

TAFI の構造と機能

Structure and function of thrombin activatable fibrinolysis inhibitor

三浦 徳, 細野 崇, 関泰一郎*

Atsushi MIURA, Takashi HOSONO, and Taichiro SEKI

Key words: thrombin activatable fibrinolysis inhibitor, TAFI, carboxypeptidase

Points

- ①TAFI (56 kDa) は、活性化ペプチド (Phe¹-Arg⁹²; 20 kDa) と触媒ドメイン (Ala⁹³-Val⁴⁰¹; 36 kDa) から構成されている。
- ②活性化ペプチドは、4つのβシートと2つのαヘリックスからなるα/βサンドイッチ構造 (Phe¹-Val⁷⁶)、部分的にαヘリックス構造を形成したリンカー領域 (Gln⁷⁷-Arg⁹²) に分けられる。
- ③トロンビンは Arg⁹²-Ala⁹³ を加水分解して、活性化ペプチドを遊離させ、TAFI を活性化する。
- ④活性中心は、亜鉛イオンを配位した HXXE コンセンサス配列からなる。
- ⑤TAFI 特異的な活性阻害因子は存在せず、体内では不安定性により活性が制御されている。

1. はじめに

Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) は、その名称が示すとおり凝固系と線溶系両者にリンクした線溶制御因子である¹⁾。凝固カスケードにより生成されたトロンビンは、最終的にフィブリン塊を形成して止血を完了させる。その後、形成されたフィブリンは、線溶酵素プラスミンにより分解・除去される²⁾。線溶反応は、フィブリンのプラスミンによる部分加水分解によりフィブリン分子上に出現する C 末端のリシン残基を介してプラスミノゲンや

プラスミン、組織型プラスミノゲン活性化因子 (tPA) が結合することにより著しく促進される。TAFI はフィブリンの C 末端リシン残基を除去することによりこれらの線溶系酵素のフィブリンへの結合を阻害し、線溶反応を抑制する。また、TAFI は線溶の制御のみならず炎症をはじめとした多様な生命現象に関与することも明らかにされつつある³⁾。

TAFI はメタロカルボキシピプチダーゼの他のファミリーに属するタンパク質とは異なる特徴的な分子構造を有しており、これらの構造に起因するユニークな機能特性を示す。本稿ではこれまでの TAFI の結晶構造解析の報告を中心に解説し⁴⁻⁶⁾、TAFI 酵素活性の発現や分子の不安定性など、血液中での活性制御メカニズムについても概説する。

日本大学大学院生物資源科学研究科栄養生理化学研究室

*責任者連絡先:

日本大学大学院生物資源科学研究科応用生命科学専攻

〒252-0880 神奈川県藤沢市亀井野 1866

Tel & Fax: 0466-84-3949

E-mail: tseki@brs.nihon-u.ac.jp

2. TAFI の分子構造

TAFI(E.C.3.4.17.20)は、膵プロカルボキシペプチダーゼ B1 (pancreatic pro-carboxypeptidase **B1**; proCPB1) のホモログ(アミノ酸配列相同性 42%)であり、血漿 proCPB2 や proCPR, proCPU の名称でも知られている。MEROPS database(<http://merops.sanger.ac.uk/>)において、CPA1 に代表される M14 メタロカルボキシペプチダーゼ(MCPs)ファミリーは、基本構造とその相同性に基づいてサブファミリーA, B に分類されている¹⁾。

TAFI は CPB1 と共にサブファミリーA に属している。サブファミリーA に分類される酵素は、N 末端に約 90 アミノ酸残基から構成される活性化ペプチドと約 300 アミノ酸残基から構成される触媒ドメインを有する zymogen として合成、分泌される。一方、サブファミリーB に属する酵素には活性化ペプチドは存在せず、恒常的に活性化している¹⁾。

TAFI は主に肝実質細胞や巨核球において 423 アミノ酸残基からなるプレプロ酵素として生合成され、シグナル配列が除去された後、401 アミノ酸残基のプロ酵素として循環血中に分泌される。全長の TAFI (56 kDa)は、活性化ペプチド(Phe¹-Arg⁹²; 20 kDa)と触媒ドメイン(Ala⁹³-Val⁴⁰¹; 36 kDa)の2つのドメインから構成されている。以下本文中のアミノ酸残基の番号は、N 末端 Phe¹ を基準とした番号で表記する。N 末端の活性化ペプチドはさらに2つの部位に分けられる。N 末端活性化ペプチドの最初の 1-76 残基(Phe¹-Val⁷⁶)は、4つのβシートと2つのαヘリックスが逆平行のα/β サンドイッチ構造を構築し、その部分に続く 77-92 残基のリンカー領域(Gln⁷⁷-Arg⁹²)は部分的にαヘリックス構造を形成している。トロンピンはリンカー領域の Arg⁹²-Ala⁹³ を加水分解して、活性化ペプチドを遊離させる。これにより触媒ドメインが露出し、基質との相互作用が可能な活性型 TAFI(TAFIa)となる。TAFIa の触媒ドメインは、9つのαヘリックスと8つのβシートとからなる MCPs に典型的なα/β-ヒドラーゼ構造を形成している。活性中心は、M14 MCPs ファミリーに特徴的な HXXE コンセンサス配列^{*1} からなり、His¹⁵⁹, Glu¹⁶², His²⁸⁸

が亜鉛イオンを配位している(図 1)⁴⁻⁶⁾。

TAFI の不安定性については以下の項目で詳しく述べるが、TAFI 分子中の 296-350 残基(5 番目のαヘリックスおよび7番目のβシートを含む領域)に存在する dynamic region が TAFI の不安定性に関与する重要な領域である^{7,8)}。また、TAFI には、5つの糖鎖結合可能部位が存在する。このうち Asn²², Asn⁵¹, Asn⁶³, Asn⁸⁶ は N-グリコシル化されているが、5番目の Asn²¹⁹ は、触媒ドメインの中に完全に埋没しており糖鎖修飾されていない⁴⁾。

Sabglas らの論文には、具体的なデータは示されていないものの TAFI がヘパリンセファロースに結合することが述べられている⁶⁾。これらの知見をもとに TAFI は、アンチトロンビン III, トロンビンで報告されているようなグリコサミノグリカンによる TAFI 活性の調節や TAFIa の不安定性に対するヘパリンの作用について推察している⁶⁾。また、Anand らもヘパリン結合部位の存在と活性制御について推察している⁵⁾。

3. TAFIa と TAFI zymogen のペプチダーゼ活性

TAFIa は、基質の C 末端に存在する Arg 残基あるいは Lys 残基を除去するペプチダーゼ活性を示す。血中においては、上述のようにフィブリン分子上の C 末端 Lys 残基を除去することにより、プラスミン(ノゲン)および tPA の分子内の Lys 結合部位を介したフィブリンへの結合を阻害し、線溶反応を抑制している。さらに、TAFIa はアナフィラトキシン C3a や C5a, プラジキニンの C 末端 Arg 残基を除去することで不活性化し、炎症反応を抑制する機能も有する¹⁻³⁾。

興味深いことに、TAFI は他の MCPs とは異なり、zymogen の状態でも低分子量の合成基質やペプチドに対して酵素活性を示す。これは、類似構造を持つ proCPB1 に存在する活性化ペプチドの Asp⁴¹ と触媒ドメインの Arg²³⁵ 間の塩橋^{*2} が存在しないことに起因すると考えられている。すなわち、proCPB1 とは異なり、生理的な状態においては TAFI の活性中心は塩橋によるタイトな分子構造を構築していない

*1 H は His を示すアミノ酸の一文字表記, E は Glu を示し, X は任意のアミノ酸を示す。すなわち-His-X-X-Glu-を意味する。

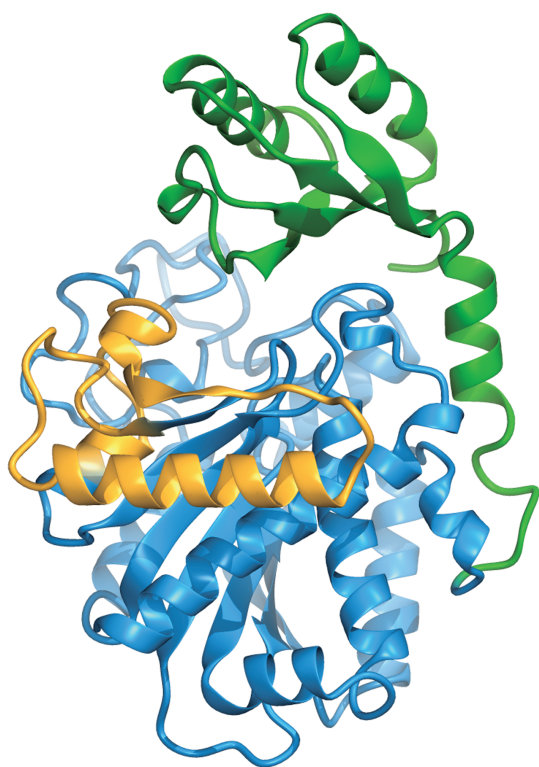


図1 ヒト TAFI の結晶構造⁴⁾

黄色は活性化ペプチド，緑色は dynamic region を示す。
PDB ID; 3D66, (URL: <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=3D66>) より転用。

ため低分子量の基質は活性中心にアクセスできることが考えられる⁴⁾。しかしながら，TAFI zymogen が有するペプチダーゼ活性の生理的な意義は不明である。

4. TAFI の不安定性と活性制御

TAFIa の半減期は 37°C で 8 分と非常に短い。とくに血中では迅速にトロンビンやプラスミンにより不活性型の TAFIai へと変換される。TAFI に対する特異的な活性阻害タンパク質は存在しないので，体内ではこの不安定性により活性が制御されていると考えられる^{7,8)}。TAFI の不安定性は以下の 2 つの構造的な特徴により説明されている⁴⁾。すなわち 1) 活性化ペプチドの放出により dynamic region の塩基性

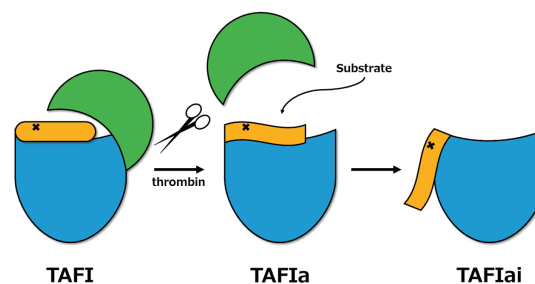


図2 TAFI のトロンビンによる活性化と TAFIa の不活性化メカニズム

TAFI zymogen において，活性化ペプチド(緑色)は dynamic region (黄色)を安定化させ，活性中心と基質との相互作用を妨げている。トロンビンにより活性化ペプチドが除去されると，dynamic region の可動性が増加し，基質は活性中心へとアクセスできるようになる。同時に dynamic region に不可逆的な構造変化が生じて触媒ドメインは崩壊する。また，この構造変化により図中黄色部分の×印がトロンビンによる分解を受けやすくなる(文献5より改変)。

アミノ酸残基(Arg³⁰², Lys³²⁷, Arg³³⁰)が分子表面へ露出すること^{4,5)}，2) TAFI の 144 番目のアミノ酸は，他のホモログとは異なる塩基性アミノ酸残基 Lys であり，それが分子表面に局在していることである⁶⁾。いずれにせよ，活性化ペプチドの放出に伴って，TAFI 自体のコンフォメーションが変化し，トロンビンやプラスミンの標的となる塩基性アミノ酸残基が分子表面に露出する可能性が考えられている(図2)。加えて，dynamic region には TAFI の基質特異性に関与する Asp³⁴⁸，TAFI の基質の C 末端の安定化に関与する Tyr³⁴¹ が存在する⁴⁾。Tyr³⁴¹ はすべてのカルボキシペプチダーゼで保存されているアミノ酸残基である。Tyr³⁴¹ は活性化ペプチドの Val³⁵ や Leu³⁹ と疎水的に相互作用しており⁴⁾，活性化ペプチドの放出が活性ドメインの立体構造そのものの崩壊につながることも考えられている⁷⁾。TAFIa の不安定性に関与すると考えられるアミノ酸残基を置換した変異体では，TAFIa の安定性が向上する。とくに dynamic region の複数のアミノ酸を置換した変異体では顕著に向上し，S305C-T325I-T329I-H333Y-H335Q の半減期は野生型の 180 倍にも延長した(表1)⁵⁾。

*² タンパク質分子中で，アルギニン，リシンなどの陽性荷電を有するアミノ酸残基と，アスパラギン酸，グルタミン酸などの陰性荷電を有する残基の間に働く弱いイオン性相互作用で，タンパク質の高次構造を安定化させる。

表1 ヒト TAFI 変異分子の安定性

Mutation	$t_{1/2}$	WT $t_{1/2}$	Mutant/WT
T325I	9.4–18 min	6.3–12 min	1.5–1.9
T325I-T329I	15 min	6.3 min	2.4
T325I-S305C	41 min	6.3 min	6.5
T325I-S305C-T329I	70 min	6.3 min	11.1
L354Q	16 min	12 min	1.3
K144N-H335Q	31 min	12 min	2.6
I239T-H335P	31 min	12 min	2.6
I158F-H335A	55 min	12 min	4.6
H333Y	47 min	12 min	3.9
K144N-H293R-S305C-H335P	4.4 h	0.2 h	22
S305C-S326N-H335Q	2.9 h	0.2 h	15
H333Y-H335Q	3.0 h	0.2 h	15
S305C-H333Y	4.3 h	0.2 h	22
T325I-H333Y-H335Q	3.5 h	0.2 h	18
S305C-H333Y-H335Q	26 h	0.2 h	130
S305C-T325I-T329I-H333Y-H335Q	19 h	0.1 h	181

$t_{1/2}$ (変異分子の半減期), WT $t_{1/2}$ は厳密に同一条件で測定され, Mutant/WT は変異による安定性の増加度を示している. 文献6のデータを参考に作成した.

5. 終わりに

TAFI は凝固と線溶の両者にリンクするユニークな線溶制御因子である. 本稿では TAFI の分子構造と機能について, とくにカルボキシペプチダーゼに特徴的な構造と TAFI の不安定性, TAFI zymogen の活性に焦点を当てて解説した. TAFI の生理機能に関しては, 紙面の都合上解説することができなかった. これらについては最近の優れた総説^{3,9)}や著者の総説¹⁰⁾をご参照いただければ幸いである.

著者全員の利益相反(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) Declerck PJ: Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor. *Hamostaseologie* **31**:165–166, 168–173, 2011.
- 2) Rijken DC, Lijnen HR: New insights into the molecular mechanisms of the fibrinolytic system. *J Thromb Haemost* **7**: 4–13, 2009.
- 3) Foley JH, Kim PY, Mutch NJ, Gils A: Insights into thrombin activatable fibrinolysis inhibitor function and regulation. *J*

Thromb Haemost **11** Suppl 1:306–315, 2013.

- 4) Marx PF, Brondijk TH, Plug T, Romijn RA, Hemrika W, Meijers JC, Huizinga EG: Crystal structures of TAFI elucidate the inactivation mechanism of activated TAFI: a novel mechanism for enzyme autoregulation. *Blood* **112**: 2803–2809, 2008.
- 5) Anand K, Pallares I, Valnickova Z, Christensen T, Vendrell J, Wendt KU, Schreuder HA, Enghild JJ, Avilés FX: The crystal structure of thrombin-activable fibrinolysis inhibitor (TAFI) provides the structural basis for its intrinsic activity and the short half-life of TAFIa. *J Biol Chem* **283**: 29416–29423, 2008.
- 6) Sanglas L, Valnickova Z, Arolas JL, Pallarés I, Guevara T, Solà M, Kristensen T, Enghild JJ, Avilés FX, Gomis-Rüth FX: Structure of activated thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor, a molecular link between coagulation and fibrinolysis. *Mol Cell* **31**: 598–606, 2008.
- 7) Sanglas L, Arolas JL, Valnickova Z, Avilés FX, Enghild JJ, Gomis-Rüth FX: Insights into the molecular inactivation mechanism of human activated thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor. *J Thromb Haemost* **8**: 1056–1065, 2010.
- 8) Gils A: Hot spots in TAFIa. *J Thromb Haemost* **8**: 1054–1055, 2010.
- 9) Morser J, Gabazza EC, Myles T, Leung LL: What has been learnt from the thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor-deficient mouse? *J Thromb Haemost* **8**: 868–876, 2010.
- 10) 関泰一郎, 三浦徳, 細野崇: メタロカルボキシペプチダーゼ TAFI の線溶抑制機能と病態生理. *血栓止血誌* **24**: 491–495, 2013.