

X線結晶構造解析から明らかになったヘパリン コファクター II のヘパリン依存性 トロンビン阻害機構

小出 武比古^{*1}

Mechanism of Heparin-dependent Thrombin Inhibition by
Heparin Cofactor II as Revealed by X-ray Crystallographic Analysis

Takehiko KOIDE

Key words : heparin, serpins, conformational change

はじめに

ヘパリンコファクター II (HCII) は、表 1 に示す特徴をもつ血中のプロテアーゼインヒビターで、セルピン (Serpins) の 1 つである。アンチトロンビン (AT) と同じく、単体としては不活性な状態で存在し、ヘパリンやデルマタン硫酸などのグリコサミノグリカン (GAG) との結合によって活性化されるという特徴がある¹⁾。HCII の GAG 依存性の阻害機構は、これまで Tollefsen ら²⁾ によって詳しく研究され、ユニークなモデルが提唱されているが、今回、Huntington ら³⁾ によって、トロンビンとの複合体の X 線結晶構造と GAG 結合によるその構造変化 (conformational change) が示されたので、以下に紹介する。なお、AT のヘパリン依存性の阻害機構については、すでに本トピックスで紹介したので、そちらと比較しながら、読みたい⁴⁾。

1. HCII の構造

native AT は反応中心ループ (reactive center loop) の一部 (図 1a 中、黄色で示したストランド) が β シート A (図 1a 中、赤色で示した 5 本のストランド) に挿入されていることがセルピンの中でユニークである。そのために反応中心 Arg 393 の側鎖が分子の内側に配向されてプロテアーゼとの反応性が悪いが、ヘパリンが結合することによって、この挿入部分が外に押し出され、AT の反応中心とプロテアーゼの活性中心との反応性が高められる (図 1a 右、文献 4 に詳述)。native HCII も、AT 同様に、反応中心ループの一部 (図 1b 中、黄色で示したストランド) が β シート A (図 1b 中、赤色で示した 5 本のストランド) に挿入されて、シート A が 6 本のストランドからなり、全体的にも AT とほぼ同じ構造を取っている。このような構造から、native HCII も AT 同様に、GAG との結合による活性化を必要とすると結

*1 姫路工業大学大学院理学研究科生命科学専攻生体物質機能解析学部門生体物質化学 II 分野 (〒 678-1297 兵庫県播磨科学公園都市)

Department of Life Science, Graduate School of Science [Himeji Institute of Technology, Kamigori-cho, Hyogo 678-1297, Japan.]

Tel : 0791-58-0212 Fax : 0791-58-0219 e-mail : koide@sci.himeji-tech.ac.jp

論できそうであるが、ATと異なり、native HCII では反応中心 Leu 444 の側鎖がすでに分子の外側に配向されているにも拘わらず、トロンビンとの反応性が悪いということがあり、これについては後述する。

2. ヘパリン結合部位

ATのヘパリン結合部位は、ヘリックス D 中の Lys 114, Lys 125, Arg 129, Arg 132, Lys 133 およびヘリックス A 中の Arg 46 と Arg 47 が

表 1 ヘパリンコファクター II・メモ

生理機能	トロンビンの阻害 ヘパリンおよびデルマトン硫酸存在下で阻害速度は著しく (数千倍) 促進される
分子量	66,000 糖鎖含量は約 10%
総アミノ酸残基数	480
構造	セルピン・スーパーファミリータンパク質。 他のセルピンよりも N 末端領域が80残基ほど長い。 システインは3残基存在するが、ジスルフィド結合は無い。
糖鎖などの修飾アミノ酸	Asn 結合型複合型糖鎖が3カ所 (Asn30, Asn169, Asn368)。 硫酸化チロシンが2残基 (Tyr60 と Tyr73)。
ヒト染色体部位	22q11.1
遺伝子構造	15,849 bp 5エクソン
血漿濃度	100 mg/l, 1.5 μ M
欠乏症	血栓傾向を呈する例もあるが、未確立。
生合成部位	肝細胞
主な局在	血中
レセプターおよび結合タンパク質	LRL (LDL レセプター関連タンパク質), SEC レセプター

図 1 native HCII の AT 様の構造.

(a) native AT の構造は反応中心ループ (黄色) が部分的に β シート A に挿入されており、そのために、反応中心 Arg の側鎖 (赤色, space filling で表示) がプロテアーゼ阻害に不利な方向を向いているという特異なセルピンであり、ヘパリン (ball-and-stick) が結合することにより、反応中心ループが β シート A から外に押し出され、自由に Michaelis 複合体を形成することができるようになる。

(b) native HCII の構造は AT と同様に、反応中心ループの一部が β シート A に挿入されている。

(c) HCII のヘリックス A (緑色) と D (シアン) 中のヘパリン結合残基は AT との間で非常によく保存されていることから、同様のヘパリン結合様式であり、結合によって同様のコンホメーション変化がおこると考えられる。

図 2 HCII-トロンビン Michaelis 複合体の結晶構造.

(a) S195A トロンビン (シアン) と HCII (色分は図1を参照のこと) の Michaelis 複合体のステレオ図。トロンビンの γ -ループと 60-挿入ループは、それぞれ、HCII の反応中心ループの前面と後面にきている。

(b) HCII の反応中心残基 (ロッドで表示) とトロンビンの活性部位のクレフト (表面で表示) の間のサブサイト間の相互作用は広範囲にわたり、かつ静電氣的 (左図: 陰性電位は赤, 陽性は青で表示) にも疎水性的 (右図: 疎水性の側鎖を緑で表示) にも相補的である。

(c) トロンビンのエキソサイト I (b 図と同じ表示法) と HCII のヒルジンの N-末端領域 (ロッドで表示, 見やすくするためにトロンビンと相互作用をしていない残基の側鎖は省略してある) の相互作用は、主に疎水性のものである。イオン性の相互作用は、HCII の Asp-70, Asp-72 とトロンビンの Lys-110H 間だけである。硫酸化 Tyr-60 と 73 はトロンビンと相互作用していないので、示されていない。

図 3 HCII の GAG 依存性トロンビン阻害の連続的機構. 詳細は本文中。(本機構のビデオは Movie 2 を見られたい)

図 1

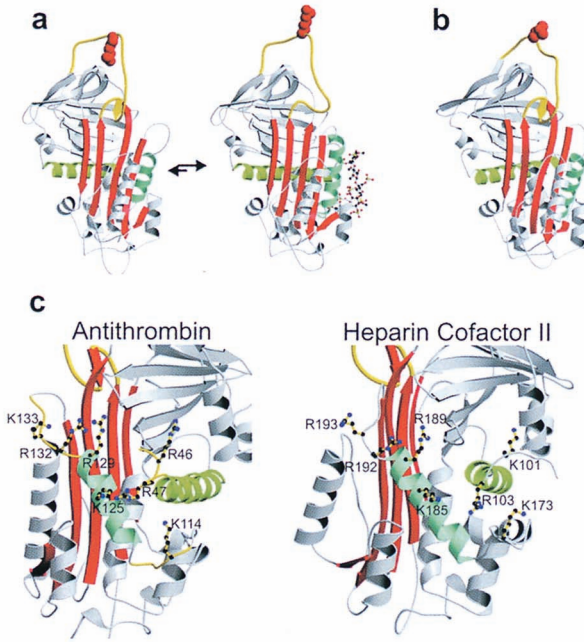


図 2

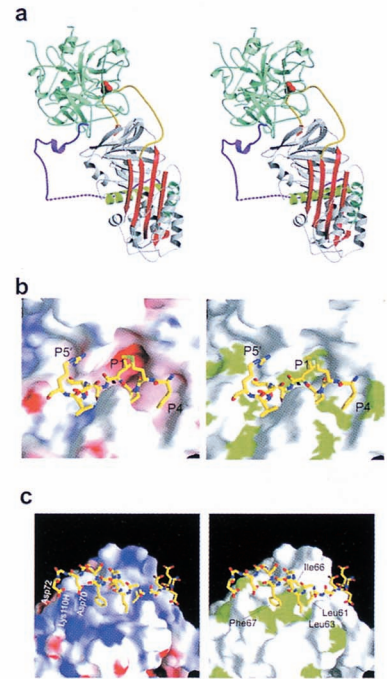
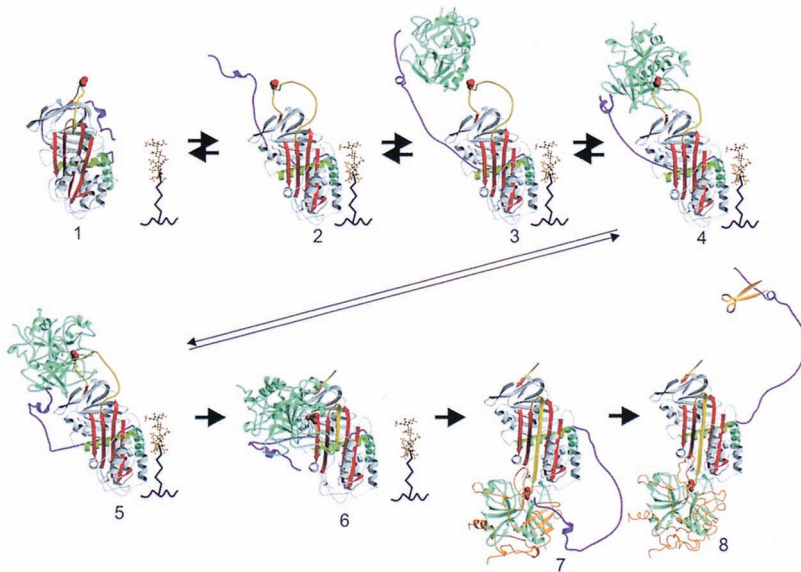


図 3



同定されている (図 1c). HCII のヘパリン (およびデルマタン硫酸) 結合部位も, AT とのアミノ酸配列の相同性や変異体の作製によって, ヘリックス D 中の Lys 173, Arg 184, Lys 185, Arg 189, Arg 192, Arg 193 などが同定されており¹⁾, ヘリックス A 中にも Lys 101 と Arg 103 が AT の Arg 46 と Arg 47 と立体構造的にも相同な個所に存在することから, AT と HCII のヘパリン結合機構は同じであると考えられる (図 1c).

3. N 末端酸性領域

HCII が構造的に AT と最も異なる点は, N 末端領域が 56 残基 (一般のセルピンよりも約 80 残基) 長いことであり, その領域にユニークな酸性アミノ酸残基の繰返し配列がある. 従来から native HCII では, この N 末端酸性領域がヘパリン結合部位とイオン結合していることが提唱されており²⁾, 今回の結晶構造解析でその立体構造が明らかにされるのが期待されたが, 残念ながら, この領域は結晶内でゆらいでいて見えないため, その構造を特定することはできなかった. さらに, 今回の HCII の結晶構造は二量体構造を取っていたため, N 末端酸性領域は native HCII とは異なる配置になっていると考えられている. これらのことは必ずしもこの領域が溶液中でもゆらいでいるということの意味するものではないが, 結晶構造からは少なくとも, この酸性領域がヘリックス D 中のヘパリン結合部位と結合していることはないという結論である. N 末端酸性領域については後程再度触れる.

4. HCII と S195A トロンピンとの ミカエリス型複合体の構造

図 2a に HCII と S 195 A トロンピン (活性中心の Ser を Ala に置換したトロンピン変異体) のミカエリス型複合体の構造を示した. ト

ロンピン (図 2a シアン色) は HCII の上部少し後ろ左寄りに結合し, トロンピンのエキソサイト II (ヘパリンとの結合部位) は, HCII のヘパリン結合部位のヘリックス D (シアン色) と同じ側面に配向している. ここで注目すべきことは, native HCII では一部が β シート A に挿入されていた反応中心ループが複合体形成において完全にシート外に出ているということである. すなわち, セルピンが十分に活性化状態であるためには, 反応中心ループが分子表面に完全に露出されていること, それによって反応中心 P 1 位のアミノ酸残基の側鎖が分子表面で外側を向いていることが必要であり, これまで AT や HCII が native form では生理機能的に不活性であり, ヘパリンやデルマタン硫酸などの GAG による活性化が必要と考えられてきたことが構造的に証明されたことになる. もうひとつ, 本ミカエリス型複合体の特徴は両タンパク質間での接触面の多さである. 通常のセルピン-プロテアーゼ複合体は主として反応中心と活性中心間の結合だけによるものであり, セルピンとプロテアーゼは, それぞれ独立して回転できるのに対して, HCII は, ①反応中心ループ, ② β シート 3 C, 4 C とその近傍, および③ N 末端酸性領域の 3 箇所においてトロンピンと接触している. まず, 反応中心ループは, P 4-P 5' (Phe 441-Arg 449) の範囲で, トロンピンの活性中心と静電的および疎水的に相互作用している (図 2b). トロンピン分子中には, 「60 挿入ループ」や「 γ -ループ」と呼ばれる挿入ループ構造部分が存在するが³⁾, 60 挿入ループ中の Asp 60 E は, シート 2 C 直前の Arg 369 と塩結合している. また, γ -ループ中の Trp 147 A は, β シート 3 C 中の Gln 308 と 4 C 中の His 290 およびその直前の短いヘリックス F1 中の Met 288 による疎水性ポケットに入り込んでおり, 同じく γ -ループ中の Asn 147 D はヘリックス F1 中の Val 286, Glu 287 および Thr 289 と水素結合を形成している. 一方, 意外であったのは, HCII に最も特徴的な N 末端の

酸性領域とトロンビンの相互作用である。この酸性領域には、いわゆるヒルジンドメインが⁵⁶EDDDY*LD⁶²と⁶⁹EDDDY*ID⁷⁵(Y*は硫酸化チロシン残基)の2個所にあり、いずれも7残基中6残基が酸性アミノ酸残基であるにも拘わらず、この領域のトロンビンとの静電的な相互作用はわずかにAsp 70とAsp 72がトロンビン中のLys 110 Hとイオン結合しているだけであり(図2c左)、この領域の相互作用は主として、2個所のヒルジンドメイン間で両親媒性のヘリックスを形成するLeu 61, Leu 63, Ile 66およびPhe 67とトロンビンのエキソサイトI中のPhe 34, Leu 65, Arg 67, Tyr 76およびMet 84間の疎水結合である(図2c右)。

5. HCIIのGAGによるアロステリック活性化

先にも触れたように、HCIIのN末端酸性領域がnative HCIIにおいてどこに位置しているのか詳細は不明であるが、酸性領域が始まるPro 52とPhe 195(ヘリックスDとシート2Aのつなぎ部分)がごく近くに存在するという傍証⁶⁾と、native formにおけるヘリックスAが図2aに示したS 195 Aトロンビンとの複合体中のヘリックスAと同じ位置にあることから、N末端酸性領域は反応中心の背面でシートBとCを取り囲むような形で、Pro 52からヘリックスAのN末端までの大きなループを形成している構造モデルが出された(図3-1)。この構造モデルによって、N末端酸性領域がnative HCIIとトロンビンとの迅速な結合を妨げていることが示唆でき、この領域を欠失させた変異体が迅速にトロンビンを阻害するという報告⁷⁾とも一致する。HCIIの反応中心ループが分子表面に露出されることに伴う明らかな構造変化はMovie 1としてHuntingtonらの論文³⁾に添付されており、PNASのweb site (www.pnas.org)で見ることができるので、ご覧いただきたい。細胞表面のGAGとの結合によって

始まるHCIIの構造変化とそれに続くトロンビン阻害機構を図3に示した。HCIIはGAGと結合すると、反応中心ループの挿入部分が分子表面に排出されて伸び、シートAの3Aと5A間が閉じられる。それと同時に、ヘリックスD(シアン色)近傍のN末端酸性領域の端(図3-1の右上)がGAGにはじき出されるようにして上方向に伸びる(図3-2)。次に、ATの場合と同様な誘導適合機構(induced-fit mechanism)によって活性型となったHCIIはGAGとより強く結合し、自由になったN末端酸性領域はトロンビンを捉える(トロンビンのエキソサイトIと結合)(図3-3)。これによって、反応中心ループがトロンビンの活性中心の窪みに入り込み、その周辺の残基が互いに接触する(図3-4)。N末端酸性領域はトロンビンをさらにHCII側に引きつけ、ミカエリス型複合体の形成に至る(図3-5)。活性なトロンビンの作用によって反応中心のペプチド結合が水解されて複合体はアシル酵素複合体となるが、この水解によって二分された反応ループの一方は、N末端酸性領域がトロンビンと結合したままで、再びシートAに挿入され始め(図3-6、黄色の部分)、ついにはトロンビンをHCII分子の反対側に70Å移動させる(図3-7)。丁度、柔道でトロンビンという相手に巴投げを掛けたようなものと想像すればよい。このような大きな変化によってトロンビンのエキソサイトIの構造が壊され、N末端酸性領域はトロンビンから解離するが、その後、血中のプロテアーゼによって水解され(図3-8)、白血球の走化性を刺激するペプチド(Asp 49-Tyr*60)を放出する。最後に、反応中心ループがシートAに挿入された結果、HCIIのGAGへの親和性が弱まり、HCII-トロンビン複合体は細胞表面のGAGから離れ、LRP(SECレセプター)にトラップされて、細胞内へ取り込まれて分解される。このようなヘパリン依存性のHCIIのトロンビン阻害機構は、上述のPNASのweb site (www.pnas.org)でMovie 2として見ることができるので、ご覧

いただきたい。

おわりに

HCIIはATと共に、ヘパリンなどのGAGによって活性化されるセルピンであり、Tollefsenらによって提唱されたHCII独特の活性化機構は大変興味深いものであった²⁾。今回、X線結晶構造解析によって、その活性化機構が可視化され、トロンビン分子がHCIIの一方の極から反対の極まで70Åも動くという驚異の阻害機構が示された。これまで立体構造が明らかにされたいくつかのセルピンの中、ヘパリン結合性のATにのみ認められた反応中心ループの β シートAへの一部挿入という構造が同じくヘパリン結合性のHCIIにも認められたことから、両セルピンのGAGによる共通な活性化機構が明らかにされたと同時に、HCIIとS195Aトロンビン複合体の構造解析結果により、「native ATにおける反応中心ループの β シートAへの挿入部分は、プロテアーゼ阻害の際に、ループ外に排出されるのか？それともその部分がプロテアーゼによって切り離された反応中心ループがシートAに完全に挿入される際の牽引力になっているのか？」というAT研究における長年の論争に終止符が打たれた。一方で、今回明らかになることが最も期待されたN末端酸性領域の構造決定は、残念ながら将来に

残されたままとなった、しかし、HCIIのN末端酸性領域の構造についても大変ダイナミックな動きのモデルが提出され、今後に大きな興味が膨らんだ。今や論文にビデオを添付できる時代となったが、今回のトピックスは、その有効性を最大に示したものであろう。

是非、ビデオの方も楽しんでいただきたい。

文 献

- 1) 小出武比古: Heparin Cofactor II. 動脈硬化 **23**: 581-585, 1996.
- 2) Van Deerlin VMD, Tollefsen DM: The N-terminal acidic domain of heparin cofactor II mediates the inhibition of α -thrombin in the presence of glycosaminoglycans. J Biol Chem **266**: 20223-20231, 1991.
- 3) Baglin TP, Carrell RW, Church FC, Esmon CT, Huntington JA: Crystal structures of native and thrombin-complexed heparin cofactor II reveal a multistep allosteric mechanism. PNAS **99**: 11079-11084, 2002.
- 4) 城谷裕子, 小出武比古: アンチトロンビンのプロテアーゼ阻害機構とヘパリンの作用機構—立体構造で見る動的構造変化—. 日本血栓止血学会誌 **10**: 93-99, 1999.
- 5) Bode W, Turk D, Karshikov A: The refined 1.9-Å X-ray crystal structure of D-Phe-Pro-Arg chloromethylketone-inhibited human α -thrombin: structure analysis, overall structure, electrostatic properties, detailed active-site geometry, and structure-function relationships. Protein Sci **1**: 426-471, 1992.
- 6) Brinkmeyer S, Eckert R, Ragg H: Evidence for allosteric activation of heparin cofactor II in the presence of heparin or dermatan sulfate. Thromb Haemostas, suppl. (abstr. No.P2082), July, 2001.
- 7) Liaw PC, Austin RC, Fredenburgh JC, Stafford AR, Weitz JI: Comparison of heparin- and dermatan sulfate-mediated catalysis of thrombin inactivation by heparin cofactor II. J Biol Chem **274**: 27597-27604, 1999.