

◆トピックス◆

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—

森田 隆 司*¹, 水野 洋*²

3-Dimensional Structure and Function of Factor IX/Factor X-binding Protein :
Coagulation Factor-binding function provided by 3D domain swapping

Takashi MORITA*¹, Hiroshi MIZUNO*²

Key words : factor IX, Factor X, Gla-domain, 3D-domain swapping, dimerization of C-typed lectin

1. はじめに

ハブ毒や百歩蛇毒には血液凝固 IX 因子や X 因子と結合し、抗凝固活性を示すタンパク質が含まれる¹⁾。表 1 に凝固 IX 因子や X 因子に結合する IX/X-bp などの性質を示した。IX/X-bp, IX-bp, X-bp はいずれもそれらのアミノ酸配列から C 型レクチンのスーパーファミリーに属するタンパク質であるが、レクチン活性は有しない。このトピックスの項では、IX/X-bp を中心にその立体構造の特徴と機能の関係について解説する。

2. IX/X-bp の立体構造²⁾

図 1 (A) は IX/X-bp の 2.5 Å 分解能におけ

る X 線結晶構造の C α リボンモデルである²⁾。サブユニット A とサブユニット B のお互いの立体配置は、分子の長軸にほぼ垂直な偽似 2 回回転軸によって関係づけられる。Ca²⁺ が各サブユニットの等価な場所に 1 個ずつ存在する。サブユニットの中央にそれぞれ 1 ヶのループが存在して、それぞれのサブユニットの外側に大きく突出して隣のサブユニットの本体部分と相互作用し安定な 2 量体を形成している。A と B 間に新たに凹型の表面構造を形成しているのが大きな特長である。

IX/X-bp は血液凝固 IX 因子あるいは X 因子の Gla ドメインと結合することをわれわれは生化学的手法を用いて明らかにしている³⁾。IX/X-bp のもつ抗凝固活性は IX/X-bp が X 因子の Gla ドメイン部分と結合することにより

*1 明治薬科大学・生体分子学教室〔〒204-8588 東京都清瀬市野塩 2-522-1〕
Department of Biochemistry, Meiji Pharmaceutical University (2-522-1, Noshio, Kiyose, Tokyo 204-8588)
E-mail:tmorita@my-pharm.ac.jp

*2 農業生物資源研究所・生物工学部・蛋白質工学研究室〔〒305-8602 茨城県つくば市観音台 2-1-2〕
National Institute of Agrobiological Resources (Kannondai 2-1-2, Tsukuba, Ibaraki 305-8602)
E-mail:mizuno@abr.affrc.go.jp

表 1 血液凝固 IX 因子・X 因子結合タンパク質とその類縁タンパク質の諸性質

名称	凝固 IX 因子・X 因子結合タンパク質 ^{1)~3)}	凝固 IX 因子結合タンパク質 ^{7)~8)}	凝固 X 因子結合タンパク質 ⁹⁾
略称	IX/X-bp	IX-bp	X-bp
起源	ハブ*毒	ハブ*毒	百歩蛇**毒
結合タンパク質***	IX 因子と X 因子	IX 因子	X 因子
解離定数	IX 因子 0.4 nM X 因子 1.1 nM	IX 因子 0.4 nM	X 因子 0.4 nM IX 因子 3 mM
アミノ酸残基数	252 残基 A鎖 129 残基 B鎖 123 残基	252 残基 A鎖 129 残基 B鎖 123 残基	252 残基 A鎖 129 残基 B鎖 123 残基

* ハブ (徳之島産) *Trimeresurus flavoviridis*
 ** 百歩蛇 (台湾産) *Deinagkistrodon actus* (五歩蛇ともいわれる)
 *** それぞれの Gla-domain に結合することにより, 抗凝固活性を示す (本文参照)

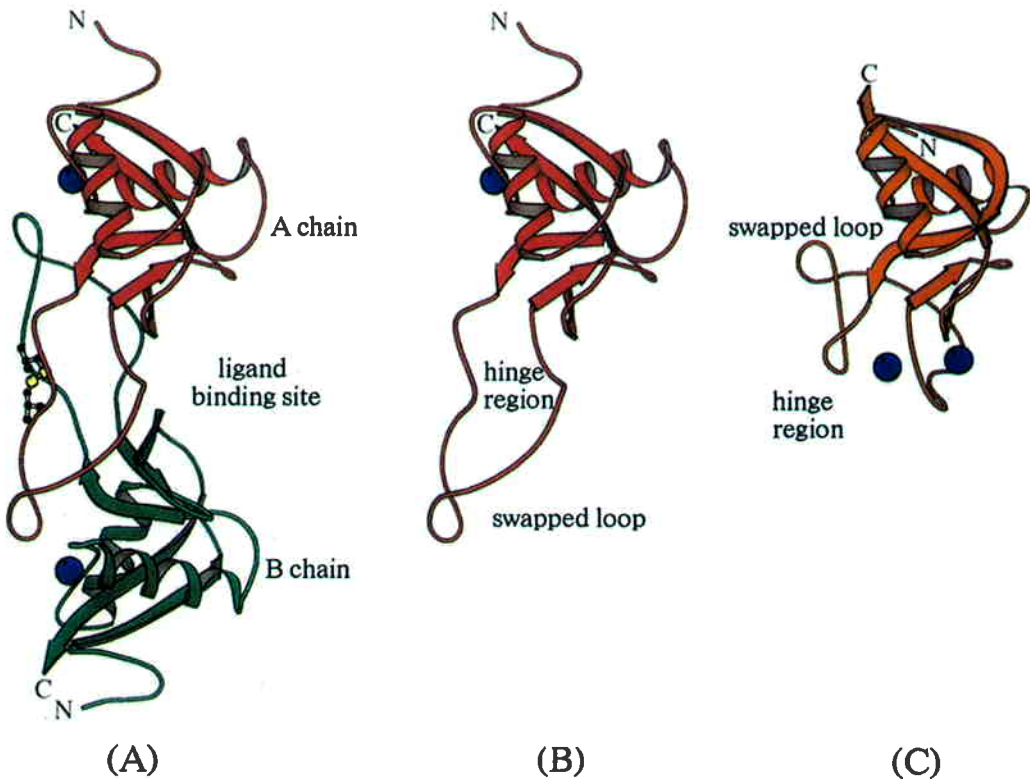


図 1 IX/X-bp と MBP の Ca^{2+} リボンモデル図の比較

(A) 偽似 2 回回転軸に垂直な方向から眺めた図である。上部がサブユニット A (A 鎖), 下部が B 鎖である。サブユニット間のジスルフィド結合は ball-and-stick 図で, Ca^{2+} は球印で示されている (文献(2)の図を改変)。(B) 図 1 (A) のサブユニット A (A 鎖) のみを抜粋したモデルである。(C) は (B) に重ねられる方向から眺めた MBP のモデルである。MBP を IX/X-bp の仮想モノマーとした時のドメインスワッピングの特徴 (swapped loop, hinge region で表示) を示す。両モデルにおける中央ループのフォールディングの違いおよび球印で示される Ca^{2+} の位置の違いに注目したい。

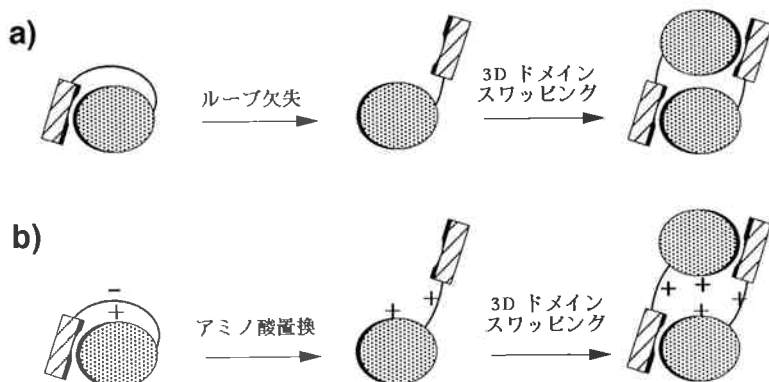


図 2 ドメインスワッピングの模式図

(a) ループ欠失 (b) アミノ酸置換に基づく 2 量化

(a) と (b) は文献 (5) の図を改変

Xa 因子 (X 因子) の有するリン脂質結合活性を阻害することによると推定している。

3. IX/X-bp とマンノース結合タンパク質 (MBP) の比較

図 1 (B) に IX/X-bp のサブユニット A のリボンモデルを, また図 1 (C) にマンノース結合タンパク質 (MBP と略) のリボンモデルをそれぞれ示す。MBP は 2 本の α -ヘリックスと 5 本の β -ストランドが C 型 CRD フォールドと呼ばれる折り畳まれ方をしており, その構造は C 型レクチンにとって共通の基本構造であると考えられている。図 1 (C) に示した MBP は IX/X-bp のサブユニット A に重ねられる方向から見たものであり, 中央のループは分子の内側に折り畳まれている。図 1 (B) と比較すると MBP のループは外側に突き出した IX/X-bp のサブユニット A のループ部分とは大きく異なることがわかる。また, Ca^{2+} 結合位置が異なり, MBP でみられるレクチン活性に必須の Ca^{2+} 結合は IX/X-bp では消失し, 新たな Ca^{2+} 結合が生じているのがわかる。一方, 中央ループ以外の部分の主鎖フォールディングについてはサブユニット A と MBP はよく類似している。ただし, サブユニット A にはジスルフィド結合でつくられる N 末端ループが余分に存在

する。両者のアミノ酸配列のホモロジーは 15% と低いにもかかわらず, 相対する $\text{C}\alpha$ の位置 (中央ループを除く) を重ね合わせた時の差の rms 値は 1.2\AA である。以上の点は, サブユニット B と MBP とを比較した場合においても同様である。

図 1 (A) を注意深く眺めてみると, サブユニット A の本体部分とサブユニット B の中央ループを組み合わせると図 1 (C) に示すような MBP の C 型 CRD フォールドとなっていることがわかる。すなわち各サブユニット間で中央ループを交換することによって, もとの C 型レクチンの基本骨格である C 型 CRD フォールドが作られていることがわかる。このことから, 2 分子の MBP が中央にあるループ構造を用いて, ループを交換して 2 量体をつくると, IX/X-bp と同様な 2 量体になるものと考えられる。したがって, IX/X-bp のヘテロ 2 量体は, MBP の構造を IX/X-bp の仮想的モノマーと見なし, 2 量化に際してループ間で 3D ドメインスワッピングが起きたものと考えられる。

4. IX/X-bp の 3D ドメインスワッピング

3D ドメインスワッピングはタンパク質の多量化機構の 1 つとして Eisenberg らによって

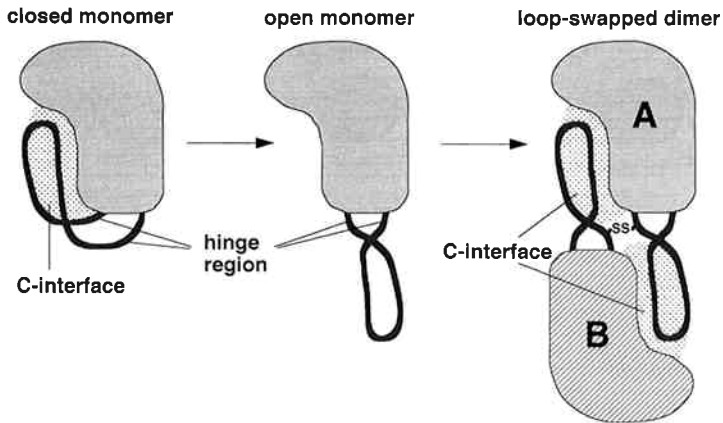


図3 IX/X-bp の場合のドメインスワッピング 2 量化的模式図

提案されたものである^{4)~6)}。図2に3Dドメインスワッピングの形成のメカニズムを示した。a) では2ケのドメインを結ぶヒンジ領域と呼ばれる loop の1部が欠如し、短くなった場合、b) は hinge loop 内のアミノ酸置換が生じ、ドメインスワッピングが起こり、2量化的場合を示している。IX/X-bp の2量化的はこのうち(a)の例に相当すると考えられる。図3にIX/X-bp が closed monomer から open monomer に変化し、loop-swapped dimer に2量化的過程を示した。IX/X-bp に対応する closed monomer は現在見いだされていないが、前述した様にIX/X-bp の各サブユニットと立体構造上非常に似ているMBPを仮想的モノマーとみなすことができる。ドメインスワッピングとみなせるもう1つの特徴はモノマーと2量体においてほぼ同一のインターフェースをもつことである。サブユニットBのスワッピングしたドメインとサブユニットAの本体部分とのインターフェースは、MBPの本体部分とループのインターフェースとよく似ており、疎水性コアを形成するアミノ酸残基がインターフェース相互作用の中心的役割を果たしている⁸⁾。

5. IX/X-bp 分子の Gla ドメイン結合サイト

IX/X-bp は血液凝固IX因子あるいはX因子のGlaドメインと結合することが知られている⁹⁾。一方、Glaドメインの立体構造はX線構造解析によって明らかにされており、Ca²⁺存在下においては安定な特有のフォールド構造をとる。IX/X-bpでは、Glaドメインとの結合サイトとして、2量化的によってつくられた、すなわち両サブユニットに囲まれた凹型表面(図1(A)の中央右側)が有力な候補に挙げられている。その根拠として次の3点が上げられる。

(1) Glaドメインのサイズと形状は候補結合部位の凹型表面にフィットする。

(2) 凹型表面の中央部に塩基性アミノ酸で作られるパッチがあり、マイナス荷電に富むGlaドメインとの間でソルトブリッジを介した相互作用が可能である。また、凹型表面の数残基の酸性アミノ酸はGlaドメインのGla残基との間でCa²⁺を介したサンドイッチ型の相互作用が可能である。

(3) 凹型表面上の塩基性および酸性アミノ酸は、同様にGlaドメインに結合するIX-bpやX-bpにおいてもよく保存されている。

6. おわりに

ヘビ毒由来の C 型 CRD のヘテロ 2 量体のファミリーに属するタンパク質の間では, それぞれの機能は異なるもののアミノ酸配列が高度に保存されている¹⁰⁾. 機能は多様であるが, レクチン活性をもたないことから推測すると, これらのタンパク質は IX/X-bp と同様に 3D ドメインスワッピングによってつくられた C 型 CRD の 2 量体であると考えられる. おそらく, 新しい機能を獲得するための進化の過程で, C 型 CRD という構造単位の有効利用が行われたものと推察することができる²⁾.

文 献

- 1) Atoda H, Hyuga M, Morita T: The primary structure of coagulation factor IX/factor X-binding protein isolated from the venom of *Trimeresurus flavoviridis*. Homology with asialoglycoprotein receptors, proteoglycan core protein, tetranectin, and Fcε receptors for immunoglobulin E. *J. Biol. Chem.* **264**: 14903-14911, 1991.
- 2) Mizuno H, Fujimoto Z, Koizumi M, Kano H, Atoda H, Morita T: Structure of coagulation factors IX/X-binding protein, a heterodimer of C-type lectin domains. *Nature Structural Biology* **4**: 438-441, 1997.
- 3) Atoda H, Yoshida N, Ishikawa M, Morita T: Binding properties of the coagulation factor IX/factor X-binding protein isolated from the venom of *Trimeresurus flavoviridis*. *Eur. J. Biochem.* **224**: 703-708, 1994.
- 4) Bennett MJ, Choe S, Eisenberg D: Domain swapping: Entangling alliances between proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**: 3127-3131, 1994.
- 5) Bennett MJ, Schlunegger MP, Eisenberg D: 3D domain swapping: A mechanism for oligomer assembly. *Protein Sci.* **4**: 2455-2468, 1995.
- 6) Schlunegger MP, Bennett MJ, Eisenberg D: Oligomer formation by 3D domain swapping: A model for protein assembly and misassembly, in Richards FM, Eisenberg DS, Kim PS (eds): *Advances in Protein Chemistry* (Vol. 50), Academic press, 1997, 61-122
- 7) Atoda H, Ishikawa M, Yoshihara E, Sekiya F, Morita T: Blood coagulation factor IX-binding protein from the venom of *Trimeresurus flavoviridis*: Purification and characterization. *J. Biochem.* **118**: 965-973, 1995.
- 8) Mizuno H, Fujimoto Z, Koizumi M, Kano H, Atoda H, Morita T: Crystal structure of coagulation factor IX-binding protein from habu snake venom at 2.6 Å; implication of central loop swapping based on deletion in the linker region. *J. Mol. Biol.* **289**: 103-112, 1999.
- 9) Atoda H, Ishikawa M, Mizuno H, Morita T: Coagulation factor X-binding protein from *Deinagkistrodon acutus* venom is a Gla domain-binding protein. *Biochemistry* **37**: 17361-17370, 1998.
- 10) Morita T, Atoda H, Sekiya F: Structure and functions of coagulation factor IX/factor X-binding protein isolated from the venom of *Trimeresurus flavoviridis*. in Singh BR, Tu AT (eds): *Natural Toxins II*, New York, Plenum Press, 1996, 187-196