

プラスミノゲンの立体構造

秋山正志*, 平井秀憲*, 宮田敏行*

Three dimensional structure of full-length plasminogen

Masashi AKIYAMA*, Hidenori HIRAI*, Toshiyuki MIYATA*

Key words: plasminogen, crystal structure, kringle domain

◆ Points ◆

- ①ヒトの閉構造プラスミノゲン (PLG) 全長の結晶構造が決定され, PLG はダイヤモンド形の分子構造であることが明らかにされた.
- ②分子表面に露出したクリングル (KR) 1ドメインのリジン結合部位が, PLG とフィブリンの相互作用の開始点であると考えられる.
- ③2個のCl⁻イオンがプラスミノゲンの閉構造を安定化させている.
- ④活性化の際に切断される Arg561-Val562 結合は, 複数の構造要因により切断されにくい構造をとっている.
- ⑤PLG はKR1ドメインのLBSを介してフィブリンのC末端リジン残基に結合しフィブリン血拴に動員される. さらに, 安定性の低いKR5ドメインがPApドメインから離れ, PLGは開構造へとコンフォメーションを変化させ切断を受けて活性化する.

1. はじめに

プラスミノゲン (PLG) は組織型もしくはウロキナーゼ型 PLG アクチベーター (tPA, uPA) によって Arg561-Val562 間のペプチド結合が分解されて二本鎖の活性型セリンプロテアーゼ (プラスミン) となり, フィブリンを分解して血拴を溶解する線溶反応を担う¹⁾. プラスミンは生理的中和因子である α 2-プラスミンインヒビターによって非可逆的に失活される. PLG の血中濃度は日本人ではおよそ 160mg/L である. 溶血性連鎖球菌はストレプトキナーゼ (SK) を分泌し, SK は PLG と 1:1 で複合体を形成し, この複合体は PLG をプラスミンに活性化しフィブ

リンを溶解する. 病原菌は菌体外に分泌した SK 様タンパク質による PLG の活性化, 次いでマトリクスメタロプロテアーゼの活性化を通して全身性の感染を成し遂げる. また, PLG はノックアウトマウスを用いた研究などから, 線溶反応以外にも基底膜および細胞外基質の分解を通じ創傷治癒やガンの浸潤・転移, 血管形成など様々な生体機能に関与している²⁾.

2. プラスミノゲン (PLG)

PLG は主に肝臓で合成され, 19 アミノ酸残基のシグナルペプチドが切断されて, 791 アミノ酸残基からなる分子量 80,000~87,000 の糖タンパ

*国立循環器病研究センター研究所分子病態部 [〒565-8565 大阪府吹田市藤白台 5-7-1]
Department of Molecular Pathogenesis, National Cerebral and Cardiovascular Center
[5-7-1 Fujishiro-dai, Suita, Osaka 565-8565, Japan]
Tel: 06-6833-5012 (ext. 2477) Fax: 06-6835-1176 e-mail: akiyamam@ri.ncvc.go.jp

ク質として血中に分泌される。2カ所の糖鎖付加部位が存在し、Asn289とThr346に糖鎖が付加されたI型とThr346のみに糖鎖が付加されたII型のPLGが血中におよそ2:3の割合で存在する。PLGはN末側から高次構造の維持に重要なPan-apple (PAP) ドメイン (preactivation peptideとも呼ばれる)、約80個のアミノ酸から構成され3組のS-S結合を有するクリングル (KR) ドメインが5つ (KR1-KR5)、セリンプロテアーゼ (SP) ドメインからなる。KR3を除くKRドメインにはリジン結合部位 (LBS) が存在し、プラスミンによる分解を受けてC末端がリジンとなったフィブリンや α 2-プラスミンインヒビターとの結合に参与する。リジンアナログである ϵ -アミノカプロン酸やtAMCHA (トラネキサム酸, トランサミン) はLBSとフィブリンの結合を抑制するため、抗線溶活性を示す。

3. PLGの立体構造とドメイン間相互作用

PLGはtPAとともに凝固反応により析出したフィブリンに結合することで、酵素と基質がフィブリン塊という固相に濃縮され効率よく活性化される。PLGはフィブリン非存在下では不活性状態の閉構造を保持する。LawらはPLG活性化の構造基盤を明らかにするために、血漿から精製した閉構造のヒト・II型PLG (Thr346のみ糖付加) 全長の結晶構造を2.45Åの分解能で決定した (PDB: 4DUU)³⁾ (図1)。PLGの7つのドメインはジグザグに集合してダイヤモンド形をとり、N末側のPAPドメインはKR4およびKR5ドメインと広範囲で相互作用していた。特にPAPドメインのLys50, Arg68およびArg70とKR4およびKR5のLBSとの間の相互作用が重要である (図2)。生化学的な実験から、PAPドメインと他のドメインとの相互作用がPLGの閉構造の維持に必要であると考えられてきた。実際、プラスミンによってLys77-Lys78結合が限定分解を受けPAPドメインが外れると、開構造を取るLys-PLGを生じる⁴⁾。閉構造のPLGでは切断されるLys77は内部に埋もれているため、Lys77の切断には立体構造の変化が切断に先立って必要であると推測された。また、KR4ドメインは

PAPドメイン、活性化ループ、SPドメインと相互作用して、PLGが不必要に活性化しないように、KR3/KR4リンカー領域を固定していた (図3)。また、SPドメインの2つのループ (672-678と703-713) はKR2ドメインと広範囲に相互作用していた。

血漿中の塩素イオンは閉構造のPLGの安定化に重要である⁵⁾。生理的なCl⁻イオン濃度条件 (150mM NaCl) 下で生成した結晶には4つのCl⁻イオンが含まれていた。そのうちの2つはKR4/PAPおよびSP/KR2ドメイン接触面の形成に参与していた。KR3ドメインのLBSは変異を持ち、*in vitro*においてリジン残基に結合せず、これまでその役割ははっきりしなかった。KR3ドメインはKR2ドメインとS-S結合を含む広範囲な相互作用の結果、SPドメインに隣接するように配位されていた。KR3とSPドメイン間にはKR3ドメインのAsn289の δ -NとSPドメインのGlu714の側鎖間の水素結合しか明確な相互作用が存在しなかった。I型PLGでは、このAsn289はN-グリコシル化されているのでこの結合は存在しないと考えられた。そこで、分解能が良くないが (5.2Å) I型PLGの結晶構造を調べたところ (PDB: 4DUU)、KR3を除く6つのドメインはII型とほぼ同じ位置にあったが、KR3ドメインの電子密度は見えなかった。I型PLGはAsn289のN-グリコシル化によりKR3ドメインの可動性が大きくなり、II型PLGよりも開構造をとりやすいことが示唆された。

4. PLG活性化の構造基盤

PLGのプラスミンへの変換にはtPAおよびuPAによる活性化ループ内のArg561-Val562結合の切断が必要であるが、無秩序なPLGの活性化を防ぐ機構は明らかではなかった。PLGの立体構造から、活性化ループはKR3/KR4リンカーで遮蔽され、切断されにくい構造をとることが分かった (図4)。さらに、O-グリコシル化されているThr346もArg561の側鎖と相互作用し活性化部位が切断されにくい構造にしていた。またII型PLGではKR3ドメインも活性化を妨害する位置にあった。このように、閉構造をとる

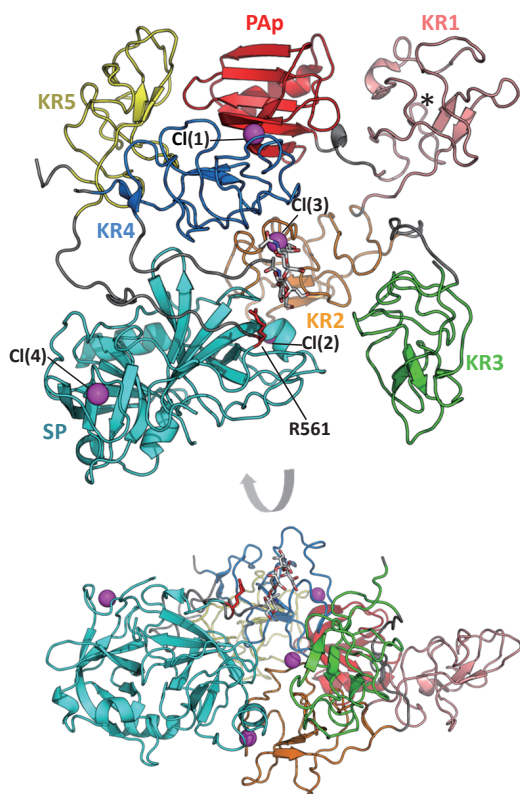


図1 プラスミノゲン (PLG) の全体構造。各ドメインを色分けして表示している。(PAP: 赤; KR1: ピンク; KR2: 橙; KR3: 黄緑; KR4: 青; KR5: 黄; SP: シアン)。4個のCl⁻イオンをマゼンダの球体で、Thr346のO型糖鎖ならびに活性化ループのR561(赤)を球棒モデルで、KR1のLBSをアスタリスクで示す。

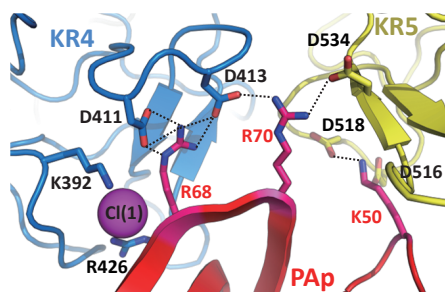


図2 PAPドメインとKR4およびKR5ドメインとの相互作用。PAPドメインのLys50はKR5ドメインのLBSのDXDモチーフのAsp518と極端に短い塩橋を形成している。PAPドメインのArg70はAsp413ならびにAsp534を介してKR4およびKR5ドメインを配位させている。Arg68はKR4ドメインのLBSをDXDモチーフのAsp411とAsp413と相互作用することでブロックしている。Cl⁻(1)はPAPドメインのArg68の主鎖のN、Arg426、Lys392の側鎖とそれぞれ水素結合を形成している。

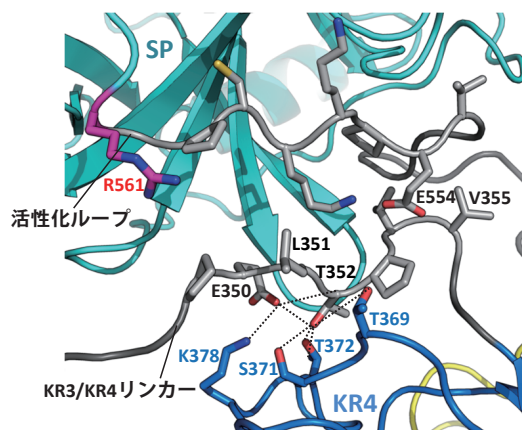


図3 KR4ドメイン、KR3/KR4リンカー、活性化ループ、SPドメイン間の接触面。KR4ドメインはKR3/KR4リンカーとGlu350-Thr352を筆頭に複数箇所相互作用している。一方、活性化ループは唯一Glu554を介して、KR3/KR4リンカーループのVal355の主鎖の窒素と相互作用している。

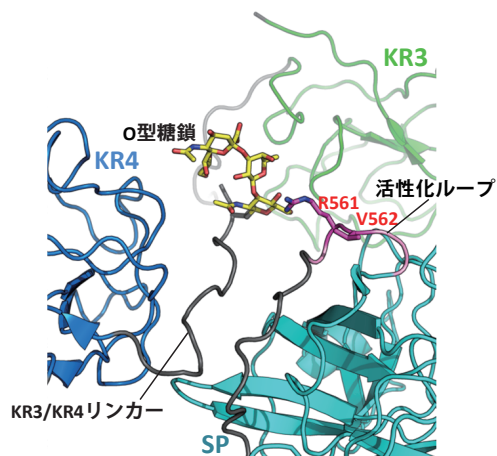


図4 閉構造において遮蔽されている活性化ループ。閉構造のPLGでは、活性化部位(R561-V562)の存在する活性化ループ(赤)はKR3/KR4リンカーループによってtPAおよびuPAから保護されている。Thr346のO結合型糖鎖もArg561の遮蔽に関与している。

PLGはtPAやuPAで活性化されにくい構造をとっていた。しかし、溶血性連鎖球菌が産生・分泌するSKはこういった活性化されにくい構造要素には捕らわれず、PLGのSPドメインと複合体を形成することによりPLGを活性化する能力を示す^{6) 7)}。

KRドメイン内に存在する4つのLBSのうち、KR1ドメインのLBSのみが閉構造のPLGで露出しているので、KR1ドメインがフィブリンもしくは細胞表面への最初の結合に関与すると考えられた。PLGの標的への動員後、他のKRドメイン中のLBSとフィブリンのC末端のリジン残基とで更に相互作用が起こり、大きな立体構造変化が引き起こされ、PLGは閉構造から伸展した開構造へと変化すると考えられる。PLG結晶の非対称ユニット中には2種のPLG分子(分子Aおよび分子B)が存在する。これまで述べてきた構造は分子Aを元としている。分子Bを分子Aと比較すると、KR5ドメインが分子Aと比べてPApドメインから約7Å外側に動きPLGのコア構造から外れ、KR5ドメインのLBSがリジン残基を含むリガンドと相互作用しうる状態に露出していた。Lawらは分子Bをプラスミノゲンの立体構造変化の中間体であると推測している。完全に閉構造の分子Aにおいて、PApドメインのLys50はKR5ドメインのLBSを構成するDXDモチーフの2つのアスパラギン酸のうちAsp518と相互作用しているが、もう一方のAsp516とは約4Å離れており(図3)、PApドメインがKR5ドメインを安定的につなぎ止めておくには両ドメインの相互作用は弱いと考えられた。この弱い結合が破れ、KR5ドメインが露出し、フィブリンに結合すると、PLGは不可逆的な開構造への立体構造変化の経路に入るものと推察された。

5. おわりに

全長PLGの結晶構造解析により、以下のよう

なPLGの活性化機構が考えられる。(1)閉構造のPLGがKR1ドメインに露出しているLBSとフィブリンのC末端のリジン残基との相互作用を介してフィブリン血栓に動員される。(2)動員されたPLGでは、安定性の低いKR5ドメインが開構造となりフィブリン内の別のリジン残基に結合し、コンフォメーション変化が起こる。(3)開構造となったPLGは活性化ループが露出し、Arg561-Val562結合がtPAやuPAによって切断される。(4)こうして生成したプラスミンがフィブリンを分解する。結晶構造解析から、KR1のLBSがPLGのフィブリンのC末端リジン残基への動員に重要な役割を果たすこと、およびKR5ドメインがPApドメインから離れ、自身のLBSを露出することがPLGの構造変化の開始に重要であることが理解された。

Disclosure of Conflict of Interests

The authors indicated no potential conflict of interest.

文 献

- 1) Rijken DC, Lijnen HR: New insights into the molecular mechanisms of the fibrinolytic system. *J Thromb Haemost* **7**: 4-13, 2009.
- 2) Castellino FJ, Ploplis VA: Structure and function of the plasminogen/plasmin system. *Thromb Haemost* **93**: 647-654, 2005.
- 3) Law RHP, Caradoc-Davies T, Cowieson N, Horvath AJ, Quek AJ, Encarnacao JA, Steer D, Cowan A, Zhang Q, Lu BGC, Pike RN, Smith AI, Coughlin PB, Whisstock JC: The X-ray crystal structure of full-length human plasminogen. *Cell rep* **1**: 185-190, 2012.
- 4) Miles LA, Castellino FJ, Gong Y: Critical role for conversion of Glu-plasminogen to Lys-plasminogen for optimal stimulation of plasminogen activation on cell surfaces. *Trends Cardiovasc Med* **13**: 21-30, 2003.
- 5) Urano T, Chibber BA, and Castellino FJ: The reciprocal effects of ϵ -aminohexanoic acid and chloride ion on the activation of human [Glu¹] plasminogen by human urokinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**: 4031-4034, 1987.
- 6) Wang X, Lin X, Loy JA, Tang J, Zhang XC: Crystal structure of the catalytic domain of human plasmin complexed with streptokinase. *Science* **281**: 1662-1665, 1998.
- 7) 宮田敏行, 峰昇平: ストレプトキナーゼ-ミニプラスミン複合体。血栓止血学会誌: **11**: 276-282, 2000.