

プロトロンビナーゼ複合体の立体構造と トロンビン産生の構造基盤

Structural basis of thrombin generation by prothrombinase complex



武田壮一

武田壮一*
Soichi TAKEDA

1991年 名古屋大学理学部生物
学科卒業
1996年 名古屋大学大学院理学
研究科生物学専攻博士課程満
期終了
1996年 松下電器産業(株)国際
研究所リサーチアシリエイト
1997年 博士(理学)取得
1998年 JSTさきがけ研究「形と
はたらき」領域研究員
2000年 理化学研究所播磨研究
所構造生物化学研究室研究員
2003年 国立循環器病研究セン
ター心臓生理機能部室長
現在に至る

Key words: thrombin, prothrombin, factor Xa, factor Va, prothrombinase complex

Points

- ①プロトロンビンはプロトロンビナーゼ(Xa 因子/Va 因子)複合体により, 2カ所のアルギニン残基 R271 および R320 のC末端側で切断を受け, トロンビンに転換される。
- ②プロトロンビンの結晶構造解析から, R320切断によりプロトロンビンから meizothrombin に転換される過程でプロテアーゼドメインと Kringle-2 ドメインとの相互作用が大きく変化することが明らかになった。
- ③オーストラリアに生息するブラウンスネークの毒腺液には溶液中で安定なプロトロンビナーゼ複合体 Pseutatin-C が含まれる。Pseutatin-C 前駆体(X 因子/V 因子複合体)の結晶構造が解明され, 活性化型プロトロンビナーゼ複合体の立体構造モデルが構築された。
- ④プロトロンビナーゼ複合体とプロトロンビンとの結合モデル, および meizothrombin との結合モデルが提案された。これらの結合モデルはプロトロンビナーゼによるプロトロンビンの逐次的な R320 および R271 での切断反応を説明する。

1. はじめに

血液凝固反応は, 逐次的な活性化プロテアーゼ凝

固因子によるプロテアーゼ前駆体凝固因子のタンパク質限定分解反応であり, この反応は凝固補助因子(コファクター)によって促進される。Xa 因子によるプロトロンビンのトロンビンへの変換は血小板膜リン脂質に結合した Va 因子によって 30 万倍以上も促進される。Xa 因子ははじめ血液凝固カスケード反応に関わる活性化プロテアーゼ分子群のアミノ酸配列や立体構造, 切断反応機構は広く理解が進んでいる。

*責任者連絡先:
国立循環器病研究センター研究所心臓生理機能部
〒565-8565 大阪府吹田市藤白台 5-7-1
Tel: 06-6833-5012, Fax: 06-6835-5416
E-mail: stakeda@ri.ncvc.go.jp

一方で、コファクターである VIIIa 因子や Va 因子がどのように IXa 因子, Xa 因子と複合体を形成し, 基質である X 因子やプロトロンビンを効率的に高い特異性をもって切断・活性化するか, その分子機構の詳細は実はよくわかっていない. その理由の一つとして, Xase (IXa 因子/VIIIa 因子) 複合体やプロトロンビナーゼ (Xa 因子/Va 因子) 複合体がリン脂質膜上でのみ形成され, 溶液中では安定な複合体形成がなされないために X 線結晶構造解析を行うことができず, 複合体の立体構造を得ることが難しいことが上げられる. プロトロンビンは Xa 因子により 2 カ所のアルギニン残基, R271 および R320 のそれぞれの C 末端側で切断を受け, 活性型のトロンビンに転換される¹⁾. この 2 カ所の切断は等価に行われず, 試験管内の反応では, ① Xa 因子のみでは R271 が優先的に切断を受けた後に (prethrombin-2 を経由して) R320 が切断されるが, ② 生理的な環境に近い状況 (Xa, Va 両因子, 人工的なリン脂質膜, カルシウムイオンの存在下) では, 逆に R320 が先に切断されて meizothrombin になった後に R271 が切断を受け, 活性のあるトロンビンが遊離される¹⁾ (図 1). 最近, プロトロンビンの結晶構造²⁾ と従来から知られていた様々な活性化中間体の結晶構造との比較によりプロトロンビンからトロンビンに転換される過程でプロテアーゼドメインに対して Kringle-2 (K2) の位置が大きく変わることが示された³⁾. 他方で, Va 因子についてはこれまで活性化プロテイン C (APC) により不活化された A2 ドメインを欠失した結晶構造が知られていたが⁴⁾, 蛇毒由来プロトロンビナーゼ複合体 Pseutarin-C 前駆体の結晶構造が解明され, Va 因子の全体構造と Xa 因子との結合様式が初めて原子レベルで明らかにされた⁵⁾. これら最近の構造生物学的知見からプロトロンビナーゼ複合体がどのようにプロトロンビンからトロンビンを産生するか, その分子機構の一端が明らかになりつつあるので, 本稿で紹介する.

2. プロトロンビンの結晶構造と R320 切断に伴う構造変化

2010 年に Prethrombin-1⁶⁾, 2013 年に Gla ドメインを除いたプロトロンビンの結晶構造が報告され²⁾, そ

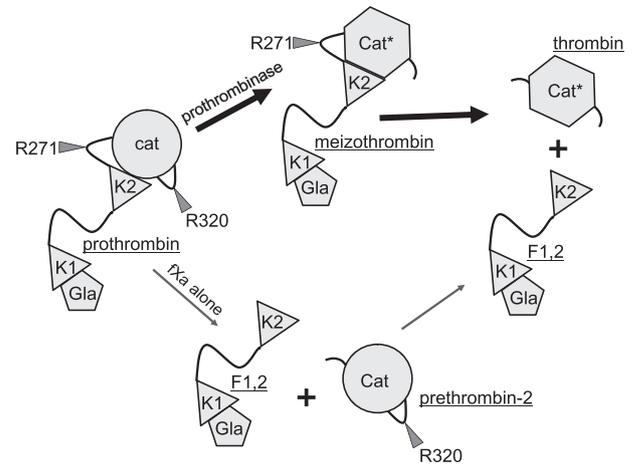


図 1 トロンビン産生経路の模式図

プロトロンビナーゼ複合体は R320, R271 の順に切断し, トロンビンを生成する. プロトロンビンは複合ドメイン構造を持ち, N 末端側から, Gla ドメイン, 二つの Kringle ドメイン (K1 および K2) それとプロテアーゼドメイン (cat) を持つ. R320 の切断はプロテアーゼドメインの活性化を伴う構造変化を引き起こす (cat* は活性化型のプロテアーゼドメインを示す). R271 の切断は F1.2 の遊離をもたらす. (文献 5 を参考にして作成)

の後 Gla ドメインを含む 2 種類のプロトロンビン変異体 ($\Delta 146-167$ および $\Delta 154-167$) 計 4 つの結晶構造が報告されている^{7,8)}. 変異体は F1 (Gla および Kringle-1 ドメイン) と K2 をつなぐリンカー部分の役割に着目した研究の一環で解析されたが, 本稿ではその内容には触れず, プロテアーゼドメインと K2 ドメインの構造について着目したい. プロトロンビンおよびトロンビンへの反応中間体でこれまで報告されたプロテアーゼドメインと K2 を含む結晶構造を分類すると, K2 のプロテアーゼドメインに対する位置関係の違いで大きく二つ (mode-1 および mode-2) に分類できることが明らかになった³⁾ (図 2). すなわち, K2 がペプチド鎖で繋がれ, R320 切断を受けていない構造は全てプロトロンビン型の mode-2, 一方で R320 切断を受けた構造は meizothrombin 型の mode-1 をとり, これらの結果は R320 切断に伴い K2 がプロテアーゼドメインに対して約 30 度動き, 二つの構造を遷移することを意味する. また, F1 と K2 のドメイン間は特定の安定な結合構造を取らず, フレキシブルなリンカーを介して多様な構造を取りうることが示された^{2,7,8)}. プロトロンビナーゼ複合体

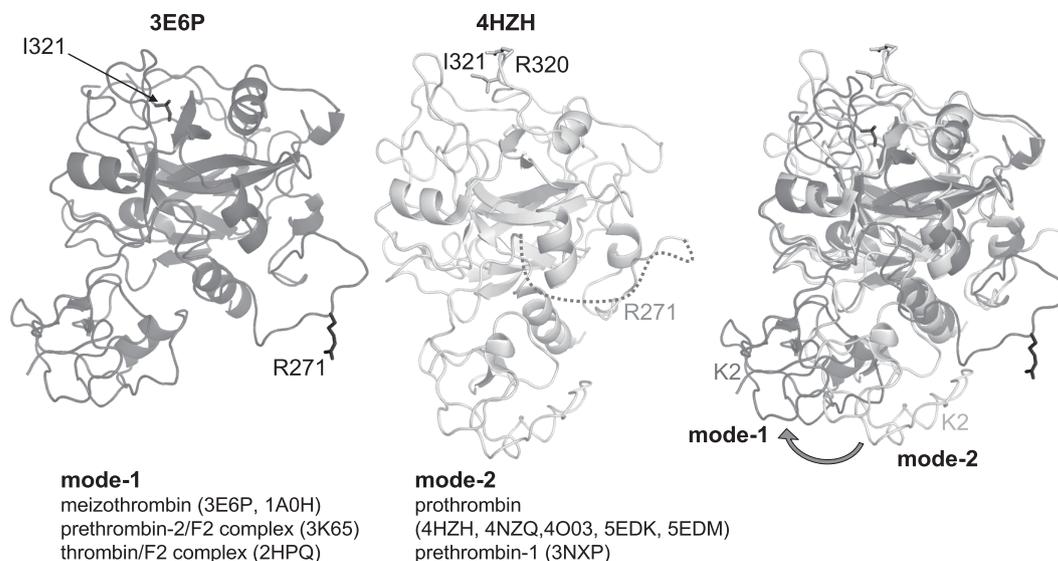


図2 Meizothrombin(左, PDB ID: 3E6P)とプロトロンビン(中央, PDB ID: 4HXH), およびそれぞれの結晶構造の触媒ドメイン部での重ね合わせ(右)

R320 切断に伴い, K2 ドメインが触媒ドメインに対して約 30 度回転するように動く(mode-1 から mode-2 へ変化). Meizothrombin 型(mode-1)およびプロトロンビン型(mode-2)の構造を持つ活性化中間体と解析された PDBID を示す. 結晶構造はそれぞれの PDB ファイルを基に Pymol で作成し, プロテアーゼドメインと K2 ドメインのみを表示している.

によるトロンビン産生メカニズムについて, 二つのモデルが提案されてきた. 一つは基質プロトロンビンが結合した後, R320 の切断に伴う構造変化により結合モードが変化する R271 の切断を行うラチェットモデル⁹⁾, このモデルではプロトロンビナーゼ自体の大きな構造変化は伴わない. もう一つはプロトロンビナーゼ側が二つの構造を遷移する ping-pong モデル¹⁰⁾. プロトロンビンの R320 切断による大きな構造変化はラチェット機構の存在を示唆する結果と言える.

3. 蛇毒 Pseutarin-C

オーストラリアに生息するコブラ科のブラウンスネーク(*Pseudonaja textilis*)は毒腺液にコブラ科蛇毒一般に含まれる神経毒成分に加え, 非常に強い血液凝固活性成分を併せ持ち, 咬まれた場合の致死率が世界で最も高い毒蛇の一つである. 毒にはプロトロンビナーゼ複合体(Pseutarin-C と命名)が含まれ¹¹⁾, 総蛋白質の 20~40% を占める. Pseutarin-C の各成分はヒトの X 因子および V 因子とそれぞれ 47.2% お

よび 57.8% (B ドメインを除く) の遺伝子配列同一性を示す. Pseutarin-C の Xa および Va 因子成分はヘビ自身が持つ血液凝固因子の遺伝子が, リン脂質膜を必要とせず, 溶液中でも強固な活性型の複合体として機能するように毒腺で重複・進化した産物である¹²⁾. この Pseutarin-C の安定な複合体形成能に着目し, 3.3 Å 分解能で X 線結晶構造解析が行われた⁵⁾. 詳細は割愛するが, 決定された構造は動物細胞に発現させた V 因子と, 大腸菌に発現しリフォールディング処理を行った X 因子とを試験管内で複合体形成させた前駆体型(プロテアーゼによる切断活性化を受けていない)Pseutarin-C である. 前駆体型 Pseutarin-C は低いながらプロトロンビナーゼ活性を有すること, V 因子成分は活性化されずとも強いコファクター活性を有することが確認されている. また, 活性化された Xa 因子成分と V 因子のペプチドの複合体の結晶構造決定も合わせて行い, 活性型 Xa でも前駆体 X 因子成分と同様な V 因子との結合様式を持つことが確認され, 一連の研究で Xa 因子と Va 因子の相互作用の主要な部分が明らかになった. 詳細は原著を参照頂くとして, ここでは結果のエッセンスの

み紹介したい。

4. Pseutarin-C の結晶構造とプロトロンビナーゼの膜結合モデル

図 3A は Pseutarin-C 前駆体の結晶構造をリボンモデルで各ドメインを色分けして示す。V 因子成分は 3 つの A ドメインと 2 つの C ドメインからなり、主鎖の繋がりには先に構造決定された VIII 因子の結晶構造^{13, 14)}と若干の C ドメインの位置のずれを除き、よく重ね合わせることができる。結晶化試料のコンストラクトには B ドメインが含まれるが、構造揺らぎが大きいため大部分は明瞭な電子密度を示さず、構造モデルには含まれていない。X 因子成分は EGF ドメイン 2 とプロテアーゼドメインを含み、Gla および EGF1 ドメインは元々のコンストラクトで除かれているためモデルには含まれない。結晶構造では X 因子は V 因子のちょうど A2 と A3 の境界部分に結合しており、X 因子プロテアーゼドメインの 170 ヘリックス(キモトリプシン配列で定義)は A2 ドメインと、EGF2 ドメインは A3 ドメインと主要な相互作用を形成している。Va 因子の A2 ドメインは APC による切断により遊離され Va 因子の不活化をもたらすが、結晶構造でみられる V 因子と X 因子の相互作用形態は APC による不活化をうまく説明する。A2 ドメインに続く酸性アミノ酸に富む a2 領域は V 因子本体部から突出して X 因子のヘパリン結合領域の近傍(トロンビンのエキソサイト II に相当)を包むように結合している。V 因子/X 因子間でみられる相互作用はこれまでの Va 因子/Xa 因子間でみられた様々な生化学的知見と矛盾せずよく合致する。さらに V 因子の a2 領域(663-680 アミノ酸残基)のペプチドと Xa(EGF2 およびプロテアーゼドメインを含む)の複合体の 2.7 Å 分解能での構造決定も同時になされている。Pseutarin-C 前駆体の X 因子(グレー)と別に解かれた Xa 因子成分(マゼンタ)を重ね合わせた図 3B をみると、V 因子との結合部には大きな構造変化がみられない。また先に述べたように Pseutarin-C の V 因子成分は B ドメインの切断を受けずとも Xa 因子成分と結合し、活性化した Va 因子と同等のプロトロンビナーゼを有することから、V 因子/X 因子間でみられる結合は Va 因子/Xa 因子間で

も保存されていると考えられる。これらの結晶構造を基に活性型プロトロンビナーゼの膜結合モデルが提案された。図 3B では Gla および EGF1 を模式的に示したが、原著では Xa 因子全体が含まれ、伸びた Xa 因子が Va 分子とほぼ平坦な分子構造を取るモデルが示されている。Xa 因子の各ドメインの配置に立体構造的な無理がなく、Gla ドメインの膜結合部は Va 因子の膜結合部と同一面上に配置できている。脂質膜に対しプロトロンビナーゼの平坦な面が垂直に配置すると仮定すると、Xa 因子触媒部および Va 因子の Cys540 は膜面からそれぞれ、60 Å および 90 Å の距離となり、それらの値は FRET 実験で求められた距離と一致する。図 3B 右のように平坦な Va 因子成分を真横から見ると Xa 因子触媒部は Va 因子と Xa 因子プロテアーゼドメインで形成される L 字の内側に位置し、正面上方を向く。この分子モデルを基にヒトの配列に置き換えたモデルも提案されている¹⁵⁾。

5. プロトロンビナーゼによるトロンビン産生の分子機構

プロトロンビナーゼの分子表面には多数の N 型糖鎖修飾部位が存在する。構造モデル上にそれらをマッピングすると、A1 および A2 ドメインの境界部と、揺らぎが大きく結晶構造に含まれない a1 周辺に糖鎖修飾部位のない比較的広い領域が存在し、上述した Xa 因子触媒部との接触に都合のよいことがわかった。したがって、プロトロンビンあるいは meizothrombin のプロテアーゼドメインと K2 ドメイン領域、すなわち prethrombin-1 (Pre-1) あるいは meizothrombin-desF1 部分は A1-a1-A2 領域に結合すると予想され、これらのドッキングモデルが提案された(図 4)。モデルでは F1 ドメインは Va 因子の C2 ドメインの近傍で膜に結合し、F1-F2 リンカー部は糖鎖修飾のない通路部を通り F2 ドメインに繋がっている。Va 因子上の予想される Pre-1 結合部は強い塩基性を示し、一方 Pre-1 はプロテアーゼドメインと K2 にまたがる分子表面の一面にのみ酸性残基の集中した領域があり、表面荷電の相補性を考慮して R320 を触媒部近傍に置いたプロトロンビンの結合モデルが構築された(図 4A)。上述したように R320

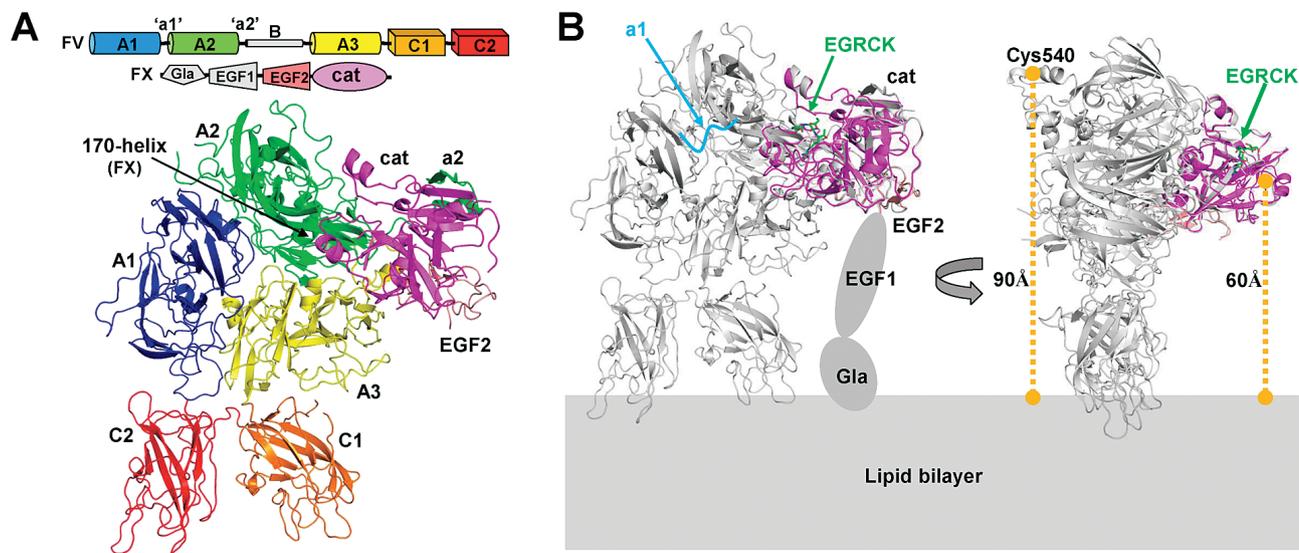


図3 Pseutarin-Cの結晶構造とプロトロンビナーゼ複合体の膜結合モデル

(A)前駆体型 Pseutarin-C のドメイン構造と結晶構造. 各ドメインを色分けして示す. 結晶構造に含まれない部分をグレーで示す. (B)Pseutarin-C 前駆体の結晶構造(薄いグレー)に活性化型 Xa 因子成分の結晶構造(PDB ID: 4BXW)の触媒ドメイン(マゼンタ)と EGF2(ピンク)および阻害剤 EGRCK(緑)を重ね合わせている. 結晶構造に含まれない EGF1 ドメイン, Gla ドメイン脂質二重膜を模式的に示している. 図は Pseutarin-C 前駆体の原子座標(PDB ID: 4BXS)を基に文献5を参考に Pymol で作成した.

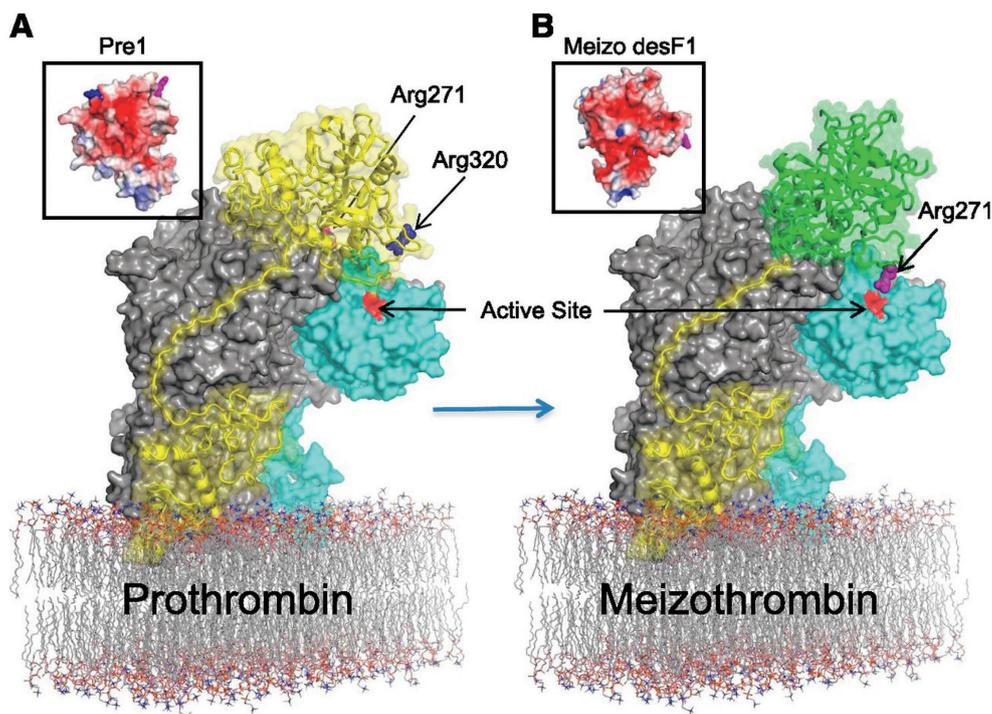


図4 プロトロンビナーゼ複合体によるプロトロンビンの連続切断メカニズムのモデル

(A)プロトロンビン結合モデル. Pseutarin-C の分子表面を, Va 因子成分をグレー, Xa 因子成分をシアンで, 触媒部を赤で示す. 結合したプロトロンビンを黄色で示す. モデルでは F1 部分(Gla および Kringle1 ドメイン)は C2 ドメインと結合し, Pre1 部分(触媒ドメインおよび K2 ドメイン)は切断を受ける R320 が Xa 因子の触媒部の近傍に位置している. (B)meizothrombin 結合モデル. R320 切断を受けた触媒部は K2 との相対位置を変え, その結果分子表面の形状および電荷分布が変化しプロトロンビナーゼとの結合様式を変え, R271 が Xa 触媒部の近傍に位置することで切断を受ける. (文献5より転載)

切断を受けて meizothrombin と変化すると K2 とプロテアーゼドメインの相互作用が変わることで分子表面に提示される酸性領域の形状等が大きく変化し、今度は R271 を触媒部に向けるようにプロトロンビナーゼに結合する(図 4B)。これにより活性化したトロンビンを切断遊離する。基質側の構造変化に伴い二つの結合様式を遷移することで、プロトロンビナーゼ側の大きな構造変化を必要とせず、逐次的な R320 および R271 の切断反応を説明できる。

6. おわりに

蛇毒由来であるが初めてプロトロンビナーゼ複合体の結晶構造が報告され、また時を同じくしてプロトロンビンの構造研究の進展があり、アミノ酸残基レベルで Va 因子と Xa 因子との相互作用、あるいはトロンビン産生のメカニズムを議論できるようになってきた。今後、得られた知見を基に、ヒトのプロトロンビナーゼ複合体や、プロトロンビナーゼとプロトロンビンあるいは meizothrombin との複合体の構造解析が行われること、あるいは立体構造を基にした変異体実験を重ねることで、トロンビン産生のより詳細なメカニズムが明らかになるであろう。

著者の利益相反(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) Krishnaswamy S: The transition of prothrombin to thrombin. *J Thromb Haemost* **11**, 265–276, 2013.
- 2) Pozzi N, Chen Z, Gohara DW, Niu W, Heyduk T, Di Cera E: Crystal structure of prothrombin reveals conformational flexibility and mechanism of activation. *J Biol Chem* **288**: 22734–22744, 2013.
- 3) Adams TE, Huntington JA: Structural transitions during prothrombin activation: On the importance of fragment 2. *Biochimie* **122**: 235–242, 2016.
- 4) Adams TE, Hockin MF, Mann KG, Everse SJ: The crystal structure of activated protein C-inactivated bovine factor Va: Implications for cofactor function. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 8918–8923, 2004.
- 5) Lechtenberg BC, Murray-Rust TA, Johnson DJ, Adams TE, Krishnaswamy S, Camire RM, Huntington JA: Crystal structure of the prothrombinase complex from the venom of *Pseudonaja textilis*. *Blood* **122**: 2777–2783, 2013.
- 6) Chen Z, Pelc LA, Di Cera E: Crystal structure of prethrombin-1. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**: 19278–19283, 2010.
- 7) Pozzi N, Chen Z, Pelc LA, Shropshire DB, Di Cera E: The linker connecting the two kringles plays a key role in prothrombin activation. *Proc Natl Acad Sci USA* **111**: 7630–7635, 2014.
- 8) Pozzi N, Chen Z, Di Cera E: How the linker connecting the two kringles influences activation and conformational plasticity of prothrombin. *J Biol Chem* **291**: 6071–6082, 2016.
- 9) Bianchini EP, Orcutt SJ, Panizzi P, Bock PE, Krishnaswamy S: Ratcheting of the substrate from the zymogen to proteinase conformations directs the sequential cleavage of prothrombin by prothrombinase. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 10099–10104, 2005.
- 10) Brufatto N, Nesheim ME: Analysis of the kinetics of prothrombin activation and evidence that two equilibrating forms of prothrombinase are involved in the process. *J Biol Chem* **278**: 6755–6764, 2003.
- 11) Rao VS, Kini RM: Pseutarin C, a prothrombin activator from *Pseudonaja textilis* venom: its structural and functional similarity to mammalian coagulation factor Xa-Va complex. *Thromb Haemost* **88**: 611–619, 2002.
- 12) Bos MH, Boltz M, St Pierre L, Masci PP, de Jersey J, Lavin MF, Camire RM: Venom factor V from the common brown snake escapes hemostatic regulation through procoagulant adaptations. *Blood* **114**: 686–692, 2009.
- 13) Ngo JCK, Huang M, Roth DA, Furie BC, Furie B: Crystal structure of human factor VIII: implications for the formation of the factor IXa-factor VIIIa complex. *Structure* **16**: 597–606, 2008.
- 14) Shen BW, Spiegel PC, Chang CH, Huh JW, Lee JS, Kim J, Kim YH, Stoddard BL: The tertiary structure and domain organization of coagulation factor VIII. *Blood* **111**: 1240–1247, 2008.
- 15) Pomowski A, Ustok FI, Huntington JA: Homology model of human prothrombinase based on the crystal structure of Pseutarin C. *Biol Chem* **395**: 1233–1241, 2014.