

カプトガニ血球細胞に存在する コアギュローゲンの立体構造

岩 永 貞 昭*1*2

Three Dimensional Structure of Coagulogen Existed in
the Horseshoe Crab Hemocytes

Sadaaki IWANAGA

Key words : horseshoe crab (*Tachypleus tridentatus*), coagulogen, crystal structure, limulus test, endotoxins

1. はじめに

コアギュローゲン (coagulogen) は、カプトガニ血球細胞内の大顆粒中に局在するゲル化タンパク質の1種で、機能的にはフィブリノーゲンと類似する¹⁾。この血球細胞 (granulocyte/amoebocyteとも呼ぶ)の抽出液は、古くから細菌内毒素の鋭敏な検出試薬として活用されており、今日、リムラス (カプトガニの意味) 試験と呼ばれている。リムラス反応の原理は、血球細胞に含まれる体液凝固カスケードを利用したもので¹⁾、血球抽出液にピコモル濃度の細菌内毒素 (リポ多糖) が触れると、カスケード反応が活性化されるとともに、最終ターゲットであるコアギュローゲンがコアギュリングルに変換される²⁾。このゲルの出来高、例えば、クロット形成時間やゲル濁度、あるいはコアギュリンを生成するクロット酵素活性などは、内毒素の量と相関する。内毒素を化学的に定量するのは、今日でも非常に困難なので、この試験法は血中

内毒素の定量や医薬品のピロジェン汚染、輸液などの管理予備テストとして広く使われている。

一方、カプトガニにとってコアギュローゲンは、主要な生体防御物質として働く。すなわち、傷害時には循環血球細胞が血管の破綻個所に遊走して、異物と接触→血球凝集と崩壊→脱顆粒→凝固系の活性化、そして、生成したコアギュリンはゲル形成を介して体液の流出を防ぎ、かつ異物 (感染菌) の被包化に役立つ⁴⁾⁵⁾。従って、機能的にもフィブリノーゲン→フィブリン変換に似ており、それとの比較において、ゲル化に伴うコアギュリン会合体や原繊維構造の形成機作はきわめて興味深い。

コアギュローゲンについては、著者らによって現存する4種のカプトガニのもの的一次構造はもとより、それらの物理的諸性質や分子進化、系統樹、さらにコアギュリン変換の機作などが明らかにされている^{1)14)~16)}。また最近、コアギュローゲンの結晶化にも成功し、その立体構造が

*1 (財) 化学及血清療法研究所 [〒 860-8568 熊本市大窪一丁目 6 番地 1 号]

KAKETSUKEN [Okubo 1-6-1, Kumamoto-shi, Kumamoto 860-8568, Japan.]

*2 藤田保健衛生大学総合医科学研究所 [〒 470-1101 愛知県豊明市沓掛町田楽ヶ窪 1-98]

Institute for Comprehensive Medical Science, School of Medicine, Fujita Health University
[1-98 Dengakugakubo, Kutsukake-cho, Toyoake-shi, Aichi 470-1101, Japan]

表1 コアギュロージン・メモ

別称	カプトガニゲル化タンパク質
cDNA 配列	日本産 (<i>Tachypleus tridentatus</i>) と米国産 (<i>Limulus polyphemus</i>) のものの全塩基配列は決定されている ¹³⁾ .
分子量 ²⁾	19,700 (±50, 超遠心)
アミノ酸残基 ⁹⁾	175 残基 (成熟タンパク質), プロペプチド (シグナル) は20 残基から成る. 糖鎖および修飾アミノ酸残基は無し. Phe と Cys 含量の多いのが目立ち, 8ケのジスルフィドを含む ¹³⁾ . 現存3属4種のカプトガニゲル化タンパク質の全一次構造も決定されている ¹³⁾ . 相互の相同アミノ酸配列は70~90%.
等電点 ⁹⁾	pI=10.5, きわめて塩基性の強いタンパク質で, 血小板第4因子とβ-スロンボグロブリンとの間に, 部分的な類似配列を示す. また, 文中で述べた如く, 立体構造的には神経成長因子と類似する ⁶⁾ .
生理機能 ¹³⁾	1. カプトガニゲル化酵素によりコアギュリンゲルに変換され, 体液の流出阻止に働く. ゲル変換の際, Arg ¹⁸ Thr ¹⁹ と Arg ⁴⁶ Gly ⁴⁷ の2カ所が切断され, 28 残基から成るペプチドCが遊離する ¹³⁾ . 2. コアギュリンは, ウサギ赤血球およびヒト白血球を強く凝集する活性をもつ. なお, コアギュロージンはこうした活性をまったく示さない ¹⁰⁾ . 3. コアギュリンは細菌凝集活性も示し, フィブリンと類似の接着能をもつ ¹⁰⁾ . また, キチン結合活性を示す.
主な生合成場所 ⁹⁾	循環血球細胞 (Amoebocytes/Granulocytes, 俗に Hemocytes と呼ぶ).
主な局在場所 ⁹⁾	血球細胞内の大顆粒中にほかの凝固因子と共存.

解かれた⁶⁾. 本稿では, それらに焦点を絞って解説したい.

2. コアギュロージンの3次元 (3D) 構造⁶⁾

表1に示す如く, コアギュロージンは一本鎖の強塩基性単純タンパク質 (pI=10.5) で, 分子量は19,700 (±50), 総アミノ酸175残基から成る. コアギュリンへの変換については, 後にも

述べるが, クロット酵素により分子のNH₂-末端側の2カ所で限定水解され, 28残基のペプチドCを遊離しつつ, 2個のジスルフィド結合を介して連結したA鎖 (18残基) とB鎖 (129残基) から成るコアギュリンモノマーに移行する. さて, 著者らは, 最近, Max-Planck 研究所 (ミュンヘン市) のBode教授らの協力を得て, コアギュロージンのX線結晶解析を進めたが, その3D構造から得られる情報は注目される.

図1 コアギュロージンの立体構造 (文献6より引用)

図中のAとB1~B6のポリペプチド鎖は, 一次構造上のA鎖 (紫色) とB鎖 (青色と緑色) に相当する⁹⁾. なお, A鎖はゆらいでいて, その立体構造は特定されていない⁶⁾. 赤橙色はα-ヘリックスを示し, 主なものは3カ所, 特にCで指摘した場所 (ペプチドCに相当) に4回半見出し出される. 黄色はS-S結合を示し, 8箇所存在する. 分子全体の立体構造は, 円筒状の砂糖 (ペプチドCに相当) を「砂糖バサミ」でつまんだ形に見える. ペプチドCの下には「くぼみ」(cove) があって, そこに疎水性アミノ酸 (Ile, Val, Phe など) がクラスターを作っている⁶⁾. 一方, 分子の最下部 (図中のB5とB6に相当し, そのトポロジーはNGFに似ている) にも, 疎水性アミノ酸残基の集中している領域があって, ペプチドCが切り離されると, その領域が「くぼみ」と相互作用して「head to tail」の会合体を形成するらしい.

図2 コアギュロージン (左) とコアギュリン (右, 推定した像) の表面に分布する荷電アミノ酸残基. 赤はAspとGluなど酸性残基, 青はLysとArgなど塩基性残基の位置分布を示す. ペプチドCが遊離されると, 「くぼみ」(cove) が露出, そこにC末側の疎水性アミノ酸残基のクラスターが相互作用して, 「head to tail」のダイマーが形成されるらしい (図1参照).

図3 神経成長因子 (a) とコアギュロージン (b), Späzle プトトマー (c), Späzle ダイマーモデル (d) の立体構造 (文献8から引用). 三者とも一次配列上の相同性は15~22%程度であるものの, 3次元構造は相互に類似する. 特に黄色で示したcystine-knotの立体構造は, トポロジー的にも酷似しており, また, 神経成長因子 (a) のGln-51 (青色) とThr-91 (赤色) のトポロジーは, コアギュリンゲル (b) でも同じ場所で見出される.

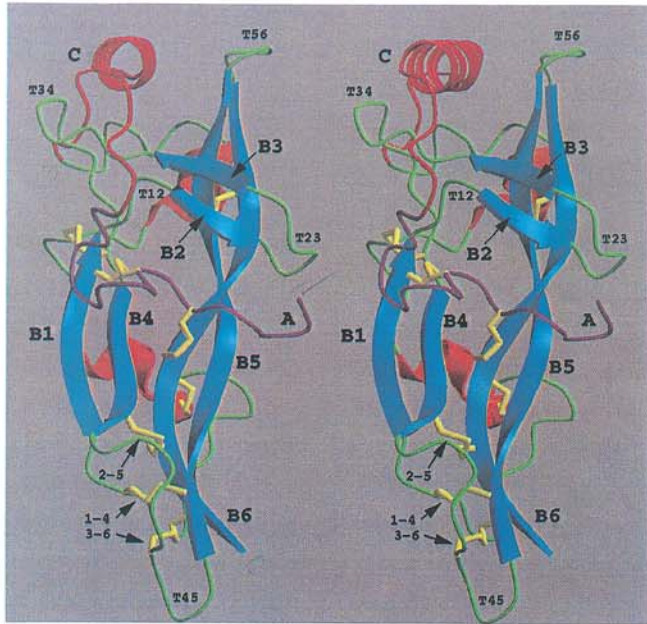


図 1

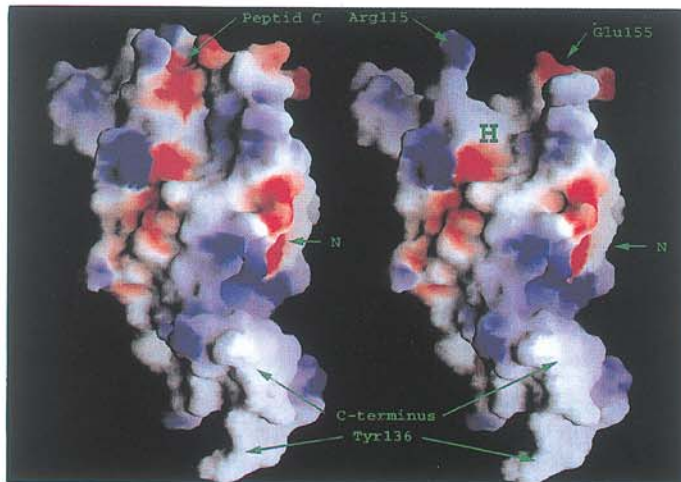


図 2

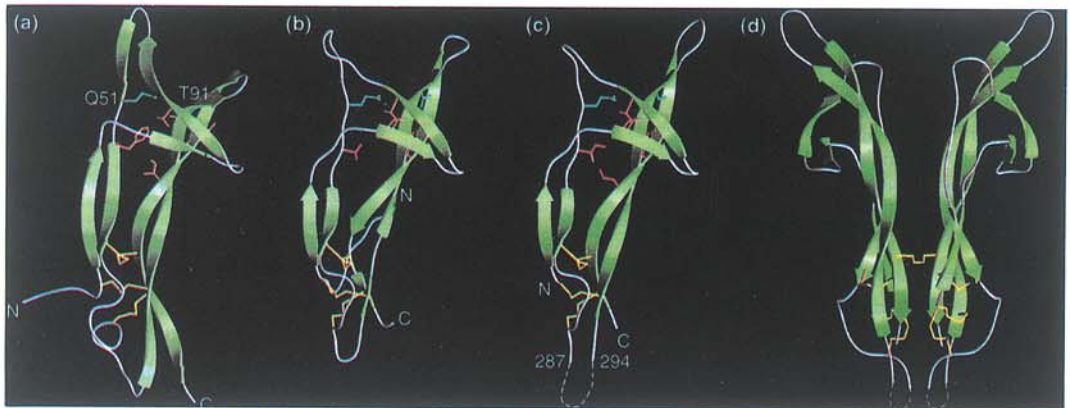


図 3

図1に2.0 Å分解能で解いた立体構造を示す。分子全体は、ラグビーボール様の伸びた回転楕円体(60×30×20 Å)である。図1のA領域はNH₂末側に相当するところで、4.5回転の α -ヘリックスのあるペプチドC領域に続き、さらに β 構造を主とするB1~B5のストランドを経て、COOH末側のB6に至る。

この3D構造の中で、A領域はゆらぎが大きく、その立体構造は特定できていないが、A領域内の2個のCys残基は、B領域のB1とB4にある2個のCys残基と、それぞれS-S結合(Cys⁸-Cys¹⁶⁷とCys¹⁰-Cys⁹⁵)している。また、B1からB6で示した6個の β -構造で特徴ある構造は、B6(Gly¹⁵⁸-Arg¹⁷³)とB5(Gly¹³⁹-Asn¹⁵³)が長いねじれた逆平行の β -シートを形成し、両端ではちょうど1回転している。さらに、B4(Val¹²²-Arg¹²⁸)とB1(Val⁹⁰-Val⁹⁶)の間、またB2(Phe⁹⁹-Thr¹⁰²)とB3(Phe¹⁰⁷-Val¹¹¹)の間にも、こうした逆平行 β -シートが見い出される。これらの β -シート構造は、後述する神経成長因子(NGFと略)やショウジョウバエのToll receptorのリガンドとして知られるSpätzleにも存在する。分子の頂上にあつて、紙面に垂直方向にあるペプチドCは、コアギュリンモノマーの生成時にクロット酵素によって切り離されるが、ペプチドCの真下には疎水性の強いアミノ酸のクラスター(Phe⁴⁸, Ile⁵⁰, Phe⁵¹, Phe⁵⁷, Val¹⁰⁹, Val¹¹¹, Phe¹¹⁸, Tyr¹⁵², Leu¹⁵⁴, Phe¹⁵⁹)が存在する。この疎水性クラスター領域は、ペプチドCに含まれる両親媒性の領域(Ile³⁰, Val³⁴とVal³⁷およびAsp²⁸, Glu³¹, Lys³², Gln³⁹とGln⁴⁰)と相互作用している。また、分子の最下部、すなわち、B鎖のCOOH末側に相当し、そのトポロジーがNGFやSpätzleのそれらと酷似する構造領域にも(後述)、疎水性アミノ酸残基の集中している領域(Tyr⁷⁶, Phe⁷⁸, Phe⁸¹, Phe⁸⁴, Phe⁹⁹, Tyr¹⁰¹, Phe¹⁰⁷)がある。ペプチドCが遊離すると、そこがCOOH末側の領域と相互作用しつつ、コアギュリンモノマーから

ダイマーに移行する。言い換えれば、最初の会合体は“head to tail”の形成を介して進むらしい。

図2と図4は、それをモデル化し、かつコアギュローゲン→コアギュリン変換を模式化して示した。図2の左はコアギュローゲンの立体モデル、右はコアギュリンモノマーの擬似立体モデルである。両者の違いは、分子の頂上に位置するペプチドCの有る無しであり、ペプチドCの外れたcove(入り江)にコアギュリンモノマーのCOOH末側が結合すると考えられる。事実、コアギュリンモノマーを二価性のクロスリンカー(Disuccinimidyl suberate)で処理すると、Lys⁸⁵とLys¹⁵⁶の間に分子間の架橋が形成され、両残基はそれぞれコアギュリンの頭部と尾部に位置することが明らかとなった(川崎裕子, 川畑俊一郎, 未発表)¹¹⁾。従つて、図4に示した“head to tail”を介したマルチマー形成の可能性は高いと考える。なお、コアギュリン繊維の電顕像には、枝分れ構造も見られるので、頭部と尾部にある重合部位のほか、side by sideの形成に関与する部位もあると推定される⁹⁾。

さて、コアギュローゲンの立体構造を、Brookhaven Protein Data Bank内の全タンパク質の3D構造と比較した結果、驚いたことに、分子全体のほぼ半分がNGFのそれに酷似することが分つた。さらに、最近、Spätzleの3D構造が解かれたが、この分子もコアギュローゲンの仲間であると言う⁸⁾。図3は3者の立体モデルである。先に述べた3対の逆平行 β -シート(図1のB1とB4, B5とB6, およびB3とB2に相当)のトポロジーは相互に似ており、また、それらの主鎖の構造を固定化する3個のS-S結合も、三者でほぼ同じ位置にある(こうしたモチーフをcystine knotと呼ぶ)。このトポロジーを基盤に、コアギュローゲンとNGFのアミノ酸配列を整理し直して見ると、特に両分子のCOOH末端側に21%の相同配列のあることが明らかとなった。従つて、コアギュロー

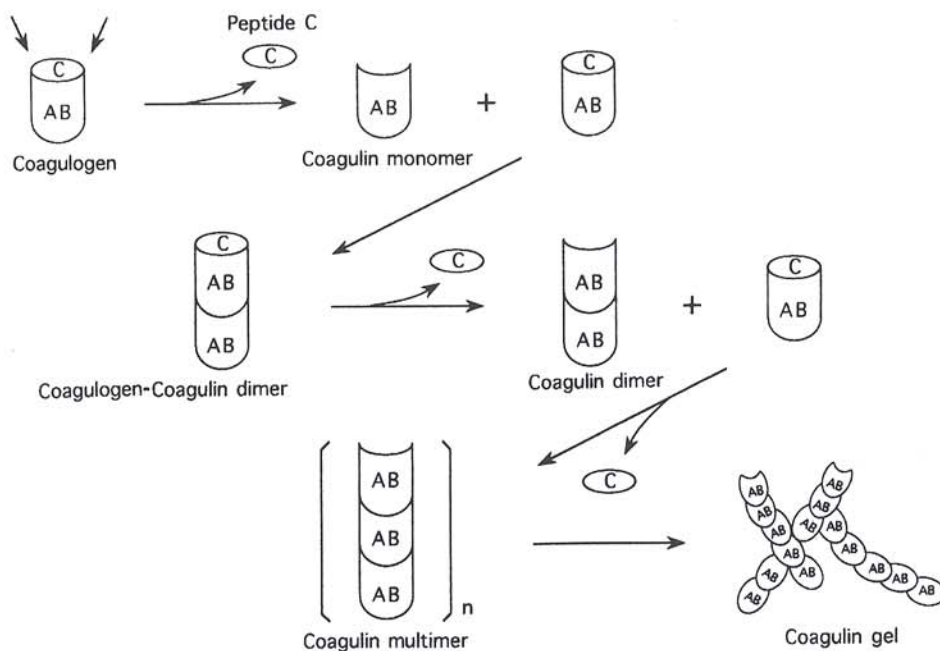


図4 コアギュローゲンからコアギュリンゲル形成への過程 (作業仮説). ここでは“head to tail”の会合について描いたが, ゲルの電顕像には side by side を介した枝分かれが見られるので, 高次のゲル形成には, さらに他領域での相互作用が必要であろう.

ゲンは NGF や Spätzle, さらに TGF- β_2 , PDGF (血小板由来の増殖因子) などのスーパーファミリーに属する可能性が考えられ⁷⁾, 今後, ゲル形成以外の生物活性を広く調べる必要がある.

3. おわりに

カプトガニの体液凝固に関する研究は, この系が内毒素によって特異的に活性化される一方, その原理を基にした内毒素の高感度検出法が広く利用されたことと相俟って, 無脊椎動物の中では例外的に詳しく研究されてきた¹¹⁾⁹⁾⁻¹⁵⁾. ここでは体液凝固系において中心的役割を果たしているゲル化タンパク質のコアギュローゲンをとり挙げ, その立体構造とそれから得られる機能情報を考察した. コアギュローゲンはゲル化して原繊維構造を形成するなど, 機能的にはフィブリノーゲンと類似するものの, その3D構造は両者でまったく異なる. 無脊椎動物には

ゲル化タンパク質として, コアギュローゲン以外に, ロブスターやザリガニ, エビ (甲殻類, なお, カプトガニはクモやサソリの仲間である) などの体液中にヴィテロゲニン (vitellogenin) が存在する. このタンパク質 (分子量 193,000 で, その cDNA から全アミノ酸配列 (1,723 残基) が推定されている¹²⁾) はコアギュローゲンやフィブリノーゲンと異なり, ペプチドの遊離無しにトランスグルタミナーゼ (XIII 因子様酵素) による架橋化を介してゲル化する. 今後, こうしたタンパク質のより詳細なゲル化のメカニズム, また, 繊維ゲルの高次構造, さらにゲル形成の生理的意義の研究が進展することを期待したい.

謝辞: 原稿の整理などして下さった若林 緑さん (当研究所血液製剤研究部) に御礼申し上げます.

文 献

- 1) Iwanaga S, Kawabata S, Muta T : New types of clotting factors and defense molecules found in horseshoe crab hemolymph: Their structures and functions, *J. Biochem (JB review)*, **123**: 1-15, 1998.
- 2) Iwanaga S: Limulus clotting reaction. *Current Opinion in Immunology* **5**: No.1, 74-82, Current Biology Ltd., London, 1993.
- 3) Iwanaga S: Primitive coagulation systems and their message to modern biology (Review). *Thrombosis and Haemostasis*, **70**: 48-55, 1993.
- 4) Muta T, Iwanaga S: Hemolymph coagulation in innate immunity. *Current Opinion in Immunology* **8**: 41-47, 1996.
- 5) Kawabata S, Muta T, Iwanaga S: The clotting cascade and defense molecules found in the hemolymph of the horseshoe crab. "New Directions in Invertebrate Immunology (Ed. by Söderhäll K, Iwanaga S, Vasta GR,)" SOS Publications, NJ, pp 255-283, 1996.
- 6) Bergner A, Oganessyan V, Muta T, Iwanaga S, Typke D, Huber R, Bode W: Crystal structure of limulus coagulogen: The clotting protein from horseshoe crab, a structural homologue of nerve growth factor. *EMBO J.* **15**(24): 6489-6797, 1996.
- 7) Bergner A, Muta T, Iwanaga S, Beisel H.-G, Delloto R, Bode W: Horseshoe crab coagulogen is an invertebrate protein with a nerve growth factor-like domain. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, **378**: 283-287, 1997.
- 8) Mizuguchi K, Parke JS, Blundell TL, Gay NJ: Getting knotted: a model for the structure and activation of spatzle. *TIBS* **23**: 239-242, 1998.
- 9) Iwanaga S, Miyata T, Tokunaga F, Muta T: Molecular mechanism of hemolymph clotting system in *Limulus*, *Thrombosis Res. (Review)* **68**: 1-32, 1992.
- 10) Liu Ty, Minett: CAS, Fortes-Dias CL, Liu T, Lin L, Lin Y: C-reactive proteins, limunectin, lipopolysaccharide-binding protein, and coagulin; Molecules with lectin and agglutinin activities from *Limulus polyphemus*. *Ann. N Y Acad Sci* **712**: 146-154, 1994.
- 11) 川崎裕子:九州大学大学院理学研究科, 修士論文(3月, 1998)
- 12) Hall M, Wang R, Van-Antwerpen R, Sottrup-Jensen L, Söderhäll K: The crayfish plasma clotting protein: a vitellogenin-related protein responsible for clot formation in crustacean blood. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 1965-1970, 1999.
- 13) 宮田敏行, 岩永貞昭: 無脊椎動物の体液凝固に関与する蛋白質の構造と分子進化 蛋白質 核酸 酵素 別冊 No.29, 30-43頁, 1986.
- 14) 岩永貞昭: 無脊椎動物の体液凝固機構, 第20回阿蘇シンポジウム記録1996(生体制御の破綻と修復, 高月 清, 渡辺 武, 植田浩司編) 85-99頁, 1997, 南山堂.
- 15) 岩永貞昭: 無脊椎動物のフィブリノーゲン様物質—コアグュローゲンの結晶構造とそのゲル化のメカニズム—, 第5回血液アゴラ, 9-30頁, 1997, メジカル・ジャーナル社, 東京.
- 16) 岩永貞昭, 川畑俊一郎: カプトガニのコアグュローゲンは神経成長因子の仲間か? 蛋白質 核酸 酵素, **43**巻(No.15), 2232頁, 1998.