

◆トピックス◆

最近明らかにされたフィブリノゲンの立体構造

諏 合 輝 子*

Crystal Structure of Intact Fibrinogen

Teruko SUGO*

Key words : crystal structure, fibrinogen, coiled-coil, central-domain, E-domain

フィブリノゲン (Fbg) は異なる 3 本鎖がジスルフィド (S-S) 結合により相互に連結して 2 量体を形成している 340-kDa の糖蛋白質で、すべての脊椎動物 Fbg は (A α B β γ)₂ の基本形を持っている。1997~98 年に、ヒト Fbg の分子の一部分、Fragment D、およびその架橋分子 D-dimer の立体構造が X 線結晶解析により明らかにされ、フィブリン形成反応にかかわる機能部位の構造が明らかとなった。これらの知見を基に、さまざまな異常 Fbg 分子の構造も推定可能となり、Fbg の構造と機能の関係を分子レベルで論ずることができるようになった (血栓止血誌 10 巻 100-105, 1999 を参照)。

その後、2000 年に二つの研究室から低分解能であるものの、ウシおよびトリ Fbg 分子の X 線結晶解析が報告され、Fbg 分子の全体像が明らかとなった。また 2001 年夏には、これまで不明瞭であった両 Fbg 分子の Central-domain が中・高分解能で解析され、そのユニークな立体構造が明らかとなった。本稿では Fbg 分子の立体構造について、最近の知見を紹介する。

Fbg の全体像

Fbg 分子の構造はその結晶化の困難さより、これまで電子顕微鏡像でのみ全体像が捉えられてきた。Fbg の結晶化を困難にしているのは、 α 鎖 C 末端 (α C) の N 末側に位置する、13~18 アミノ酸残基の繰り返し構造がもたらす、高い α C 領域の可動性と推定されている。Doolittle らは、繰り返し構造を持たないトリ Fbg を選び¹⁾⁻²⁾、Cohen らは Lys-specific 酵素による限定分解で、繰り返し構造を含む α 鎖 391-580 と β 鎖 1-60 が切断された 285-kDa のウシ modified Fbg³⁾ を用いて結晶化に成功した。両グループの解析結果をまとめると、① Fbg 分子は小さな central-domain とその両末端にある二つの D 領域を、 $\alpha\beta\gamma$ 鎖の 3 本のヘリックスの coiled-coil がゆるやかに右旋回しながら planar sigmoidal 形に連結し、ほぼ 2 回転軸対称体としての基本骨格を持つ (Fig. 1)。この構造は、shadowing 法で見られたいわゆる “3-nodular” 像よりも、negative staining 法で得られた電顕像⁴⁾ に酷似している。しかし、② coiled-coil 部分は可動性があるために coiled-coil の曲がり (bend) が変化しやすく、特に中

* 自治医科大学分子病態治療研究センター, 分子病態研究部 [〒 329-0498 栃木県河内郡南河内町薬師寺 3311-1] Center for Molecular Medicine, Jichi Medical School
Tel: 0285-58-7398 Fax: 0285-44-7817 e-mail: sugosan@jichi.ac.jp

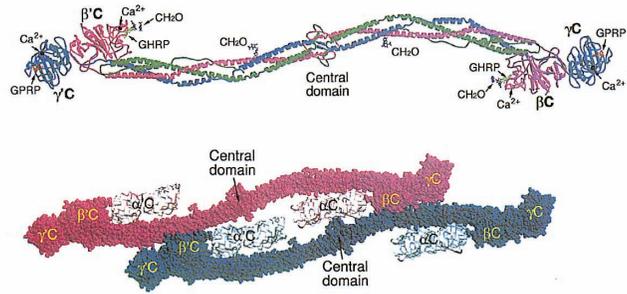


Fig. 1

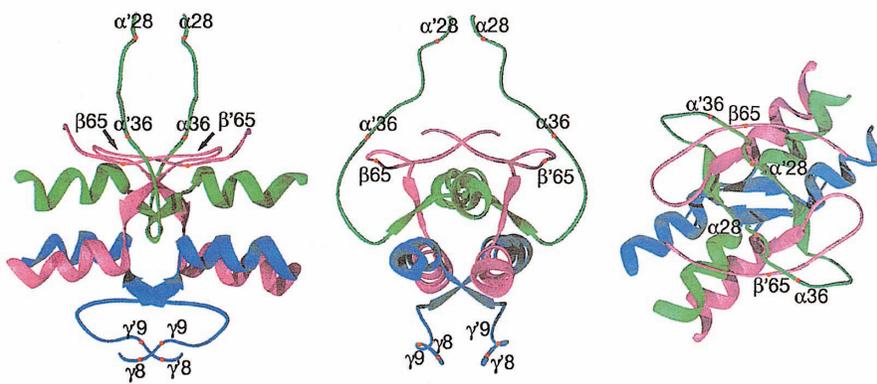


Fig. 2

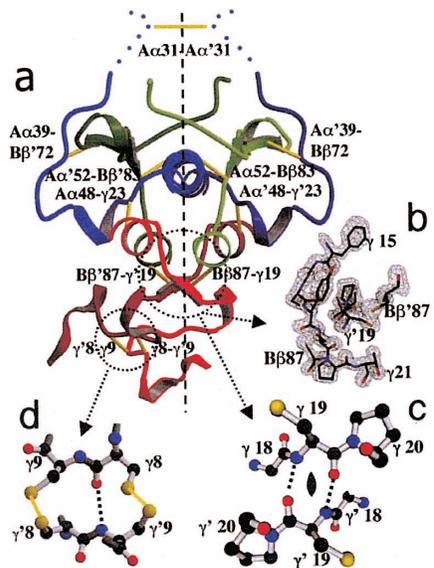


Fig. 3

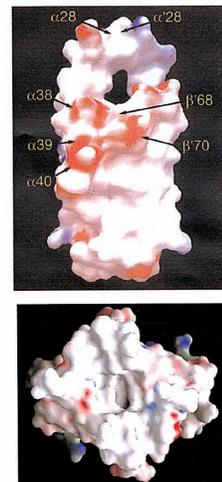


Fig. 4

間に位置する plasmin sensitive 領域は可動性が高いため、容易に分子の対称性が崩れ、Fbg 分子は個々に異なる立体構造をとりうる。このために、それらが end-to-end に連結されたフィブリンも多様な構造を持つことが可能となり、フィブリン・ネットワークの多様性が生じるものと思われる。③ トリ Fbg の場合、 α 鎖は D 領域の S-S ring 部分に到達すると coiled-coil 側に引きもどり、 α CN 末端約 50 残基は 4 本目のヘリックスとして coiled-coil に巻き込まれる。しかし、それ以降 C 末端までは α C はそれぞれの側の coiled-coil や D 領域近傍で、可動性の高い disordered 状態として存在するのみで、明確な構造として存在していない。従って、電顕像から推定された、“2 本の α C が central-domain に結合して独立領域として存在する”こと⁵⁾は立証されなかった。むしろ、結晶中では隣の Fbg 分子の α C と結合しているようである (Fig. 1 下段)。しかし、この分子間結合は結晶化の際の packing 段階で生じた可能性がある。④ フィブリンペプチド A, B (FPA, FPB) を含む $\alpha\beta$ 鎖 N 末端 10~20 数残基は、central-domain の 2.7-Å 分解能電子密度マップでは全く認められず、極めて高い可動性領域であることが示された²⁾。

Central-domain の構造

トリ native Fbg²⁾、とウシ Fbg の 35-kDa E5 分画の結晶解析⁶⁾より、Fbg の central-domain は、二つの半分子 ($A\alpha B\beta\gamma$) の双方の N 末端部が、2 組の分子間 S-S ring と多くの非共有結合により相互に絡み合あって dimer 化し、分液ロートが coiled-coil のひもに垂直に突き刺さったような、特異な構造であることが判明した。

Fig. 2 は 2.7-Å 分解能で解析したトリの central-domain を 3 方向から見たリボンモデル図で、Central-domain は垂直軸に対して対称であり、FPA と FPB はロート側に位置し、 γ 鎖 1~20 残基は coiled-coil の下部に位置して γ - γ “bow-tie” 部分を形作っている。一方 1.4-Å 分解能でこの構造の詳細を見ると、 α 鎖のロート壁を支えるのに適した位置に β 鎖が突き出て S-S 結合しており、半分子同士の結合に寄与する S-S 結合は比較的外部に、coiled-coil を支えるための S-S 結合は分子の内部に存在しているのが明らかとなった。また、半分子を密接に結びつける多くの非共有結合の存在も、電子密度マップ上で確認されている (Fig. 3)。ロート内部壁面には hydrophobic アミノ酸のみが位置し、ロート外壁上層には、トロンビン結合部位と推測できる陰性荷電が集まった部分が存在

Fig. 1 トリ Fbg 分子の主鎖骨格リボンモデル図 (上図) と、Space-filling モデル図 (下図) α 鎖は緑色、 β 鎖は赤色、 γ 鎖は青のリボンで色分けし、隣り合った Fbg 分子を赤、青の 2 色で識別し、それぞれの分子の α 鎖末端 (α C) の存在領域を示した。(Yang, et al., Biochemistry, 2001 転載許可)

Fig. 2 Coiled-coil に対して水平方向(左)、垂直方向(右)、Coil 軸方向(中)にそって見た、トリ Fbg の Central-domain のリボンモデル図。リボンの色分けは Fig. 1 と同じ (Yang, et al., Biochemistry, 2001 転載許可)。

Fig. 3 1.4-Å 分解能でみたウシ Fbg 由来 E5 分子の Central-domain の立体構造。a) Fbg 分子の長軸方向にそった横断面図。 α 鎖は青、 β 鎖は緑、 γ 鎖は赤色、分子内鎖間 S-S 結合は黄 bar で識別した。ロート形状の垂直軸に対して、 $\alpha\beta\gamma$ 鎖は対称であるが、 γ 鎖 N 末端領域のみ、対称軸(点線)に対して片側に偏っている。b) Central-domain 内部で 2 つの半分子が密接に相互作用している γ 鎖領域 (γ 15-21, γ '19-21) の電子密度マップ。c) γ 鎖は N 末端領域 (γ 18-21) 以降は 2 回転軸対称の関係にある。d) γ “bow-tie” 部分のうち、 γ 8- γ '9 と γ 9- γ '8 の S-S 結合により、非対称の関係がうまれる。(Madrado et al., PNAS, 2001 転載許可)。

Fig. 4 Central-domain のロート状構造の GRASP 図。陰性荷電は赤色、陽性荷電は青色で彩色してある。上図はトリ・ロートの外壁部分図、下図はウシ・ロート内部表層が見える位置からの図 (Yang, et al., Biochemistry, 2001, Madrazo et al., PNAS, 2001 転載許可)。

する (Fig. 4). この部分にトロンビンが結合すると仮定すると、二つの FPA を選択的にほぼ同時に切断することが可能で、FPA 切断の酵素学的データを説明でき、また、空間的に少し離れている (と考えられる) FPB の切断が、必ず FPA よりも遅れる現象も説明できる。

ウシとトリの central-domain の違いは、coiled-coil 下部の γ - γ "bow-tie" 部分の対称性である。Cohen らは、ウシではロート垂直軸に対して片側に "bow-tie" が位置しており、 γ 鎖間の隣り合った残基同士 (γ 8- γ '9 と γ 9- γ '8) が S-S 結合するには、"bow-tie" 自身も対称構造がとれないことを示した。このような非対称性のために、"bow-tie" 部分は偏った側の coiled-coil に接近して、coiled-coil の曲がりを引き起こして、Fbg 分子の立体構造の多様性の一因となることが強調されている。しかし、E5 分画はキモトリプシン処理で調製されており、分子の均一性が完全に保たれている証拠は少なく、native 構造とは異なっている可能性がある。また "bow-tie" 部分は γ 鎖の末端部分であるために、結晶化の際に非対称に packing された可能性も考えられるため、Fbg すべての分子に適用してこの部分の非対称性を重要視し

て良いか疑問が残る。

以上のように、両グループの研究結果には多少の違いが認められるものの、長い間待ち望んでいた Fbg 分子の立体構造の詳細が明らかとなった。今後、さらなる高分解能での解析報告や、結晶化しにくい領域を含む、ヒト Fbg 分子の立体構造が解明されるのを期待する。

文 献

- 1) Yang Z, Mochalkin I, Veerapandian L, Riley M, Doolittle RF : Crystal structure of native fibrinogen at 5.5-Å resolution. PNAS **97** : 3907-3912, 2000.
- 2) Yang Z, Kollman J, Pandi L, Doolittle RF. : Crystal structure of native chicken fibrinogen at 2.7 Å resolution. Biochemistry, **40**, 12515-12523, 2001
- 3) Brown JH, Volkmann N, Jun G, Henschen-Edman AH, Cohen C : The crystal structure of modified bovine fibrinogen. PNAS **97** : 85-90, 2000.
- 4) Williams RC Morphology of bovine fibrinogen monomers and fibrin oligomers. J Mol Biol **150** : 399-408. 1981
- 5) Veklich YI, Gorkun OV, Medved LV, Nieuwenhuizen W, Weisel JW : Carboxyl-terminal portions of the α chains of fibrinogen and fibrin. Localization by electron microscopy and the effects of isolated α C fragments on polymerization. J Biol Chem **268** : 13577-13585, 1993
- 6) Madrazo J, Brown JH, Litvinovich S, Dominguez R, Yakovlev S, Medved L, Cohen C. Crystal structure of the central region of bovine fibrinogen (E5 fragment) at 1.4-Å resolution. PNAS **98** : 11967-11972, 2001.