



フォン・ビルブランド因子のモジュレータータンパク質 であるボトロセチンの立体構造と機能

松井 太衛*¹, 広津 晶子*², 水野 洋*²

3-D Structure of Botrocetin, a von Willebrand Factor Modulator Protein
from Snake Venom of *Bothrops jararaca*

Taei MATSUI*¹, Akiko HIROTSU*², Hiroshi MIZUNO*²

Key words : von Willebrand factor, botrocetin, platelet aggregation, snake venom, 3-D structure

1. はじめに

ボトロセチンはマムシ科の *Bothrops jararaca* ヘビ毒から単離された分子量約 27 kDa のタンパク質であり、試験管内でフォン・ビルブランド因子 (VWF) 依存性の血小板凝集を惹起する補助因子として、抗生物質のリストセチンとともにフォン・ビルブランド病 (VWD) の補助診断をはじめ、血小板機能検査や血栓形成機構の基礎研究に広く用いられている。ボトロセチンは 1978 年に Read らによって見い出されて以来¹⁾ その正確な作用機序はまだ明らかにされていないが、1993 年に一次構造²⁾、2000 年には VWF 分子上の推定結合サイトが明らかにされ³⁾、そしてごく最近その立体構造が明らかにされた⁴⁾。

2. ボトロセチンの性質

ボトロセチンの性質を表 1 にまとめる。リストセチンは、0.5~1.5 mg/ml の高濃度で血小板凝集を起こすのに対して、ボトロセチンは数 $\mu\text{g/ml}$ のオーダーで、血小板凝集を惹起する。ボトロセチンによる血小板凝集はリストセチン同様、VWF と GPIIb に依存しているが、ボトロセチンの結合する相手は VWF であり、この複合体が GPIIb と相互作用する。リストセチンは VWF 以外にも血小板の GPIIb に作用し⁵⁾、2 mg/ml 以上では、フィブリノーゲンを沈殿させるが、ボトロセチンにはそのような性質は見られない。

ボトロセチンは 133 残基の α サブユニットと 125 残基の β サブユニットがジスルフィド結合したヘテロダイマーであり、糖を含まず、各サブユニットはそれぞれ 7 残基の Cys を持ち (うち 1 残基がサブユニット間の S-S 結合を

*1 藤田保健衛生大学総合医科学研究所・医高分子学研究部門 [〒470-1192 愛知県豊明市沓掛町田楽ヶ窪 1-98] Division of Biomedical polymer Science, Institute for Comprehensive Medical Science, Fujita Health University [Kutsukake 1-98, Toyoake, Aichi 470-1192, Japan.]
TEL : 0562-93-9381 FAX : 0562-93-8832 e-mail : tmatsui@fujita-hu.ac.jp

*2 農業生物資源研究所・生体高分子研究グループ・蛋白機能研究チーム [〒305-8602 茨城県つくば市観音台 2-1-2] National Institute of Agrobiological Sciences [Kannondai 2-1-2, Tsukuba, Ibaraki 305-8602, Japan.]
e-mail : mizuno@nias.affrc.go.jp

形成), サブユニット間で45%のホモロジーを示す²⁾(図 1). α , β サブユニットともに, Ca^{2+} 依存性動物レクチンに見られる糖認識モチーフ (CRD) を含み, C 型レクチンスーパーファミリーに属するが, 血小板凝集誘起活性には Ca^{2+} 等の 2 価金属イオンを必要とせず, またレクチンとしての糖認識活性も報告されていない. ちなみにムラサキウニの体腔液レクチンであるエキノイジンとは, 31%程度のホモロジーである⁶⁾. ボトロセチンの等電点は pI 4.6 であり, 酸性アミノ酸が β サブユニットに多く, 塩基性アミノ酸は α サブユニットに多い(表 1). 興味深いことに, ボトロセチンと同様の VWF モジュレーターである *Bitis arietans* ヘビ毒由来のビチセチン⁷⁾ は, ボトロセチンと全体で45%程度のホモロジーしかなく(図 1), pI 9.1 と逆の電荷を帯びている(表 1).

一方, これまでにヘビ毒から, ボトロセチンと類似構造を持ったさまざまな生理活性物質が単離されている^{6,8)}. ハブ毒 (*Trimeresurus flavoviridis*) 由来の凝固第 IX 因子結合タンパク質 (FIX-BP) や凝固第 IX/X 因子結合タンパク質 (FIX/X-BP), GPIb 結合タンパク質であるエキセチン (*Echis carinatus*) やアルボアグレギン B (*T. alborablis*), ジャララカ GPIb-BP (*B. jararaca*), フラボセチン (*T. flavoviridis*), マムシギン (*Agkistrodon halys blomhof-*

fii) などは, まったく異なる活性を持つが, ボトロセチンといずれも 50%以上の高いホモロジーを示し(図 1), C 型レクチンスーパーファミリーに属している (すべてレクチンとしての活性は持たないことから一群のタンパク質は C 型レクチン様タンパク質と呼ばれる).

3. ボトロセチンの立体構造

Sen らは 100 mM MgCl_2 存在下にボトロセチンの結晶化を行い, X 線解析により 1.8 Å の解像度で立体構造を明らかにしている⁴⁾. ボトロセチンは A 鎖 (α サブユニット), B 鎖 (β サブユニット) とともに 2 本の α ヘリックスを持ち, それぞれ 7 本と 8 本の β ストランドを含んでいる(図 2A). 分子全体の折れ曲がり方は, FIX-BP⁹⁾ や FIX/X-BP¹⁰⁾, フラボセチン A¹¹⁾ とほぼ同じであり(図 2D), 約 $75 \times 35 \times 35 \text{ \AA}$ の伸びた構造をしている. 各サブユニットは球状ドメインとそこからとび出した大きなループからなり, このループ部分が互いに相手側の球状ドメインと相互作用することでジスルフィド結合 (Cys 80-Cys 75) によるダイマー形成をさらにサポートする(図 2B). このとび出しているループ部分は, マンノース結合タンパク質のような C 型レクチンでは同じサブユニットの球状ドメイン側に反り返っているが, ボトロセチ

表 1 フォン・ビルブランド因子活性化ヘビ毒タンパク質のプロファイル

名称	ボトロセチン	ビチセチン
由来	<i>Bothrops jararaca</i> (マムシ科)	<i>Bitis arietans</i> (クサリヘビ科)
結合タンパク質	VWF (A1 ドメイン)	VWF (A1, A3 ドメイン?)
固定血小板	凝集可能	凝集可能
有効濃度	0.5 $\mu\text{g/ml}$ <	0.5 $\mu\text{g/ml}$ <
分子量	27 kDa (258 aa)	25 kDa (256 aa)
α サブユニット	15 kDa (133 aa)	16 kDa (131 aa)
β サブユニット	14.5 kDa (125 aa)	13 kDa (125 aa)
pI	4.6	9.1
酸性アミノ酸	13%/19% (α/β)	16%/13% (α/β)
塩基性アミノ酸	14%/11% (α/β)	14%/19% (α/β)

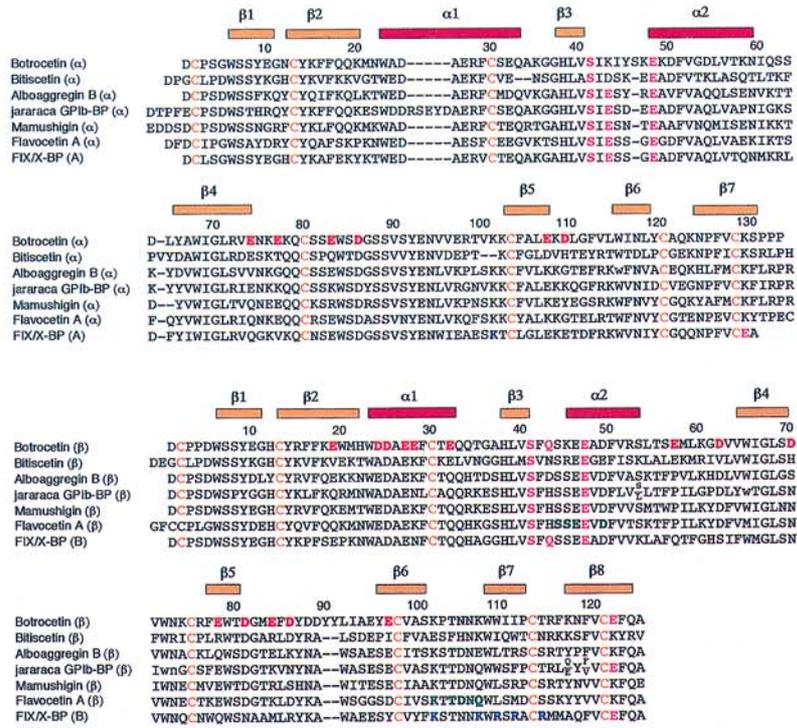


図 1

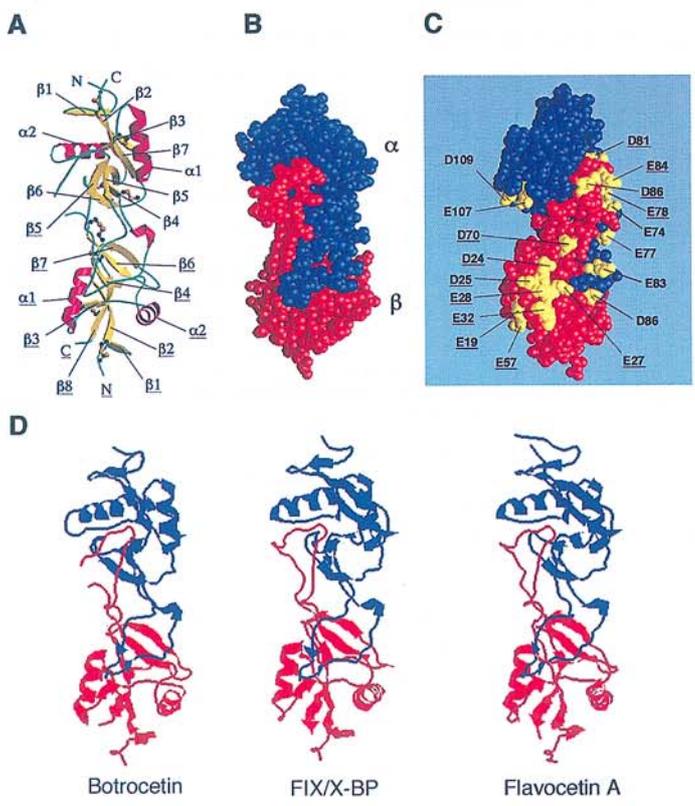


図 2

ンをはじめ, これまで立体構造の明らかにされている C 型レクチン様タンパク質はすべて, ループ部分が相手側の球状ドメインに伸び, あたかも相手側で反り返ったループ部分をミミックするようないわゆるドメインスワッピングを起こしている¹⁰⁾¹²⁾. このようなループ・スワッピングが CRD の精鎖認識活性を消失させるのではないかと考えられる¹⁰⁾. また, このループと球状ドメインは折れ曲がるにしても, 相手側にとび出すにしても, 互いの疎水面 (C-インターフェース) を介して相互作用することが C 型レクチン様タンパク質間でよく保存されている. 両サブユニットはジスルフィド結合によって連結しているが, 実際にはこの疎水性相互作用の力が大きい.

FIX-BP⁹⁾ や FIX/X-BP¹⁰⁾ では両サブユニットともに 2 価金属イオンの結合サイトが存在する. ボトロセチンは結晶化の際に Mg^{2+} イオンを必要としたが, β サブユニットのみが保存された 2 価金属イオンの結合サイトを有し, Ser 41, Gln 43, Glu 47, Glu 122 の側鎖で Mg^{2+}

イオンの結合ポケットを形成する. 一方 α サブユニットでは結合サイトを構成するアミノ酸の一部が塩基性アミノ酸 (Lys 43, Lys 129) に置換されており (図 1), 金属イオンの結合サイトが消失しているが, この置換されたアミノ酸の正電荷によって金属イオンを仲介せずとも安定な構造が保持されている⁹⁾. フラボセチン A でも同様にアミノ酸置換によって, 2 価金属イオン結合サイトが影響を受け, 両サブユニットともに金属イオンを結合していない¹¹⁾.

4. ボトロセチンの VWF 結合サイト

ボトロセチンや FIX-BP, FIX/X-BP などは, 2 つのサブユニットが会合することで, 中央が窪んだ表面構造を形成し, この部分でリガンドと結合すると考えられる^{9)~11)}. FIX-BP と FIX/X-BP ではともに, この窪みの近くに正電荷のパッチ構造があり, FIX や FX の Gla ドメインの γ -カルボキシグルタミン酸との相互作用に関与すると思われる⁹⁾¹⁰⁾. 実際, 最近, 水

図 1 ボトロセチンと類似したヘビ毒タンパク質の一次構造の比較

ボトロセチン, ピチセチン, アルボアグレギン B, jararaca GPIb-BP, マムシギン, フラボセチン A, FIX/X-BP の α , β サブユニットのアミノ酸配列をそれぞれホモロジーが最大となるように並べた. 残基番号はボトロセチンの番号を示す. 二次構造を α ヘリックス (赤のボックス) と β ストランド (黄色のボックス) で示す⁹⁾. 保存されている Cys 残基を黄色で, 2 価金属イオン結合サイトを形成するアミノ酸残基をピンク色で示す. 赤で示した残基は, ボトロセチンの VWF との結合に関与すると思われる酸性アミノ酸残基を示す⁹⁾. 緑はフラボセチン A の GPIb との結合に関与すると思われる親水性アミノ酸残基¹¹⁾を示し, 青で示した残基は FIX/X-BP の γ -カルボキシグルタミン酸との結合に関与すると思われる残基¹⁰⁾を示す.

図 2 ボトロセチンの立体構造

ボトロセチンの立体構造 (Protein Data Bank (PDB): 1FVU) をリボンモデル (A, D) と空間充填モデル (B, C) で示した. いずれも上は α サブユニット (A 鎖, 青), 下は β サブユニット (B 鎖, 赤) を示す. A: ボトロセチンの各 α ヘリックス (ピンク) と β ストランド (黄色) および番号 (β 鎖の方はアンダーラインを付記) を示す. また, ジスルフィド結合を黄色のボールで示し, それぞれのサブユニットの N 末端 (N) と C 末端 (C) を示す. β サブユニットの Asp 88-Tyr 91 は, シグナルがはっきりせず描かれていない. B: とび出したループ構造が互いのサブユニットを抱き込むような構造が見られる. C: リガンドの結合サイトと予想される窪み側を示す. VWF 上のボトロセチン結合サイトは塩基性アミノ酸が重要であることから, ボトロセチン側の酸性アミノ酸領域が結合に関与するのではないかと予想されている. 2 つのサブユニットから形成される窪み近傍に存在する酸性アミノ酸残基 (図 1 参照) を黄色で示した (β サブユニット由来の残基はアンダーラインで示す). β サブユニットの D 62 と E 97 は影に隠れて見えない. これらの酸性アミノ酸残基はボトロセチンに特徴的であり, 特に D 24 から E 32 に比較的大きな集団を形成する. D: FIX/X-BP (PDB: 1IXX) およびフラボセチン A (PDB: 1C3A) と比較したもの. ボトロセチンが FIX/X-BP やフラボセチン A とほとんど同じ全体像を示すことがわかる. Molscript と Grasp および RasMol 2.6 Beta を用いて作図した.

野らによって FX-BP と FX の Gla ドメインとの複合体の X 線解析が行われ、予想した場所での詳細な相互作用の様子が明らかにされている¹³⁾。しかしながら、この領域はボトロセチンでは数カ所において別の種類のアミノ酸に置き換えられている(図 1)。またフラボセチン A などの GPIb 結合タンパク質に共通して保存され、GPIb との結合に関与すると思われる β サブユニットの親水性アミノ酸残基からなるパッチ¹¹⁾(図 1)もボトロセチンではいくつか別のアミノ酸に置換されている。対してボトロセチンでは中央の窪み近傍から β 鎖の 2 価金属イオン結合サイトにかけて酸性アミノ酸のパッチ構造が見られる(図 2C)。この負電荷領域は β サブユニットの 14 残基と α サブユニットの 6 残基の酸性アミノ酸からなり(図 1, 図 2C)、ほかのヘビ毒タンパク質では見られないことから、ボトロセチンの生理活性の発現にきわめて重要と考えられる。最近、広津らはビチセチンの立体構造を明らかにしているが、ビチセチンは前述したように一次構造上はボトロセチンとそれほど高いホモロジーを示さず、逆に対照的な pI を持つにも関わらず、ボトロセチンとよく似た酸性アミノ酸のパッチ構造と、さらに塩基性のパッチも合わせ持つことが明らかにされている¹⁴⁾。

VWF 側のボトロセチンの結合サイトは、A1 ドメイン(残基 479~717)に存在することが VWF のプロテアーゼ断片¹⁵⁾や、合成ペプチド¹⁶⁾、リコンビナント A1 ドメイン¹⁷⁾、部位特異的抗 VWF モノクローナル抗体¹⁸⁾などを使った実験から示されてきた。松下らは、A1 ドメイン内の荷電アミノ酸を逐次 Ala に置換する Ala-スキャンニング法を用いて、ボトロセチンの結合に必須のアミノ酸残基をわり出したところ、Arg 629, Arg 632, Arg 636, Lys 667 などが重要であることを明らかにしている³⁾¹⁹⁾。これらはすべて塩基性アミノ酸残基であり、これらによって構成される VWF の A1 ドメインの正電荷領域にボトロセチンの窪みにある負電荷

領域が結合するのではないかと予想される。ビチセチンに関しては VWF のコラーゲン結合ドメインである A3 ドメイン(残基 910~1111)に結合するという報告がなされているが²⁰⁾、松井らはボトロセチンと同じく Ala スキャンニング法を用いて、ビチセチンの結合に必須のアミノ酸残基がきわめてボトロセチンの結合サイトに近いことを見つけており²¹⁾、今後の解明が待たれる。

このようにボトロセチンと一次構造上高いホモロジーを持つヘビ毒タンパク質は、立体構造的にも互いに類似した全体構造を持っているが、一部のアミノ酸残基を変化させることで、抗体のように効率良くさまざまな特異性を発揮する結合スポットを創出しているのではないかと考えられる。また、ビチセチンやボトロセチンを還元してサブユニットに分けると VWF との結合能が失われるが⁸⁾²²⁾、VWF との結合には単純な静電的なアフィニティ以外にも両サブユニットによって構成される立体構造も重要と思われる。今後、VWF との複合体を用いた構造解析により、さらに詳細に結合面が明らかにされることで、モジュレーターによる VWF の活性化メカニズム(GPIb 結合サイトの構造変化)が分子レベルで解明されると思われる。

文 献

- 1) Read MS, Shermer RW, Brinkhous KM: Venom coagglutinin: an activator of platelet aggregation dependent on von Willebrand factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **7**: 4514-4518, 1978.
- 2) Usami Y, Fujimura Y, Suzuki M, Ozeki Y, Nishio K, Fukui H, Titani K: Primary structure of two-chain botrocetin, a von Willebrand factor modulator purified from the venom of Bothrops jararaca. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 928-932, 1993.
- 3) Matsushita T, Meyer D, Sadler JE: Localization of von Willebrand factor-binding sites for platelet glycoprotein Ib and botrocetin by charged-to-alanine scanning mutagenesis. *J Biol Chem* **275**: 11044-11049, 2000.
- 4) Sen U, Vasudevan S, Subbarao G, McClintock RA, Celikel R, Ruggeri ZM, Varughese KI: Crystal structure of the von Willebrand factor modulator botrocetin. *Biochemistry* **40**: 345-352, 2001.
- 5) Hoylaerts MF, Nuyts K, Peerlinck K, Deckmyn H,

- Vermynen J: Promotion of binding of von Willebrand factor to platelet glycoprotein Ib by dimers of ristocetin. *Biochem J* **306**: 453-463, 1995.
- 6) 千谷晃一, 松井太衛, 浜子二治, 鈴木政美: 関西血栓フォーラム「血小板血栓形成の分子機構」: vWF-GPIb 軸の相互作用に影響を及ぼす蛇毒蛋白質の構造と機能(藤村吉博編集), pp182-189, 東京, ライフサイエンス出版, 1997.
 - 7) Matsui T, Hamako J, Suzuki M, Hayashi N, Ito M, Makita K, Fujimura Y, Ozeki Y, Titani K: *Res Commun Biochem. Cell. Mol. Biol.* **1**: 271-284, 1997.
 - 8) 藤村吉博, 川崎富久, 千谷晃一: von Willebrand 因子と血小板の結合反応を制御する蛇毒蛋白質の構造と機能. *日本血拴止血学会誌* **6**: 237-251, 1995.
 - 9) Mizuno H, Fujimoto Z, Koizumi M, Kano H, Atoda H, Morita T: Crystal structure of coagulation factor IX-binding protein from habu snake at 2.6 Å; implication of central loop swapping based on deletion in the linker region. *J Mol Biol* **289**: 103-112, 1999.
 - 10) 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 Struct. Biol* **4**: 438-441, 1997.
 - 11) Fukuda K, Mizuno H, Atoda H, Morita T: Crystal structure of flavocetin-A, a platelet glycoprotein Ib-binding protein, reveals a novel cyclic tetramer of C-type lectin-like heterodimers. *Biochemistry* **39**: 1915-1923, 2000.
 - 12) 森田隆司, 水野 洋: 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. *日本血拴止血学会誌* **10**: 305-309, 1999.
 - 13) Mizuno H, Fujimoto Z, Atoda H, Morita T: Crystal structure of an anticoagulant protein in complex with the Gla domain of factor X. *Proc Natl Acad Sci* (in press)
 - 14) 広津晶子, 福田耕一, 水野 洋, マーチュンキー, 森田隆司, 松井太衛, 千谷晃一: フォン・ビルブランド因子(vWF)依存性血小板凝集促進因子 bitiscetin の結晶構造. *日本結晶学会 2000 年度年会要旨集* **12**, 2000.
 - 15) Andrews RK, Booth WJ, Gorman JJ, Castaldi PA, Berndt MC: Purification of botrocetin from *Bothrops jararaca* venom. Analysis of the botrocetin-mediated interaction between von Willebrand factor and the human platelet membrane glycoprotein Ib-IX complex. *Biochemistry* **28**: 8317-8326, 1989.
 - 16) Sugimoto M, Mohri H, McClintock RA, Ruggeri ZM: Identification of discontinuous von Willebrand factor sequences involved in complex formation with botrocetin. A model for the regulation of von Willebrand factor binding to platelet glycoprotein Ib. *J Biol Chem* **266**: 18172-18178, 1991.
 - 17) Sugimoto M, Ricca G, Hrinca ME, Schreiber AB, Searfoss GH, Bottini E, Ruggeri ZM: Functional modulation of the isolated glycoprotein Ib binding domain of von Willebrand factor expressed in *Escherichia coli*. *Biochemistry* **30**(21): 5202-5209, 1991.
 - 18) Fujimura Y, Miyata S, Nishida S, Miura S, Kaneda M, Yoshioka A, Fukui H, Katayama M, Tuddenham EGD, Usami Y, Titani K: The interaction of botrocetin with normal or variant von Willebrand factor (type IIA and IIB) and its inhibition by monoclonal antibodies that block receptor binding. *Thromb Haemost* **68**: 464-469, 1992.
 - 19) Matsushita T, Sadler JE: Identification of amino acid residues essential for von Willebrand factor binding to platelet glycoprotein Ib. Charged-to-alanine scanning mutagenesis of the A1 domain of human von Willebrand factor. *J Biol Chem* **270**: 13406-13414, 1995.
 - 20) Obert B, Houllier A, Meyer D, Girma JP: Conformational changes in the A3 domain of von Willebrand factor modulate the interaction of the A1 domain with platelet glycoprotein Ib. *Blood* **93**: 1959-1968, 1999.
 - 21) 松井太衛, 松下 正, 齋藤英彦, 藤村吉博, 千谷晃一: von Willebrand 因子(vWF)上のピチセチン結合サイトの解析. *Int J Hematol* **73**(supplement): 239, 2001.
 - 22) Hamako J, Matsui T, Suzuki M, Ito M, Makita K, Fujimura Y, Ozeki Y, Titani K: Purification and characterization of bitiscetin, a novel von Willebrand factor modulator protein from *Bitis arietans* snake venom. *Biochem Biophys Res Commun* **226**: 273-279, 1996.