

◆トピックス◆

トロンビン

鈴木宏治*1, 上村みどり*2

Thrombin : Structure-function Relationship

Koji SUZUKI*1 and Midori KAMIMURA*2

Key words : thrombin, 3D structure, structure-function relationship of thrombin, catalytic active center, subsites interacting with substrates

はじめに

トロンビン (α -Thrombin) は血漿蛋白質プロトロンビンの限定分解によって産生されるトリプシン様のセリンプロテアーゼで、表1に示す性質を有する。その生理機能は、表2に示すようにきわめて多様である。すなわち、止血血栓の形成や創傷治癒など生命の維持進展に不可欠な作用を有するとともに、しばしば病的状態下では過剰に産生されて血栓塞栓症の最大の原因になる。また、トロンビンの慢性的な産生亢進は動脈硬化や関節リウマチ、腎炎、神経細胞死等の多くの病態の原因にもなる。こうしたトロンビンの多様な生理的ならびに病理的作用は、いずれもトロンビンがプロテアーゼとして血漿蛋白質や細胞膜受容体を限定分解することによって発現される。しかし、トロンビンの多様な生理活性がどのようなメカニズムで発現されるのかその分子機構は最近まで明らかでなかった。こうしたなか、近年、相次いでトロンビン受容体 (Protease-activable receptor : PAR-1, 3, 4)¹⁾²⁾ が発見され、各組織や細胞に対するトロンビン作用の特異性の一部は、組織特異的な受容

体の存在とそれらの発現量の違いに基づくことが示唆されてきた。また、トロンビンが多様な機能を示すもう一つの理由としては、結晶化 D-Phe-Pro-Arg-chloromethylketone (PPACK)-トロンビンやヒルジン誘導体 (hirulog) 結合トロンビンの X 線解析に基づく 3 次元構造の解析³⁾⁴⁾ や種々のアミノ酸を置換した組換え変異トロンビンの機能の解析^{5)~7)} の結果から、トロンビン分子上に各基質蛋白ごとに特異的に反応するアミノ酸残基が存在するためであることが明らかになってきた。本稿では、こうしたトロンビンの特異な機能の発現に関わる分子内のアミノ酸残基について立体的に眺めることにする。

1. トロンビンの全体的な構造

トロンビンの立体構造には、PPACK-トロンビン複合体 (pdb 1 abj. ent)、トロンボモジュリン (TM) 第 5EGF ドメインペプチド-トロンビン複合体 (pdb 1 hlt. ent)、アルガトロバン (MD-805)-トロンビン複合体 (pdb 1 dwc. ent) 等の複数の X 線結晶構造が提出されており、そ

*1 三重大学医学部分子病態学講座 [〒 514-8507 津市江戸橋 2-174]

Department of Molecular Pathobiology, Mie University School of Medicine [Tsu, Mie 514-8507, Japan.]

*2 帝人(株)創薬第一研究所 [〒 191-8512 東京都日野市旭が丘 4-3-2]

Teijin Institute for Biomedical Research, [Asahigaoka 4-3-2, Hino, Tokyo 191-8512, Japan.]

表1 トロンビンの生化学的性質

別称	α -トロンビン, Factor IIa
生理機能	表2を参照
分子量	35,600 (アミノ酸配列からの推定量: 33,659) A鎖: 4,091 (4,091), B鎖: 31,500 (29,568) Prothrombin: 72,500 (70,559) Meizo-thrombin: 72,500 (70,559) β -thrombin: 34,300 (32,924) γ -thrombin: 31,100 (29,152)
総アミノ酸残基数	295 (A鎖: 36, B鎖: 259)
ドメイン構造	分子内に既知のドメイン構造はないが, 基質や結合蛋白質と相互作用し, 特異的な機能の発現に関わるモジュール構造が存在する (exosite 1, exosite 2 など)。
糖鎖などの修飾アミノ酸等電点	B鎖の Asn53 に分子量約2,000の糖鎖が結合している。 7.5 (ウシ) (ウシプロトロンビン: 4.2~4.3)
ヒト染色体部位	プロトロンビン遺伝子: 11p11-q12
遺伝子構造	プロトロンビン遺伝子 (21 kb, 14 エクソン) のうち, トロンビン mRNA は VIII-XIV エクソンに由来する。
血漿濃度	プロトロンビンとして 1.5 μ M (110 mg/l)。 トロンビン濃度は不明。
欠乏症	15家系以上のプロトロンビン欠損症 (機能異常症) が見つかっている。
血漿中半減期	プロトロンビンとして 60 時間, TAT として 3~12 分。
主な産生場所	プロトロンビンは肝細胞で産生されるが, トロンビンは血小板, 血管内皮細胞, 単球などの血液接触細胞膜の表面の他, 脳神経細胞や線維芽細胞など血液非接触細胞の上に形成されたプロトロンビナーゼによって産生される。
主な局在場所	プロトロンビンは血漿中に存在し, トロンビンは恐らくフィブリンに結合しており, アンチトロンビンで阻害された複合体 (TAT) として血漿中を循環し, SEC レセプター等によって捕らえられて代謝される。
レセプターおよび結合蛋白質	血管内皮細胞上のトロンボモジュリン, 種々の細胞膜上のトロンビンレセプター (PAR-1, PAR-3, PAR-4), 種々のトロンビンインヒビター (アンチトロンビン, ヘパリンコファクター-II, プロテイン C インヒビター, α -アンチトリプシン, プロテアーゼネキシンなど), 血小板膜蛋白 GP I b, GPIV など。

それぞれの立体構造は微妙に異なっている。これは, トロンビンと反応物質の複合体が結晶化する時に反応物質によってトロンビンが異なった立体構造をとったためと考えられる。そこで本稿では, 反応物質と相互作用するトロンビン分子上のアミノ酸残基がもっともよく見えるように, 反応物質ごとに適したモデルを用いることにした。

トロンビンは A 鎖と B 鎖の 2 本鎖からなるが, PPACK-トロンビンの X 線結晶構造

(1.9 Å 分解能) から, A 鎖と B 鎖は独立したドメイン構造をとらず近接して一体型をなしており, およそ $45 \times 45 \times 50 \text{ \AA}^3$ の少し楕円形をした球状構造であることが判明した³⁾。

1) A 鎖: A 鎖は B 鎖とは 1 本の S-S 結合と 5 本の水素結合で結ばれている。A 鎖は主に複数のターン構造から構成され, B 鎖の活性中心の真反対側に存在し, ほぼキモトリプシン (ノーゲン) の活性化ペプチドの存在場所に位置している。A 鎖は少なくともトロンビンの凝固関

表 2 トロンピンの生理機能

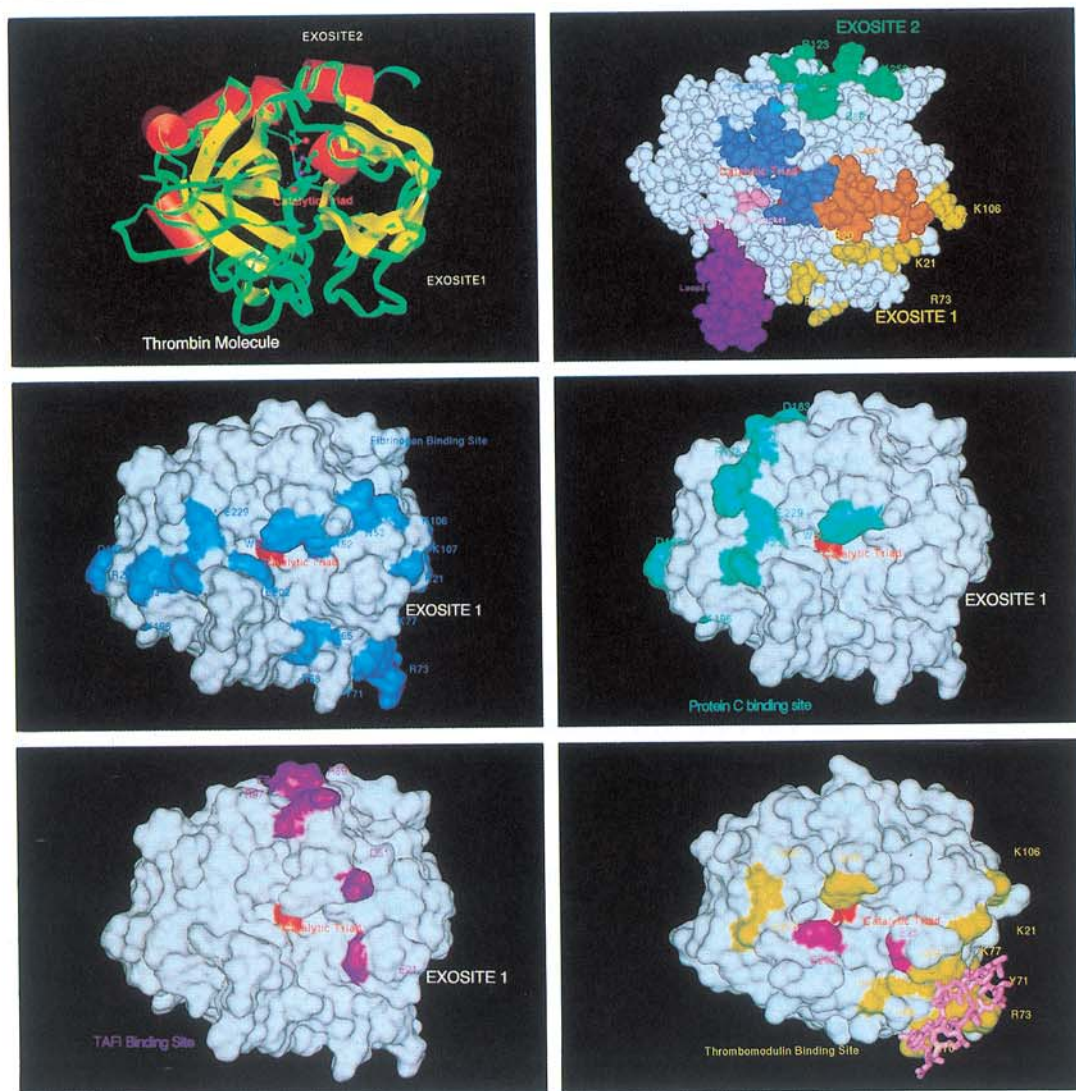
A. 血漿蛋白質の限定分解作用	
血液凝固・凝固制御・抗線溶因子の活性化	
フィブリノゲン凝固	
凝固 V, VIII, XI, XIII 因子などの活性化。	
プロテイン C の活性化 [トロンボモジュリン (TM) を介した凝固制御]	
Pro-TAFI の活性化 [TM を介した活性化: フィブリン血栓の保護]	
B. 細胞膜受容体の限定分解作用	
血小板の活性化	
粘着反応 (接着因子発現)	
放出反応 (凝固因子, 増殖因子, Serpin, ATP, ADP, TXA2 などの放出)	
凝集反応	
白血球 (単球・マクロファージ, 好中球) の活性化	
組織因子産生	
接着因子産生	
サイトカイン産生	
顆粒成分放出	
活性酸素産生	
血管内皮細胞の活性化・障害	
組織因子産生	
TM の発現低下	
von Willebrand factor (vWF) 放出	
プロスタサイクリン産生 [HUVECs (+), 末梢静脈内皮 (-)]	
PAF, PAI-1 産生 (tPA 産生抑制)	
P-セレクトリン, E-セレクトリン, VCAM, ICAM などの産生	
細胞移動 [末梢血管内皮細胞 (+), 大動脈内皮細胞 (-)]	
細胞収縮 (血管透過性の亢進)	
細胞増殖・成長作用	
血管平滑筋細胞, 線維芽細胞, 神経芽細胞, 心房細胞など	
肝増殖因子 (HGF) 活性化因子 (pro-HGFA) の活性化	
細胞走化作用	
白血球, マクロファージ, 癌細胞など	
カルシウム代謝作用	
骨吸収促進 (骨細胞)	
ホルモン様作用	
心房性 Na 利尿ペプチド (ANP) 発現 (心房細胞)	

連機能の発現には直接必要なく, プロトロンピン独自の機能の発現やその活性化に必要な領域と考えられている。

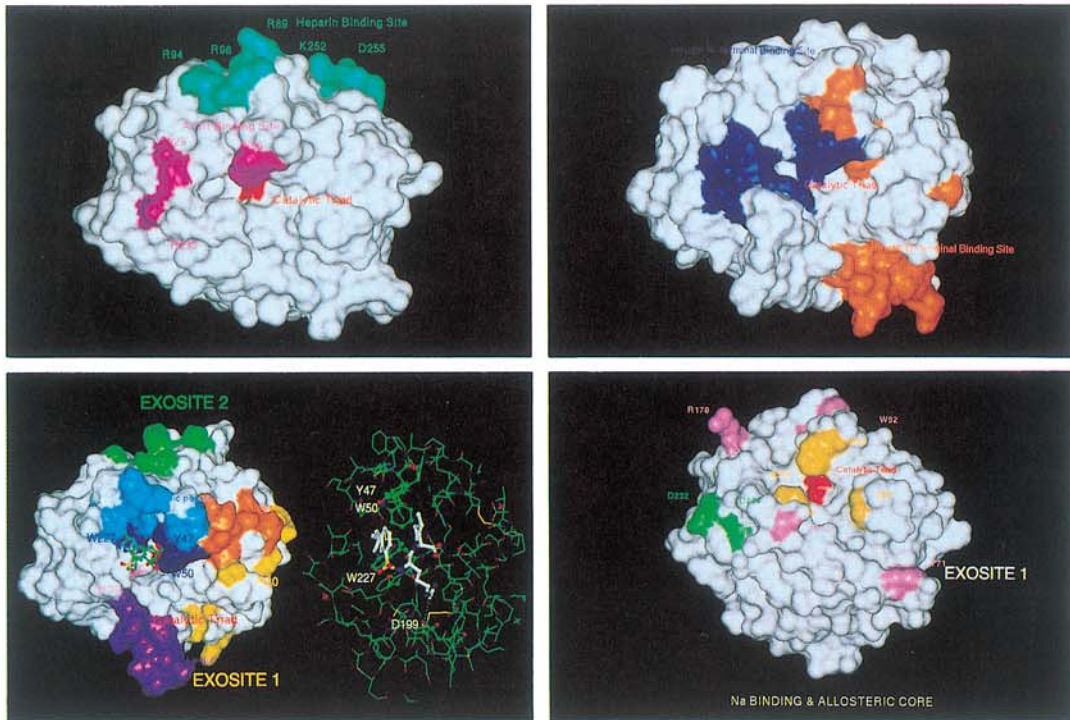
2) **B 鎖**: これまでに知られているトロンピンの機能はすべて B 鎖が担うと考えられている。2次構造から眺めると, B 鎖は基本的に 6本の β -ストランドがつくるバレル様構造 (β -barrel) からなる 2つのドメイン様構造に 5本のヘリックス構造, 1本のヘリクスターン構造および分子表面の複数のターン構造が加わって構成される (図 1)。

セリンプロテアーゼとして機能するトロンピンの触媒活性の発現にもっとも重要な活性中心付近の構造はトリプシンのそれと近似し, トロンピン分子の表面に存在する裂け目様構造 (Cleft) の内部に存在する。トロンピンとトリプシンの触媒活性の本質的な違いは, 両プロテアーゼの立体構造と合成阻害剤に対する反応性の違いから, トリプシンの S190 がトロンピンでは Ala (A200) に置換していることによると推定されている。

トロンピンの多様な機能の発現にはトロンピ



- | | | |
|---|---|---|
| 1 | 2 | <p>図 1 2次構造からみたトロンビン分子
円筒のα-ヘリックス構造(赤色)とリボンのβ-シート構造(黄色)は複数のターンおよびループ構造(緑色)で結ばれている。反応に関与する分子表面のアミノ酸側鎖は複数の緩やかなターンおよびループ構造の上に配位する(pdb 1 abj. entによる)。</p> <p>図 2 トロンビン分子上の機能モジュール(CPKモデル: pdb 1 dwc. entによる)
(1) Catalytic triad: 赤色 (2) Anion-binding exosite 1: 黄色
(3) Anion-binding exosite 2: 緑色 (4) Primary specificity pocket: 桃色
(5) Hydrophobic pocket: 青色 (6) Loop 1: 橙色
(7) Loop 2: 紫色</p> <p>図 3 トロンビン分子上のフィブリノゲン結合アミノ酸残基(Connollyモデル: pdb 1 abj. entによる)。
図 4 トロンビン分子上のプロテインC結合アミノ酸残基(Connollyモデル: pdb 1 abj. entによる)。
図 5 トロンビン分子上のTAFI結合アミノ酸残基(Connollyモデル: pdb 1 abj. entによる)。
図 6 TMが結合するトロンビン分子上のアミノ酸残基(黄色)とExosite 1に結合したTMの第5EGFドメインペプチド(桃色スティックモデル), およびTMに結合することによりプロテインCとの反応を消失するE25とE202残基(マゼンダ色)(Connollyモデル: pdb 1 hlt. entによる)。</p> |
| 3 | 4 | |
| 5 | 6 | |



7	8
9	10

- 図 7 トロンビン分子上のヘパリン結合残基 (緑色) とアンチトロンビン結合残基 (マゼンダ色) (Connolly モデル: pdb 1 hlt. ent による).
- 図 8 トロンビン分子上のヒルジン結合アミノ酸残基 (Connolly モデル: pdb 1 abj. ent による). ヒルジンの N 末端領域が結合するアミノ酸残基を濃青色で, C 末端領域が結合するアミノ酸残基を濃黄色で示す.
- 図 9 トロンビン分子上に結合するアルガトロパンの分子モデル. 左図: トロンビン分子の活性中心に入込んだアルガトロパン (緑色のスティックモデルで示す). トロンビン分子上の各機能モジュールは図 2 と同じ (Connolly モデル: pdb 1 dwc. ent による). 右図: アルガトロパンが相互作用するトロンビン分子表面のアミノ酸側鎖 (白色). W227 はアルガトロパンのキノリン環と疎水結合し, Y47 と W50 に囲まれた窪みにピペリジン環が入込み, D199 とアルギニン側鎖が水素結合する. 左図の分子を垂直軸に沿って 90 度回転させた分子モデル.
- 図 10 トロンビン分子上の Na^+ イオンによるアロステリック酵素誘導アミノ酸残基 (Connolly モデル: pdb 1 hlt. ent による). Na^+ がトロンビン分子上の D232, D234 残基 (緑色) に結合すると, 活性中心 (赤色) 周辺のアロステリックコア構造の W50, E25, E202 残基 (黄色) に立体構造変化が生じて凝固促進活性が発現される. アロステリックコアのさらに外側の Y71, W92, W148, R178 残基 (桃色) はフィブリノゲンやヒルジンとの結合に関与するが, アロステリック変化は生じない.

ン分子表面上の機能担当領域 (モジュール) が重要である. 主なモジュールとしては触媒活性中心とともに以下の幾つかの基質や機能調節因子との結合部位 (subsite) が示唆されている⁸⁾. 以下, トロンビン分子上のアミノ酸残基はヒト・トロンビン B 鎖の番号で示す (図 2: CPK モデル).

(1) Catalytic triad: H43, D99, S205 (赤色)

(2) Anion-binding exosite 1: R20, K21, R68, K70, R73, K77, K106, K107, K154 (黄色)

(3) Anion-binding exosite 2: R89, R98, R123, R245, K247, K248, K252 (緑色)

(4) Primary specificity pocket: D199, A200 (桃色)

5) Hydrophobic pocket: H43, Y47-W50,

R93-L96, I179, W227 (青色)

(6) Loop 1: L45-N57 (橙色)

(7) Loop 2: L144-G155 (紫色)

トロンビンの作用は、基質、阻害物質、機能調節因子等がトロンビン分子上の特異的な機能モジュールと水素結合、イオン結合、疎水結合、ファン・デル・ワールス結合などで相互作用することによって発現される。これまでにトロンビン分子上の機能モジュールの中でも、2種の陰イオン結合部位 (Exosite 1 と Exosite 2) および Loop 2 領域と相互作用する物質が明らかにされている⁶⁾。

A) Exosite 1 に結合する凝固関連分子

フィブリノゲン A α 鎖

第 V 因子

第 VIII 因子

ヘパリンコファクター II の N 末端領域

TM の第 5EGF ドメイン

Thrombin-activable fibrinolysis inhibitor

(TAFI=plasma procarboxypeptidase B)

細胞膜トロンビン受容体

血小板膜蛋白質 GP1b α 鎖

ヒルジン C 末端領域

抗トロンビン DNA (DNA aptamer)

B) Exosite 1 と反発する凝固関連分子

プロテイン C

(プロテイン C 活性化ペプチドの C 末端領域 (P5'-P9':K-M-T-R-R) は Exosite 1 と反発するが、トロンビンが TM と複合体を形成することにより消失する)

C) Exosite 2 に結合する凝固関連分子

ヘパリン

第 VIII 因子

D) Loop 2 (L144 - G155) に結合する凝固関連分子

フィブリノペプチド A

第 V 因子

ヒルジン

2. トロンビンの構造と機能の関係

上記のように、トロンビン分子上の Exosite 1 や Exosite 2 はトロンビンの基質や機能調節因子の結合に関わる重要なモジュールである。トロンビンの自己消化やトリプシン処理で生じる β トロンビン (β -Thrombin) は、B 鎖の Exosite 1 領域の R73-N74 結合が切断されたものであり、Exosite 1 と相互作用するすべての蛋白質に対する親和性が低下する。また、Loop 2 領域の K154-G155 結合の切断により生じる γ -トロンビン (γ -Thrombin) ではこの領域に結合する物質に対する親和性が低下する。これらの典型的なモジュール以外にも基質蛋白や機能調節因子と相互作用し、トロンビンの特異的な機能の発現に関与するアミノ酸の存在が示唆されている。Tsiang らおよび Hall らはトロンビン B 鎖の荷電や局性を有するアミノ酸の 77 箇所を Ala に置換した組換え Ala 置換トロンビンを作製し、トロンビン基質のフィブリノゲン、プロテイン C、TAFI、トロンビン機能調節因子の TM に対する反応性の変化、および ATIII による組換え Ala 置換トロンビンの阻害に及ぼす影響を検討した⁵⁾⁷⁾。その結果、個々の反応分子との相互作用に種々のアミノ酸が関与することが示唆された。以下にトロンビン分子は Connolly surface モデル (水分子 [半径 1.4 Å とする] が接触しうる分子の表面を表すモデル) で示し、相互作用に関与するアミノ酸残基はヒト・トロンビン B 鎖の残基で示して彩色する。活性中心 (Catalytic triad アミノ酸) は赤色で示す。

(1) トロンビン分子上のフィブリノゲン結合部位 (組換え Ala 置換トロンビンによるフィブリノゲンの活性化に影響を及ぼすアミノ酸残基): K21, W50, K52, N53+T55, K65, H66, R68, Y71, R73, K77, K106+K107, D193+K196, E202, E229, R233, D234 (図 3)⁵⁾。

(2) トロンビン分子上のプロテイン C 結合部位 (組換え Ala 置換トロンビンによるプロテ

イン C の活性化に TM の影響がほとんどみられないアミノ酸残基): W50, R178, R180, D183, D193, K196, E229, R233 (図 4)⁹⁾⁷⁾。

(3) トロンビン分子上の TAFI 結合部位 (TM 存在下での組換え Ala 置換トロンビンによる TAFI の活性化で, プロテイン C の活性化には影響を与えず, TAFI の活性化に特異的に影響を及ぼすアミノ酸残基): E25, D51, R89, E94, R97 (図 5)⁷⁾。

(4) トロンビン分子上の TM 結合部位 (組換え Ala 置換トロンビンによるプロテイン C の活性化に TM が強く影響を及ぼすアミノ酸残基): K21, Q24, K62, K65, R68, T69, R70, W71, R73, K77, K106 (図 6)。このモデルでは TM の第 5EGF ドメインペプチドを Exosite 1 領域に配位してある。TM はトロンビン分子にアロステリック変化を惹起することによって, TM の非存在時にみられるトロンビン分子上の E25 と E202 残基とプロテイン C 活性化ペプチドの P3 部位 (D167) と P3' 部位 (D172) との間の反発が消失させ, プロテイン C はトロンビンと相互作用出来るようになると推定されている⁷⁾⁹⁾¹⁰⁾。モデルでは E25 と E202 残基をマゼンダ色で示す。

(5) トロンビン分子上のヘパリンとアンチトロンビン (ATIII) の結合部位⁶⁾: ヘパリン存在下の ATIII による組換え Ala 置換トロンビンの阻害は, トロンビン B 鎖のヘパリン結合部位 (Exosite 2 の R89, R93, E94, R98, R245, K248, K252-D255-Q256) およびトロンビン活性中心の周辺領域 (Subsite: W50, E229, R233) のアミノ酸置換で低下した。Exosite 2 へのヘパリンの結合はトロンビン活性中心の構造だけでなく, Exosite 1 へのトロンビン基質の結合性も低下させると推定されている。トロンビン分子上のヘパリン結合部位を緑色, ATIII reactive loop (反応部位) の結合残基をマゼンダ色で示す (図 7)。なお, 活性中心の周辺残基 (E25, R178-R180-D183, E202) の置換によって, ヘパリン非存在下での ATIII による阻害は僅か

あるが促進される。

(6) トロンビン分子上のヒルジン およびトロンビン受容体の結合部位: トロンビンとヒルジン複合体の X 線結晶構造解析から詳細に検討された。ヒルジンはトロンビン活性中心の存在する裂け目様構造 (Cleft) の内部に納まるように結合してトロンビンとすべての基質との相互作用を完全に阻害する。概略的には, ヒルジンの N 末端領域が活性中心近傍に作用し, 長く伸びた C 末端側領域が Exosite 1 を含む領域に結合する⁴⁾⁵⁾ (図 8)。

ヒルジンの N 末端領域と相互作用するトロンビン B 鎖のアミノ酸: H43, Y47, (P49), W50, L96, E146, C201, E202, S205, S226, G228, E229, G230, C231, R233, 236 (濃青色)。なお, ヒルジン N 末端領域は活性中心の H43 と S205 にも直接結合するため, これらの残基も濃青色で示した。

ヒルジンの C 末端領域と相互作用するアミノ酸: F19, K21, (P49), K52, L60, R62, R68, T69, R70, Y71, R73, I78, W92 (濃黄色)。

トロンビン受容体 (Protease-activating receptor (PAR)-1, -3, -4) にはヒルジン C 末端のアミノ酸配列 (F56-E57-E58-I59-P60-Y63) と近似の配列 (mouse (m) PAR-1: F-E-L-V-P-L, mPAR-3: F-E-E-F-P-L, mPAR-4: L-E-L-P-A-S) が存在することから²⁾, トロンビン受容体はこの領域でトロンビン分子上のヒルジン C 末端結合領域に結合すると推定されている。

(7) トロンビン分子上の DNA aptamer の結合部位⁵⁾: 特定の塩基配列を有する DNA はトロンビンの活性を阻害し, DNA aptamer と呼ばれる。DNA aptamer の活性はトロンビン分子上の Exosite 1 領域の K65, H66, R70, Y71, R73 を Ala に置換することで消失したことから, DNA aptamer 結合部位は Exosite 1 領域と推定される (図 2 参照)。

(8) トロンビン分子上の合成トロンビン阻害剤の結合部位: トロンビン阻害剤の一つアルガトロバン (Argatroban: MD-805) (2R, 4R)-4

-methyl-1-[Na-(RS)-3-methyl-1, 2, 3, 4-tetra-hydro-8-quinolenesulphonyl]-L-arginyl]-2-piperidine carboxylic acid) はキノリン環、ピペリジン環およびアルギニンからなる構造を有し、高い選択性でトロンビンの活性中心近傍に結合し、酵素活性をほぼ完全に阻害する¹¹⁾。この阻害反応で、キノリン環はトロンビン B 鎖の W227 と疎水結合し、ピペリジン環は Y47 と W50 に囲まれた窪みに入り込み、アルギニン側鎖については主鎖の C=O と NH 基が G228 と水素結合し、伸びた側鎖は少し離れた D199 と水素結合すると推定されている (図 9)。

(9) トロンビン分子上のアロステリック誘導部位: トロンビンはアロステリック酵素であり、Na⁺ イオンの結合により立体構造とその機能に変化する。すなわち、Na⁺ の結合したトロンビンはフィブリノゲンや第 V 因子などを活性化する凝固促進酵素に変化し、逆に Na⁺ が解離することにより TM に結合して凝固阻害因子として機能する¹²⁾。Guinto らはトロンビン分子上の D232, D234 残基に Na⁺ が結合すると、活性中心周辺のアロステリックコア構造 (Allosteric core) の W50, E25, E202 残基に変化が生じて凝固促進活性を発現すると推定している¹³⁾ (図 10)。一方、アロステリックコア構造のさらに外側に存在する Y71, W92, W148, R178 残基はフィブリノゲンやヒルジンへの結合に関与するが、アロステリック変化は生じないと述べている。

3. 機能修飾型トロンビン

Gibbs らはトロンビン分子上のフィブリノペプチド A との相互作用部位の一つ (B 鎖の E229: 図 3 参照) を Ala 残基に置換したところ、血液凝固活性が選択的に低下し、相対的にプロテイン C 活性化能が高まったトロンビン誘導体の作製に成功した (野生型に比較し、フィブリノゲン親和性は 2.5%, 血小板凝集活性

は 1.3%, トロンビン受容体活性化能は 14.6% に低下, 膜結合 TM 親和性は 88%, 可溶性 TM 親和性は 161%, プロテイン C 親和性は 47.5% に変化)¹⁴⁾。E229 残基は既述の Na⁺ 結合部位 (D232-D234: 図 10 参照) に極めて近い場所に位置することから、E229A トロンビンはトロンビンを Na⁺ 結合状態に留めるのではないかと推定している。

一方、Berg らはトロンビンのフィブリノゲン分解活性を阻害し、プロテイン C 活性化能を高める物質を探索し、低分子化合物 (LY254603) を同定した¹⁵⁾。この物質はトロンビンの基質認識部位 (S3) に結合し、プロテイン C 活性化ペプチド領域の P3 部位との親和性を高めると推察している。(トロンビン B 鎖の E39 と E192 残基はそれぞれ プロテイン C 活性化ペプチド領域の D167 (P3 部位) と D172 (P3'部位) と反発しているが、TM への結合によってこの反発は消失すると考えられている。この LY254603 はそれらの反発を弱める作用があるのかもしれない。)

まとめ

組換え変異トロンビンの機能の解析と X 線結晶解析による立体構造の解析の組合せにより、トロンビンの持つ機能の特異性と多様性は、活性中心 (Catalytic triad) 近傍だけでなく活性中心から離れた周辺領域 (Subsite) も含めたかなり広範囲な領域の複数のアミノ酸側鎖との相互作用に基づくことが明らかになってきた。また、トロンビンは Na⁺ イオンや TM, ヘパリンなどのグリコサミノグリカンなどの機能変換分子の影響を受けてその分子表面の微細な立体構造を変化させ機能を変えるアロステリック酵素であることも判明した。こうした知見に基づき、抗血栓・抗炎症・抗動脈硬化などを旨とする新しいトロンビン機能変換物質の開発と抗トロンビン療法の発展が期待される。

文 献

- 1) Vu T-KH, Hung DT, Wheaton VI, Coughlin SR: Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell* **64**: 1057-1068, 1991.
- 2) Kahn ML, Zheng Y-W, Huang W, Bigornia V, Zeng D, Moff S, Farese RV, Jr, Tam C, Coughlin SR: A dual thrombin receptor system for platelet activation. *Nature* **394**: 690-694, 1998.
- 3) Bode W, Mayr I, Baumann U, Huber R, Stone SR, Hofsteenge J: The refined 1.9 Å crystal structure of human α -thrombin: Interaction with D-Phe-Pro-Arg chloromethylketone and significance of the Tyr-Pro-Pro-Trp insertion segment. *EMBO J* **8**: 3467-3475, 1989.
- 4) Rydel TJ, Tulinsky A, Bode W: Refined structure of the hirudin-thrombin complex. *J Mol Biol* **221**: 583-601, 1991.
- 5) Tsiang M, Jain AK, Dunn KE, Rojas ME, Leung LLK, Gibbs CS: Functional mapping of the surface residues of human thrombin. *J Biol Chem* **270**: 16854-16863, 1995.
- 6) Tsiang M, Jain AK, Gibbs CS: Functional requirements for inhibition of thrombin by antithrombin III in the presence and absence of heparin. *J Biol Chem* **272**: 12024-12029, 1997.
- 7) Hall SW, Nagashima M, Zhao L, Moser J, Leung LLK: Dissociation of thrombin's protein C and TAFI activities by site-directed mutagenesis. *Blood* **92** (No 10) Supplement **1**: 184a, 1998.
- 8) Guillin M-C, Bezeaud A, Bouton M-C, Jandrot-Perrus, M: Thrombin specificity. *Thromb Haemost* **74**: 129-133, 1995.
- 9) Hortin GL, Trimpe BL: Interaction of thrombomodulin with thrombin via anion-binding exosite 1 results in an allosteric change that alters thrombin's substrate specificity. *J Biol Chem* **266**: 6866- 6871, 1991.
- 10) Ehrlich HJ, Grinnell BW, Jaskunas SR, Esmon CT, Yan SB, Bang NU: The P3 (D167) and P3' (D172) acidic residues of the activation peptide in protein C, which have been shown to contribute to the slow rate of activation by free α -thrombin. *EMBO J* **9**: 2367-2373, 1990.
- 11) Stubbs MT, Bode W: A player of many parts: The spotlight falls on thrombin's structure. *Thromb Res* **69**: 1-58, 1993.
- 12) Dang QD, Vindigni A, Cera ED: An allosteric switch controls the procoagulant and anticoagulant activities of thrombin. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 5977-5981, 1995.
- 13) Guinto ER, Vindingni A, Ayala YM, Dang QD, Cera ED: Identification of residues linked to the slow \rightarrow fast transition of thrombin. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 11185-11189, 1995.
- 14) Gibbs CS, Coutre SE, Tsiang M, Li W-X, Jain AK, Dunn KE, Law VS, Mao CT, Matsumura SY, Meiza SJ, Paborsky LR, Leung LLK: Conversion of thrombin into an anticoagulant by protein engineering. *Nature* **378**: 413-416, 1995.
- 15) Berg DT, Wiley MR, Grinnell BW: Enhanced protein C activation and inhibition of fibrinogen cleavage by a thrombin modulator. *Science* **273**: 1389-1391, 1996.