

## 凝固第 Xa 因子の立体構造

鎌田 健司\*<sup>1</sup>, 宮田 敏行\*<sup>2</sup>

Three Dimensional Structure of Blood Coagulation Factor Xa

Kenji KAMATA\*<sup>1</sup> and Toshiyuki MIYATA\*<sup>2</sup>

**Key words:** X-ray crystallography, Factor Xa, domain, three dimensional structure, serine protease

### 1. はじめに

Factor X は表 1 に示す諸性質をもつセリンプロテアーゼ前駆体である。その活性型である Factor Xa はトロンビン産生酵素であるため、抗血栓薬の標的酵素として、その特異的合成阻害剤の開発が進められている。トロンビンは凝固活性以外にトロンビン受容体を介する情報伝達を行なうことが知られているが、Factor Xa も Effector cell protease receptor-1 (EPR-1) を介して細胞に作用し、なかでも血管内皮細胞に対しては NO 産生を促進することが示されている。このように、多機能をもつ Factor Xa の立体構造が、X 線結晶解析の手法で決定された。本稿では、Factor Xa の立体構造をその機能の面から解説し、トロンビンとの相違についても述べたい。

### 2. Factor Xa の全体構造

図 1 に筆者らの解析した、Gla ドメインを取り除いたヒト Factor Xa の構造を示す<sup>1)</sup>。この

構造は、低分子の合成阻害剤 (FX-2212a) との複合体の構造である。Factor Xa は、Gla ドメインと 2 つの EGF ドメイン (EGF 1, EGF2) からなる Light Chain とトリプシン様セリンプロテアーゼドメインである Heavy Chain からなる。このドメイン構成は、ほかの凝固タンパク質である Factor VIIa, Factor IXa そして活性化 Protein C と同様である。Light Chain と Heavy Chain は、一つの S-S 結合で結ばれている。S-S 結合以外にも Light Chain の EGF 2 ドメインとそれに続く C 末端領域は、プロテアーゼドメインと密接に相互作用しており一体化した構造であると考えられる。

EGF1 ドメインは、数残基からなるリンカー部位により EGF2 ドメインと結合している。このリンカー部位は特定の構造を持っておらず、また両ドメイン間にほかの相互作用はないため、構造に自由度がありヒンジ領域となっている。そのため単体の Factor Xa では、EGF 1 ドメインはプロテアーゼ/EGF2 ドメインから突き出している程度自由に動くことができると考えられる。実際ほかの結晶構造解析では、Fac-

\*<sup>1</sup> 萬有製薬創薬研究所創薬推進第一研究室 (〒 300-2611 茨城県つくば市大久保 3)

Drug Discovery Laboratories, Banyu Pharmaceutical Co., Ltd. (Okubo 3, Tsukuba 300-2611, Japan.)

\*<sup>2</sup> 国立循環器病センター研究所脈管生理部 (〒 565-8565 大阪府吹田市藤白台 5-7-1)

Laboratory of Thrombosis Research, National Cardiovascular Center Research Institute (5-7-1, Fujishiro-dai, Suita 565-8565, Japan.)

表1 X因子メモ

別名	Stuart factor, Prower factor
生理機能	プロトロンビン活性化のほか、第VII因子、第VIII因子、プロテインCの活性化を行なう。ニワトリ胚ではウイルス活性化酵素として働く。
分子量	血中には2本鎖(分子量59,000, L鎖17,000+H鎖42,000 (SDS-PAGE))で循環。L鎖15,725, H鎖34,188 (cDNAから推定)+15%糖鎖。
総アミノ酸残基数	L鎖139残基, H鎖306残基。両鎖は1つのS-S結合で結ばれている。H鎖のアミノ末端から52残基が切り離され活性化する。
ドメイン構造	アミノ末端からGlaドメイン, 2つのEGF様ドメイン, セリンプロテアーゼドメインから成る。
糖鎖などのアミノ酸	$\gamma$ -カルボキシグルタミン酸(11残基, 6位, 7位, 14位, 16位, 19位, 20位, 25位, 26位, 29位, 32位), エリスロ $\beta$ ヒドロキシアスパラギン酸(63位), 糖鎖は活性化ペプチド内の4カ所(Thr 159, Thr 171, Asn 181, Asn 191)。
ヒト染色体部位	13q34-ter, 第VII因子遺伝子の2.8 kb下流
遺伝子構造	約25 kb, 8エクソン, 第X因子cDNAの3'非翻訳領域はわずか10 bp。
血漿濃度	8 mg/l, 170 nM
欠乏症	ヘテロ体は無症状が多い。ホモ体もしくは複合ヘテロ体は出血を呈する。
血中半減期	24~40 時間
主な生合成の場所	肝
主な局在場所	血中
レセプターおよび結合蛋白質	Xa因子: 凝固第V/Va因子, Effector cell protease receptor-1 (EPR-1) X因子: CD11b/CD18 (Mac-1)
血中インヒビター	アンチトロンビンIII (ヘパリン存在下1,000倍促進される), 組織因子経路インヒビター (TFPI)
活性化因子	IXa因子, VIIa-組織因子複合体
活性中心残基	His 236, Asp 282, Ser 379

アミノ酸残基番号はLight Chainのアミノ末端Alaを1とし、Light ChainとHeavy Chainのあいだの3残基も含めて、つづき番号で表示した。

tor XaのEGF1ドメインはDisorderしており、その座標は決定されていない。

結晶化のためには取り除かれたGlaドメインは、EGF1ドメインのさらに下方に存在していると考えられ、全体として縦に長い構造をとると予想される。血小板上では、Glaドメインがリン脂質膜に結合し、EGF1, EGF2ドメインを介して活性部位のあるプロテアーゼドメインにつながっている。図1中では、活性部位に赤色CPKモデルで示した阻害剤が結合している。Fluorescence energy transferの実験によると活性部位はリン脂質膜の上方61Åに位置するとされており、図1の構造と矛盾しない<sup>2)</sup>。また、Factor Vaと結合することによってこの距離は69Åに変化する。これはFactor Vaと

の結合によりEGFドメイン間のヒンジ領域が構造変化を起こすためと考えられ、この活性部位の高さの調節がリン脂質膜上での基質プロトロンビンの認識に重要であると予想される。また、プロテアーゼドメインとEGF1ドメインには一つずつカルシウム結合部位が存在し、ピンクで示したカルシウムイオンが結合している。

### 3. Light Chain

GlaドメインとEGFドメインの構造については、本シリーズのほかの総説でくわしいので、本稿ではFactor Xaにおけるこれらのドメインの役割について述べる。

**Glaドメイン:** Factor X/XaのGlaドメイ

ンは、11 個の修飾アミノ酸、 $\gamma$ -カルボキシグルタミン酸を持ち、カルシウムイオン存在下で活性化された血小板のリン脂質膜に Factor X/Xa をアンカリングしていると考えられる。アンカリングによって Factor X/Xa の自由度が減少し、ほかの因子 (VIIa, IXa, Va) との複合体形成を促進する。

**EGF ドメイン:** EGF1 ドメインには、GlnL49, GlyL64, LeuL65 そして修飾アミノ酸  $\beta$ -ヒドロキシアスパラギン酸 HyaL63 からなる高親和性のカルシウム結合部位が一つ存在する。(残基番号の前の L は、Light Chain を示す。以後、Heavy Chain の残基番号はキモトリプシンの残基番号システムを用いる。) NMR を用いたウシ Factor X の構造解析により、カルシウムイオンによって Gla ドメインと EGF1 ドメイン間の相対位置が変化することが示された<sup>3)</sup> (図 2)。このことからカルシウムイオンはドメイン間の構造を安定化しており、リン脂質膜上でプロテアーゼドメインが他因子により活性化を受けたり、プロトロンビンの活性化を正常に行なうために必要な立体構造の保持に不可欠であると考えられる。このように EGF1 および EGF2 ドメインは、リン脂質膜上での足場としての役割をしていると考えられるが、直接これらのドメインに結合する因子は見つかっていない。ただし最近の報告で EGF1 ドメインと EGF2 ドメインを結ぶリンカー部位が EPR-1 との結合部位であることが示唆された<sup>4)</sup>。Factor Xa は EPR-1 に結合することによって免疫細胞や血管内皮細胞の活性化などを行うが、プロトロンビナーゼ複合体の形成にも関与しているという報告もある。このリンカー部位が、構造上フレキシブルであることを考慮すると EPR-1 の結合が Factor Xa の構造を安定化しプロトロンビナーゼ複合体の形成に関与している可能性も考えられる。

## 4. Heavy Chain

### 活性化機構

Factor Xa の Heavy Chain は、トリプシン様のプロテアーゼドメインである。血液凝固カスケードにおいて Factor X は、Factor VIIa/Tissue factor 複合体 (外因系経路) あるいは、Factor IXa/Factor VIIIa 複合体 (内因系経路) によって活性化される。また、ヘビ毒プロテアーゼ (Russell's Viper Venom-X, RVV-X) も Factor X を活性化する。前駆体である Factor X から活性型 Factor Xa への活性化機構は、Factor X の構造解析がなされていないため正確にはわからないが、トリプシンでの機構と同様であると考えられる。すなわち Heavy Chain の N 末端領域に存在する、52 アミノ酸からなる活性化ペプチドが切り取られ、Ile16 で始まる新しい N 末端が生じる。この新たに生じた N 末端領域はタンパク質の内部に折り込まれ、N 末端のアミノ基が Asp194 とイオン結合を形成する。Asp194 は活性セリン Ser195 の隣の残基であり、この結合によって活性部位の構造が完成する。

### サブサイト

血液凝固系ではプロテアーゼ反応をになう酵素のほかに、いろいろな補因子が活性化およびその制御に重要な働きをしている。Factor Xa の活性化は、補因子 Tissue factor と結合した Factor VIIa が形成する外因系 Xase か、補因子 Factor VIIIa と結合した Factor IXa が形成する内因系 Xase が行う。またプロトロンビンの効率的な活性化には、Factor Xa が補因子 Factor Va と結合し、プロトロンビナーゼ複合体を形成することが不可欠である。活性化段階におけるこれらの Xase との結合部位は、Factor X の配列を持つペプチドによる活性化の阻害実験で調べられた<sup>5)</sup>。それらの結果から、これらの因子と相互作用する Factor Xa 上のサブサイトはすべて Heavy Chain に存在すると予想された。実際に活性化因子と複合体を形成す

図 1

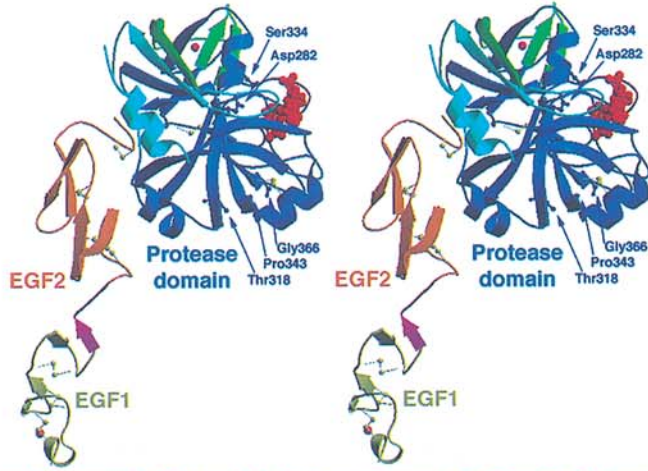
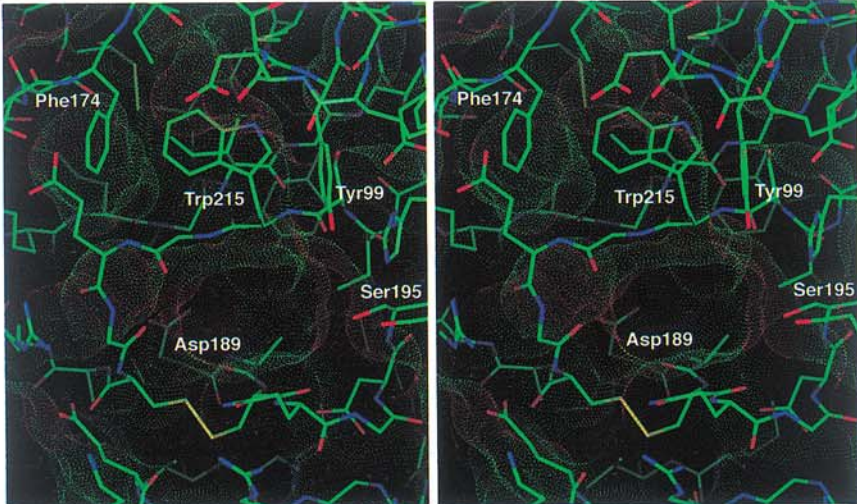
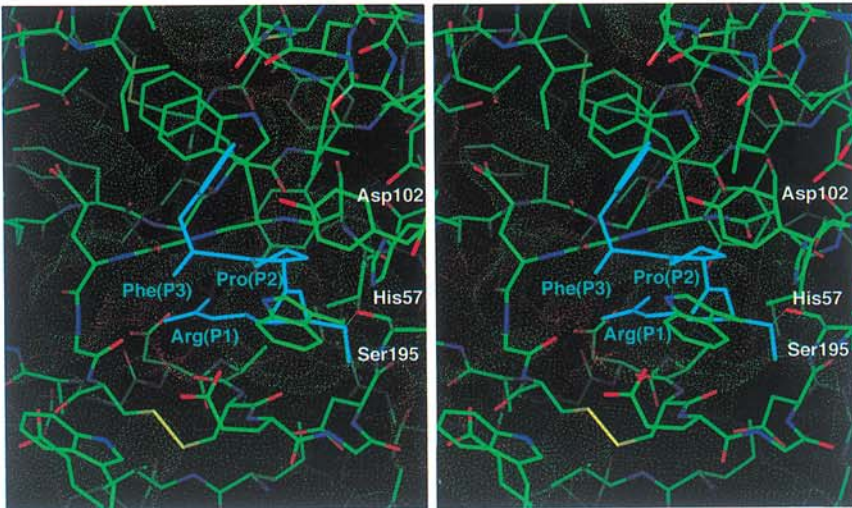


図 3 (a)



(b)



図の説明は次頁

る前駆体 Factor X の構造は明らかでないの  
で, Factor Xa におけるこれらの部位を図 1  
に緑で示した. 活性化因子と結合すると考えら  
れる部位は立体構造上, 近い位置に存在シラス  
ターを形成している. また Factor X の活性化  
は, 補体系の受容体 Mac-1 の結合によって促進  
される. この活性化機構は明らかになっていな  
いが, 受容体 Mac-1 との結合部位もこのドメイ

ンに存在する<sup>6)</sup>.

活性化された Factor Xa がプロトロンビナ  
ーゼ複合体を形成する際に補因子 Factor Va  
と結合するサブサイトも, ペプチドを用いたト  
ロンビン生成の阻害実験できめられた<sup>7)</sup>. 図 1  
にこのサブサイトをシアンで示した. Factor  
Va との結合部位もすべて Heavy Chain に存  
在すると考えられ, これらのサブサイトは, ほ

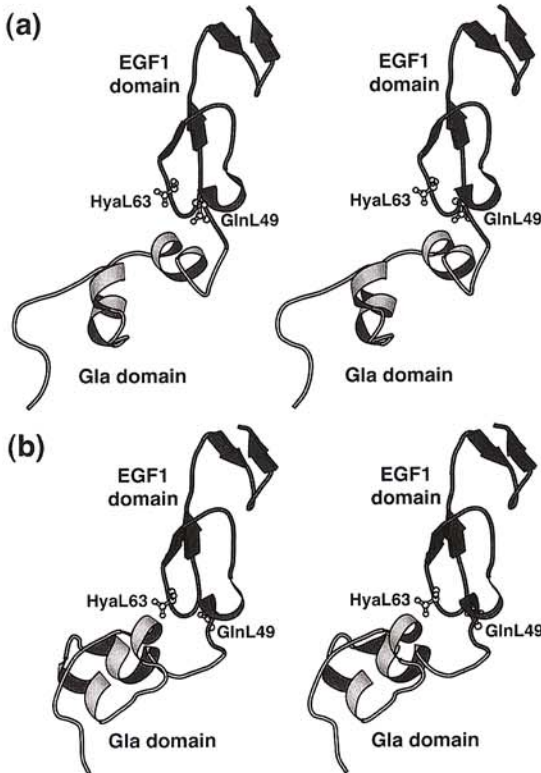


図 2 NMR で決定されたウシ Factor X の Gla ド  
メイン・EGF1 ドメインの構造. (ステレオ図)  
Ca<sup>2+</sup> の結合に関与する残基 GlnL49 と  
Hyal63 を Ball-and-Stick モデルで示す.  
Ca<sup>2+</sup> は NMR では観測できない.  
(a) Ca<sup>2+</sup> 非存在下での構造. PDB: 1WHF  
(b) Ca<sup>2+</sup> 存在下での構造. PDB: 1WHF

図 1 Des[1-44] factor Xa と阻害剤 FX-2212a 複合体の結晶構造 (ステレオ図) Light Chain は, EGF1 ドメイン (黄色リボンモデル), EGF2 ドメイン (オレンジリボンモデル) で構成される. Gla ドメインは結晶化のために切除されている. EGF ドメイン間のリンカー部位 (マゼンタリボンモデル) は EPR-1 の結合部位と考えられる. Heavy Chain のプロテアーゼドメイン (青色リボンモデル) 中, 活性化因子 (Factor VIIa/Tissue factor あるいは Factor IXa/Factor VIIIa 複合体) と相互作用が予想される部位を緑で, プロトロンビナーゼ複合体中で Factor Va と相互作用が予想される部位をシアンで示す. 阻害剤 FX-2212a (赤色 CPK モデル) が活性部位に結合している. EGF1 ドメインとプロテアーゼドメインにカルシウム (ピンク CPK モデル) が結合. 黄色の Ball-and-Stick モデルは S-S 結合を示す. 変異により異常症を引き起こすことの知られているアミノ酸 (残基番号は, キモトリプシンの番号ではなく原文通りの残基番号を示した.) を紺色の Ball-and-Stick で示した. Protein Data Bank (PDB) : 1XKB

図 3 活性部位の構造 (ステレオ図).

Solvent Accesible Surface をドットで示した. 塩基性の部分を青色で, 酸性の部分を赤色で示す.  
(a) Factor Xa, PDB: 1XKA, (b) PPACK の結合したトロンビン, PDB: 1PPB

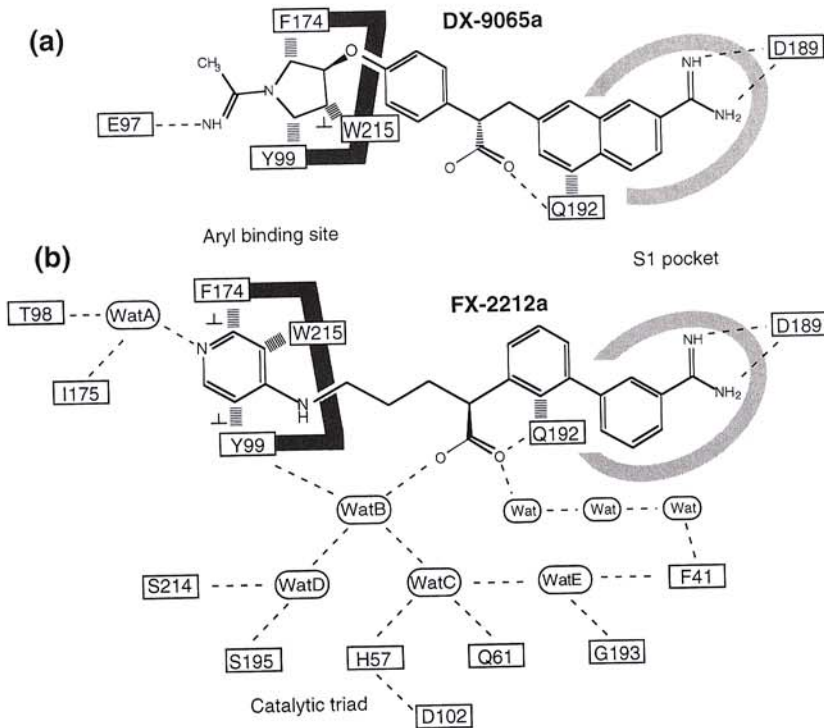


図4 Factor Xa 特異的阻害剤の結合様式の模式図。

水素結合を細い破線で、疎水結合を太い破線で示す。(a) 第一製薬で開発された DX9065a, (2S)-{4-[1-acetimido]- (3S)-pyrrolidiny]-oxyphenyl}-3-(7-amidino-2-naphthyl) propionic acid と (b) 萬有製薬で開発された阻害剤 FX-2212a (2S)-(3'-amidino-3-biphenyl)-5-(4-pyridylamino) pentanoic acid. PDB:1 FAX, 1 XKA, 1 XKB

かの血液凝固系のプロテアーゼに対してアミノ酸配列の相同性が低い領域に存在していた。

### 基質特異性

血液凝固系のプロテアーゼはトリプシン様プロテアーゼであり、すべて同様の骨格構造を持つ。同様の骨格構造をもつプロテアーゼによって、複雑な血液凝固カスケードがきちんと制御され働くのは、それぞれのプロテアーゼが特有の基質特異性を獲得しているからである。解析された構造からそれぞれのプロテアーゼの基質特異性を説明することができる。血中における Factor Xa の基質は、プロトロンビンや Factor VII である。これら基質となるタンパク質の切断部位におけるアミノ酸配列を比較すると、Factor Xa は切断するペプチド結合の一つ前

のアミノ酸残基 (P1 残基) にアルギニン、2つ前の P2 残基にグリシン、P3 残基には水溶性アミノ酸、そして P4 残基には逆に脂溶性アミノ酸へ特異性を示すことがわかる。図3にトロンビンと Factor Xa の活性部位近傍の構造を示す。トロンビンの構造は、基質アナログの D-Phe-Pro-Arg Chloromethylketone (PPACK) との複合体であり、PPACK の結合様式から基質の結合様式が推定できる。ペプチド結合の切断を行うのは Ser195 であり、His57, Asp102 の各残基が電子リレー系を構成している。トロンビンや Factor Xa はともに活性部位の隣に P1 残基であるアルギニンの側鎖が入り込む深い S1 ポケットをもっている。この S1 ポケットの底には負電荷をもつ Asp189 が位置し、アルギ

表 2 アミノ酸置換が同定されている凝固 X 因子異常症

異常 X 因子	アミノ酸置換	置換のある領域	ホモ/ヘテロ	X 因子活性	X 因子抗原量
St Louis II	Gla 7 →Gly	Glaドメイン	ホモ	1~3%	100%
Vorarlberg	Gla 14 →Lys	Glaドメイン	ホモ	5%	20%
Tokyo	Gla 32 →Gln	Glaドメイン	ホモ	2%	85%
Kurayoshi	Arg 139 →Cys	L-chainのC末端	ホモ	31%, 72% <sup>a</sup> , 98% <sup>b</sup>	69%
Stockton	Asp 282 →Asn (活性中心 Asp)	プロテアーゼドメイン	ヘテロ	43%	100%
Roma	Thr 318 →Met	プロテアーゼドメイン	ホモ	3%	80%
Marseille	Ser 334 →Pro	プロテアーゼドメイン	ホモ	21%	107%
Italian	Ser 334 →Pro	プロテアーゼドメイン	ホモ	15~28%	80%
Friuli	Pro 343 →Ser	プロテアーゼドメイン	ホモ	4~9%	100%
Nagoya 2	Gly 366 →Ser	プロテアーゼドメイン	ヘテロ	34%	80%

抗原量がきわめて低下しているX因子欠損症は除いた。アミノ酸番号はL-chainのアミノ末端を1とした。キモトリプシンの残基番号システムではそれぞれ、Asp282→102, Thr318→135, Ser334→152, Pro343→161, Gly366→184である。<sup>a</sup> 組織因子を加えて活性化後, 合成基質で測定。<sup>b</sup> RVV-Xを加えて活性化後, 合成基質で測定。

ニンに対する特異性を決定している。P2 残基の結合する S2 Site は, PPACK のプロリンの結合している位置であると考えられる。Factor Xa の構造ではかさの大きい Tyr99 がその位置をしめており, これが P2 残基がかさの小さいグリシンに制限される理由と考えられる。P3 残基は Factor Xa の主鎖と  $\beta$  シート状の水素結合を形成し, アミノ酸側鎖は水溶液に露出し, P4 残基は, Tyr99, Trp215, Phe174 で形成される Factor Xa に特異的な疎水性ポケット, Aryl Binding Site に結合すると考えられる。

抗血栓薬として Factor Xa に特異的な阻害剤の開発が行われている。現在までに 2 種類の合成阻害剤と Factor Xa の複合体構造が発表されている<sup>118)</sup>。図 4 にそれぞれの阻害剤の結合様式を模式的に示した。どちらの阻害剤も S1 ポケットおよび Aryl Binding Site と相互作用している。これらの構造が, さらに良い阻害剤の開発に有益な情報を提供すると期待される。

#### 不活性化

血中においては, 活性化された Factor Xa は速やかにアンチトロンビン III と Tissue factor pathway inhibitor (TFPI) によって阻害される。これら阻害機構は, 血液凝固系が正しく制御されていく上で重要である。TFPI の第 2 Kunitz ドメインは Factor Xa の活性部位に結

合し阻害するが, TFPI に阻害された Factor Xa の構造は明らかになっていない。トリプシンと TFPI の第 2 Kunitz ドメインの構造解析より, TFPI の結合により Factor Xa の Aryl Binding Site が大きく構造変化を起こすことが予想されている<sup>9)</sup>。

## 5. Factor X 異常症

先天性 Factor X 欠乏症は稀な出血性疾患である。ホモ体もしくは複合ヘテロ体の患者は出血傾向を示すものの, 活性が約 50% に低下するヘテロ体では出血が観察されない。したがって, 欠乏症のほとんどはホモ体もしくは複合ヘテロ体として同定されている。これまでに 26 家系の Factor X 欠乏症の遺伝子解析が終了している。表 2 は, 欠乏症のなかでも, 抗原が存在し活性が低下する異常症 (10 家系) の結果をまとめた。これらのうち, プロテアーゼドメインに同定された 5 つの変異は図 1 に紺色の Ball-and-Stick モデルで示した。Ser334Pro および Pro343Ser (キモトリプシンの残基番号システムでは, それぞれ Ser152, Pro161, この章のみ Light Chain のアミノ末端を 1 とした。) の各変異をもつ Factor X Marseille および Factor X Friuli は, 患者血漿より精製され酵素学的性質が調べ

られている。

Factor X Marseille は、活性化に障害があった。Factor IXa や RVV-X による活性化では、Km 値は変わらないものの kcat が 1/3 に低下した。一方、活性型に変換すると、その合成基質水解活性やプロトロンビン活性化能は正常であった。このことから、活性化における Ser334 の重要性が指摘されている<sup>10)</sup>。Factor X Friuli (Pro343Ser) も活性化に障害が認められた。IXa や VIIa 組織因子複合体による活性化は大きく低下 (75% および 98%) していた。Factor X Marseille と異なる点は、活性型 Factor Xa Friuli はプロトロンビン活性化能が約 1/3 に低下しており、それは主に kcat 値の低下に寄因することであった。

## 6. まとめ

Factor Xa の X 線結晶解析による立体構造の解明により、Factor Xa の厳密な基質特異性を形成する構造要素が明らかとなった。また、Factor V/Va や Factor Xa の特異的レセプター EPR-1 との結合に関与すると考えられる領域の立体構造も明らかとなった。これらの構造情報は、今後 Factor Xa の生理機能に関する研究のみならず、Factor Xa の機能を調節する物質の開発につながるものと考えられる。

## 文 献

- 1) Kamata K, Kawamoto H, Honma T, Iwama T, Kim SH: Structural basis for chemical inhibition of human blood coagulation factor Xa. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**: 6630-6635, 1998.
- 2) Husten EJ, Esmon CT, Johnson AE: The active site of blood coagulation factor Xa. Its distance from the phospholipid surface and its conformational sensitivity to components of the prothrombinase complex. *J Biol Chem* **262**: 12953-12961, 1987.
- 3) Sunnerhagen M, Olah GA, Stenflo J, Forsen S, Drakenberg T, Trewhella J.: The relative orientation of Gla and EGF domains in coagulation factor X is altered by Ca<sup>2+</sup> binding to the first EGF domain. A combined NMR-small angle X-ray scattering study. *Biochemistry* **35**: 11547-11559, 1996.
- 4) Ambrosini G, Plescia J, Chu KC, High KA, Altieri DC: Activation-dependent exposure of the inter-EGF sequence Leu83-Leu88 in factor Xa mediates ligand binding to effector cell protease receptor-1. *J Biol Chem* **272**: 8340-8345, 1997.
- 5) Chattopadhyay A, Fair DS: Molecular recognition in the activation of human blood coagulation factor X. *J. Biol. Chem.* **264**: 11035-11043, 1989.
- 6) Altieri DC, Etingin OR, Fair DS, Brunck TK, Geltosky JE, Hajjar DP, Edgington TS: Structurally homologous ligand binding of integrin Mac-1 and viral glycoprotein C receptors. *Science.* **254**: 1200-1202, 1991.
- 7) Chattopadhyay A, James HL, Fair DS: Molecular recognition sites on factor Xa which participate in the prothrombinase complex. *J Biol Chem* **267**: 12323-12329, 1992.
- 8) Brandstetter H, Kuhne A, Bode W, Huber R, von der Saal W, Wirthensohn K, Engh RA: X-ray structure of active site-inhibited clotting factor Xa. Implications for drug design and substrate recognition. *J Biol Chem* **271**: 29988-29992, 1996.
- 9) Burgering MJ, Orbons LP, van der Doelen A, Mulders J, Theunissen HJ, Grootenhuis PD, Bode W, Huber R, Stubbs MT: The second Kunitz domain of human tissue factor pathway inhibitor: cloning, structure determination and interaction with factor Xa. *J Mol Biol* **269**: 395-407, 1997.
- 10) Bezeaud A, Miyata T, Helley D, Zheng YZ, Kato H, Aillaud MMF, Juhan-Vague I, Guillin MC: Functional consequences of the Ser-334->Pro mutation in a human factor X variant (factor X Marseille). *Eur J Biochem* **234**: 140-147, 1995.