

◆凝固・線溶・血小板タンパク質の機能発現機構◆

セルピン凝集性疾患： その重合メカニズムを中心に

山崎正幸*



山崎正幸

Structural basis for serpin inhibition and polymerization

Masayuki YAMASAKI*

Key words: Serpin, Antithrombin, α_1 -Antitrypsin, Loop-insertion, Domain-swapping

平成9年3月 京都大学農学部 卒業
 平成11年3月 京都大学大学院農学研究
 科修士課程 修了
 平成14年3月 京都大学大学院農学研究
 科博士後期課程 修了
 同年4月 生物系特定産業研究推進
 機構 派遣研究員
 平成15年4月 京都大学大学院農学研究
 科 産学連携研究員
 平成18年5月 ケンブリッジ大学医学研
 究所 客員研究員
 平成19年6月 ケンブリッジ大学医学研
 究所 リサーチアソシエイト
 平成23年5月 京都大学白眉センター/
 再生医科学研究所 特定
 准教授

❖ Points ❖

- ・セルピンとは？
- ・セリンプロテアーゼを阻害するためのユニークなメカニズム
- ・タンパク質重合における新しい概念の提出
- ・ α_1 -Antitrypsin 欠損症の分子基盤を理解する
- ・まだまだ広がりを見せるセルピン研究

1. はじめに

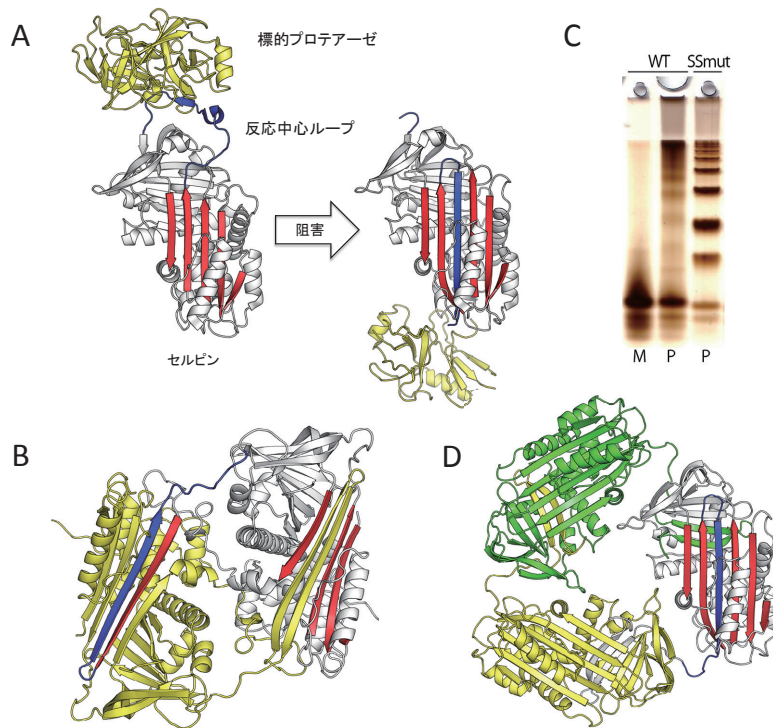
セリンプロテアーゼを阻害する一群のスーパーファミリーたんぱく質はセルピン (Serpine: Serine Protease Inhibitor の略称) と呼ばれ、現在ヒトでは36種類が同定されている。血液凝固系ネットワークにおいて Thrombin の活性を絶妙に調節する, Antithrombin, Protein C Inhibitor, Heparin Cofactor II, Protease Nexin-1, これらはすべてその仲間である。セルピンの阻害機構をつかさどるユニークな構造変化について説明するだけでも実は十分に面白いのであるが、ここでの主なトピックは、家族性変異を原因とするセルピンの細胞内での重合とそれに関わる疾患となる。

Antithrombin と α_1 -Antitrypsin, これらのたんぱく質がまるでパズルのようにお互いの構造モチーフを交換し重合する姿, またその根底に横たわるセルピンとしての構造原理に少しでも興味を持っていたら幸いである。

2. セルピン研究において存在した 2つの大きな命題

セルピンはバクテリアからヒトまで3000種類以上も同定されており、我々の日常の何処にでも存在していると言っても過言ではない。我々の血中で一番多いセルピンは α_1 -Antitrypsin であり、好中球エラスターゼを阻害することで肺を自己

*京都大学白眉センター／再生医科学研究所 [〒606-8507 京都市左京区聖護院川原町53]
 The Hakubi Center/Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University
 [53 Shogoin, Kawahara-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8507, Japan]
 Tel: 075-751-3847 Fax: 075-751-4646 e-mail: yamasaki.masayuki.8r@kyoto-u.ac.jp



図

(A) セルピンの阻害機構：セルピンは反応中心ループ（青色）を餌とし、標的プロテアーゼ（黄色）をアシル複合中間体としてトラップするや否や、急速にループを分子中央の β シート（赤色）に挿入する。プロテアーゼはその活性中心構造を壊されたまま、セルピン分子下部で保持されるため、加水分解が起こりにくく阻害されたままの状態が続く。セルピン分子は天然状態では不安定であり、反応中心ループの挿入により激しく安定化する（例えば α_1 -Antitrypsinの場合Tmは約2倍へ）。(B) Antithrombin 二量体の構造：分子中央の β シートのうち、2本のストランドを交換することで二量体が形成されている。そのうち1本は天然構造では露出している反応中心ループ（青色）で、セルピン分子の大規模な安定性の増加が予想される。(C) α_1 -Antitrypsin 重合メカニズムの限定：野生型とSS変異体ではNative PAGE上でラダー形成に明らかな違いが見られる。(D) α_1 -Antitrypsin 欠損症に関わる重合体の構造：分子C末端のストランドを隣の分子と交換することで重合体を完成している。ここでは反応中心ループ（青色）は自らの分子の β シート（赤色）に挿入しているが、その結果分子として安定化が引き起こされることには変わりがない。

組織障害から護っている。次いで血中では Antithrombin が多く、その血液凝固系における見事な働きは皆様をご存知の通りである。「マウストラップ」と称されるそのユニークな阻害メカニズム(図A)を明らかにすることは研究者達にとって大きな魅力であり、両タンパク質は30年ほど前からセルピンの構造研究を華やかに彩ってきた^{1) 2)}。

一方でセルピンには研究すべき負の側面が存在していた。欧米では、Caucasian の3000人に1人が α_1 -Antitrypsin のZ型ホモ変異(Glu342Lys)を保持するため、 α_1 -Antitrypsin 欠損症という疾患が身近となる。諸症状は、 α_1 -Antitrypsin が肝臓細胞内で凝集することによる肝硬変、また血中に α_1 -Antitrypsin が不足することによる肺気腫である。それらの予防・治療のため α_1 -Antit-

rypsin 重合メカニズムに関する分子レベルでの知見が求められていたが、まだまだ不十分であった。

Antithrombin 欠損症も確かに存在するが、ヘテロ変異を持つだけでも若いうちから重篤な血栓症になり得るため患者の多くは稀少家系に限られる。一方 α_1 -Antitrypsin 欠損症においては、肝硬変になる患者はZ型ホモ変異保持者の約5%の年少者であり、多くが中高年以降においてようやく肺気腫を発症するため、変異が次世代へと引き継がれ易いという問題点を持つ。

3. Antithrombin 重合体構造の決定

2006年、それまで鶏卵白の主成分Ovalbuminを研究の中心としていた私はセルピン構造研究の

本拠地である英国ケンブリッジ大学医学研究所に研究員として渡り、タンパク質凝集の研究へと視点を移した(ちなみに Ovalbumin は機能未知の、セルピンである理由も謎なセルピンである)。そこで着目したのは、Antithrombin の P80S 変異を持った患者の血液から精製した、非常に安定な二量体に関する論文であった³⁾。タンパク質の結晶化にはミリグラム単位の精製されたサンプルが必要であるが、P80S 患者はスペインに僅かしか存在せず、*in vivo* からのサンプル収集は不可能と思われた。そこで私は血中から精製した野生型の Antithrombin を用いて、試験管内で安定な凝集体を作成する条件を見つけ出し、精製、結晶構造解析を行ったのである⁴⁾。

我々の目の前に姿を現した構造(図 B)は分子がお互いに手を繋いでいるかの様であり、以下の点で非常にユニークなものであった。

- (1) 分子の中央の β ストランドをお互いに交換し、全体としては天然構造が二つ並んだ様な規則正しい重合体構造を完成していること。
- (2) セルピンの阻害メカニズムにおいて重要な反応中心ループが分子中央に挿入されている、つまり重合体構造はとても安定に見えること。

この構造は Antithrombin P80S 変異の患者の血中に存在した非常に安定な二量体を良く説明できると考えられた。反応中心ループを挿入することによる分子の劇的な安定化が、セルピン重合体の形成においてもこのように美しく遂行されているとは、この構造が解けるまで我々でさえも予想していなかった。

4. α_1 -Antitrypsin 欠損症を支配する重合体構造とは？

β ストランドの交換を阻害する SS 変異体を α_1 -Antitrypsin においてデザインしたことで、本研究はさらなる広がりを見せた。まず、変異体はグアニジン変性剤の条件では、 α_1 -Antitrypsin の重合を非常に効率よくブロックできた。さらに、その変異体を還元状態で重合させた後に再酸化を促すと、分子間で SS 結合の形成が観察された⁴⁾。これらは、Antithrombin で観察された重合メカニズムが α_1 -Antitrypsin においても起こることを良

く示唆している。一方で興味深いのは、熱変性の条件では、SS 結合を導入することで α_1 -Antitrypsin の重合メカニズムを制限できている様に見えることである(図 C)。また、それら重合体は非常に安定であり、構造解析に適していた。

決定した α_1 -Antitrypsin 重合体構造は、その規則正しい重合という意味では、Antithrombin と同じコンセプトを備えていたが、分子の裏側の β ストランドを隣の分子と交換しているという点で Antithrombin 重合体形成メカニズムとは大きく異なるものであった(図 D)⁵⁾。これは「一つのタンパク質が規則正しく、しかも幾通りにも重合できる」という、タンパク質の重合における新しい概念の提出である。

では、一体どの重合体が α_1 -Antitrypsin 欠損症を引き起こすかと言うことであろうか？ 幸運にも同時期に同じケンブリッジ医学研究所のグループが、Z 型変異体を保持する患者の肝臓細胞封入体の α_1 -Antitrypsin に特異的に反応する抗体の作製に成功していた⁶⁾。早速試してみたところ、その抗体は後者の α_1 -Antitrypsin 重合体に良く反応した⁵⁾。後年、 α_1 -Antitrypsin の Z 変異体を酵母のサイトゾルに発現し、蓄積した重合体を精製し、その構造を決定した(Unpublished data)。それは後者の α_1 -Antitrypsin 重合体と全く同じ構造であったことから、*in vivo* からも強い実験的証拠を得られたと考えている。

5. 近年のセルピン研究の流れと私の興味

α_1 -Antitrypsin 欠損症の治療に対するその他のアプローチとしては、低分子化合物を利用しオートファジーを活性化することで細胞内封入体を消去した例⁷⁾、最新の遺伝子治療を応用した例⁸⁾などが挙げられる。遺伝子検査の概念が普及しつつある欧米では、このような遺伝疾患は減少していく傾向にある。

近年のセルピン研究は新しい方向性の盛り上がりを見せている。実はセルピンの多くは、本トピックで紹介した α_1 -Antitrypsin, Antithrombin の様な阻害能を持っていない。しかし全く異なる機能で、我々の生体で極めて重要な役割を担っている。Angiotensinogen は血圧を調節する Angiotensin I

ペプチドをそのN末端に含有する。HSP47はヒトで最も多いタンパク質であるコラーゲンの構造形成を助ける。TBGはthyroxineというホルモンの輸送に欠かせない。Maspinはがん細胞の分化を調節する。セルピンの多様性に関する理解がどんどん進むことで、過去の命題に捕われず、その研究は果てしない広がりを見せている。セルピンの阻害メカニズムと重合体形成を支配した、反応中心ループの挿入と熱安定化という単純で美しいルール、この一般性を見直すべき時期がまたやってくるであろう。

Disclosure of Conflict of Interest

The author indicated no potential conflict of interest.

文 献

- 1) Huntington JA, Randy RJ, Carrell RW : Structure of a serpin-protease complex shows inhibition by deformation. *Nature* **406** : 923-936, 2000.
- 2) Huntington JA : Thrombin inhibition by the serpins. *J Thromb Haemost* **11** : 254-264, 2013.
- 3) Corral J, Huntington JA, González-Conejero R, Mushunje A, Navarro M, Marco P, Vicente V, Carrell RW : Mutations in the shutter region of antithrombin result in formation of disulfide-linked dimers and severe venous thrombosis. *J Thromb Haemost* **2** : 931-939, 2004.
- 4) Yamasaki M, Li W, Johnson DJ, Huntington JA : Crystal structure of a stable dimer reveals the molecular basis of serpin polymerization. *Nature* **455** : 1255-1258, 2008.
- 5) Yamasaki M, Sendall TJ, Pearce MC, Whisstock JC, Huntington JA : Molecular basis of α_1 -Antitrypsin deficiency revealed by the structure of a domain-swapped trimer. *EMBO rep* **12** : 1011-1017, 2011.
- 6) Miranda E, Pérez J, Ekeowa UI, Hadzic N, Kalsheker N, Gooptu B, Portmann B, Belorgey D, Hill M, Chambers S, Teckman J, Alexander GJ, Marciniak SJ, Lomas DA : A novel monoclonal antibody to characterize polymers in liver disease associated with α_1 -Antitrypsin deficiency. *Hepatology* **52** : 1078-1088, 2010.
- 7) Hidvegi T, Ewing M, Hale P, Dippold C, Beckett C, Kemp C, Maurice N, Mukherjee A, Goldbach C, Watkins S, Michalopoulos G, Perlmutter DH : An autophagy-enhancing drug promotes degradation of mutant α_1 -Antitrypsin Z and reduces hepatic fibrosis. *Science* **329** : 229-232, 2010.
- 8) Yusa K, Rashid ST, Strick-Marchand H, Varela I, Liu PQ, Paschon DE, Miranda E, Ordóñez A, Hannan NR, Rouhani FJ, Darche S, Alexander G, Marciniak SJ, Fusaki N, Hasegawa M, Holmes MC, Di Santo JP, Lomas DA, Bradley A, Vallier L : Targeted gene correction of α_1 -Antitrypsin deficiency in induced pluripotent stem cells. *Nature* **478** : 391-394, 2011.