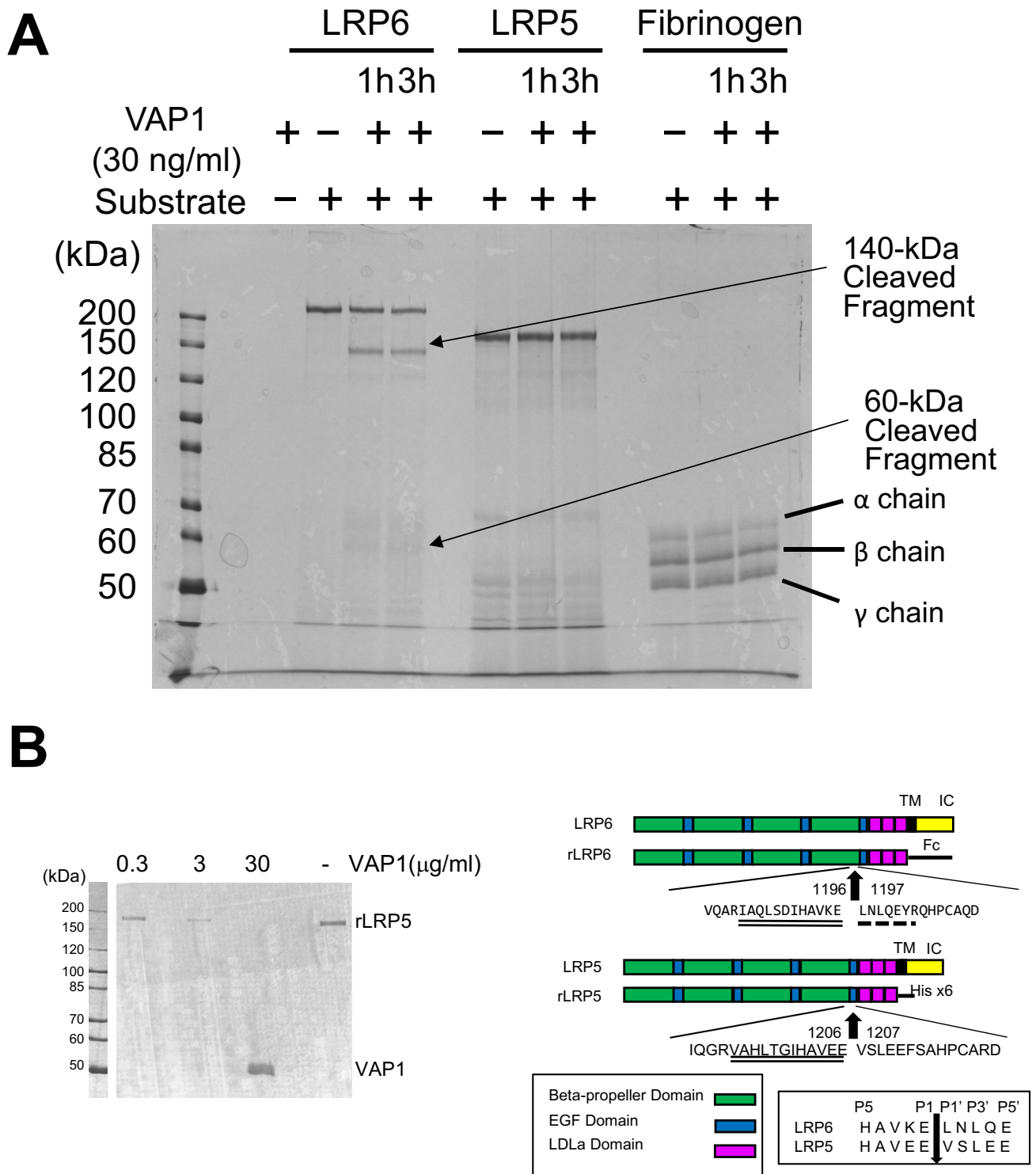


Fig. 9. LRP5, LRP6のVAP1による切断実験

A: 17 $\mu\text{g/ml}$ の組換えヒトLRP6、17 $\mu\text{g/ml}$ の組換えマウスLRP5または50 $\mu\text{g/ml}$ の精製ウシfibrinogenを0.03 $\mu\text{g/ml}$ のVAP1で1時間もしくは3時間、37°C、PBS中でインキュベートを行なった。試料を10% アクリルアミドゲルを用いてSDS-PAGEで分離し、銀染色を行なった。

B: 26 $\mu\text{g/ml}$ の組換えマウスLRP5とそれぞれの濃度のVAP1を1時間、37°C、PBS中でインキュベートを行った。試料を10% アクリルアミドゲルを用いてSDS-PAGEで分離し、銀染色を行なった。

C: 質量分析の結果から得られたLRP6とLRP5の予想切断部位とそのペプチド配列を示した。LRP5/6は4番目の β プロペラドメインのC末端付近で切断されていることが示唆された。

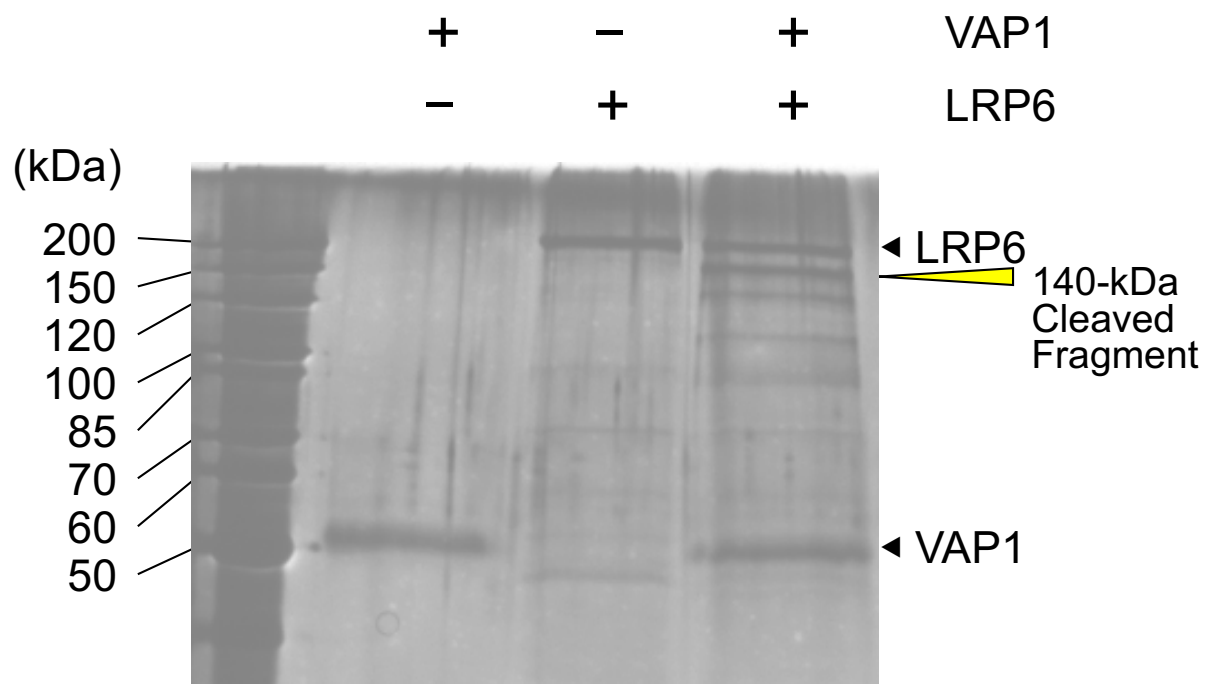


Fig. 10. マウスLRP6のVAP1による切断実験

13 $\mu\text{g/ml}$ の組換えマウスLRP6を20 $\mu\text{g/ml}$ のVAP1と37°C、1時間でインキュベーションを行なった。試料を15% アクリルアミドゲルを用いてSDS-PAGEで分離し、銀染色を行なった。

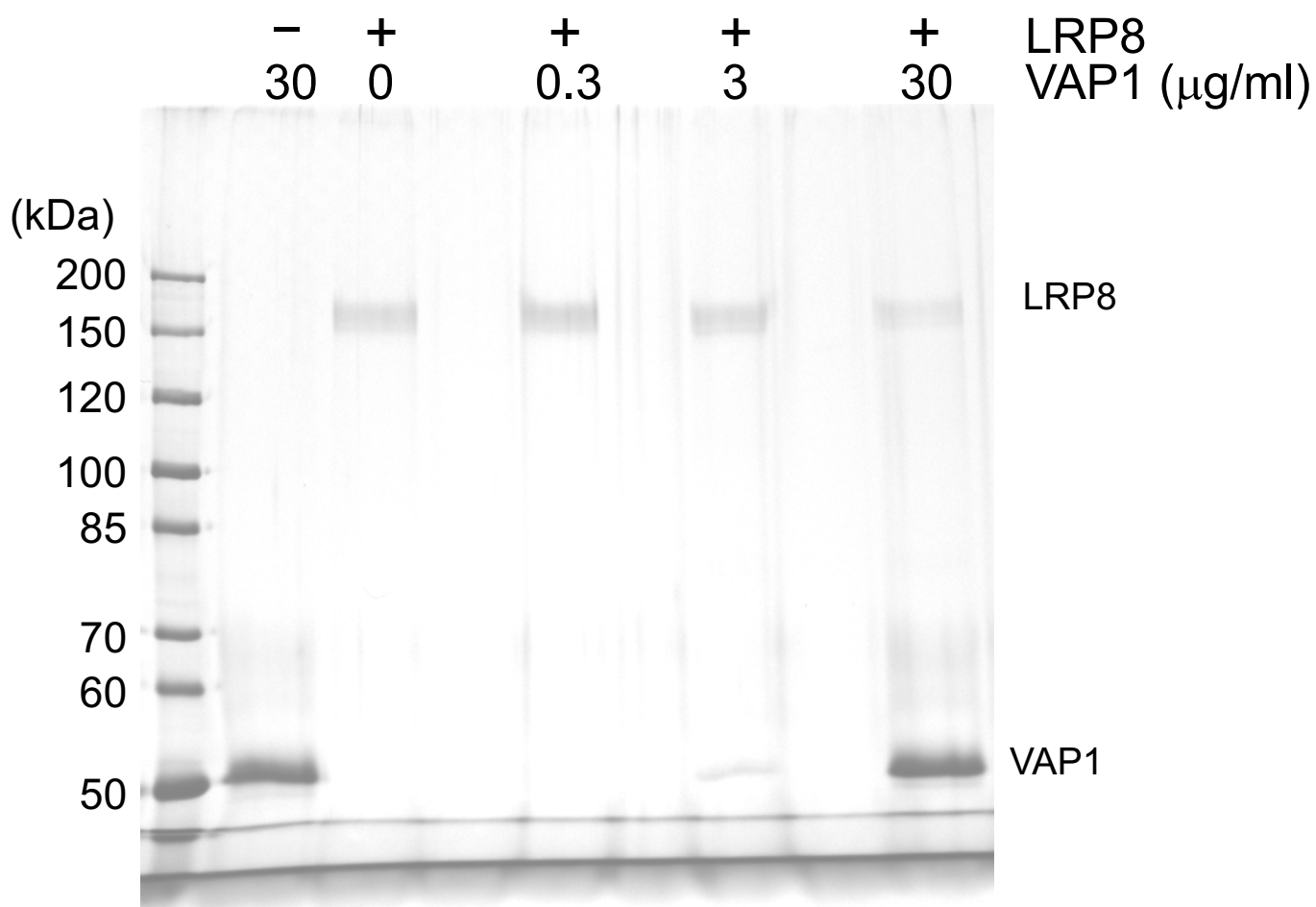


Fig. 11. LRP8のVAP1による切断実験

15 $\mu\text{g/ml}$ の組換えヒトLRP8とVAP1 0.3, 3, 30 $\mu\text{g/ml}$ を1時間、37°C、PBS中でインキュベートした。試料を10% アクリルアミドゲルを用いてSDS-PAGEで分離し、銀染色を行なった。

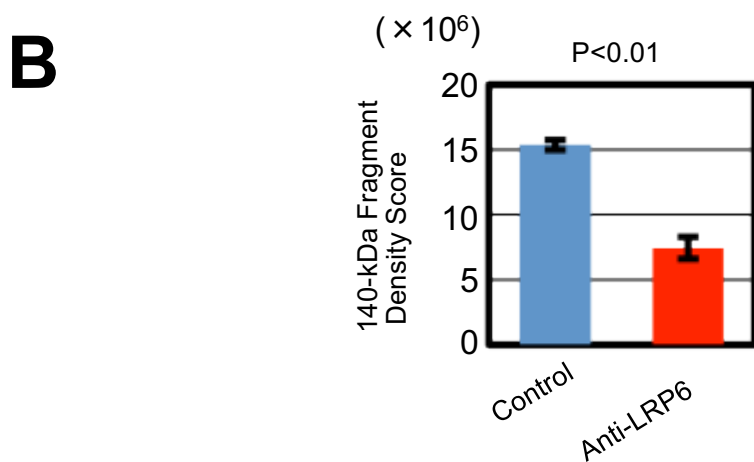
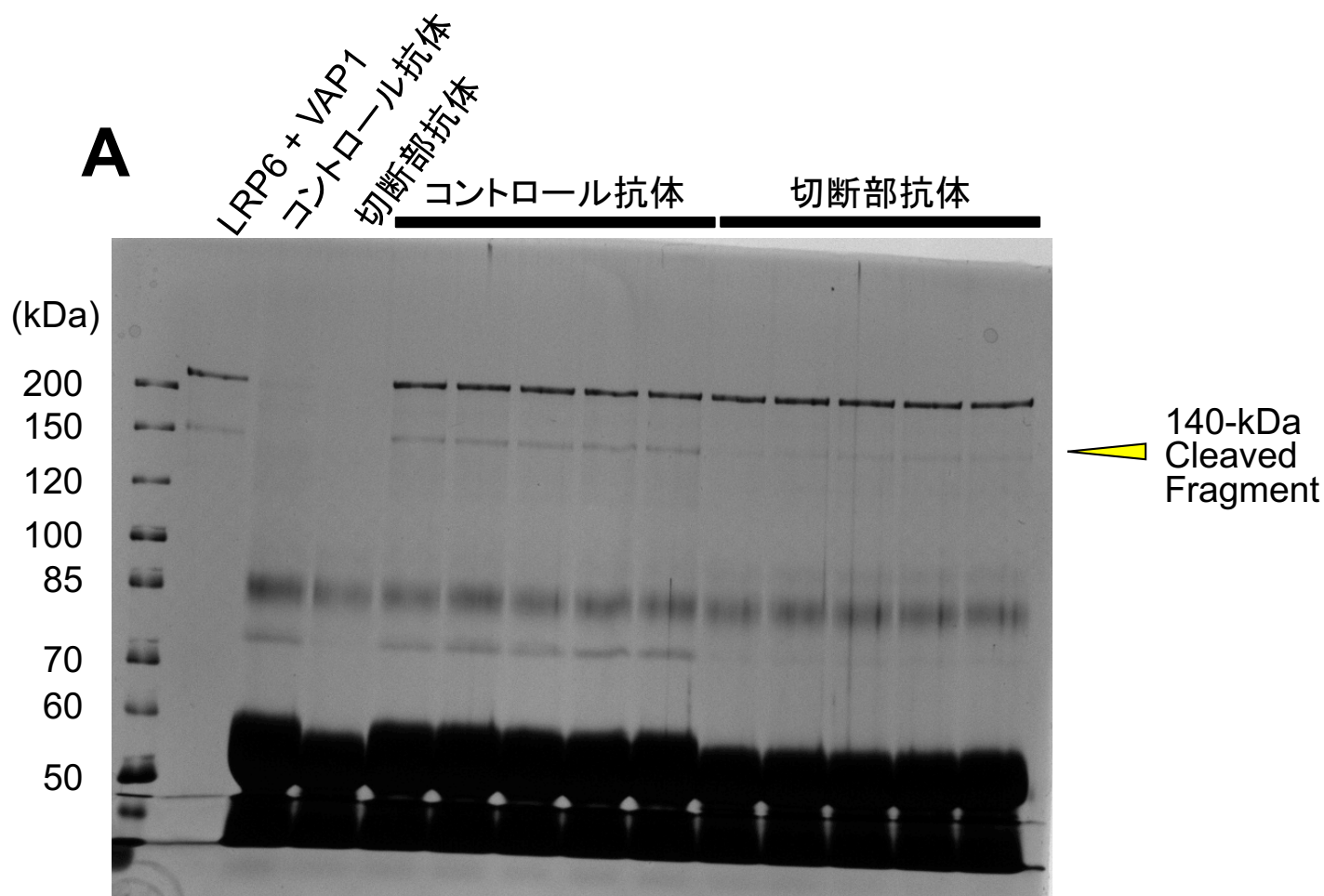


Fig. 12. LRP6の切断阻害抗体の作成

A: 30 $\mu\text{g/ml}$ の組換えヒトLRP6を2 mg/ml の切断部抗体あるいはコントロール抗体とプレインキュベーションした。その後30 ng/ml のVAP1と37 $^{\circ}\text{C}$ 、1時間インキュベートした。反応後の試料を10% アクリルアミドゲルを用いてSDS-PAGEで分離し、銀染色を行なった。

B: Aで見られた140 kDaの切断断片の濃さを測定した。二つの実験条件間でマン・ホイットニーのU検定を行ない有意差 ($P < 0.01$) が見られた。(n=5、エラーバーは標準誤差を表す)

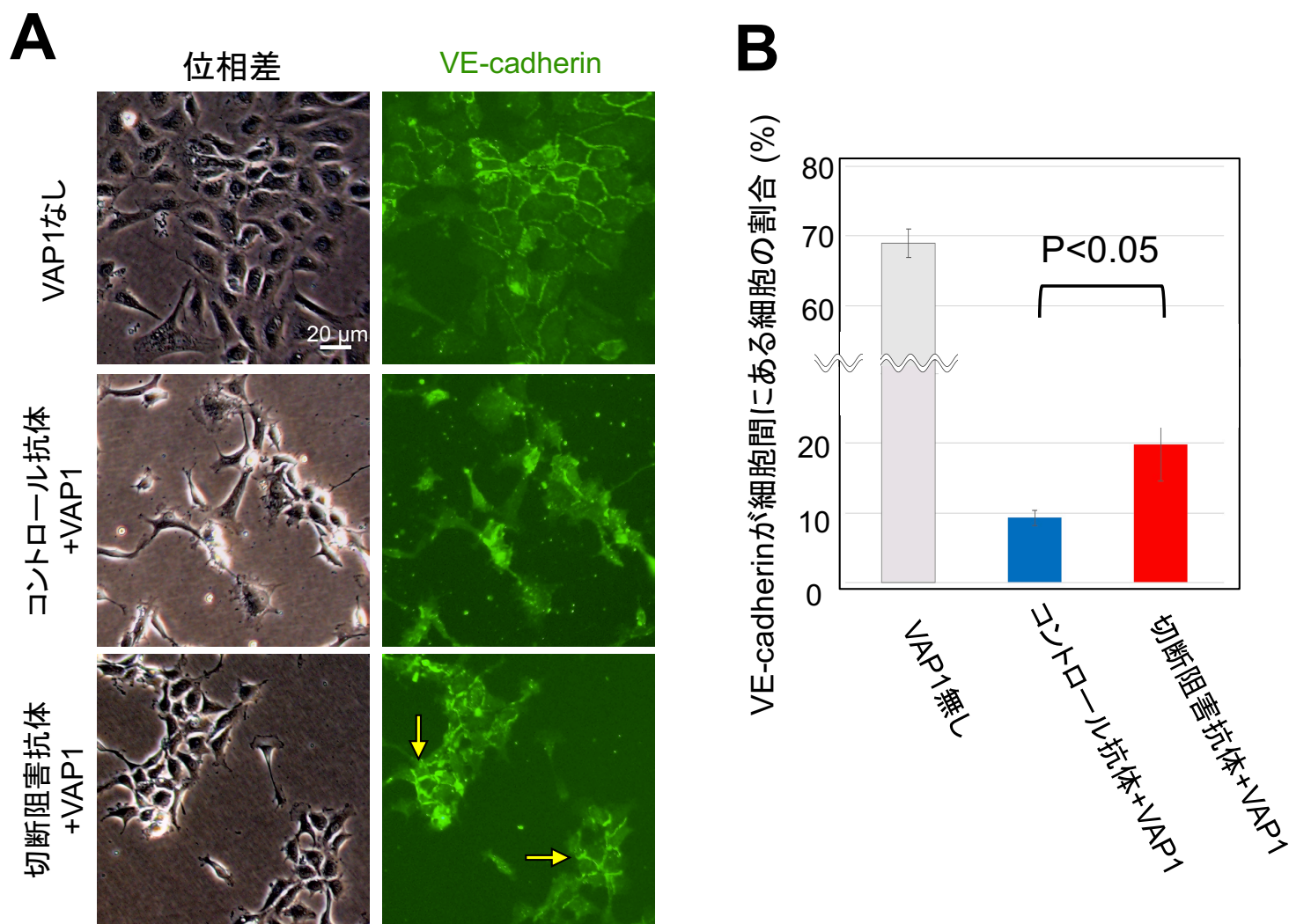


Fig. 13. LRP6切断阻害抗体によるVAP1細胞応答阻害実験

A: HUVECを1.35 mg/mlの切断阻害抗体とプレインキュベーションした後、140 ng/mlのVAP1と37°C、1時間、無血清培地中でインキュベーションを行なった。細胞を固定し、抗VE-cadherin抗体で免疫染色を行なった。切断阻害抗体を加えた細胞では細胞間解離が抑制された (矢印)。

B: 全細胞中のVE-cadherinが細胞間にある細胞の割合をグラフに示した。コントロール抗体とVAP1を加えた試料と、切断阻害抗体とVAP1を加えた試料の間でウェルチのt-検定を行った。(エラーバーは標準誤差を表す)

A

コントロール血清

LRP6切断阻害抗血清

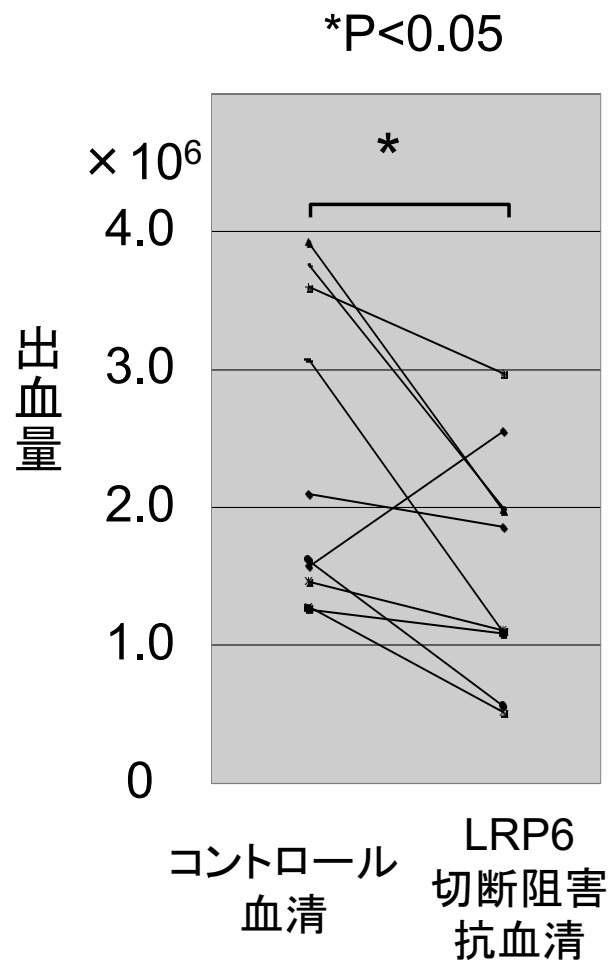
**B**

Fig. 14. VAP1により誘導される出血におよぼすLRP6切断阻害抗血清の影響

A: VAP1をLRP6切断阻害抗血清あるいはコントロール血清と共にマウス皮内に注射した。1時間後に出血斑を観察した。

B: 出血量をデンストメトリーで定量化し、グラフに示した。同一個体のそれぞれの出血斑を線で繋いだ。Wilcoxonの符号付順位和検定を行なった。N=10。

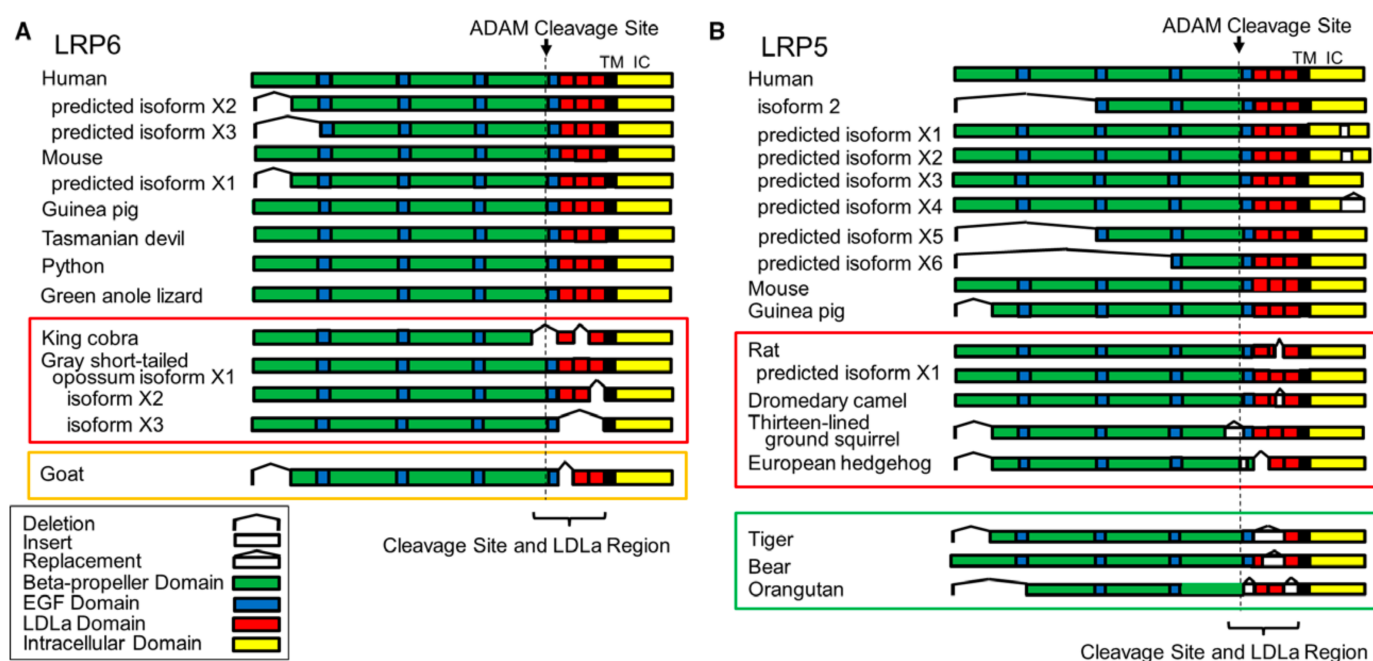


Fig. 15. 様々な動物におけるLRP5, LRP6の変異領域

様々な動物種におけるLRP6 (A), LRP5 (B) の推定アミノ酸配列から変異領域を模式図で示した。出血耐性を持つ動物のLRP5とLRP6を赤色の枠で囲んだ。出血耐性が弱い動物のLRP6をオレンジ色の枠で、出血耐性が調べられていない動物のLRP5を緑色の枠で囲んだ。ヒト、マウス、ラット以外の動物種はゲノムからの推定アミノ酸配列をNCBI RefSeqから引用したものである。

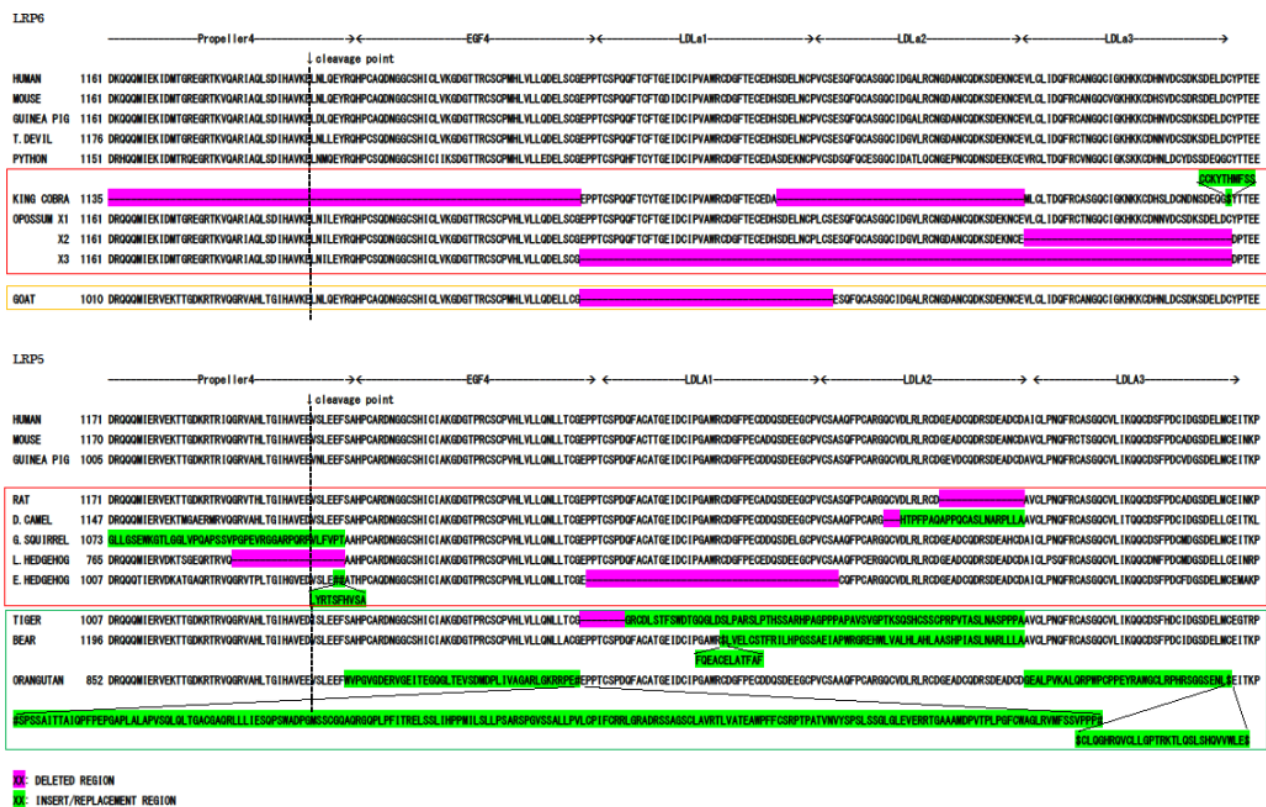


Fig. 16. 様々な動物におけるLRP6とLRP5のLDLaドメインとVAP1切断部位の推定アミノ酸配列

出血耐性を持つ動物のLRP5とLRP6を赤色の枠で囲んだ。出血耐性が弱い動物のLRP6をオレンジ色の枠で、出血耐性が調べられていない動物のLRP5を緑色の枠で囲んだ。様々な動物におけるLRP6とLRP5のアイソフォームのLDLaドメインとVAP1切断部位のアミノ酸配列を示した。ハイライトされた部分はヒト、マウス、モルモットとのLRP5、LRP6と比べて、欠失している部位 (ピンク)、置換している部位 (緑色) を表している。

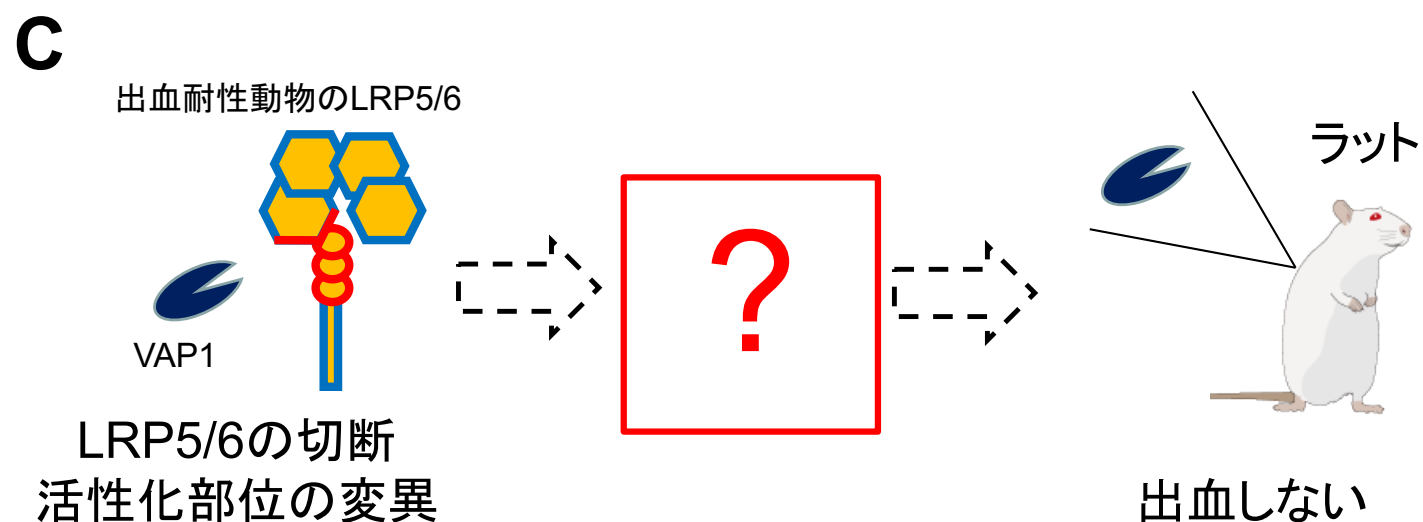
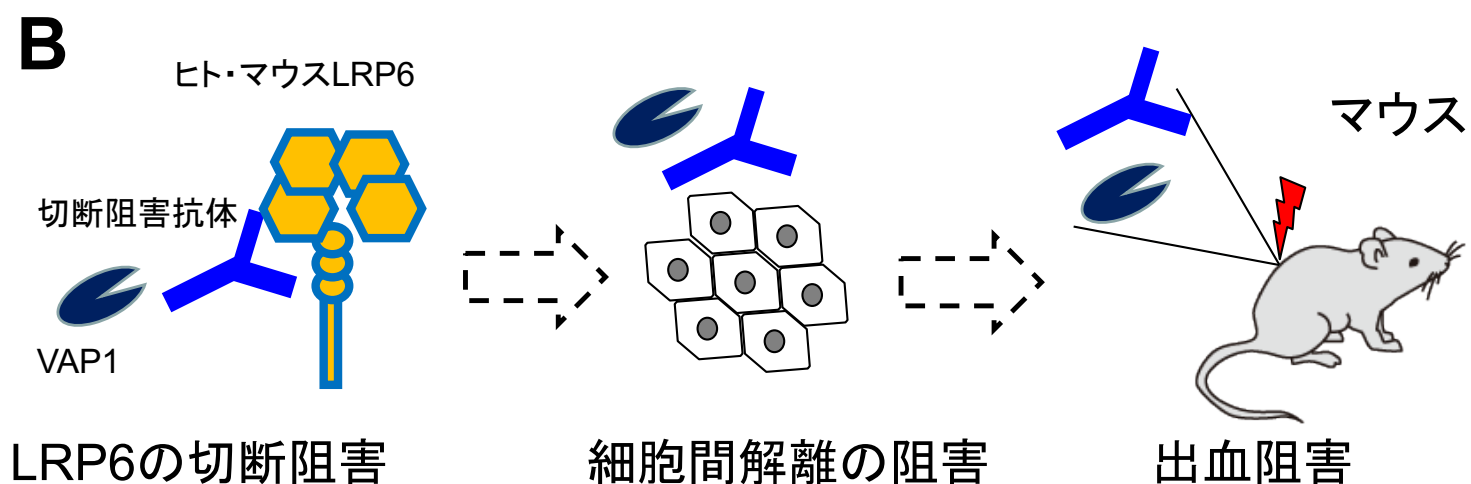
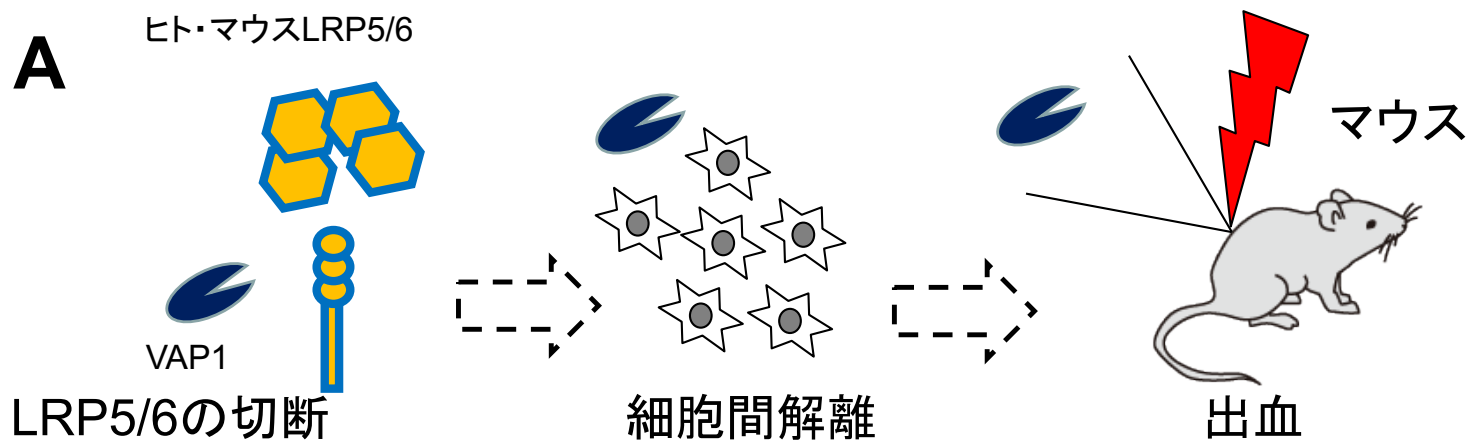


Fig. 17. LRP5/6の切断と細胞間解離と出血の関わり

LRP5/6はVAP1により活性化部位で切断され、その切断を抑えることで細胞間解離や出血が抑制される。(A, B)。LRP5/6の切断活性化部位に変異を持つヘビ毒耐性動物の血管内皮細胞におけるVAP1に対する細胞応答を明らかにすることは、LRP5/6の切断、血管内皮細胞の細胞間解離、出血の繋がりを調べる上で重要である。

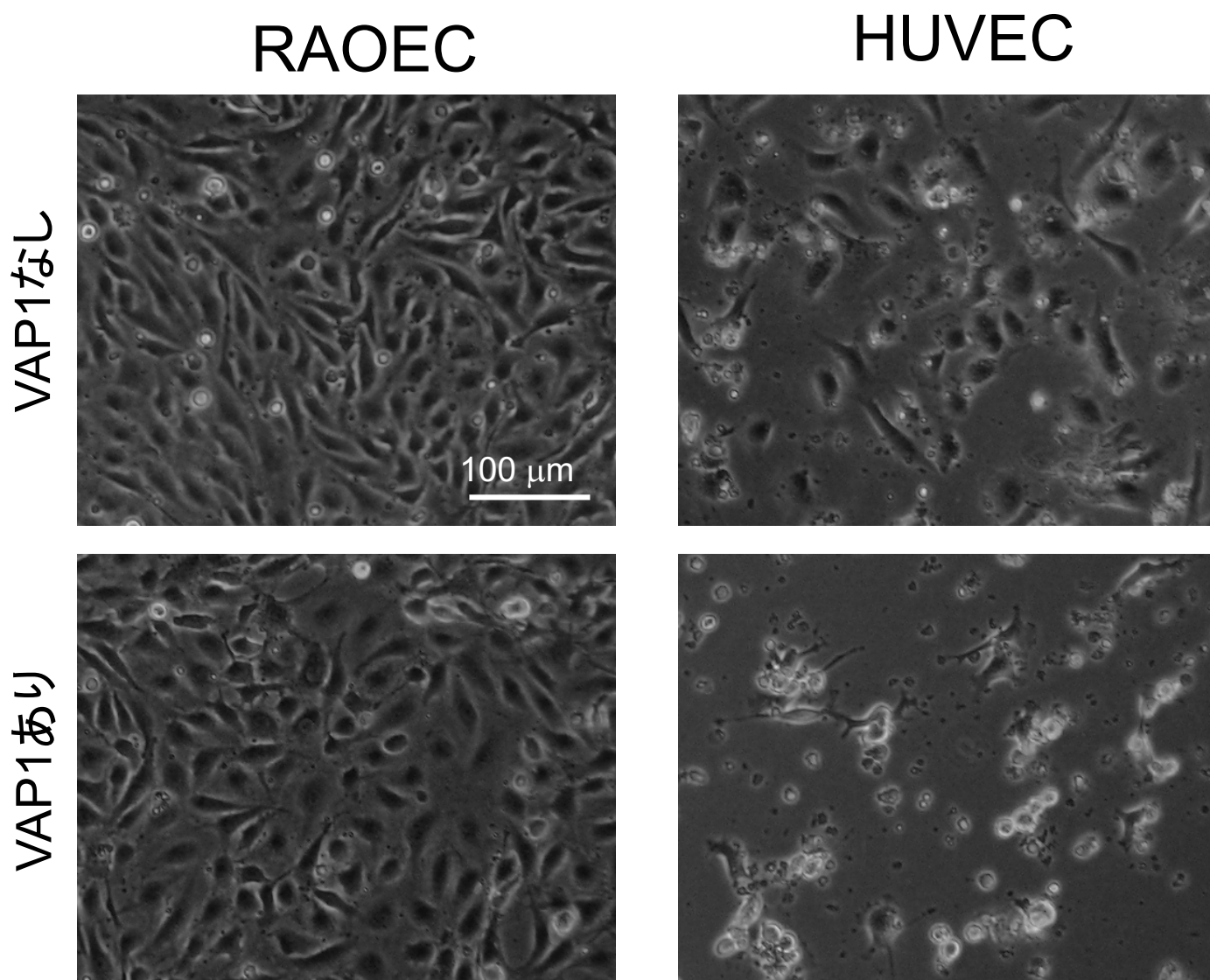


Fig. 18. ラット血管内皮細胞に対するVAP1の作用実験

RAOECあるいはHUVECに対し、280 ng/mlのVAP1の存在下と非存在下で37℃、2時間、無血清培地中でインキュベーションを行なった。位相差顕微鏡を用いて観察した。

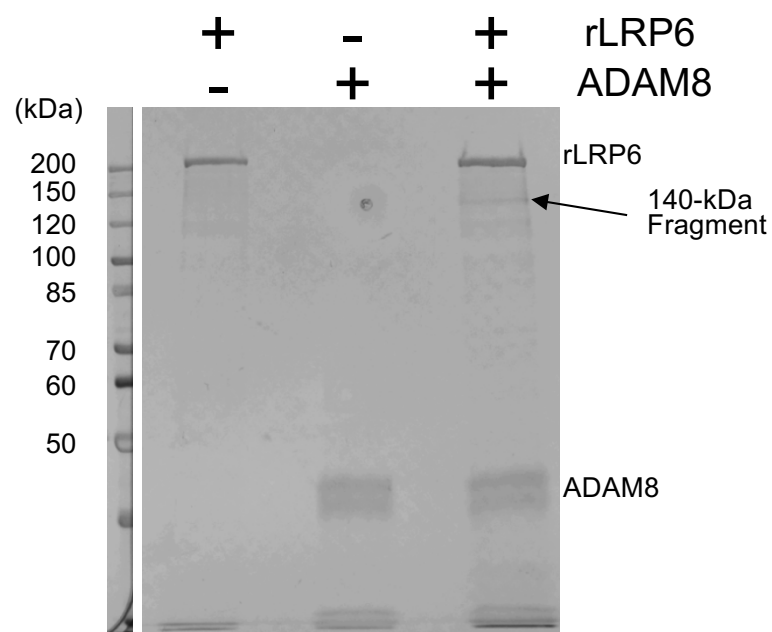


Fig. 19. ADAM8によるLRP6の切断実験

64 $\mu\text{g/ml}$ の組換えヒトLRP6を20 $\mu\text{g/ml}$ の組換えヒトADAM8と3時間、37°Cでインキュベーションを行った。12% ポリアクリルアミドゲルを用いてSDS-PAGEを行い、銀染色を行なった。

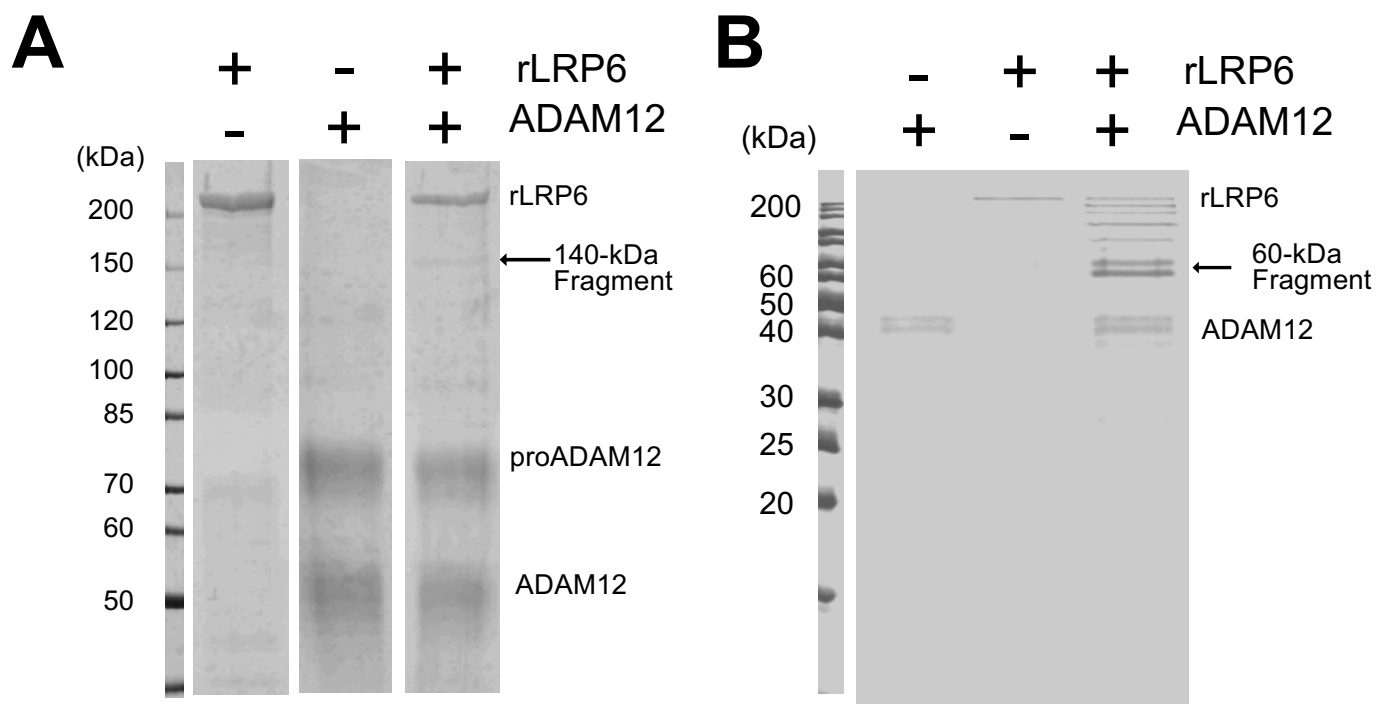


Fig. 20. ADAM12によるLRP6の切断実験

A: 20 $\mu\text{g/ml}$ の組換えヒトLRP6を200 $\mu\text{g/ml}$ の組換えヒトADAM12と18時間、37°Cでインキュベーションを行った。10% ポリアクリルアミドゲルを用いてSDS-PAGEを行い、銀染色を行なった。

B: Aと同条件でLRP6とADAM12をインキュベーションした後、Protein A-Sepharoseを用いて、Fcドメインを含むLRP6のC末端側の切断断片を濃縮、分離した。15% ポリアクリルアミドゲルを用いてSDS-PAGEを行い、銀染色を行なった。

ADAM	Detected LRP6 Fragments	Cleavage Site
Rattlesnake Venom VAP1	140 kDa: IAQLSDIHAVKE 60 kDa: LNLQEYR	1196E-1197L
Human ADAM8	140 kDa: IAQLSDIHAVKE	1196E-1197L
Human ADAM12	140 kDa: IAQLSDIHAVKE 60 kDa: LNLQEYR	1196E-1197L

Fig. 21. ADAM8, ADAM12によるLRP6の切断部位

ADAM8、ADAM12により切断されたLRP6切断断片を、LC/MS/MSにより解析した。検出されたペプチドとそこから予想される切断部位を示した。

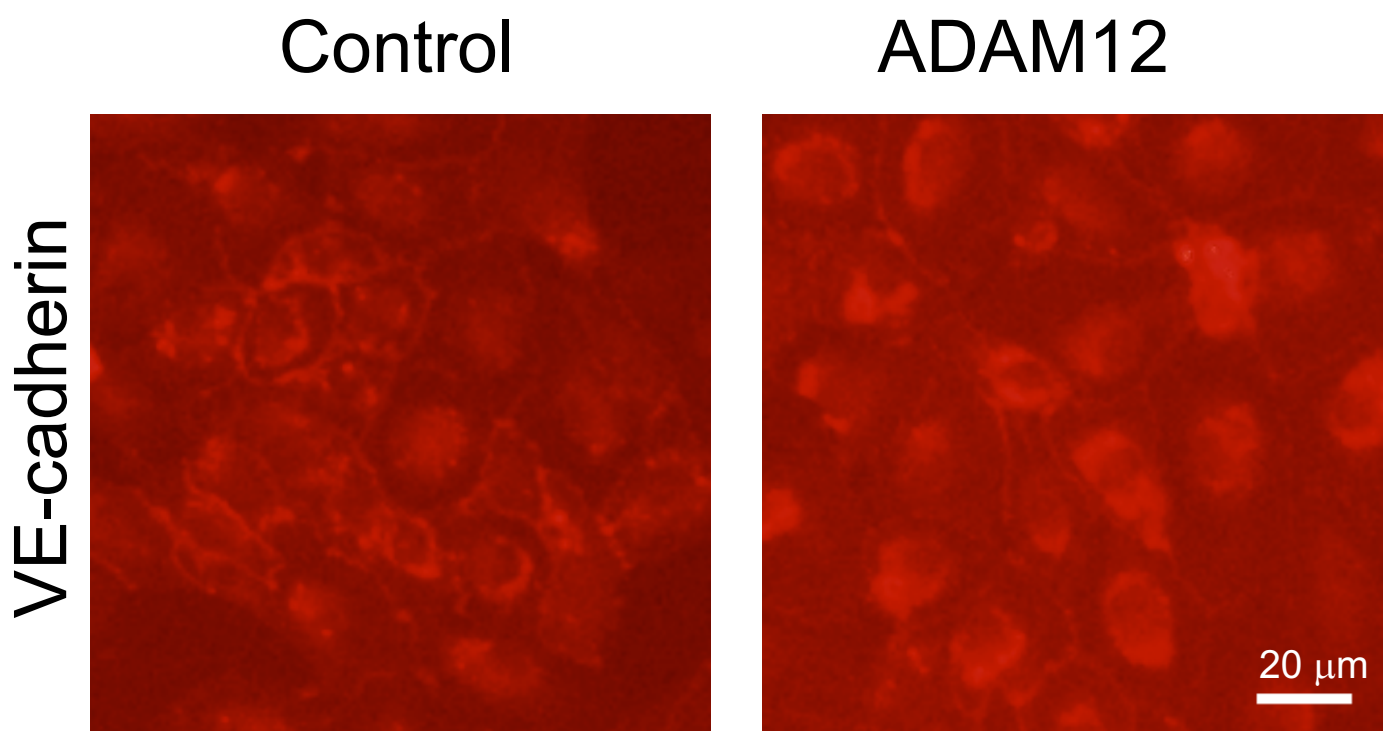


Fig. 22. ADAM12で処理した細胞におけるVE-cadherinの局在性

HUVECを10 μ g/mlの組換えヒトADAM12の存在下もしくは非存在下で40時間、37°Cでインキュベートした。固定した後、抗VE-cadherin抗体で免疫染色を行った。

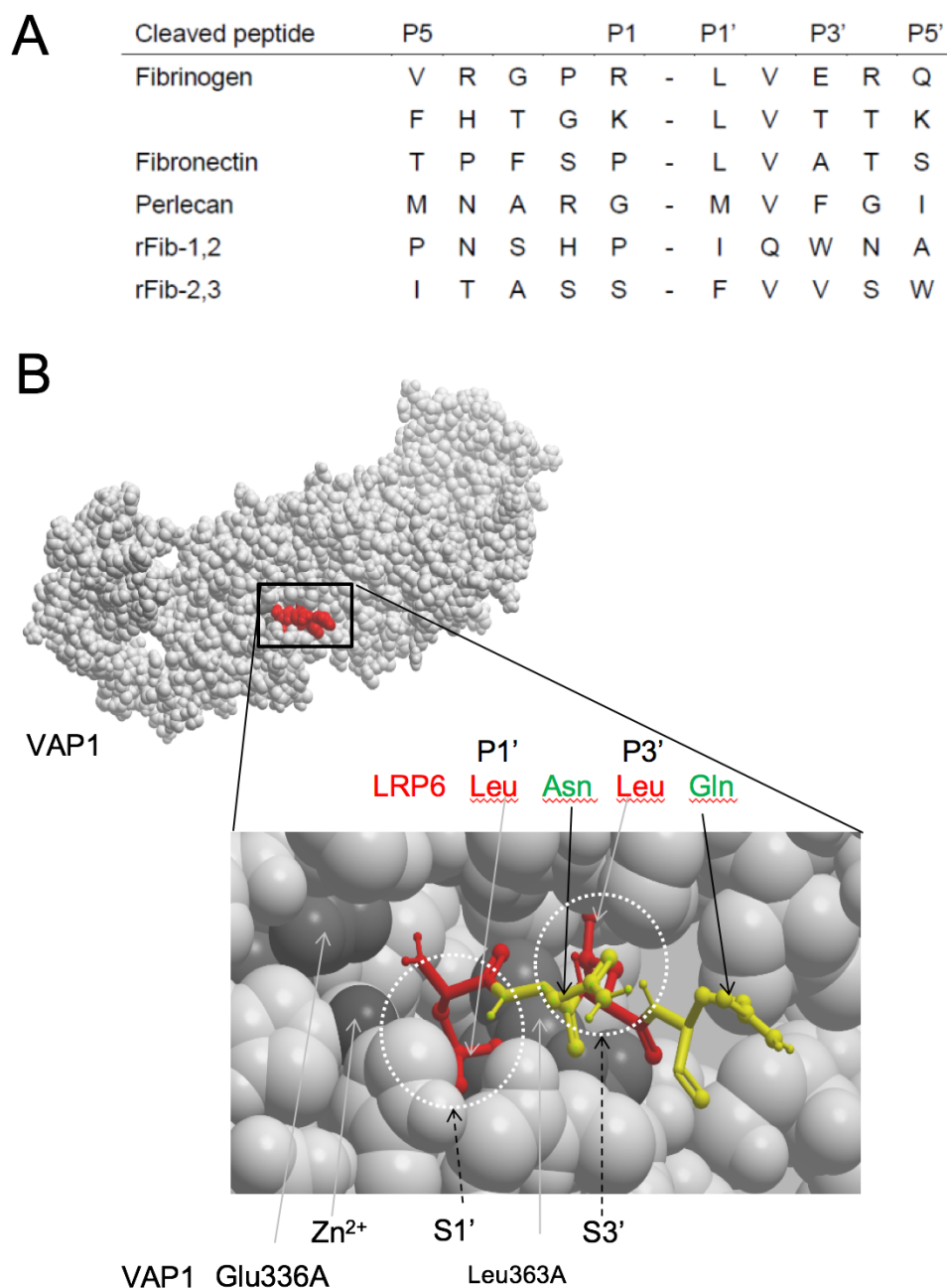


Fig. 23. VAP1の基質とその切断部の構造

A: VAP1の基質とその切断部を示した。切断部断片のN末端解析により得られた切断部周辺のアミノ酸配列を示した。

B: VAP1とLRP6切断部のドッキングシミュレーションをICM-BROWSER (Molsoft) を用いて行い、そのドッキングモデルを示した。VAP1の基質の結合クレフトを拡大した。VAP1をspace filling modelで、LRP6切断部のC末端側のペプチド配列をball-and-stick modelで表した。酵素活性に関わるZn²⁺とGlu336Aは灰色で示した。白い破線で囲まれている部位は、VAP1のS1'、S3'ポケットである。

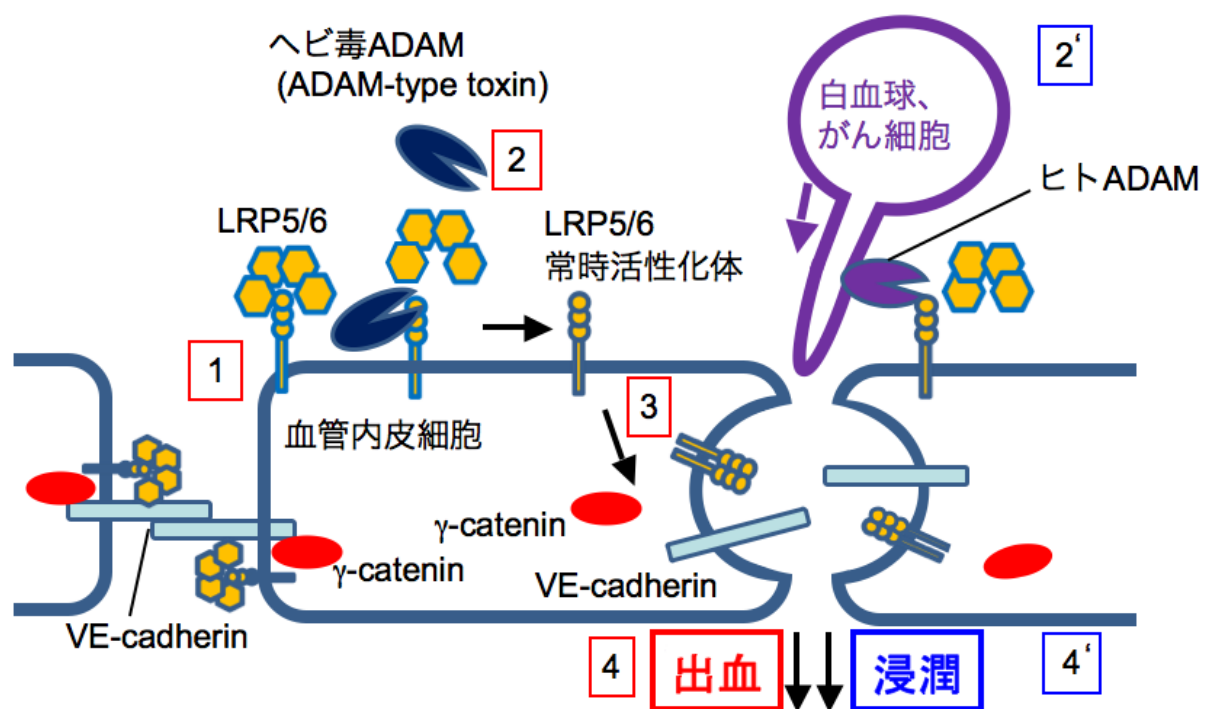


Fig. 24. ADAMによる細胞間解離の分子機構

へビ毒ADAMによる出血では、血管内皮細胞膜上のLRP5/6を切断することにより、LRP5/6が活性化され、細胞間接着が解離し、出血を起こすと考えられる。

白血球やがん細胞による浸潤では、その細胞膜上のADAMが血管内皮細胞膜上のLRP5/6を活性化部位で切断し、それによりLRP5/6が活性化されて、細胞間接着が解離し、浸潤が可能となるというモデルが考えられる。