

# 血小板凝集阻害蛋白質 AAPP の構造と機能

## Structural & functional study of AAPP from mosquito



杉山佳奈子

杉山佳奈子\*  
Kanako SUGIYAMA

**Key words:** anti-coagulants, anti-platelet, collagen binding protein, crystal structure, mosquito protein

2009年 横浜市立大学大学院  
国際総合科学研究科 生体超  
分子科学専攻 博士後期課程  
修了 博士(理学)取得  
2010年 横浜市立大学大学院  
生命ナノシステム科学研究科  
生体超分子システム科学専攻  
博士研究員  
2013年 公益財団法人神奈川科  
学技術アカデミー 朴「イン  
フルエンザウイルス創薬」プ  
ロジェクト 常勤研究員  
現在に至る

### Points

- ①ハマダラカの持つ AAPP はコラーゲンに結合することによって、血小板の凝集を阻害し、血栓の形成を阻害する。
- ② AAPP はマウス等の体内、体外両方においてコラーゲンに結合し、血栓の形成を阻害する。
- ③ AAPP の構造を明らかにした結果、コラーゲン結合に必須な部位を特定し、新たな血栓阻害薬に関する知見を得た。
- ④抗血小板薬であるプラビックスは、国内年間売り上げが 1,000 億円のブロックバスターであるが、AAPP は新しい効能を持つ抗血小板薬となり得る。

## 1. はじめに

血小板は血管内皮細胞の傷害の際や様々な因子によって凝集を引き起こし、それが冠血管を閉塞すれば心筋梗塞に、脳血管を閉塞すれば脳梗塞に、末梢血管を閉塞すれば慢性動脈閉塞症などを引き起こす。

す。

基本的な血液凝固系において、その第一ステップはコラーゲンと血小板の結合であり、最終的には秒単位でフィブリンの凝集までが進む<sup>1)</sup>。コラーゲンと血小板の結合は、von Willebrand factor (VWF) を介してスタートし、VWF の A1 ドメインが血小板の glycoprotein (Gp) Ib に結合することで、血小板の凝集と活性化が促進される。さらに血小板がフィブリンノーゲンと結合することによって血栓の形成をさらに加速する。血小板は自身の GpVI がコラーゲンに直接相互作用することによっても活性化し、ADP や TXA2 などの分子の放出が起こり、これに引き続く様々な血液凝固因子の働きとこれらの複合によって、

\*責任者連絡先：  
公益財団法人神奈川科学技術アカデミー  
朴「インフルエンザウイルス創薬」プロジェクト  
〒213-0012 神奈川県川崎市高津区坂戸 3-2-1 KSP 東棟  
302  
Tel: 044-819-2323, Fax: 044-819-2320  
E-mail: pp-sugiyama@newkast.or.jp

安定な血栓が形成される<sup>2-4)</sup>。

吸血昆虫のうち、ヒトを吸血する蚊は、こうした止血系の影響から逃れ、短時間で必要十分な量の血液を得るために、高度に進化した戦略を持っている。蚊が吸血する際、口針を皮膚内に刺入し、末梢血管より吸血を行う。末梢血管を探り当てるために幾度となくプロービングとよばれる刺入出行動を繰り返すが、この作業をできるだけ短時間で終わらせるために、唾液を分泌し、血管拡張を促進する物質で血管の感知を容易にしていると考えられている。一方、プロービングにより鋭利な口針によって、末梢血管が傷つき鬱血する場合はしばしば見られる。

マラリア原虫の宿主でもあるハマダラカ (*Anopheles Stephensi*) の場合、唾液と共に抗凝固因子や血管拡張因子など様々な分子を宿主の体内に注入することで血液の凝固を防いでいる<sup>5,6)</sup>。近年、この中のひとつとして、非常に強い血小板凝集阻害活性を持つ AAPP (*Anopheles anti-platelet protein*) を同定した<sup>7)</sup>。

AAPP はその性質から、新たな生体性の抗血栓薬、抗凝固薬の候補として期待されている。現在使用されている抗血小板剤の一番の問題点は出血である。血小板の機能を止めて病的血栓形成を阻害する一方で、本来の役割の止血機能まで阻害してしまい、薬効がでる投与量と出血を助長する投与量のマージンが少ない<sup>8)</sup>。従来の抗血小板剤は全て血小板を標的にしている薬剤であり、血小板の機能を阻害してしまう。局所でのみ抗血小板作用を発揮し、全身的には止血機能を維持できる新薬の開発が望まれており、AAPP は絶好のターゲットである。

そこで本研究では、AAPP と、AAPP に結合し AAPP とコラーゲンの結合を阻害する抗体との複合体構造の解析を行った。本研究で得られる成果は、単に科学論文発表にとどまらず、製薬メーカーのバックアップを得られれば、臨床治験への可能性への期待も高い。

## 2. AAPP の機能と配列

AAPP はその名が示す通り、血小板の凝集を防ぐ蛋白質である。具体的な機能としては、血小板への結合ではなくタイプ I およびタイプ III のコラーゲンとの特異的な結合であり、血小板や VWF, ADP,

FactorXa などの他の血液凝固系因子には影響を及ぼさない。しかし、AAPP がコラーゲンに結合することによって、コラーゲンと血小板の結合に伴う  $Ca^{2+}$  の上昇は減少することなどがわかっており、結果的に AAPP は血小板の凝集を確実に阻害している。

また、AAPP によるコラーゲンと血小板の結合阻害は *in vivo*, *in vitro* 両者において予想を超える強い活性を示した。AAPP は細胞外においてヒト、ラットおよびマウスの血小板阻害作用を発揮するだけでなく、マウス体内においても代謝されずに働き、コラーゲンによって引き起こされる血液の凝固を阻害し、マウスの尾の切断による出血の停止を妨げることなく、マウスの肺臓死を防いでいる<sup>9)</sup>。

AAPP はアミノ酸 278 残基からなる蛋白質であり、N 末端側に唾液腺移行シグナルを有し、吸血行動を行うメスの蚊の唾液腺に局所的かつ大量に発現している。90 から 150 残基付近には GERich 領域と呼ばれるコラーゲンと類似のリピード領域が存在しており、それ以降の C 末端ドメインが機能ドメインと分類される (図 1)。中近東、アフリカおよび東南アジアハマダラカと藪蚊をはじめとする蚊以外の生物においてホモログは確認されていない。また、蚊の中では *Anopheles Aegyptie* の *aegyptin* など、同じ機能を持ったものが確認されているが、*aegyptin* は AAPP が結合しないタイプ IV コラーゲンに結合することがわかっており、コラーゲンに結合して血小板の凝集を防ぐ機能は同じだが、詳細な機序については異なっているのではないかと考えられている<sup>10)</sup>。

AAPP 遺伝子は 4 つの exon と 3 つの intron から成り立っており、どの領域がコラーゲンとの結合機能を担っているのかを明らかにするため、それぞれの exon ごとに発現させた各種 AAPP を作製した。コラーゲンを付着させたプレートに AAPP を添加し、抗体による検出を行ったところ、全長 AAPP ( $\Delta$ SignalPeptide) および exon 3-4 領域のみがコラーゲンに結合する事がわかった (図 2)。当初の仮説としてはコラーゲンと似た GERich 領域が疑似コラーゲンとしてコラーゲンに結合するのではないかと考えていたが、実際に結合に関わるのはそれ以降の C 末端領域であった。

また、金沢大学吉田教授が作製した、anti-AAPP exon 3-4 モノクローナル抗体のうちのひとつ、8H7

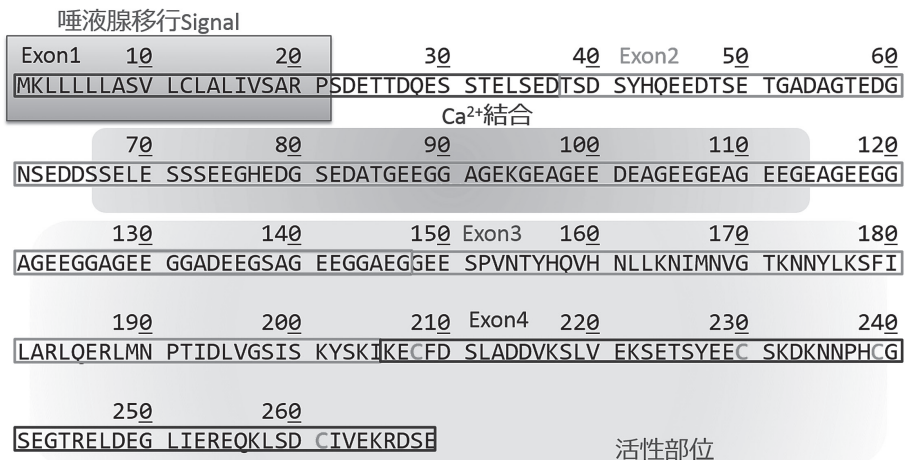


図1 AAPPのアミノ酸配列  
 AAPP遺伝子の4つのexonごとに分割して示した。  
 N末端側21残基は唾液腺移行のためのシグナルペプチドになっている。

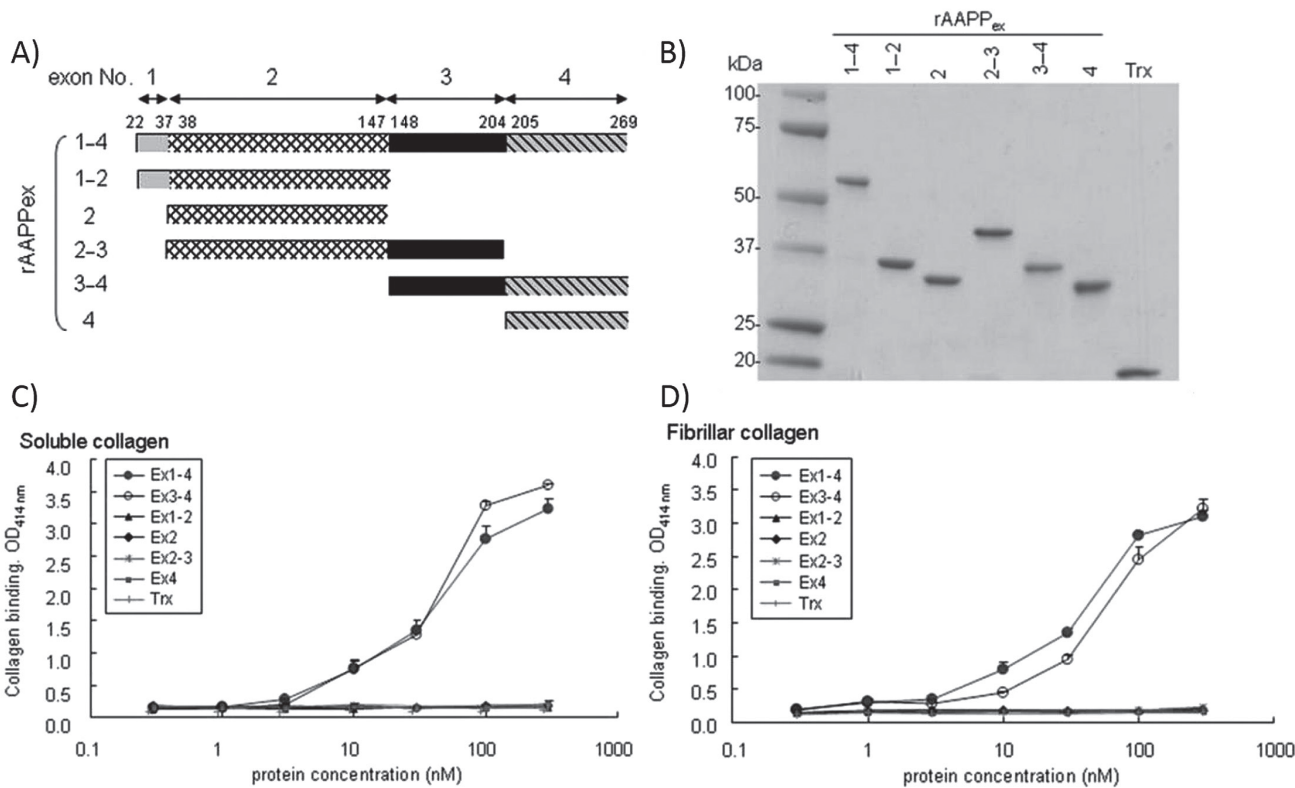


図2 Exonごとの発現とコラーゲンとの結合実験結果(文献9から引用)

A) Exonごとの分割と B) 発現結果  
 C) D) AAPPとコラーゲンとの結合実験の結果  
 シグナルペプチドを除いた全長AAPP(Ex1-4)とEx3-4のみコラーゲンと結合する。

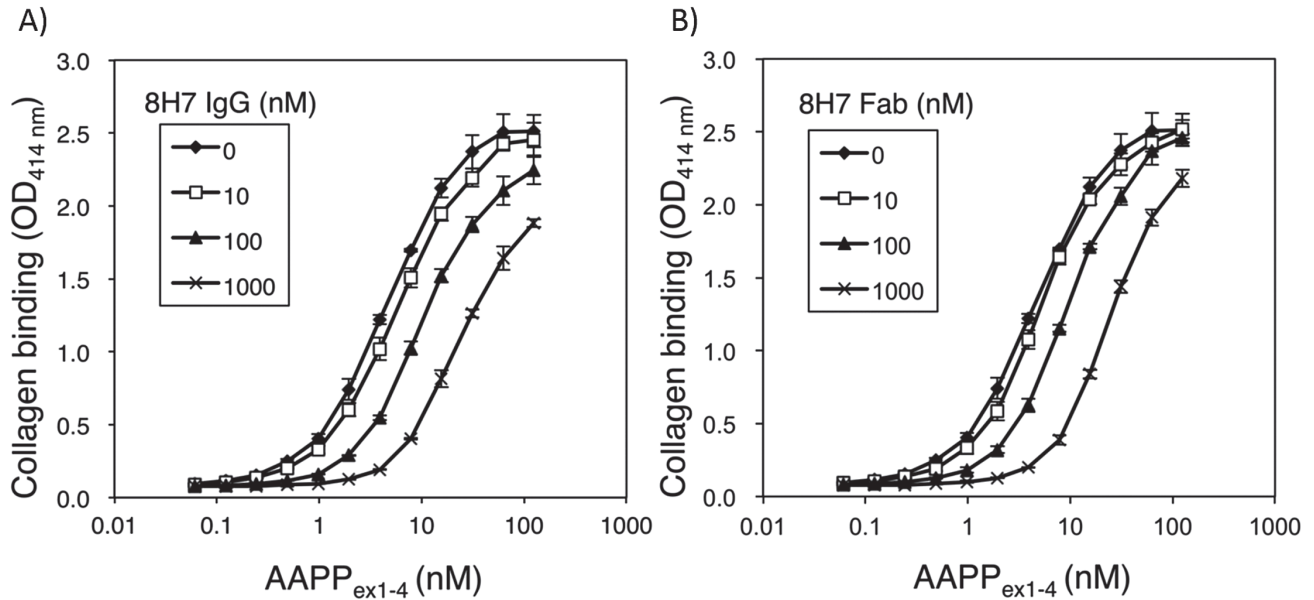


図3 8H7抗体によるAAPPとコラーゲンの結合阻害(文献11から引用)

◆で示した抗体を加えない時のコラーゲンとAAPPの結合に比べて、抗体を加えていくことでAAPPのコラーゲン結合能が低下していくことがわかる。IgGおよびFab両者で同様の現象が確認できた。

抗体がAAPPのコラーゲンの結合能を阻害することがわかった(図3)。

### 3. AAPPの構造解析

AAPPの構造は、単独では結晶が得られなかったため、全長AAPPと8H7抗体のFab領域との複合体の結晶を作製し、その構造解析を行った。結晶構造としては、8H7FabとAAPPのC末端側202-269残基の構造が確認できた(図4)。結晶化から結晶ができるまでには2週間程度かかっているが、AAPPはその間に安定な単位まで分解したと考えられる。実際に溶液状態で4°Cに1カ月静置したAAPPのmass spectrometryを測定したところ、C末端側のみのピークが確認された。

構造が確認できたAAPPのC末端領域は2本のヘリックスが2カ所のS-S結合で結合したヘアピン構造を取っており、ヘリックス間のループに抗体が結合していた。この結果から、8H7抗体とAAPPの結合にはexon 4にあたるこのヘアピンヘリックスが重要であると考えられる。これは溶液状態における結合実験の結果(exon 3-4が必須)と異なっているが、おそらく発現時においてexon 3が存在するこ

とで初めてヘアピンヘリックス構造を取ることができのではないかと考えている。

ここで明らかになったコラーゲンとの結合を阻害する8H7抗体とAAPPとの結合様式を元に、これらの結合がAAPPとコラーゲンとの結合に与える影響を明確にするため、ヘアピンヘリックス構造の維持に必須なS-S結合に関わるアミノ酸(Cys239, Cys261)と、抗体との結合に関わるループ領域のアミノ酸の変異体を作製し、8H7抗体とAAPPとの結合、AAPPとコラーゲンとの結合を確認した(図5)。

その結果、ループ領域のアミノ酸をAlaに変異させたものは8H7抗体には結合できなくなるが、コラーゲンとの結合には変化がないことがわかった。一方で、2つのCys残基を変異させたものは8H7抗体にもコラーゲンにも結合できず、Cys239のみの変異体に関しては抗体には結合できず、コラーゲンとの結合も弱くなることを明らかにした。また、ループ領域前後のみ(AAPP 225-244)を発現させたものは全くコラーゲンに結合しないことがわかった。以上のことからAAPPとコラーゲンの結合にはヘアピンヘリックス構造全体が必要であり、抗体によるAAPPとコラーゲンの結合阻害は、おそらく、コラーゲンがAAPPの結合部位にアクセスするために体



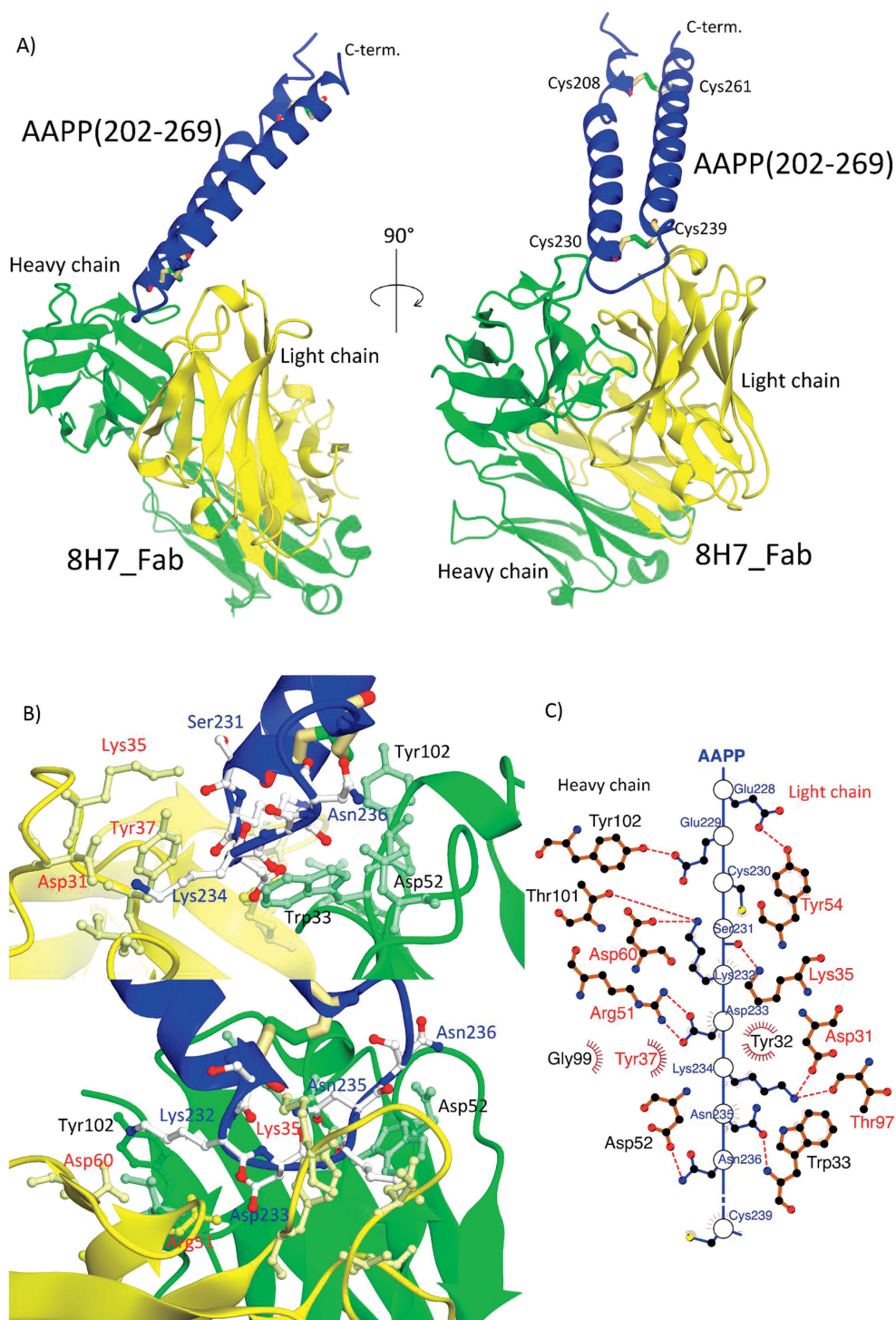


図4 AAPP-8H7Fab 複合体の構造

A) 全体構造リボン図

B) 結合部位のアミノ酸構造図

C) 結合部位 Ligplot

AAPP のヘアピンヘリックスが Fab のくぼみに突き刺さるように結合していた。結合に関わるアミノ酸を B) および C) に示した。

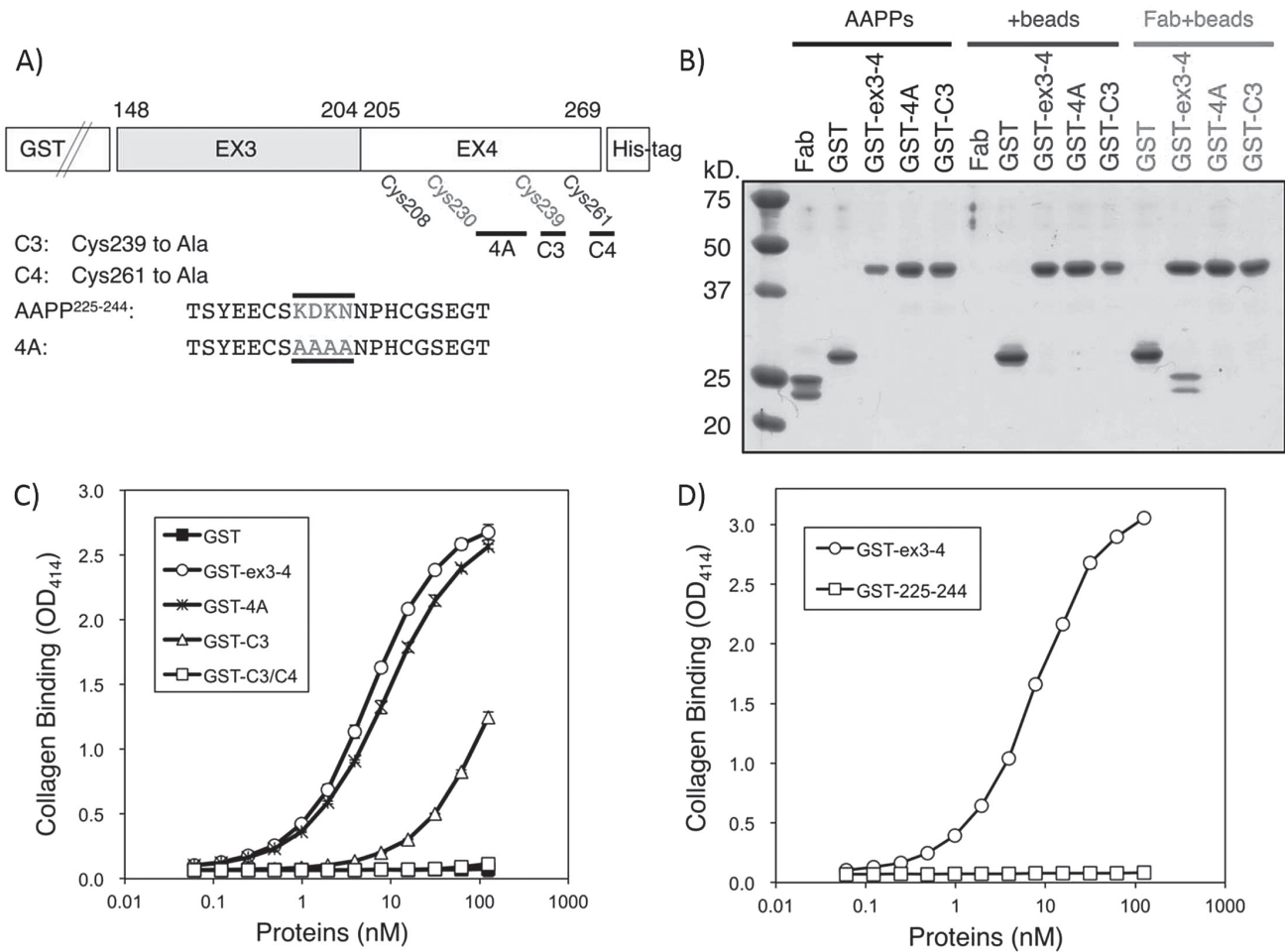


図5 変異体の発現と結合実験結果(文献11から引用)

抗体との結合に関わるループ領域のアミノ酸(Lys232-Asn235)をすべてAlaに変異させたものを4A, ループに近いCys239のAla変異体をC3, ループから遠いCys261Ala変異体をC4とした。

A) 変異アミノ酸部位

B) GST プルダウンアッセイの結果

C) AAPP(Ex3-4)とコラーゲンとの結合実験

WT(GST-Ex3-4)との比較から, 4A変異体ではコラーゲンとの結合に変化がないことがわかる。C3変異体では結合が低下し, C3およびC4両方をAlaに変えた変異体(C3/C4)ではほぼコラーゲンには結合しない。

D) AAPP225-244とコラーゲンの結合実験

ヘアピンヘリックス構造なしではコラーゲンに結合しない。

積的に必要な空間に8H7抗体が存在することで, 立体的な障害となって, 結合阻害を起こしていることが示唆された(図6)。

#### 4. まとめ

以上の結果から, AAPPとコラーゲンの結合にはAAPP末端側のヘアピンヘリックス構造が重要であることを明らかにした。本研究では, AAPPの血

栓阻害作用と今後の可能性に期待して研究を行った結果, 120アミノ酸から成るAAPPのexon 3-4部位のみで十分に血栓阻害薬として働く可能性を示した。

残念ながら, 現在に至るまでAAPPの全長構造およびコラーゲンとの複合体構造は得られておらず, exon 2にあたるGERICH部位や, 今回の構造には含まれていなかったヘアピンヘリックスの上流部位がどのような構造をしていて, どのように働いているかはわかっていない。これまでの研究により, exon 2

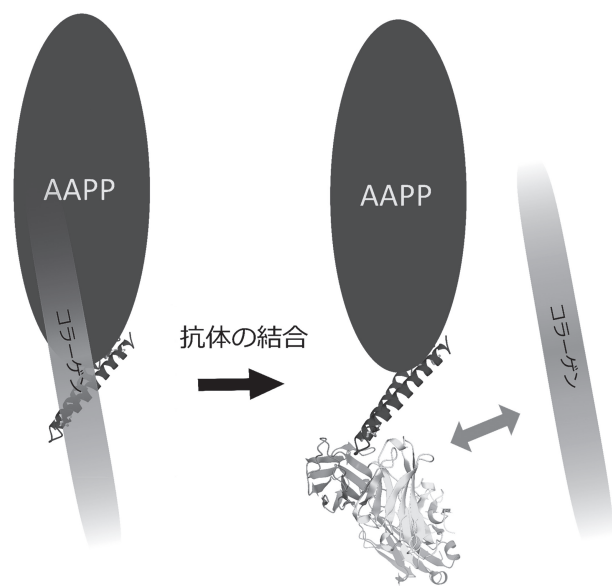


図6 AAPPとコラーゲン結合模式図

分析超遠心の結果、AAPPおよびAAPP-Fab複合体は非常に細長い形をしていることが予想されている。構造解析の結果から、AAPPはC末端に位置するヘアピンヘリックスを足場にコラーゲンに結合しており、Fabが結合することによってコラーゲンの結合を間接的に阻害することが予想される。

には $\text{Ca}^{2+}$ が結合することはわかっているが、 $\text{Ca}^{2+}$ の結合によるAAPPの機能への影響などもわかっていない。AAPPに関する研究のまだ道半ばであり、aegyptinなどAAPP以外の様々な蚊の持つ蛋白質の可能性と共に、今後の研究が待たれるものである。

## 謝辞

本研究は金沢大学吉田栄人教授ならびに大塚製薬林秀樹氏との共同研究の成果であり、両先生および研究室の皆さんの研究と、共同研究を行う機会を与

えてくださったことに感謝の意を表します。

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) Ruggeri ZM: Platelets in atherothrombosis. *Nat Med* **8**: 1227–1234, 2002.
- 2) Clemetson KJ: Platelets and primary haemostasis. *Thromb Res* **129**: 220–224, 2012.
- 3) Clemetson KJ, Clemetson JM: Platelet collagen receptors. *Thromb Haemost* **86**: 189–197, 2001.
- 4) Nieswandt B, Watson SP: Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor? *Blood* **102**: 449–461, 2003.
- 5) Ribeiro JM: Role of saliva in blood-feeding by arthropods. *Annu Rev Entomol* **32**: 463–478, 1987.
- 6) Ribeiro JM, Rossignol PA, Spielman A: Role of mosquito saliva in blood vessel location. *J Exp Biol* **108**: 1–7, 1984.
- 7) Yoshida S, Sudo T, Niimi M, Tao L, Sun B, Kambayashi J, Watanabe H, Luo E, Matsuoka H: Inhibition of collagen-induced platelet aggregation by anopheline antiplatelet protein, a saliva protein from a malaria vector mosquito. *Blood* **111**: 2007–2014, 2008.
- 8) Van de Werf F: Balancing benefit and bleeding risk of anti-thrombotic agents in the individual patient with an acute coronary syndrome. *Circulation* **121**: 5–7, 2010.
- 9) Hayashi H, Kyushiki H, Nagano K, Sudo T, Iyori M, Matsuoka H, Yoshida S: Identification of the active region responsible for the anti-thrombotic activity of anopheline anti-platelet protein from a malaria vector mosquito. *Platelets* **24**: 324–332, 2013.
- 10) Calvo E, Tokumasu F, Marinotti O, Villevall JL, Ribeiro JM, Francischetti IM: Aegyptin, a novel mosquito salivary gland protein, specifically binds to collagen and prevents its interaction with platelet glycoprotein VI, integrin  $\alpha 2\beta 1$ , and von Willebrand factor. *J Biol Chem* **282**: 26928–26938, 2007.
- 11) Sugiyama K, Iyori M, Sawaguchi A, Akashi S, Tame JR, Park SY, Yoshida S: The crystal structure of the active domain of Anopheles anti-platelet protein, a powerful anti-coagulant, in complex with an antibody. *J Biol Chem* **289**: 16303–16312, 2014.