

◆トピックス◆

フィブリノゲンの立体構造からみた異常フィブリノゲン

諏 合 輝 子*

The Structure-Function Relationship of Hereditary Dysfibrinogens

Teruko SUGO*

Key words: crystal structure, dysfibrinogen, fragment D, D-dimer polymerization, D:D interface

はじめに

フィブリノゲン (Fbg) は異なる 3 本鎖ポリペプチドが、ジスルフィド (S-S) 結合により相互に連結し、2 量体 ($A\alpha B\beta\gamma$)₂ を形成している 340-kDa の糖蛋白質である (表 1)。6 個のアミノ末端が集まった central domain (fragment E) と 2 個の 86-kD の D 領域 (Fragment D) が D-E-D と左右対照に位置し、3 本鎖のらせん構造 “coiled coil” が D-E 間を連結する “3-nodule” 構造であることが電子顕微鏡解析により明らかにされている。Fbg はトロンビンにより central domain からフィブリノペプチド (FP) A および B を遊離し、フィブリン (Fbn) 重合反応 (分子間 E:D 結合, D:D 結合による 2 本鎖 protofibril 形成と、引き続く α 鎖カルボキシ末端領域 (α C-domain) を介した Lateral association) と Fbn 間架橋反応により、太い Fbn 線維からなる Fbn matrix を形成する。最近、2 つのグループにより Fbg 分子の一部分、 γ 鎖 C 末端領域 30-kD 部分 (Fbg γ C30), coiled coil 領域を含む fragment D, およびその架橋分子 D-dimer (D-D) などの 2.1~2.9 分解能での X 線結晶解析が報告され、従来分子レベルで

特定されていなかった、E:D 結合, D:D 結合, Ca^{2+} 結合を構成する Fbg の立体構造が明らかとなった。本稿では、主に立体構造から見た分子間 E:D 結合, D:D 結合, Ca^{2+} 結合を中心に述べる。

Fragment D の構造

結晶解析に用いた Fragment D は、 α 鎖 (111~197, 87 残基), β 鎖 (134~461, 328 残基), γ 鎖 (88~406, 319 残基) からなる 86-kD の約 130 Å 長さのトリプシン消化断片で、各鎖 N 末や γ 鎖 C 末数十残基を除いた 683 残基のアミノ酸の立体座標が決定された。Fragment D は、 $\alpha\beta\gamma$ 鎖からなる coiled coil 構造、その終点地点にそれぞれの鎖が結合する S-S-架橋領域、さらにその C 末端側に β , γ 鎖のそれぞれ独立した球状領域が 130 度の角度に離れて位置した全長 130 Å の分子である。 α 鎖は S-S-架橋領域後一部 4 本目の helix として coiled coil 領域に戻るが、C 末端側 10 残基は helix 構造がくずれている。 $\beta\gamma$ 鎖の C 末端球状領域は helix, β sheet の loop 構造などが複雑に組み合わされているよく似た立体構造である。特に、両鎖間で対応す

* 自治医科大学止血血拴 [〒 329-0498 栃木県河内郡南河内町薬師寺 3311-1]

Division of Hemostasis and Thrombosis Research, Institute of Hematology, Jichi Medical School (3311-1 Yakushiji Minamikawachi-Machi, Kawachi-Gun, Tochigi-Ken 329-0498, Japan)

表 1 フィブリノゲン・メモ

染色体局在部位 遺伝子構造	第4染色体長腕遠位側1/3に5'→3'方向、 $\gamma \rightarrow \alpha \rightarrow \beta$ の順に存在するが、 β は3'→5'の逆方向に配置。 α (5 exons), β (8 exons), γ (10 exons)
分子量	(A α -B β - γ) ₂ の形で3.4×10 ⁵ A α 鎖 (6.7×10 ⁴), B β 鎖 (5.6×10 ⁴), γ 鎖 (4.75×10 ⁴)
アミノ酸残基数	A α 鎖 (160 残基), B β 鎖 (461 残基), γ 鎖 (411 残基), 正常分子の約3%は γ' 鎖 (427 残基)を持つ。
糖鎖及び修飾アミノ酸	糖鎖附加…… β 鎖 (Asn-364), γ 鎖 (Asn-52) リン酸化……A α 鎖 (Ser-3), A α 鎖 (Ser-345) 水酸化……B β 鎖 (Pro-31) 硫酸化…… γ' 鎖 (Tyr-418, Tyr-422)
ドメイン構造	E-domain D-domain α C-domain
主な生合成部位	肝臓
血漿濃度	2-3 mg/ml
生理機能	1) トロンビンにより架橋化フィブリン線維を形成。 2) 血小板凝集の cofactor。 3) 2次線溶の cofactor。 4) ある種のフィブリンによる細胞接着, 伸展, 移動活性など, 炎症反応の防御や組織修復に関与。
レセプター・結合蛋白質	血小板膜糖蛋白質 (GP II b/III a) 遺伝子異常報告は約260例。
先天性欠損症・異常症	異常蛋白質の報告例としては, アミノ酸置換 (44例), 蛋白質一部欠失 (6例), 新規ペプチド附加 (1例)

る220アミノ酸を重ね合わせたときのC α 原子間の平均2乗偏位値 (RMSD) は1.42Åであり, 両領域の立体構造は非常に似ていると言える (図1a)。従って両鎖C末領域には, FPA, Bの放出に伴いFbna β 鎖のN末端に露呈されるGPR (a-knob), GHR (b-knob) 配列が結合するくぼみ (Hole) と, Ca²⁺結合部位がそれぞれ存在する。実際, 両ペプチド, Ca²⁺とを共存させて結晶化したfragment Dは, それぞれのリガンドが想定結合部位に結合していることが明らかにされた。しかし, β 鎖のGHR結合は γ 鎖のGPR結合と比べて弱く, b-holeの入り口近くにはN-linked糖鎖が存在すること, GHRペプチドはE:D結合を阻害しないことなどを考慮すると, GHR配列の β 鎖holeへの結合がE:D結合に必須反応である可能性は低い。

分子間E:D結合

'A'反応基のGPR配列, これと相補的に働くD領域の反応基'a'との反応は, 'A-a'として従来E:D分子間結合を担うものと知られている。Recombinant Fbg γ C30 (γ 143V~411Val)とGPRP-amideの共結晶の2.1Å分解能での解析により, D領域の反応基'a'の実体は図1bに示したように, γ C末端近傍にGPRが入り込む狭いスペースの“Hole“であることが判明した。Glyの α アミノ基は γ 330D, γ 364Dと, Argのグアニジド基は γ 329Q, γ 330Dと, γ 340Hは γ 330Dと水素結合を形成し, ペプチドがそれらの残基に非常に近接した位置で結合している。GPR側にアミノ酸置換がある異常Fbg (G→V, P→L, R→S, N, G)では, holeスペース('a')に入りきれないか, holeスペースを埋めきれないために正常な水素結合を形成できず, 分子間E:D結合が阻害されるこ

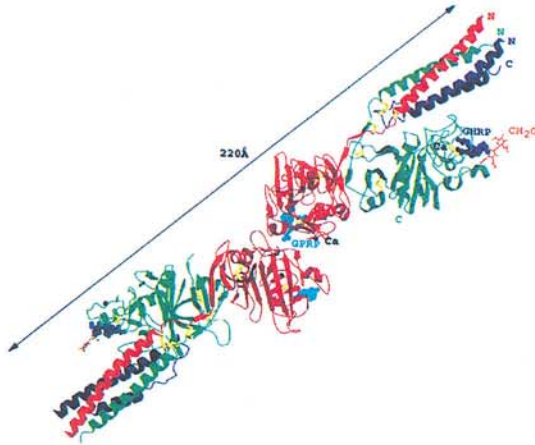


図 1a 2種類のリガンドとCa²⁺が結合したD-dimerのα-carbon骨格図 (Everse, et al. Biochemistry 1998より 転載許可取得)

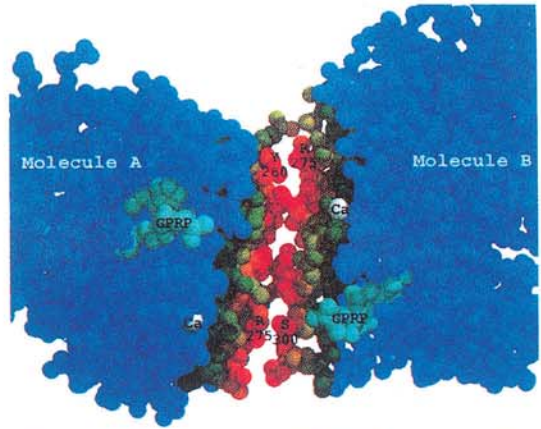


図 1c D:D interfaceの立体充填図 end-to-endで接合した2つのfragment Dのうち、もっとも接合面に近い残基を濃い赤色で接合面から遠ざかるにつれて緑色になるように色分けした。(Spraggon, et al. Nature 1998 転載許可)

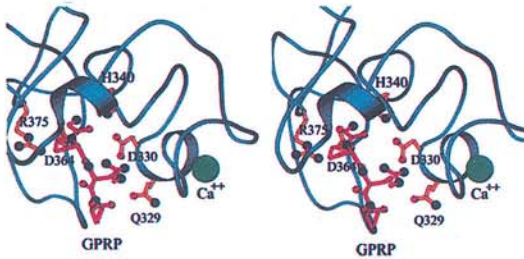
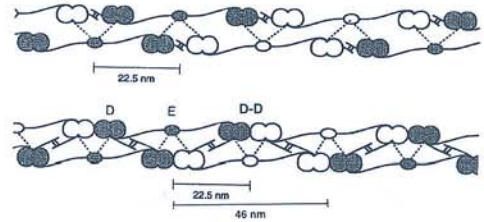


図 1b γ鎖の'a'重合部位の立体透視図 'A'部位としてのGPRPはピンクに、'a'重合部位に関与する残基とγ375は黄色に、Ca²⁺は緑色に彩色した。(Cote, et al. Blood 1998より 転載許可取得)

Longitudinal (end-to-end)



Transverse (side by side)

図 1d 2つのγ-γ架橋結合説 (Mosesson et al. J. Struct Biol. 1995より改変)

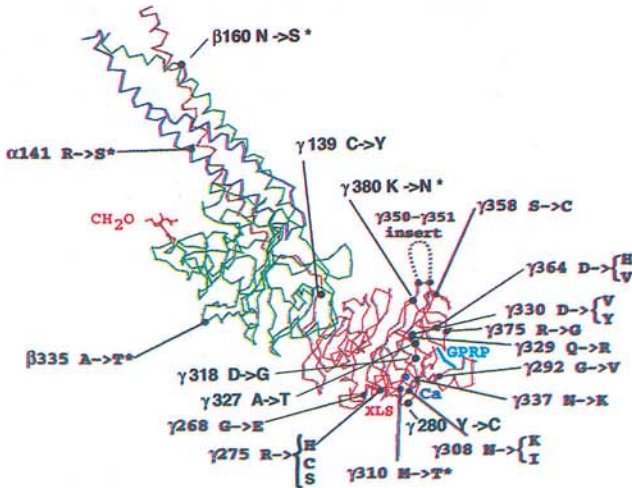


図 2 fragment D上の異常Fbgの異常部位。α鎖は青、β鎖は緑、γ鎖は赤でペプチドを色分けしてある。2残基前に余剰糖鎖がつくアミノ酸には*印を、架橋結合部位はXLSと記入。(Everse et al. Thromb. Haemost. 1998より加筆改変)

となる。同様に D 領域側の $\gamma 329Q \rightarrow R$, $\gamma 330D \rightarrow Y$, $\gamma 364D \rightarrow H$, V 置換の異常 Fbg も分子間 E:D 結合が阻害すると予想され, 実際, これらの異常分子では Fbn 重合障害があり, 立体構造モデルでの予想と一致した。

分子間 D:D 結合

2 本鎖 protofibril の形成は, 異なる Fbn モノマーの E:D 結合を起点に, D 領域 γ 鎖 C 末端領域が互いに反対方向 (end-to-end) に近接してならば, 分子間 D:D 結合が形成されることにより急速に伸展する。分子間 D:D 結合構造は, XIIIa 因子により架橋された Fbn をトリプシン消化して得られた D-dimer と GPRP-amide の共結晶の X 線結晶解析から明らかにされた。D-dimer は 2 つの γ 鎖 C 末端領域を中心に 2 分子の fragment D が 180 度の角度に配列する非対称の全長 220 Å の分子である。両領域上の 2 つの GPRP-amide 結合部位は同一方向に面している。D:D 結合の接合面 (D:D interface) にはある程度の溶媒が入り込める隙間が存在するが, 両サイドの多くのアミノ酸間の水素結合により密接に結合している。しかし, A 分子側の $\gamma 275R$ は B 分子側の $\gamma 300S$, B 分子側の $\gamma 275R$ は A 分子側の $\gamma 280Y$ など, 水素結合の相手は分子間で異なる非対称結合である。従って, D:D interface やその近傍に位置するアミノ酸が別のアミノ酸に置換した場合, 正規の水素結合が形成されず D:D 結合が阻害されることが推定される。実際, 接合面で中心的役割を果たす $\gamma 275R$ が C, H, S に置換した異常 Fbg では, E:D 結合は正常に進むが D:D 結合は阻害されると報告されている。 $\gamma 275R \rightarrow C$ 置換の場合, $\gamma 275C$ に S-S 結合で Cys などの余分な分子を持つが, それらが interface に存在することはスペース上困難であり, D:D 結合を阻害する原因であると推定されたが, $\gamma 275R \rightarrow H$ や S 置換した場合, 立体構造モデルでは正規の水素結合に近い水素結合をとることが可

能で, 重合障害を示す異常分子の実体に一致しなかった。同様の方法で interface の極近傍に存在するアミノ酸置換分子を推定すると, $\gamma 308N \rightarrow I$ の場合, Ile の側鎖はどのような立体構造も interface と衝突することが判明し, また $\gamma 308N \rightarrow K$ 置換では, Lys が $\gamma 321$ の Lys と電気的反発を起こすことが予想され異常分子の重合障害を説明できた。さらに, $\gamma 310M \rightarrow T$ による置換で $\gamma 308N$ に余剰糖鎖を附加される場合, $\gamma 275R \rightarrow C$ の場合と同様に接合面間に糖鎖が存在するには分子が大きすぎることも, また, 余剰糖鎖は γ 鎖間架橋結合基 $\gamma Q398$ の近傍に到達可能であることが推定された。実際, この異常分子は他の γ 鎖異常分子と異なり, 重合障害ばかりでなく強い γ 鎖間架橋結合障害があり, 立体構造モデルでの異常機能推定が有効であることが実感できた。

γ - γ 架橋結合

Fbn モノマーが半分子長ずれあった 2 本鎖 protofibril は, γ 鎖間架橋結合 ($\gamma Q398$ - $\gamma K407$) により, 安定な Fbn 線維を形成する。この反応は, D:E 結合や D:D 結合に依存しない反応であり, 同じ protofibril 上の隣り合った D 領域間架橋 (Longitudinal) 説と, 異なる protofibril 上の D 領域間 (Transverse) 説が提唱され論争されてきた (図 1d)*。非対称に結合した D-dimer の立体構造は Longitudinal 説を支持するが, D-dimer の γ 鎖 C 末端約 10 残基の座標は双方とも決定されていないために, どの fragment D の γ - γ 鎖間架橋結合なのか特定できていない。従って, 両 C 末端約 10 残基のとり得る構造の長さを考慮すると, 異なる protofibril 間 γ - γ 架橋結合も可能性があり, Transverse 説は否定できない。

Ca イオン結合

Fbg の fragment D 内には 1 個の高親和性

表2 フィブリノゲン異常症

α 鎖		β 鎖		名称	γ 鎖		名称
位置	置換	位置	置換		位置	置換	
7	D→N	14	R→C	Christchurch	139	C→Y	Pretoria**
11	E→G	15	G→C	伊勢ほか	268	G→E	倉敷
12	G→V	44	R→C	Nijmegen	275	R→C	東京II他
16	R→C	68	A→T	Naples		R→H	佐賀他
	R→H	160	N→S	新潟		R→S	鴨川
17	G→V	335	A→T	Pontoise	280	Y→C	Banks Peninsula
18	P→L	462	stop→K	大阪VI**	284	G→R	Brescia
19	R→S		12 残基附加		292	G→V	Baltimore I
	R→N	G 9-L 72	Deletion	New York I	308	N→K	京都I他
	R→G	(Exon 2)				N→I	Baltimore III
20	V→D				310	M→T	旭
141	R→S				318	D→G	Giessen IV
434	S→N				319-320	deletion	Vlissingen I
526	E→V				327	A→T	東京V**
532	S→C				329	Q→R	名古屋
554	R→C				330	D→Y	京都III
	R→L					D→V	Milano I
					337	N→K	Bern I
					350	Q 後 15 残基附加	Paris I
					358	S→C	Milano VII
					364	D→V	Melun I
						D→H	松本 I
					375	R→G	大阪 V
					380	K→N	Kaiserslautern

塩基の置換・欠失・挿入による frame shift で
 α 鎖が Truncation された例

268 RNPS → QEP stop Otago I

452 GPD → WS-Stop Milano III

461-610 Deletion Margurg I

476 MDLG → HCLA Stop Lincoln

524 ERE → ELS... found in USA*

臨床症状は出血，血栓，創傷治癒不全，Amiloydosis*，無症状などに分けられるが，同置換報告であっても一致しない場合がある。同一複数報告例の場合，初発表例ではなく日本地名のついた報告例を表記している。**未発表

Ca²⁺ 結合部位と複数個の低親和性結合部位が存在する。Ca²⁺ は protofibril の association を促進し Fbn 形成反応を促進するばかりでなく，プラスミンによる Fbn 分解を受けにくい Fbn 構造を保つ働きがある。Ca²⁺ 結合部位は図 1b に示すように GPR 配列の結合する A-hole に近接した位置にあるが，独立した結合部位である。Ca²⁺ は γ 318D, γ 320D, γ 322F, γ 324G の 4 残基と，2 分子の H₂O と 6 配位結合を形成している。従って，これら配位結合の消失につながる γ 318D → GFbg では Ca²⁺ の影響が変化すると予想される。実際， γ 318D → G や γ 319-320 欠失異常 Fbg は高親和性 Ca²⁺ の消失とプラスミン抵抗性弱화가報告されている。同様の変化が認められるものに γ 337N → K と γ 375R → G の異常 Fbg があるが，結晶解析では， γ 337 と γ 375 は直接の Ca²⁺ 結合部位では

なく，高親和性 Ca²⁺ の消失の理由は不明である。しかし，Fbg γ C30-Ca²⁺ の結晶では γ 375 は A-hole の反応基 γ 364D と hole の入り口に位置する γ 297D 双方と水素結合しており， γ 375R → G への変換は A-hole-knob 結合に影響を及ぼし，さらに A-hole に近接する Ca²⁺ 結合部位にも影響を与えた可能性がある。このように機能する高親和性 Ca²⁺ 結合部位は γ 鎖にあるが，立体的相似構造の β 鎖にも Ca²⁺ 結合部位がある。しかし， β 鎖上アミノ酸の配位数は 3 と減少しており，低親和性 Ca²⁺ 結合であると推察できる。その他の低親和性 Ca²⁺ 結合部位は結晶解析では特定できていない。

異常 Fbg 因子

現在までに約 50 種類異常 Fbg 分子の異常部

位が判明している(表2). 異常部位はFPAとその切断部位, α , γ 両鎖の A-Knob-Hole 構成部位, α C 領域, γ 鎖 C 末端部と β 鎖上の 7 例と分類できる. 図 2 示すように, 25 の異常部位が fragment D のペプチド骨格上で示すことができる. FPA や α C 領域は fragment D に含まれないので示していないが, β 鎖異常部位は非常に少なく(7 例), すべての γ 鎖異常部位は C 末端部分に集中していることがわかる. Fbg の立体座標にこうした異常部位アミノ酸を適用し, 置換などによって引き起こされた Fbg 立体構造のゆがみの程度から, なぜ機能異常につながるのかを推察できるようになった. しかし, 立体構造上大きなゆがみを生じない置換, 附加例など, すべての異常 Fbg に適用はできていない. この理由には, 結晶化に用いた蛋白質が酵素消化された蛋白質で, 分解された段階ですでに立体構造が変化した可能性があること, あるいは分子の極一部の蛋白質を用いたために, 本来あるべき領域との間の結合が消失し, 分子の安定化のために別な結合が生じた結晶になった可能性などが挙げられる. Fbg 全体の結晶を用いた X 線結晶解析の結果が待たれるが, Fbg の立体構造と機能の関係を明らかにする有効な手段として, 新たな異常部位を持つ Fbg を発見すること, 異常分子の機能異常をさらに詳細に解析することの重要性を実感している.

謝辞: なお, 本トピックスでは紙面の都合上紹介しなかったが, 結晶解析データをもとに作製した個々の異常フィブリノゲン分子モデルを提供して下さった Dr. Kathleen K. Pratt に深く感謝する.

文 献

- 1) Matsuda M: The structure-function relationship of hereditary dysfibrinogens. *Int. J. Hematology* **64**: 167-179, 1996.
- 2) Spraggon G, Everse SJ, Doolittle RF: Crystal structures of fragment D from human fibrinogen and its crosslinked counterpart from fibrin. *Nature* **389**: 455-462, 1997.
- 3) Everse SJ, Spraggon G, Veerapandian L, Riley M, Doolittle RF: Crystal structure of fragment double-D from human fibrin with two different bound ligands. *Biochemistry* **37**: 8637-8642, 1998.
- 4) Everse SJ, Spraggon G, Doolittle RF: A three-dimensional consideration of variant human fibrinogens. *Thromb Haemost* **80**: 1-9, 1998.
- 5) Côté HCF, Lord ST, Pratt KP: γ -Chain dysfibrinogenemias: molecular structure-function relationships of naturally occurring mutations in the γ -chain of human fibrinogen. *Blood* **92**: 2195-2212, 1998.