

トロンビンの機能モジュール

The functional modules on thrombin molecule



鈴木宏治

鈴木宏治*
Koji SUZUKI

Points

- ① トロンビンは生命の維持・進展に重要な基質タンパク質を限定分解するセリンプロテアーゼである。
- ② トロンビンは Na⁺ イオン依存性に機能を変換するアロステリック酵素である。
- ③ トロンビン分子の表面には基質タンパク質や機能調節因子、阻害因子と反応する機能モジュール (Exosite 1, Exosite 2, Hydrophobic pocket など) が存在する。
- ④ これらのモジュール構造を標的とする新しいトロンビン機能変換物質の開発が期待される。

1974年
大阪大学大学院薬学研究科博士課程修了
1977年
三重大学医学部臨床検査医学助手
1980年
スウェーデン・ルンド大学医学部臨床化学教室招聘教授
1989年
徳島大学酵素科学研究センター酵素細胞学部門教授
1991年
三重大学医学部分子病態学教授
2009年
三重大学理事(研究担当)・副学長
2011年
鈴鹿医療科学大学薬学部特任教授
鈴鹿医療科学大学社会連携研究センター長
現在に至る

日本血栓止血学会(顧問), 日本血液学会(名誉会員), 日本検査血液学会(名誉会員), 日本血管生物医学会(名誉会員)など

Key words: thrombin, functional modules, exosites, protein substrate, cofactors, antithrombin

1. はじめに

トロンビン(α -Thrombin: 分子量 35,600)は血漿蛋白のプロトロンビン(分子量 72,500)が陰性荷電リン脂質上で第Xa因子・第Va因子複合体(Prothrombinase complex)による限定分解を受けて生成される2本鎖(A鎖: 分子量 4,091 およびB鎖: 分子量 31,500)からなるトリプシン様セリンプロテアーゼである。生理的に重要な α トロンビンは自己消化を受けると低分子基質分解活性のみを持つ β トロンビン(β -Thrombin:

分子量 34,300)や γ トロンビン(γ -Thrombin: 分子量 31,100)に変換される。また、プロトロンビンから α トロンビンが生成される過程で一過性に高分子量トロンビンである Meizo-thrombin(分子量 72,500)が生成される。

α トロンビン(以下、トロンビン)は、表1に示すように、止血血栓の形成や創傷治癒だけでなく、生命の維持進展に重要な極めて多彩な生理機能を有する。一方、凝固亢進状態を来す病的状態下では、トロンビンは過剰に生成され、血栓塞栓症の最大の原因になる。また、トロンビンの慢性的な生成は動脈硬化や関節リウマチ、腎炎、肺線維症、神経細胞死などの多様な病態形成の原因になる。こうしたトロンビンの多彩な生理的、病理的作用の発現の背景には、(1)トロンビンは様々な組織や細胞で生成さ

*責任者連絡先:
鈴鹿医療科学大学薬学部薬学科
〒513-8670 三重県鈴鹿市南玉垣町 3500-3
Tel: 059-340-0597
E-mail: suzukiko@suzuka-u.ac.jp

表1 トロンビンの生理機能

| | |
|---|--|
| A | 血漿蛋白質の限定分解作用 |
| | 血液凝固系・凝固制御系・線溶制御系・補体系・肝増殖因子活性化因子の活性化 |
| | フィブリノゲン凝固 |
| | 凝固系第 II, V, VIII, XI, XIII 因子などの活性化 |
| | プロテイン C の活性化(トロンボモジュリン[TM]を介する凝固制御) |
| | TAFI 前駆体の活性化(TM を介する線溶制御, フィブリン血栓の保護) |
| | 補体系第 2 経路の活性化(C5 活性化) |
| | HGF-activator(HGFA)前駆体の活性化 |
| B | 細胞膜受容体の限定分解作用 |
| | 血小板の活性化 |
| | 粘着反応(接着因子発現) |
| | 放出反応(凝固因子, 増殖因子, Serpin, ATP, ADP, TXA2 などの放出) |
| | 凝集反応 |
| | 白血球(単球・マクロファージ, 好中球)の活性化 |
| | 組織因子産生 |
| | 接着因子産生・活性化 |
| | サイトカイン産生 |
| | 顆粒成分放出 |
| | 活性酸素産生 |
| | 血管内皮細胞の活性化・障害 |
| | 組織因子産生 |
| | TM の発現低下 |
| | von Willebrand factor(VWF)放出 |
| | プロスタサイクリン産生(HUVECs[+], 末梢静脈内皮[-]) |
| | PAF, PAI-1 産生(tPA 産生抑制) |
| | P-セレクチン, E-セレクチン, VCAM, ICAM などの産生 |
| | 細胞移動(末梢血管内皮細胞[+], 大静脈内皮細胞[-]) |
| | 細胞収縮(血管透過性の亢進) |
| | 細胞増殖・成長作用 |
| | 血管平滑筋細胞, 線維芽細胞, 神経芽細胞, 心房細胞など |
| | 細胞走化作用 |
| | 白血球, マクロファージ, 癌細胞など |
| | カルシウム代謝作用 |
| | 骨吸収促進(骨細胞) |
| | ホルモン様作用 |
| | 心房性 Na 利尿ペプチド(ANP)発現(心房細胞) |

れ, その場で必要な特異的な機能の発現に関与する, (2)各組織や細胞には種々の細胞膜プロテアーゼ受容体(protease-activated receptors: PAR-1, 3, 4)が存在し, その発現分布(割合)や発現量の違いが細胞の機能に影響を及ぼす^{1, 2)}, そして, (3)トロンビン分

子の表面には各々の基質蛋白や機能調節因子と特異的に反応する機能担当領域(modules モジュール)が存在し, トロンビンの様々な機能の発現に関与することが考えられる. 本稿では主に, トロンビンの多様な機能の発現に関わる分子上の特異的構造である

エクソサイト(exosites)などの機能モジュールについて解説する。

なお、本論文は拙者らの総説(鈴木宏治, 上村みどり: トロンビン. 血栓止血誌 10(2/3): 195~203, 1999)を改変したものである。

2. トロンビンの構造

トロンビンの立体構造としては、結晶化 D-Phe-Pro-Arg-chloromethylketone (PPACK)-トロンビン³⁾, ヒルジン誘導体(hirulog)結合トロンビン⁴⁾, トロンボモジュリン(TM)第5EGFドメインペプチド-トロンビン複合体⁵⁾, アルガトロバン(MD-805)-トロンビン複合体⁶⁾などの複数のX線結晶解析の構造が報告されている。これらのトロンビンの立体構造は微妙に異なっており、この理由は、トロンビンと反応物質の複合体が結晶化する際に反応物質の影響を受けてトロンビンが異なる立体構造をとるためと考えられる。そこで本稿では、反応物質と相互作用するトロンビン分子上のアミノ酸残基が最もよくみえるように、反応物質ごとに適したモデルを用いて示すことにした。

トロンビンはA鎖とB鎖の2本鎖からなり、PPACK-トロンビンのX線結晶構造(1.9 Å分解能)の解析結果から、A鎖とB鎖は独立したドメイン構造をとらず一体化しており、全体としては45×45×50 Å³のやや楕円形の球状構造となっている³⁾。

(1)A鎖: A鎖はB鎖とは1本のS-S結合と5個の水素結合で結ばれている。A鎖は複数のターン構造から構成され、B鎖の活性中心の真反対側の、ほぼキモトリプシン(ノーゲン)の活性化ペプチドの位置に存在する。A鎖はトロンビンの主な機能の発現には直接関与せず、プロトロンビンからトロンビンが生成される過程に必要な領域と考えられている。

(2)B鎖: これまでに知られているトロンビンの機能は全てB鎖が担っている。2次構造から眺めると、B鎖は基本的に6本のβ-ストランドがつくるバレル様構造(β-barrel)からなる2個のドメイン様構造に、5本のα-ヘリックス構造、1本のヘリックスターン構造および分子表面の複数のターン構造が加わって構成されている(図1-1)。

セリンプロテアーゼであるトロンビンの触媒活性

中心(Catalytic site)構造はトリプシンのそれと近似しているが、トロンビンの活性中心は分子表面に存在する裂け目様構造(Cleft)の内部に存在する。トロンビンとトリプシンの触媒活性の本質的な違いは、両プロテアーゼの立体構造と合成阻害薬に対する反応性の違いから、トリプシン活性中心のSer残基(S190)がトロンビンではAla残基(A200)になっているためと推測されている。

トロンビン分子内の種々のアミノ酸をAlaに置換した組換え変異蛋白の機能解析などから、トロンビンの多様な機能(基質選択性)の発現には、トロンビン分子表面上の機能担当領域(モジュール)の存在が重要と考えられている⁷⁻⁹⁾。主なモジュールとしては触媒活性中心と共に、下に示す幾つかの基質蛋白や機能調節因子(コファクター)との相互作用部位(Subsite)の存在が知られている^{10, 11)}。以下、トロンビンのアミノ酸残基はヒト・トロンビンB鎖の番号で示す(図1-2: CPKモデル)。

- (1) Catalytic triad: H43, D99, S205(赤色)
- (2) Exosite 1: R20, K21, R68, K70, R73, K77, K106, K107, K154(黄色)
- (3) Exosite 2: R89, R98, R123, R245, K247, K248, K252(緑色)
- (4) Active center pocket: D199, A200(桃色)
- (5) Hydrophobic pocket(60 loop): H43, Y47, W50, R93-L96, I179, W227(青色)
- (6) Loop 1: L45-N57(黄土色)
- (7) Loop 2: L144-G155(紫色)

トロンビンの酵素活性は、基質蛋白、機能調節因子、阻害物質等がトロンビン分子上の特異的な機能モジュールと水素結合、イオン結合、疎水結合、ファン・デル・ワールス結合などで相互作用することによって発現される。これまでに解析されたトロンビン分子上の機能モジュール、すなわち2種の陰イオン結合部位(anion-binding site)であるExosite 1とExosite 2, Hydrophobic pocket(60 loop)およびLoop 2領域と相互作用する物質には以下のものが推定されている¹¹⁾。

- A. Exosite 1とその周辺に結合する凝固関連分子
 フィブリノゲン Aα鎖
 第V因子

- 第 VIII 因子
 第 XI 因子
 ヘパリンコファクターII(HCII)の N 末端領域
 Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI)
 プロテアーゼ活性化受容体(PARs)
 TM の第 5EGF ドメイン
 血小板膜糖蛋白 GPI α 鎖
 ヒルジン C 末端領域
 活性阻害 DNA aptamer
- B. Exosite 1 と反発する凝固関連分子
 プロテイン C
- C. Exosite 2 とその周辺に結合する凝固関連分子
 高分子量ヘパリン(AT によるトロンビン阻害を促進するヘパリン)
 ポリリン酸(トロンビン依存性の第 XI 因子活性化促進物質)
 プロトロンビン-フラグメント 2
 GPIb α 鎖(トロンビン依存性の第 XI 因子活性化促進物質)
 活性阻害 DNA aptamer
- D. Hydrophobic pocket(活性中心周辺の 60 loop) に結合する凝固関連因子
 フィブリノゲン
 プロテイン C
 第 XIII 因子
 アンチトロンビン
 プロテイン C インヒビター
 ヒルジン N 末端領域
- E. Loop 2 領域に結合する凝固関連分子
 フィブリノペプチド A
 第 V 因子
 ヒルジン

3. トロンビンの各モジュールと機能の関係

前述のようにトロンビン分子上の Exosite 1 や Exosite 2 はトロンビンの基質蛋白や機能調節因子の結合に関わる重要なモジュールである。実際に、トロンビンの自己消化やトリプシン処理で生成される β トロンビンは、B 鎖の Exosite 1 領域の R73-N74 結合が切断されたものであり、Exosite 1 と相互作用する全ての基質蛋白や機能調節因子に対する親和性が

低下している。また、Loop 2 領域の K154-G155 結合の切断によって生じる γ トロンビンではこの領域に結合する分子に対する親和性が低下している。

一方、Exosite 1 や Exosite 2 の他にもトロンビンの特異的機能の発現に関与するモジュール(Hydrophobic pocket)が存在する。この領域の種々のアミノ酸残基を Ala に置換した組換え変異トロンビンを用いた解析により、トロンビン基質のフィブリノゲン、第 XIII 因子、プロテイン C、TAFI の反応性が低下し、また、機能調節分子の TM やヘパリンに対する反応性も変化し、さらにヘパリンの有無に関わらずアンチトロンビン(AT)によるトロンビン阻害活性も低下するなど、この領域は種々の基質蛋白や機能調節因子、阻害因子との相互作用に重要と考えられている。⁸⁻¹²⁾

以下に、基質蛋白や機能調節因子、阻害物質などと相互作用するトロンビン分子(Connolly surface モデル[半径 1.4 Å の水分子が接触する分子表面を表すモデル])上のアミノ酸残基について、ヒト・トロンビン B 鎖の残基で示す。なお、活性中心(Catalytic triad アミノ酸残基)は赤色で示す。

1) Na⁺ イオンの結合によるトロンビンのアロステリック変化

トロンビンはアロステリック酵素であり、トロンビンの E229, D232, D234 残基に Na⁺ イオンが結合した分子型(fast structure)では、活性中心周辺のアロステリックコア構造(Allosteric core)と Exosite 1 の W50, E25, E202 残基の立体構造が変化し、Exosite 1 にフィブリノゲンや第 V 因子、PAR-1 などが結合して、凝固反応が促進される。逆に Na⁺ イオンが解離した分子型(slow structure)になると、トロンビンは Exosite 1 を介して TM が結合し、凝固制御因子として機能する^{12,13)}。

2) フィブリノゲンの結合部位

トロンビンの Exosite 1 のアミノ酸残基(K65, H66, R68, R70, Y71, R73, K77)および Hydrophobic pocket のアミノ酸残基(W50, K52, N53, T55)を Ala に置換した組換えトロンビンはフィブリノゲン活性化能が著しく低下したことから、フィブリノゲンは Exosite 1 および近傍の Hydrophobic pocket の複数のアミノ酸残基に直接結合するものと推測される(図 2)^{7,8)}。

3) 第 XI 因子の結合部位

トロンビンは第 XI 因子を活性化して内因系凝固系にポジティブフィードバックをかける。このトロンビンによる第 XI 因子活性化は、血小板由来のポリリン酸のような陰性荷電リン脂質や血小板膜の GPIb α 存在下に促進される。トロンビンの Exosite 1 のアミノ酸残基 (R68, R70, R73) と Exosite 2 のアミノ酸残基 (R98, R245, K248) を Ala に置換した組換え変異トロンビンでは、陰性荷電リン脂質や GPIb α 存在下の第 XI 因子の活性化能が著しく低下した。Exosite 1 のアミノ酸のみを変換したトロンビンに陰性荷電リン脂質と GPIb α は結合したが、第 XI 因子は結合しなかった。また、Exosite 2 のアミノ酸のみを変換したトロンビンには第 XI 因子は結合したが、陰性荷電リン脂質と GPIb α は結合しなかった。これらの結果から、トロンビンの Exosite 1 に結合した第 XI 因子は、Exosite 2 に結合した陰性荷電リン脂質や GPIb α と複合体を形成することで効率よく活性化されると推測される¹⁴⁾。

4) 第 XIII 因子の結合部位

Na⁺ イオン結合トロンビンは第 XIII 因子を活性化し、安定化フィブリンの生成に参与する。このトロンビンによる第 XIII 因子の活性化において、Hydrophobic pocket とその周辺のアミノ酸残基 (W50, R178, R180, D183, E229, R233) を Ala に置換した組換えトロンビンは第 XIII 因子活性化能が著しく低下した。また、Exosite 1 のアミノ酸 (H66, Y71, N74) を Ala に置換した組換えトロンビンでは第 XIII 因子の活性化を促進するフィブリンの効果が低下した。これらの結果から、トロンビンは Exosite 1 に結合したフィブリンによって立体構造が変化し、Hydrophobic pocket に結合した第 XIII 因子を効率よく活性化すると推定される¹⁵⁾。

5) TM の結合部位

TM はトロンビンの機能を凝固促進因子から凝固阻害因子に変換する機能調節物質である。TM は Na⁺ イオン解離型トロンビンに結合して、アロステリック変化を惹起し、抗凝固因子のプロテイン C (PC) を活性化する。この反応において、Exosite 1 およびその周辺のアミノ酸残基 (K21, Q24, K62, K65, R68, T69, R70, W71, R73, K77, K106) を Ala に置換した組換えトロンビンは、TM 存在下の

PC 活性化能が著しく低下した。この結果から、TM はトロンビンの Exosite 1 およびその周辺に結合すると考えられた^{10, 16)}。その後、TM の第 5EGF ドメインペプチドとトロンビンの複合体の X 線結晶構造の解析からこのことが実証された⁵⁾ (図 3: このモデルでは TM の第 5EGF ドメインペプチドを Exosite 1 領域に配位し、また、E25 と E202 残基を赤紫色で示してある)。

6) PC の結合部位

PC は TM の EGF4 ドメインに結合し、TM 結合トロンビンによって活性化ペプチドが限定分解されて活性化される。トロンビンの Hydrophobic pocket と周辺のアミノ酸残基 (W50, R178, R180, D183, D193, K196, E229, R233) を Ala に置換した組換えトロンビンは、TM の有無に関わらず PC 活性化能が著しく低下したことから、TM に結合した PC は TM 結合トロンビンの Hydrophobic pocket に結合して効率よく活性化されると考えられた^{10, 16, 17)}。一方、PC は Na⁺ 結合トロンビンではほとんど活性化されない。この理由は、PC の活性化ペプチド C 末端 (P5'-P9': K-M-T-R-R) が Na⁺ 結合型トロンビンの Exosite 1 と反発している、すなわち、PC 活性化ペプチドの P3 部位 (D167) と P3' 部位 (D172) が Na⁺ 結合型トロンビンの E25 と E202 のそれぞれと電気的に反発しているためと考えられている。これに対して、TM が結合したトロンビンではその立体構造が変化して、PC とトロンビン Exosite 1 の間の反発は消失し、PC はトロンビンと強く相互作用して効率よく活性化されると推定されている (図 3)^{11, 18)}。

7) TAFI 前駆体の結合部位

TAFI 前駆体 (=procarboxypeptidase B) は TM 結合トロンビンによって活性化される。活性化 TAFI はフィブリン C 末端の Lys 残基を除去して、線溶系酵素の t-PA やプラスミノゲンの結合を阻止し、フィブリン血栓を保護する。また、活性化 TAFI は補体系因子の C5a を不活化して炎症反応を阻害する。TM 結合トロンビンによる TAFI 前駆体の活性化において、TAFI 前駆体は TM の EGF3 から EGF6 ドメインの領域に結合して TM 結合トロンビンの限定分解を受ける。この反応で、トロンビンの Exosite 1 周辺のアミノ酸残基 (E25, D51, R89, E94, R97) を Ala に置換した組換えトロンビンは、PC 活性化能には影響を与

えず、TAFI 前駆体活性化能のみが低下した。TM に結合した TAFI 前駆体は、トロンビン上の TM 結合部位 (Exosite 1) とは異なる Exosite 1 周辺領域に結合して効率よく活性化されると考えられる^{10, 11, 16)}。

8) ヘパリンと AT の結合部位

ヘパリンは AT に結合して、AT の反応部位の立体構造を変え、トロンビンや第 Xa 因子の活性中心との結合を促進する。高分子量ヘパリンはトロンビンにも結合し、AT とトロンビンの反応速度を著しく高める。この高分子量ヘパリンのトロンビンへの結合において、トロンビンの Exosite 2 のアミノ酸残基 (R89, R93, E94, R98, R245, K248, K252-D255-Q256) を Ala に置換した組換え変異トロンビンへの結合能が低下した。また、AT によるトロンビン阻害は、Hydrophobic pocket のアミノ酸残基 (W50, E229, R233) を Ala に置換したトロンビンでは低下した。このことから、高分子量ヘパリンはトロンビンの Exosite 2 に、AT はトロンビンの Hydrophobic pocket に結合すると推定された^{9, 11)}。また、Exosite 2 への高分子量ヘパリンの結合はトロンビン活性中心の立体構造を変えると共に、Exosite 1 へのトロンビン基質蛋白の結合能も低下させることが示唆された。トロンビン上のヘパリン結合部位を緑色で、AT reactive loop (反応部位) に結合する残基を赤紫色で示す (図 4)。

9) ポリリン酸の結合部位

内因系凝固系の増幅機構の一つであるトロンビンによる第 XI 因子の活性化は、活性化血小板や微生物に由来するポリリン酸によって著しく促進される。陰性荷電を有するポリリン酸はトロンビン上の (高分子量ヘパリン結合部位と部分的に重なる) Exosite 2 に結合して ($K_d \div 5 \text{ nM}$)、トロンビンと第 XI 因子を連結し、トロンビンによる第 XI 因子の限定分解反応を促進する^{19, 20)}。

10) プロテイン C インヒビター (PCI) の結合部位

PCI は活性化 PC (APC) の阻害因子として発見されたが、高分子量ヘパリンの存在下にトロンビンも阻害する。PCI によるトロンビンの阻害にはトロンビンへの Na^+ イオンの結合と Exosite 2 へのヘパリンの結合が重要である。一方、凝固制御系の重要なプロテアーゼである APC および TM-トロンビン複合体は、AT では阻害されず、PCI のみによって阻害され

る。PCI による TM-トロンビン複合体の阻害にはトロンビンの Exosite 1 領域 (R62, K65, Y71) への TM の結合が不可欠である。トロンビンと PCI 複合体の X 線結晶構造 (1.6 Å) の解析から、PCI の反応部位はトロンビン活性中心に直接結合すると共に、TM の結合によって活性中心外縁に出現した Hydrophobic pocket (60-loop) 構造にも結合し、また、Exosite 2 に結合したヘパリンが両分子間を連結することが判明した²¹⁻²³⁾。

11) ヒルジン結合部位

ヒルジンはトロンビンと全ての基質蛋白との相互作用を阻害する。トロンビンとヒルジン複合体の X 線結晶構造の解析から、ヒルジンはトロンビンの活性中心が存在する裂け目様構造 (Cleft) の内部に沿って結合し、その N 末端領域はトロンビンの活性中心 (H43 と S205) とその近傍 (Y47, W50, L96, E146, C201, E202, S226, G228, E229, G230, C231, R233, R236) に結合し (濃青色で示す)、また、長く伸びた C 末端側領域は Exosite 1 を含む広範な領域のアミノ酸残基 (F19, K21, K52, L60, R62, R68, T69, R70, Y71, R73, I78, W92) に結合する (黄土色で示す) ことが示唆された (図 5)^{4, 11)}。

12) PARs の結合部位

PAR-1, PAR-3, PAR-4 の細胞外領域には、ヒルジン C 末端領域のアミノ酸配列 (F56-E57-E58-I59-P60-Y63) と近似の配列 (mouse (m) PAR-1 : F-E-L-V-P-L, mPAR-3 : F-E-E-F-P-L, mPAR-4 : L-E-L-P-A-S) が存在する²⁾。このことから、PARs は F56-Y63 領域でトロンビン分子上のヒルジン C 末端領域結合部位 (Exosite 1) に結合すると推定されている。図 6 は、X 線結晶構造解析で明らかにされた、Exosite 1 からトロンビン活性中心が存在する Cleft の領域にかけて結合する未分解型 PAR-1 の N 末端側配列の結合状態を示す²⁴⁾。

13) DNA aptamer の結合部位

トロンビン活性を阻害する特定の塩基配列を有する DNA aptamer が複数報告されている。この DNA aptamer の活性はトロンビンの Exosite 1 のアミノ酸残基 (R75 など) を Ala に置換することで消失した。また、Exosite 2 に結合して抗凝固活性を示すものや、さらに Exosite 1 に結合して種々の陽性金属イオンの影響を受け活性が変化するものなど、トロンビン阻

害 DNA aptamer は新しい抗凝固薬としての可能性が追求されている^{11, 25, 26)}.

4. プロトロンビンの活性化に伴うトロンビン機能モジュールの出現

プロトロンビンの触媒ドメインには Exosite 1 や Exosite 2 はみられない。トロンビン上の機能モジュールである Exosite 1 や Exosite 2, また Na⁺ イオン結合部位/Exosite 1/トロンビン活性中心とその周辺領域の連鎖的構造変化は、プロトロンビンの活性化に伴って出現する¹¹⁾。プロトロンビンの活性化過程では、**図 7** に示すように、十分量の第 Va 因子が存在する場合は、陰性荷電リン脂質上で最初に第 Xa 因子/第 Va 因子複合体により、プロトロンビンの R320 が切断されて酵素活性を示す Meizo-thrombin (MzT) が生成され、続いて MzT (または第 Xa 因子) によって触媒ドメインとフラグメント 2 (F2) ドメインの間の R271 が切断されて遊離型トロンビンとフラグメント 1+2 (F1.2) が生成される。これに対して、第 Va 因子が無いあるいは十分量存在しない場合は、活性化反応は非常に緩やかに進み、最初に第 Xa 因子によって R271 が切断されて酵素活性の無いプレトロンビン 2 (Pre2) と F1.2 の非共有結合による Pre2/F1.2 複合体が形成され、続いて Pre2 の R320 が第 Xa 因子によって切断されて遊離型トロンビンが生成される。他方、反応過程で生成されたトロンビンはプロトロンビンの R155 を切断してフラグメント 1 (F1) と酵素活性の無いプレトロンビン 1 (prethrombin 1: Pre1) を生成する。Pre1 は陰性荷電リン脂質に結合できないが、第 Xa 因子/第 Va 因子複合体により R320 が切断された場合は desF1-MzT が、R271 が切断された場合は Pre2・F2 複合体が生成される。引き続き、desF1-MzT と Pre2/F2 複合体は遊離型トロンビンと F2 に変換される。

こうしたプロトロンビンの活性化に伴い出現する Exosite 1, Exosite 2, Na⁺ イオン結合部位などはどの段階で出現するのか、Exosite 1 領域あるいは Exosite 2 領域を特異的に結合する抗体やペプチドを用いて詳細に解析された。その結果、Exosite 1 は R320 の切断に伴って出現することが判明した。一方、Exosite 2 領域はプロトロンビンの F2 ドメインで

遮蔽されているため、触媒ドメインから F2 ドメインが乖離する R271 の切断によって出現することが示唆された。さらに Exosite 1 の機能発現に重要な触媒ドメインの Na⁺ イオン結合部位は R320 の切断によって出現することが証明された。したがって、R320 の切断で生じる MzT にはトロンビンと同様に、Exosite 1 と Na⁺ イオン結合部位が出現しており、基質蛋白 (第 Va 因子, 第 VIIIa 因子, PC, TAFI) や機能調節因子 (TM) との相互作用が可能になるものと推定された。実際に、TM 存在下の MzT による PC や TAFI の活性化能は遊離型トロンビンよりも 6 倍ほど高いと報告されている。他方、R271 の切断によって出現する Exosite 2 に結合すると推定されるヘパリンやポリリン酸, GPIIb/IIIa などが関与する生理的・病的機能は遊離型トロンビンに対してのみ作用することが示唆され、実際に高分子量ヘパリン依存性の AT の作用は遊離型トロンビンに対してのみみられ、MzT ではみられない。

5. 機能修飾型トロンビン

トロンビン上のアミノ酸残基を他のアミノ酸で置換することによって、新たな機能が付与される。フィブリノペプチド A との相互作用部位の一つ (B 鎖の E229) を Ala に置換したトロンビンでは血液凝固活性が低下し、相対的に PC 活性化能が高くなるトロンビン誘導体が生成されると報告されている (野生型トロンビンに比較して、フィブリノゲン親和性は 2.5%, 血小板凝集活性は 1.3%, PAR-1 活性化能は 14.6% と著しく低下し、細胞膜 TM への親和性は 88%, 可溶性 TM 親和性は 161%, PC 親和性は 47.5% に変化した²⁷⁾)。E229 は既述の Na⁺ 結合部位 (D232-D234) に極めて近い場所に位置することから、E229A 変換はトロンビンを Na⁺ 解離状態に留めるのではないかと推定されている。

アミノ酸変異により PC 活性化能を高めたメイゾトロンビン (MzT) も検討されている²⁸⁾。Na⁺ イオン結合アミノ酸を Ala や Leu に置換した変異型 MzT や Na⁺ イオン結合部位と相互作用するループ 2 領域を除去した変異型 MzT では、フィブリノゲン凝固活性は著しく低下したが、PC 活性化能は 10 倍以上高まった。

一方、トロンビンのフィブリノゲン分解活性を阻害し、PC活性化能を高める低分子化合物(LY254603)が同定されている²⁹⁾。この物質はトロンビンの基質認識部位(S3)に結合し、PC活性化ペプチド領域のP3部位との親和性を高めるものと推定されている(トロンビンB鎖のE25とE202残基はそれぞれPC活性化ペプチド領域のD167(P3部位)とD172(P3'部位)と反発しているが、トロンビンのTMへの結合によってこの反発は消失するが、LY254603はそれらの反発を弱める作用があるものと推察されている)。

6. 合成トロンビン阻害薬の作用部位

合成トロンビン阻害薬は凝固亢進状態で生じる血栓症の治療薬として非常に重要である。天然の阻害薬であるATと異なり、その作用部位はトロンビン活性中心とその周辺部位に結合してすべての天然基質の分解を阻害する。ここでは広く臨床応用されている2つの合成阻害薬の作用部位について概説する。

(A)アルガトロバン Argatroban: 慢性動脈閉塞症における四肢潰瘍、安静時疼痛や冷感の改善、また、ヘパリン惹起性血栓塞栓症の治療薬として用いられるトロンビン阻害薬のアルガトロバンは、キノリン環、ピペリジン環およびアルギニンからなる構造である((2R,4R)-4-methyl-1-[Na-(RS)-3-methyl-1,2,3,4-tetrahydro-8-quinolonesulphonyl]-L-arginyl]-2-piperidine carboxylic acid)。高い選択性でトロンビン活性中心とその近傍に結合し、酵素活性をほぼ完全に阻害する⁶⁾。この阻害反応で、キノリン環はトロンビンB鎖のW227と疎水結合し、ピペリジン環はY47とW50に囲まれた窪みに入り込み、アルギニン側鎖は主鎖のC=OとNH基がG228と水素結合し、伸びた側鎖は少し離れたD199と水素結合すると推定されている(図8-1)。

(B)ダビガトラン Dabigatran: 非弁膜症性心房細動による脳血栓塞栓症の予防に用いられる直接トロンビン阻害薬のダビガトランは、プロピオン酸、ピリジン、ベンジミダゾール、ベンザミジンが連結された構造である(3-(2-[(4-Carbamimidoyl-phenylamino)methyl]-1-methyl-1H-benzoimidazole-5-carbonyl)pyridin-2-yl-amino)-propionic Acid)。この薬剤の主成分はプロピオン酸基にメチル基が、またベンザミジン基

にエテキシレート基が結合した構造であり(ダビガトランエテキシレート Dabigatran etexilate: Ethyl 3-([2-([4-(amino [(hexyloxy) carbonyl] imino) methyl] phenyl] amino) methyl)-1-methyl-1H-benzoimidazol-5-yl] carbonyl) (pyridin-2-yl) amino) propanoate)、不活性化されたプロドラッグである。経口摂取され消化器官から体内に吸収されたプロドラッグは血中および肝臓のエステラーゼによってメチル基とエテキシレート基が加水分解で除去されて活性型に変換される。活性型のダビガトランは、ベンジミダゾールリングがトロンビンの活性中心近位(P-pocket)に、ピリジンリングとプロピオン酸基が活性中心から離れた遠位部位(D-pocket)に、そしてベンザミジン基が Hydrophobic pocket に結合してトロンビンを選択的かつ強力に阻害する(図8-2)³⁰⁾。

7. トロンビン以外の凝固系プロテアーゼの機能モジュール

トロンビン以外の凝固系プロテアーゼの第Xa因子、第IXa因子、第VIIa因子、APCのプロテアーゼドメインにもトロンビンのExosite 1やExosite 2のアミノ酸配列とは異なるが、似た役割をもつ機能モジュールが存在し、基質蛋白の分解や機能調節因子による活性の制御に重要な役割を果たしている^{11,31)}。これらのプロテアーゼの機能発現には、トロンビンにおけるNa⁺イオンの結合と異なり、Ca²⁺イオンの結合が重要である。

第Xa因子においては、Exosite 2様構造に第Va因子が結合し、プロトロンビン活性化酵素複合体(Prothrombinase complex)の形成に重要や役割を果たす。また、第IXa因子のExosite 2様構造には第VIIIa因子が結合し、第X因子活性化酵素複合体(Tenase complex)の形成に重要や役割を果たす。さらに、第Xa因子と第IXa因子のExosite 2様構造は、ATによる阻害反応を促進するヘパリンの結合部位にもなる。

一方、第VIIa因子ではExosite 1様構造に基質蛋白の第X因子が結合する。また、第VIIa因子による第X因子の活性化を促進する組織因子(TF)は第VIIa因子のExosite 2様構造(R277, M306, D309)に結合すると推定されている。

他方、APCはそのExosite 1様構造で第Va因子を

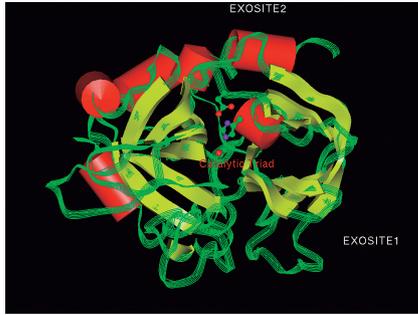


図 1-1 2次構造からみたトロンビン分子
 α -ヘリックス構造(赤色円筒)と β -シート構造(黄色リボン)は複数のターン構造およびループ構造(緑色)で結ばれている。活性中心となる His-Arg-Ser 残基を中央に示す。トロンビンの基質蛋白や機能調節因子が反応する分子表面のアミノ酸残基は主に緩やかなターン構造やループ構造の上に存在する(PDB ID: 1ABJ による)。

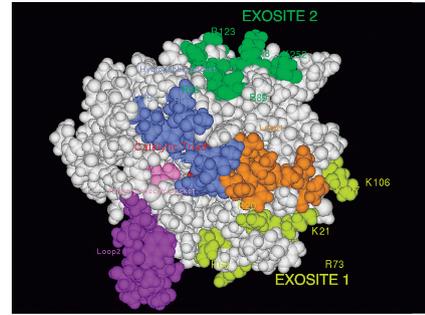


図 1-2 トロンビン分子上の機能モジュール(CPK モデル, PDB ID: 1DWC による)
 (1)Catalytic triad: 赤色 (2)Anion-binding exosite 1: 黄色 (3) Anion-binding exosite 2: 緑色 (4)Active center pocket: 桃色 (5)Hydrophobic pocket: 青色 (6)Loop 1: 黄土色 (7)Loop 2: 紫色

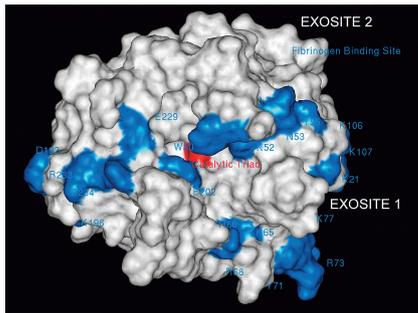


図 2 トロンビン分子上のフィブリノゲン結合アミノ酸残基(青色)
 フィブリノゲンはトロンビンの Exosite 1 および活性中心周辺のアミノ酸残基に結合する(Connolly モデル, PDB ID: 1ABJ による)。

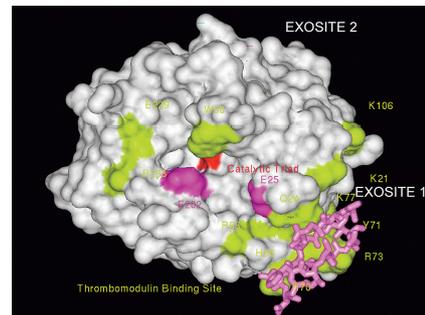


図 3 トロンビン分子上の TM 結合アミノ酸残基(黄色)
 TM はトロンビンの Exosite 1 および活性中心周辺のトロンビンのアミノ酸残基に結合する。図では TM の第 5EGF ドメインペプチド(桃色スティックモデル)の Exosite 1 への結合モデルを示す⁵⁾。プロテイン C 活性化ペプチドの D167 と D172 の各々は Na⁺ 結合型トロンビンの E25 と E202 残基(赤紫色)と反発しているが, TM がトロンビンに結合するとそれぞれの反発は消失する。(Connolly モデル, PDB ID: 1HLT による)。

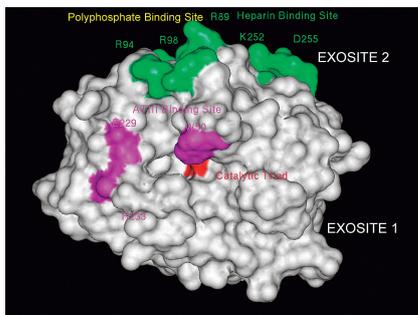


図 4 トロンビン分子上のヘパリン結合アミノ酸残基(緑色)とアンチトロンビン結合アミノ酸残基(赤紫色)
 高分子量ヘパリンはアンチトロンビンの反応部位を活性化すると共にトロンビンの Exosite 2 に結合して, アンチトロンビンの反応部位とトロンビンの活性中心の間のアシル結合形成反応を促進する。ポリリン酸はヘパリン結合部位と部分的に重なる Exosite 2 のアミノ酸残基に結合する(Connolly モデル, PDB ID: 1HLT による)。

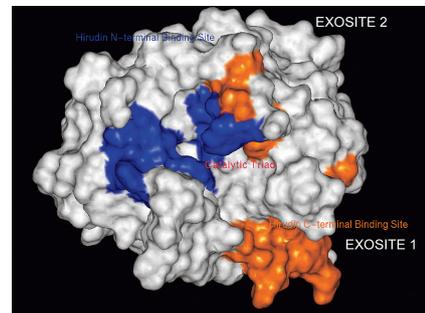


図 5 トロンビン分子上のヒルジン結合アミノ酸残基(Connolly モデル, PDB ID: 1ABJ による)
 ヒルジンの N 末端領域はトロンビンの活性中心とその周辺に結合し(濃青色), C 末端領域は Exosite 1 および活性中心周辺のアミノ酸残基(黄土色)に結合して, トロンビンによるほとんど全ての天然基質の限定分解を阻止する。

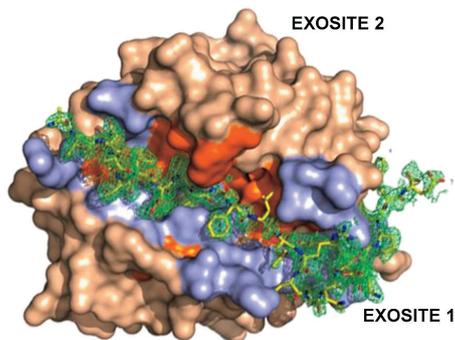


図6 トロンビン分子上の未分解型 PAR-1 細胞外 N 末端側ペプチドの結合²⁴⁾

トロンビンは、Exosite 1 からトロンビン活性中心がある Cleft で未分解型 PAR-1 の細胞外 N 末端側ペプチドを捕えて、側鎖の Arg41-Ser42 結合を限定分解して PAR-1 を活性化する(文献 24 から引用)。

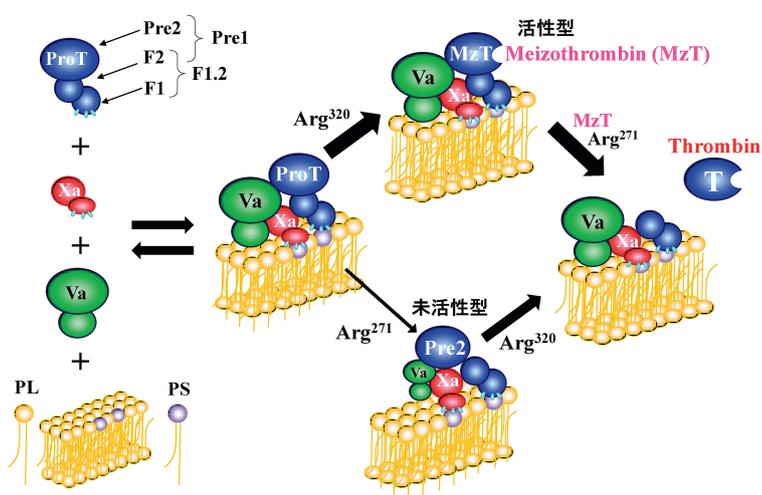


図7 プロトロンビン (FII) の活性化過程

FII は、十分量の第 Va 因子が存在する場合は、陰性荷電リン脂質上で第 Xa 因子/第 Va 因子複合体により FII の R320 が切断されて酵素活性を示す Meizo-thrombin (MzT) となり、続いて MzT (または第 Xa 因子) によって触媒ドメインとフラグメント 2 (F2) ドメインの間の R271 が切断されて遊離型トロンビンとフラグメント 1+2 (F1.2) が生成される。他方、第 Va 因子が十分にない場合は、活性化反応は非常に緩やかに進み、最初に第 Xa 因子によって R271 が切断されて酵素活性の無いプレトロンビン 2 (Pre2) と F1.2 の非共有結合による Pre2/F1.2 複合体が形成され、続いて Pre2 の R320 が第 Xa 因子によって切断されて遊離型トロンビンが生成される。また、反応過程で生成されたトロンビンは FII の R155 を切断してフラグメント 1 (F1) と酵素活性の無いプレトロンビン 1 (prethrombin 1: Pre1) を生成する(文献 11 を改変した)。

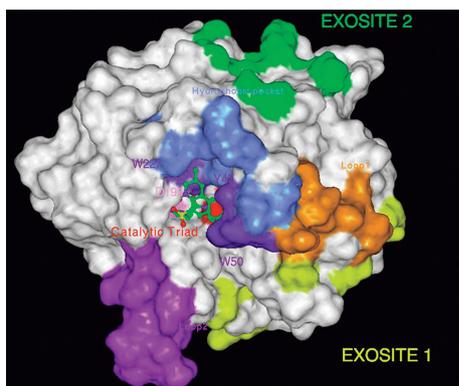


図8-1 トロンビン分子上に結合するアルガトロバンの分子モデル⁶⁾

トロンビンの活性中心に入込んだアルガトロバン(緑色スティックモデル)。トロンビンの各機能モジュールは図 1-2 と同じ (Connolly モデル, PDB ID: 1DWC による)。アルガトロバンのキノリン鎖はトロンビンの W227 と疎水結合し、ピペリジン環は Y47 と W50 に囲まれた窪みに入り込み、アルギニン側鎖が D199 と水素結合して活性を強く阻害する(文献 6 から引用)。

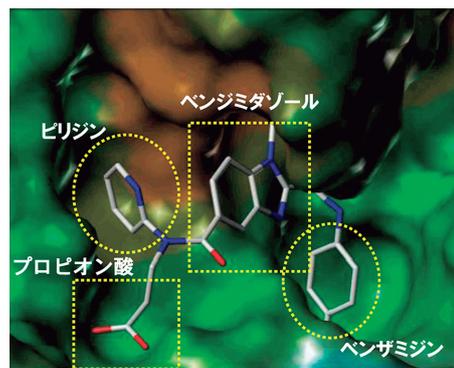


図8-2 トロンビンの活性中心に結合するダビガトランの分子モデル³⁰⁾

ダビガトランは、ベンジミダゾールリングがトロンビンの活性中心近位 (P-pocket) に、ピリジンリングおよびプロピオン酸が活性中心遠位 (D-pocket) に結合し、ベンザミジンが Specificity pocket に結合して、トロンビン活性を選択的かつ強く阻害する ($K_i=4.5$ nM) (文献 30 から引用)。

捕捉し、第 Va 因子の Arg506 部位を限定分解して失活化する。また、APC の Exosite 1 様構造には高分子量ヘパリンが結合し、このヘパリンは PCI による APC 阻害を促進する。

上述の第 Xa 因子/第 Va 因子複合体、第 IXa 因子/第 VIIIa 因子複合体、第 VIIa 因子/第 X 因子複合体、APC/第 Va 因子複合体の形成においては、いずれも第 Xa 因子、第 IXa 因子、第 VIIa 因子、APC 分子のプロテアーゼドメインに連結する 2 個の EGF ドメインと Gla ドメインを介して結合した陰性荷電リン脂質膜上で起きる反応であり、酵素と基質蛋白間の相互作用にはプロテアーゼドメイン以外の領域である EGF ドメインや Gla ドメインも重要な役割を果たしている。

8. まとめ

トロンビン分子表面のアミノ酸を Ala に置換した遺伝子組換え変異トロンビンの機能の解析と X 線結晶解析による立体構造の解析の組合せにより、トロンビンの持つ機能の特異性と多様性は、トロンビンの基質蛋白や阻害因子がトロンビン活性中心 (Catalytic site) とその周辺だけでなく、活性中心から離れた周辺領域も含めたかなり広範囲な領域の複数のアミノ酸側鎖と相互作用することによって発現されることが明らかになった。また、トロンビンは、Na⁺ イオンや TM, ヘパリンなどのグリコサミノグリカンなどの機能調節因子の結合によって、トロンビン分子表面の微細な立体構造を変化させて機能を変えるアロステリック酵素であることも明らかになった。こうした情報に基づき、トロンビンの凝固活性阻害薬だけでなく、トロンビンのモジュール構造を標的として、トロンビン惹起性の様々な病態を改善する新しいトロンビン機能変換物質の開発が期待される。

著者の利益相反 (COI) の開示 :

鈴木宏治 : その他の報酬 (旭化成関連講演料, ベーリンガーインゲルハイム社関連講演料, 他)

文献

- 1) Vu TK, Hung DT, Wheaton VI, Coughlin SR: Molecular

- cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell* **64**: 1057–1068, 1991.
- 2) Kahn ML, Zheng YW, Huang W, Bigornia V, Zeng D, Moff S, Farese RV, Tam C, Coughlin SR: A dual thrombin receptor system for platelet activation. *Nature* **394**: 690–694, 1998.
- 3) Bode W, Mayr I, Baumann U, Huber R, Stone SR, Hofsteenge J: The refined 1.9 Å crystal structure of human α -thrombin: Interaction with D-Phe-Pro-Arg chloromethylketone and significance of the Tyr-Pro-Pro-Trp insertion segment. *EMBO J* **8**: 3467–3475, 1989.
- 4) Rydel TJ, Tulinsky A, Bode W, Huber R: Refined structure of the hirudin-thrombin complex. *J Mol Biol* **221**: 583–601, 1991.
- 5) Fuentes-Prior P, Iwanaga Y, Huber R, Pagila R, Rumennik G, Seto M, Morser J, Light DR, Bode W: Structural basis for the anticoagulant activity of the thrombin-thrombomodulin complex. *Nature* **404**: 518–525, 2000.
- 6) Féthière J, Tsuda Y, Coulombe R, Konishi Y, Cygler M: Crystal structure of two new bifunctional nonsubstrate type thrombin inhibitors complexed with human α -thrombin. *Protein Sci* **5**: 1174–1183, 1996.
- 7) Stubbs MT, Bode W: A player of many parts: the spotlight falls on thrombin's structure. *Thromb Res* **69**: 1–58, 1993.
- 8) Tsiang M, Jain AK, Dunn KE, Rojas ME, Leung LL, Gibbs CS: Functional mapping of the surface residues of human thrombin. *J Biol Chem* **270**: 16854–16863, 1995.
- 9) Tsiang M, Jain AK, Gibbs CS: Functional requirements for inhibition of thrombin by antithrombin III in the presence and absence of heparin. *J Biol Chem* **272**: 12024–12029, 1997.
- 10) Hall SW, Nagashima M, Zhao L, Morser J, Leung LL: Thrombin interacts with thrombomodulin, protein C, and thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor via specific and distinct domains. *J Biol Chem* **274**: 25510–25516, 1999.
- 11) Bock PE, Panizzi P, Verhamme IMA: Exosites in the substrate specificity of blood coagulation reactions. *J Thromb Haemost* **5**(Suppl 1): 81–94, 2007.
- 12) Dang OD, Vindigni A, Di Cera E: An allosteric switch controls the procoagulant and anticoagulant activities of thrombin. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 5977–5981, 1995.
- 13) Guinto ER, Vindigni A, Ayala YM, Dang QD, Di Cera E: Identification of residues linked to the slow→fast transition of thrombin. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 11185–11189, 1995.
- 14) Yun TH, Baglia FA, Myles T, Navaneetham D, López JA, Walsh PN, Leung LL: Thrombin activation of factor XI on activated platelets requires the interaction of factor XI and platelet glycoprotein Ib alpha with thrombin anion-binding exosites I and II, respectively. *J Biol Chem* **278**: 48112–48119, 2003.
- 15) Philippou H, Rance J, Myles T, Hall SW, Ariens RA, Grant PJ, Leung L, Lane DA: Roles of low specificity and cofactor interaction sites on thrombin during factor XIII activation. Competition for cofactor sites on thrombin determines its fate. *J Biol Chem* **278**: 32020–32026, 2003.
- 16) Hortin GL, Trimpe BL: Interaction of thrombomodulin with thrombin via anion-binding exosite 1 results in an allosteric change that alters thrombin's substrate specificity. *J Biol Chem* **266**: 6866–6871, 1991.

- 17) Qureshi SH, Yang L, Manithody C, Iakhiaev AV, Rezaie AR: Mutagenesis studies toward understanding allostery in thrombin. *Biochemistry* **48**: 8261–8270, 2009.
- 18) Ehrlich HJ, Grinnell BW, Jaskunas SR, Esmon CT, Yan SB, Bang NU: The P3 (D167) and P3' (D172) acidic residues of the activation peptide in protein C, which have been shown to contribute to the slow rate of activation by free α -thrombin. *EMBO J* **9**: 2367–2373, 1990.
- 19) Choi SH, Smith SA, Morrissey JH: Polyphosphate is a cofactor for the activation of factor XI by thrombin. *Blood* **118**: 6963–6970, 2011.
- 20) Mutch NJ, Myles T, Leung LL, Morrissey JH: Polyphosphate binds with high affinity to exosite II of thrombin. *J Thromb Haemost* **8**: 548–555, 2010.
- 21) Fortenberry YM, Whinna HC, Cooper ST, Myles T, Leung LL, Church FC: Essential thrombin residues for inhibition by protein C inhibitor with the cofactors heparin and thrombomodulin. *J Thromb Haemost* **5**: 1486–1492, 2007.
- 22) Li W, Adams TE, Nangalia J, Esmon CT, Huntington JA: Molecular basis of thrombin recognition by protein C inhibitor revealed by the 1.6-Å structure of the heparin-bridged complex. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**: 4661–4666, 2008.
- 23) Suzuki K: Hepatocyte growth factor activator (HGFA): its regulation by protein C inhibitor. *FEBS J* **277**: 2223–2229, 2010.
- 24) Gandhi PS, Chen Z, Di Cera E: Crystal structure of thrombin bound to the uncleaved extracellular fragment of PAR1. *J Biol Chem* **285**: 15393–15398, 2010.
- 25) Padmanabhan K, Padmanabhan KP, Ferrara JD, Sadler JE, Tulinsky A: The structure of alpha-thrombin inhibited by a 15-mer single-stranded DNA aptamer. *J Biol Chem* **268**: 17651–17654, 1993.
- 26) Russo Krauss I, Pica A, Merlino A, Mazzarella L, Sica F: Duplex-quadruplex motifs in a peculiar structural organization cooperatively contribute to thrombin binding of a DNA aptamer. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **69**: 2403–2411, 2013.
- 27) Gibbs CS, Coutré SE, Tsiang M, Li WX, Jain AK, Dunn KE, Law VS, Mao CT, Matsumura SY, Mejza SJ: Conversion of thrombin into an anticoagulant by protein engineering. *Nature* **378**: 413–416, 1995.
- 28) Koike H, Okuda D, Morita T: Mutations in autolytic loop-2 and at Asp554 of human prothrombin that enhance protein C activation by meizothrombin. *J Biol Chem* **278**: 15015–15022, 2003.
- 29) Berg DT, Wiley MR, Grinnell BW: Enhanced protein C activation and inhibition of fibrinogen cleavage by a thrombin modulator. *Science* **273**: 1389–1391, 1996.
- 30) Huel NH, Nar H, Pripke H, Ries U, Stassen JM, Wienen W: Structure-based design of novel potent nonpeptide thrombin inhibitors. *J Med Chem* **45**: 1757–1766, 2002.
- 31) Page MJ, Macgillivray RT, Di Cera E: Determinants of specificity in coagulation proteases. *J Thromb Haemost* **3**: 2401–2408, 2005.