

◆トピックス◆

アンチトロンビンのプロテアーゼ阻害機構と
ヘパリンの作用機構

—立体構造で見る動的構造変化—

城 谷 裕 子*, 小 出 武 比 古*

Mechanisms of Protease Inhibition by Antithrombin and Action of Heparin

Hiroko SHIROTANI* and Takehiko KOIDE*

Key words : antithrombin, heparin, protease inhibition, serpin

はじめに

アンチトロンピンは表1に示す特徴をもつ血中セルピン (Serpins, Serine-proteinase inhibitor) で、凝固系の主要な制御因子である¹⁾。アンチトロンピンはヘパリンに高い親和性があり、ヘパリン存在下でトロンピンや Xa 因子に対する阻害速度は、それぞれ1,000倍と300倍に促進されることが良く知られている。これまでの一次構造レベルの解析により、アンチトロンピンのN末端領域にヘパリン結合部位があり、C末端近傍にプロテアーゼとの反応部位 (Arg393-Ser394) があることが明らかにされている²⁾。アンチトロンピンはほかの血中セルピンと同様に三次元構造的には、A, B および C の3方向に大別される逆平行 β -シートからなる多数のストランド (s1A~s4Cと略)、9個の α -ヘリックス (hA~hIと略)とコイル構造部分で構成されるタンパク質である (図1-a)²⁾。最近、Carrellらにより native form と latent form のアンチトロンピンダイマーの2.6Å分解能でのX線結晶構造³⁾や、高親和性ヘパリンのコア

部分のペンタサッカライドとの複合体の2.9Å分解能の結晶構造が報告され⁴⁾、アンチトロンピンとヘパリンの三次元的相互作用部位とヘパリン結合によるアンチトロンピン分子内の動的構造変化が示された。その結果、アンチトロンピンはヘパリン非存在下ではインヒビターとして「不完全な」セルピンであり、ヘパリン存在下ではじめて「完全な」インヒビターになることが明らかになった。本稿では、アンチトロンピンに代表されるセルピンのプロテアーゼ阻害機構の特徴とアンチトロンピンの立体構造にみられる特異的領域の役割について概説し、さらに遺伝的変異体からの情報やヘパリン非依存性に迅速にプロテアーゼを阻害できる α_1 -アンチトリプシンの立体構造との比較から、アンチトロンピンのヘパリン依存性プロテアーゼ阻害における動的構造変化について解説する。

1. プロテアーゼ阻害機構—アシル結合の形成と反応ループの動的構造変化

セルピンがプロテアーゼインヒビターとして

* 姫路工業大学・理学部・生命科学科・生体物質化学II講座 [〒678-1297 兵庫県赤穂郡上郡町播磨科学公園都市] Department of Life Science, Faculty of Science, Himeji Institute of Technology [Harima Science Garden City, Kamigori-cho, Ako-gun, Hyogo 678-1297]

表1 アンチトロンビン・メモ

別 称	アンチトロンビンIII (略号) AT または ATIII
生理機能	血液凝固の制御, 特に, Xa 因子とトロンビンの阻害 ヘパリンの存在下で阻害速度は著しく促進される
分子 量	58,000 (SDS-PAGE) 50,000 (cDNA からの推定)+15% 糖鎖
総アミノ酸残基数	432
ドメイン構造	分子内にドメイン構造はない。しかし, 分子全体として他の多くの蛋白質 と共通構造を有し, セルピン・スーパーファミリーを形成している。
糖鎖などの修飾アミノ酸	Asn 結合型複合型糖鎖が4カ所 (Asn96, Asn135, Asn155, Asn192) 血中アンチトロンビンの5~10% には Asn135 に糖鎖が付加されていない (アンチトロンビン β)
ヒト染色体部位	1q23-25
遺伝子構造	13,480 pb 7エクソン (ただし, 1, 2, 3A, 3B, 4, 5, 6)
血漿濃度	150 mg/l, 2.6 μ M
欠 乏 症	静脈血栓症
血漿中の半減期	2.83 日 ^{*)} ヘパリン治療中の血栓症患者までは, 2.13 日
生合成の場所	肝細胞
局在場所	血中
レセプターおよび 結合蛋白質	LRP (LDL レセプター関連タンパク質), SEC レセプター

機能する際、反応ループ (reactive loop) に大きな構造変化がおこる。つまり、図 1-a に示すように分子表面に突出している反応ループが標的プロテアーゼの「基質」として認識され、反応部位 (P1-P1') (アンチトロンビンでは Arg393-Ser394) のペプチド結合がプロテアーゼにより切断される。この際、P1 位 Arg393 のカルボニル炭素とプロテアーゼの活性中心 Ser195 の水酸基の酸素との間にアシル結合が形成されてアシル酵素複合体となると同時に、図 1-b に示すように、切断された反応ループの N 末端側 15 残基 (P1~P15) が s3A と s5A 間に入り込み、新たなストランド (s4A) となる。この際 P1 位の Arg393 はプロテアーゼを伴って、アンチトロンビン分子の端から端まで約 70 Å 移動する。この動的変化がプロテアーゼとの安定な複合体形成に重要と考えられている。アンチトロンビンや PAI-1 (プラスミノゲンアクチベーターインヒビター 1) では反応部位が切断されていないにもかかわらず、s4A として分子内に挿入された latent form の存在も知

られており、s4A の形成がセルピンの安定な構造と考えられている (図 1-c)。

2. 反応ループと近位ヒンジ領域

α_1 -アンチトリプシン (native form) の反応ループは、図 2-c に示すように分子表面に完全に露出しており、P1 位 Met358 の側鎖が分子の外側に配向され、セリンプロテアーゼの活性部位と相補的なコンフォメーションを形成しているので、プロテアーゼとの反応性が高く、切断後の反応ループの分子内挿入が起こりやすい。しかし、アンチトロンビンの P1 位 Arg393 の側鎖は分子の内側に配向されているためプロテアーゼとの反応性がきわめて低い (図 2-a)。さらに重要なことに、アンチトロンビンの反応ループは P14 位 (Ser380, 緑色の球) と P15 位 (Gly379, 黒色の球) においてストランド内へ入り込んでいるため、ストランドに歪みを与え、切断された反応ループの挿入も起こりにくい⁴⁾。ヘパリンがアンチトロンビンに結合する

と分子中の様々な部位で構造変化が起こるが、この P14・P15 位のアミノ酸はヘパリン結合のアロステリック的影響を受けてストランド内から押し出され、 α_1 -アンチトリプシンの native form と同じ位置に移行する (図 2-b, c, 後述)。この部位を含む P15~P10 位は、近位ヒンジ領域 (proximal hinge) と呼ばれ、反応ループが s4A として入り込む際のヒンジ (蝶番) の役割を担っている²⁾。近位ヒンジ領域には、アミノ酸側鎖の比較的小きな残基が多く存在し、遺伝的変異によって側鎖の大きなアミノ酸に置換されると [例えばアンチトロンビン Hamilton (P12 位, Ala382 → Thr), Charleville (P10 位, Ala384 → Pro), Cambridge II (P10 位, Ala384 → Ser) など], プロテアーゼに対する阻害活性を喪失し、基質化することが知られている。つまり、近位ヒンジ領域におけるアミノ酸変異により反応ループの分子内挿入が妨害されるという知見も、この領域が反応ループの挿入に重要な役割を果たしていることを示唆している。

3. 遠位ヒンジ領域

近位ヒンジ領域に対し、プロテアーゼにより切断された反応ループの C 末側領域の動的構造変化に関わるのが遠位ヒンジ領域 (distal hinge) で、アンチトロンビンの Pro397~Pro407 (s1C) がそれに相当する。遠位ヒンジ領域を含む Phe402~Pro429 に変異をもつアンチトロンビン欠乏症では、トロンビンとの相互作用やヘパリン結合能の減少と共に血中抗原量の減少も見られることから、Lane らは「多面的影響型 (pleiotropic effect-type, PE 型)」変異と呼ぶことを提唱している⁵⁾。PE 型変異アンチトロンビンの分子病因は、反応部位の立体構造への影響や SEC レセプターによる代謝、分子のフォールディング異常による分泌障害、さらに立体構造上は遠隔であるがヘパリン結合領域へも影響を及ぼすことが推察されているが、不明な点が多い。そこでわれわれは、3 種の代表

的 PE 型変異アンチトロンビン [Oslo 型 (Ala404 → Thr), Kyoto 型 (Arg406 → Met), Utah 型 (Pro407 → Leu)] を培養細胞系で発現し、その分泌と機能解析を行った⁶⁾。その結果、Oslo 型は分泌は正常だが、ヘパリン結合能やトロンビン阻害活性が皆無であること、Kyoto 型は分泌は正常だが、低機能分子であること、Utah 型は分泌障害となるが、ヘパリン結合能を有することを見だし、これら PE 型変異体は近接した領域の 1 アミノ酸置換体であるにもかかわらず、分泌性と機能的性質がそれぞれ異なることを明らかにした。

4. シャッター領域

上述のように、反応ループはプロテアーゼによって切断を受けると、s3A と s5A 間に s4A として分子内に挿入されるが、これらのストランド間が開く際に関与している領域が hB を中心とするシャッター (shutter) 領域である (図 1-a)。すなわち s3A と s5A 間が開く際には、まず両ストランド間の水素結合が切断された後、これらストランドが hB の溝の上をスライドするが⁷⁾、この領域の「開きやすさ」が反応ループの「入りやすさ」と関係すると考えられている。ごく最近、Carrell らはシャッター領域に変異を持つ異常アンチトロンビン Wobble 型 (Thr85 → Lys) と Wibble 型 (Thr85 → Met) について詳細な解析を行った⁸⁾。Thr85 はすべての動物種のアンチトロンビンにおいて保存されている残基で¹⁾、これが Wobble 型 (Lys) のように側鎖が大きく、極性のあるアミノ酸残基に置換されると不安定化されて、分泌異常となるが、Wibble 型 (Met) のように大きい極性のない側鎖のアミノ酸残基に置換されると正常に分泌されるものの、機能異常となる。さらに Wibble 型はストランドの開閉が曖昧になるため latent form になりやすい。興味深いことに、両変異体共、ヘパリンに対して天然型より高い親和性を示す。つまり、シャッター領域は s3A と s5A 間

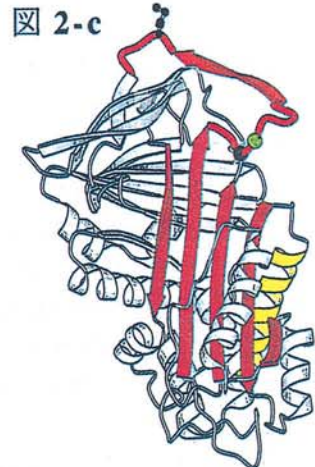
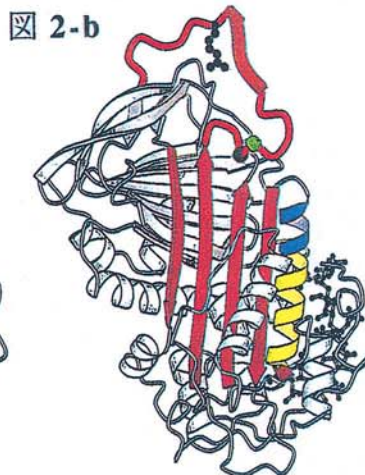
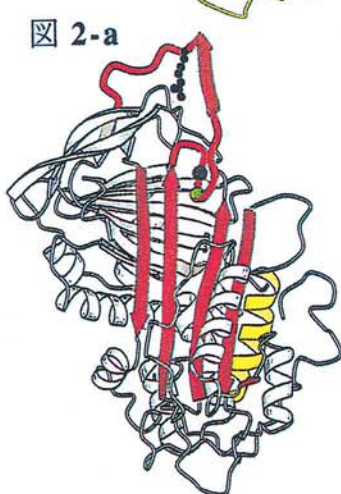
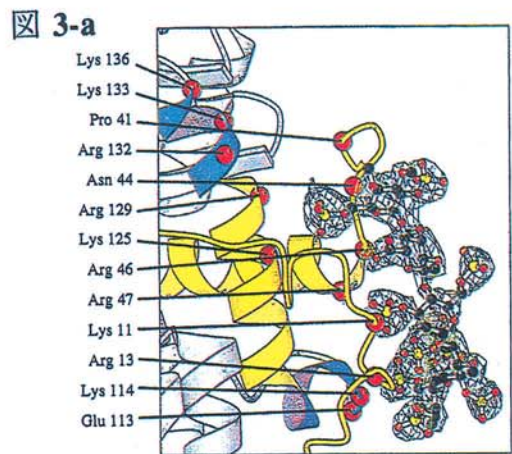
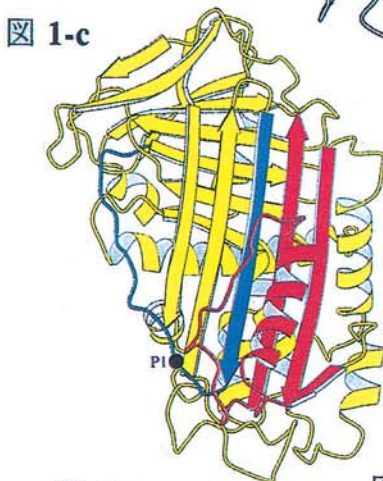
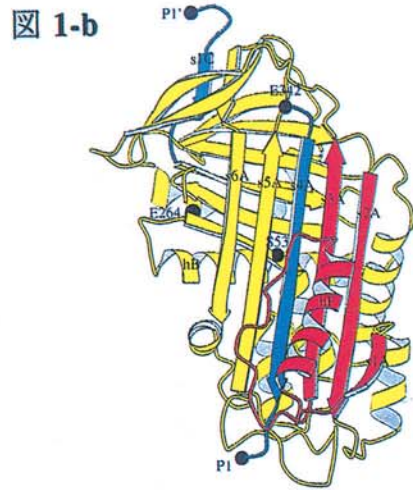
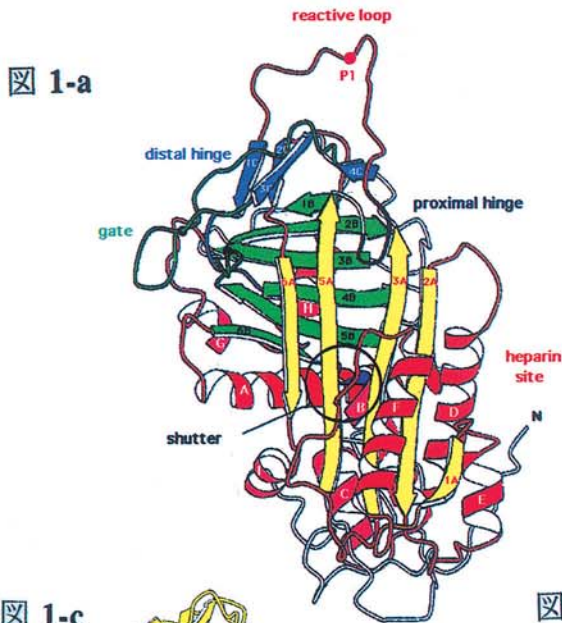
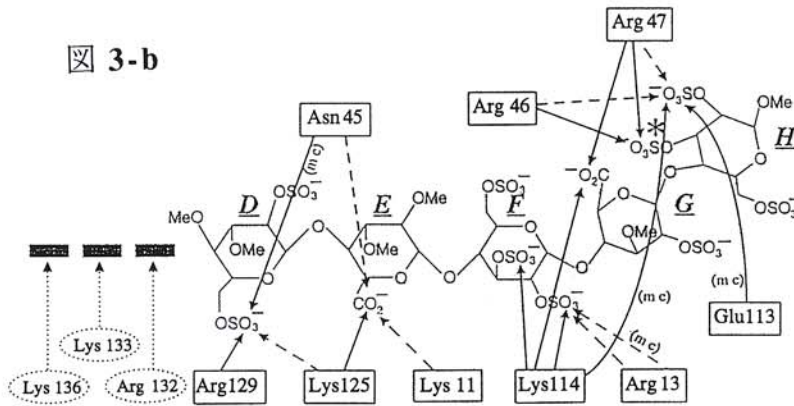


図 3-b



- 図 1-a アンチトロンビンの native form²⁾ (Stein PE, Carrell RW, Nature Struct Biol 2:96-113, 1995 より改変して引用).
ヘリックス A~I は赤色のリボンで、ストランド A (1A~6A) は黄色、ストランド B (1B~6B) は緑色、ストランド C (1C~4C) は青色で示した。
- 図 1-b α_1 -アンチトリプシンの cleaved form²⁾ (Stein PE, Carrell RW, Nature Struct Biol 2:96-113, 1995 より引用)
- 図 1-c プラスミノノーゲンアクチベーターインヒビター 1 の latent form²⁾ (Stein PE, Carrell RW, Nature Struct Biol 2:96-113, 1995 より引用)
- 図 2-a アンチトロンビンの native form⁴⁾. (Jin L et al., Proc Natl Acad Sci USA 94:14683-14988, 1997 より引用)
反応部位の P1 位の側鎖を ball-stick モデルで示す。アンチトロンビンの P1 位 Arg の側鎖は分子の内側を向いている。
- 図 2-b ペンタサッカライドの結合により起こるアンチトロンビンの構造変化⁴⁾ (Jin L et al., Proc Natl Acad Sci USA 94:14683-14988, 1997 より引用)
ペンタサッカライドの結合により hD (黄色)の青色で示した部分が伸長し、内側のストランド 2A と 3A を押すため、P14 位 (緑色の球) と P15 位 (黒色の球) の残基がストランド内から押し出される。
- 図 2-c α_1 -アンチトリプシンの native form⁴⁾ (Jin L et al., Proc Natl Acad Sci USA 94:14683-14988, 1997 より引用)
反応部位の P1 位の側鎖を ball-stick モデルで示す。反応部位の P1 位 Met の側鎖は分子の外側を向いているため、プロテアーゼと迅速に反応できる。
- 図 3-a ペンタサッカライドとアンチトロンビンの結合領域⁴⁾ (Jin L et al., Proc Natl Acad Sci USA 94:14683-14988, 1997 より引用)
結合部位を黄色と青色 (ペンタサッカライドの結合により生じる 2 つのヘリックス; hD の C 末側と N 末側 (P-ヘリックス)) で示す。
- 図 3-b ペンタサッカライドとアンチトロンビンの水素結合⁴⁾ (Jin L et al., Proc Natl Acad Sci USA 94:14683-14988, 1997 より引用)
ペンタサッカライドへの水素結合を実線、可能性のある水素結合を破線で、mc はペプチド主鎖とペンタサッカライドの水素結合を示す。Arg132, Lys133, Lys136 はペンタサッカライドから離れているため水素結合の範囲外であるが、長鎖ヘパリンとは相互作用する可能性がある。

の開閉に影響を与え、さらにヘパリンとの結合やアンチトロンビンの活性にも影響を与える重要な領域である。

5. ヘパリン結合によるアンチトロンビンの動的構造変化とプロテアーゼ阻害活性の促進

これまでアンチトロンビンのヘパリン結合領域は、アンチトロンビン富山(Arg47 → Cys)な

どの異常症例の解析や化学修飾実験, さらには部位特異的変異体の解析によって, hA と hD に存在する塩基性アミノ酸残基群であることが明らかにされてきたが¹⁾, 前述の Carrell らによる X 線結晶構造解析によって⁴⁾, アンチトロンビンのヘパリン由来ペントサッカライド結合部位は, hD (Lys125 や Arg129 の側鎖), hA (Arg46 や Arg47 の側鎖, および Asn45 の主鎖アミド), N 末端領域 (Lys11, Arg13 の側鎖と主鎖アミド) および hC と hD 間にペントサッカライド結合により新生する「P-ヘリックス」(P はペントサッカライドに由来する) 中の Glu113 の主鎖アミドと Lys114 の側鎖および主鎖アミドであることが明らかになった (図 3-a). ペントサッカライドが接触すると, Arg46 と Arg47 はそれぞれ 17 Å と 8 Å 移動して糖鎖の硫酸基と水素結合を形成する. また, hD は s2A と s3A を押す方向へ約 10° 傾き, その N 末端側の Glu113~Gln118 のコイル構造が 2 回転の hP となり, hD に対して直角方向に形成される. さらに, hD の C 末端側も 1.5 回転分のヘリックスが形成されて, Arg132, Lys133, Lys136 の側鎖がペントサッカライド結合部位の方向を向くようになる. これらの残基はペントサッカライドとは離れているので, 両者の間に水素結合は形成されないが, 長鎖ヘパリンとは相互作用する可能性が高いと考えられている (図 3-b). また, hD が伸長することによるアロステリック効果で, 上述した native form (図 2-a) ではストランド内に入り込んでいた反応ループ内の P14・P15 位のアミノ酸残基が押し出され, ストランドの歪みがなくなるとともに P1 位 Arg393 の側鎖が分子の外側を向くようになり, インヒビターとして反応しやすい形に変換される⁹⁾ (図 2-b). また, アンチトロンビンの N 末端部分 (Ile22~Arg46) は, ペントサッカライドが結合すると大きく移動してアンチトロンビン-ペントサッカライド複合体を安定化する, 立体的なゲートとしての役割を担っている¹⁰⁾.

アンチトロンビンの native form と latent

form の立体構造を比較すると, native form の hD はわずかにねじれており, ヘパリン結合部位である Arg47, Lys125 および Arg129 はペントサッカライド結合領域の方向を向き, Arg129 の N^ε 基は Glu414 の側鎖と水素結合を形成して側鎖を安定化することにより, ペントサッカライドの硫酸基とイオ的な相互作用をしやすくしている. しかし, latent form では, hD はまっすぐに伸び, Arg47 は Ser112 と Lys125 は Ile7 と Arg129 は Asn45 と水素結合しており, ヘパリン結合に重要なアミノ酸残基の領域はすべてヘパリン結合領域の方向に向いていない³⁾.

おわりに

最近の X 線結晶構造解析によりアンチトロンビンの立体構造とヘパリン依存性の活性促進機構が明らかになった. アンチトロンビンの生理機能の発現にヘパリンが必要とされる理由は, 1) 反応部位の P1 位 Arg393 の側鎖が分子内部に配向されているため, プロテアーゼと反応しにくい, 2) 反応ループの一部 (P14 位と P15 位) がストランド内に入り込み, ストランドに歪みを与えているため, 切断後に反応ループが挿入されにくい, 3) 近位ヒンジ領域, 遠位ヒンジ領域およびシャッター領域が反応部位切断後の立体構造変化に深く関与している, 4) hA と hD の塩基性アミノ酸残基の側鎖がヘパリン中の硫酸基を捕捉する方向へ配置されており, ヘパリンとの結合後はそれを安定化し, プロテアーゼとの反応性を高めるような構造変化が起こることなどが挙げられる. これらは, アンチトロンビンが生理的にはヘパリン存在下でのみ阻害機能を発揮するように, 進化の過程で巧妙にデザインされてきたことを示している. これまで平面的にしか考えられなかったプロテアーゼとインヒビターの反応機構を今後は立体的かつ動的変化として捉えていくことができるようになった.

文 献

- 1) 小出武比古: Antithrombin. 動脈硬化 **23**: 573-579, 1996.
- 2) Stein PE, Carrell RW: What do dysfunctional serpins tell us about molecular mobility and diseases? *Nature Struct Biol* **2**: 96-113, 1995.
- 3) Skinner R, Abrahams J-P, Whisstock JC, Lesk AM, Carrell RW, Wardell MR: The 2.6 Å structure of antithrombin indicates a conformational change at the heparin binding site. *J Mol Biol* **266**: 601-609, 1997.
- 4) Jin L, Abrahams JP, Skinner R, Petitou M, Pike RN, Carrell RW: The anticoagulant activation of antithrombin by heparin. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 14683-14988, 1997.
- 5) Lane DA, Olds RJ, Conard J, Boisclair M, Bock SC, Hultin M, Abildgaard U, Ireland H, Thompson E, Sas G, Horellou MH, Tamponi G, Thein S-L: Pleiotropic Effects of antithrombin strand 1C substitution mutations. *J Clin Invest* **90**: 2422-2433, 1992.
- 6) Shirotani H, Tokunaga F, Koide T: Cellular and functional characterization of three recombinant antithrombin mutants that caused pleiotropic effects-type deficiency. *J Biochem*: in press
- 7) Stein P, Chothia C: Serpin tertiary structure transformation. *J Mol Biol* **221**: 615-621, 1991.
- 8) Beauchamp NJ, Pike RN, Daly M, Butler L, Makris M, Dafforn TR, Zhou A, Fitton HL, Preston FE, Peake IR, Carrell RW: Antithrombin Wibble and Wobble (T85M/K): Archetypal conformational diseases with *in vivo* latent-transition, thrombosis, and heparin activation. *Blood* **92**: 2696-2706, 1998.
- 9) Pike RN, Potempa J, Skinner R, Fitton HL, McGraw WT, Travis J, Owen M, Jin L, Carrell RW: Heparin dependent modification of the reactive center arginine of antithrombin and consequent increase in heparin binding affinity. *J Biol Chem* **272**: 19652-19655, 1997.
- 10) Fitton HL, Skinner R, Dafforn TR, Jin L, Pike RN: The N-terminal segment of antithrombin acts a steric gate for the binding of heparin. *Protein science* **7**: 782-788, 1998.