

◆トピックス◆

可溶性組織因子 (sTF) および VIIa 因子-sTF 分子複合体の結晶構造

副島見事^{*1}, 水口純^{*1}, 岩永貞昭^{*1*2}

Crystal Structures of Soluble Tissue Factor and Factor VIIa-Tissue Factor Complex

Kenji SOEJIMA^{*1}, Jun MIZUGUCHI^{*1} and Sadaaki IWANAGA^{*1*2}

Key words: factor VII, tissue factor, factor VII-tissue factor complex, zymogen-like form, active form

1. はじめに

外因系血液凝固反応は、血管障害部位の細胞膜上に露呈した組織因子 (TF) と、血中の活性化 VII 因子 (VIIa) が、Ca²⁺ 存在下 1:1 の複合体を形成し、IX 因子 (IX) および X 因子 (X) を活性化することにより開始される。表 1 に VIIa および TF に関する生化学的なデータをまとめた。

図 1a に示すように、TF はその構造からサイトカインレセプターファミリーに分類されるが、現在までのところ VII (a) が唯一知られているリガンドである。一方、VIIa は図 1b に示すように、 γ -カルボキシグルタミン酸 (Gla) ドメインに加えて、Epidermal growth factor (EGF)-1 ドメイン、EGF-2 ドメインおよびトリプシン様のセリンプロテアーゼドメインを有し、血中では約 1% が VIIa として、また大部分は前駆体型 (VII) として存在する。前駆体型の VII は、ほかの凝固因子 (活性型の Xa や XIIa

など) もしくは VIIa-TF 複合体により Arg152-Ile153 が切断され、Gla ドメインと EGF-1 ドメイン、EGF-2 ドメインからなる Light chain と、プロテアーゼドメインからなる Heavy chain が Cys135-Cys262 の間でジスルフィド結合した二本鎖 VIIa へと変換される。VIIa は天然基質である IX および X の活性化ペプチド部位を加水分解することで、凝固の一連のカスケードを稼働させるが、VIIa それ自身単独ではきわめて弱い酵素活性しか示さない。この酵素活性が弱いという点では IXa と共通する面がある。しかし、VIIa が TF と複合体を形成すると、触媒活性は劇的に上昇し、IX および X の活性化速度は約 10⁴ 倍高められる。さらに、VIIa は TF 存在下で、トリペプチド合成基質 (S2288) の加水分解活性が 10~100 倍上昇する。このことから、VIIa 単独では、たとえ二本鎖であっても、プロテアーゼとして未完全な前駆体様構造をとっており、TF と分子複合体を形成すると、セリンプロテアーゼドメインが完成した活性型

*1 (財) 化学及血清療法研究所 菊池研究所 (〒 869-1298 熊本県菊池郡旭志村川辺)

The Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute, Kikuchi Research Center [Kawabe, Kyokushi-Mura, Kikuchi-Gun, Kumamoto 869-1298, Japan.]

*2 藤田保健衛生大学 総合医科学研究所 (〒 470-1101 愛知県豊明市沓掛町田楽ヶ窪 1-98)

Institute for Comprehensive Medical Science, School of Medicine, Fujita Health University [1-98 Dengakugakubokutsukake-cho, Toyoake-Shi, Aichi 470-1101, Japan.]

表 1 Factor VII および Tissue factor の諸性質 (ヒト)

諸性質	Factor VII	Tissue factor
染色体位置	13q34-qter	1p21-22
遺伝子構造: () 内はエクソン数	12.8 kbp (8)	12.4 kbp (6)
分子量 (SDS PAGE) (cDNA からの推定)+糖鎖	50,000~56,000	45,000~47,000
総アミノ酸残基数	406	263
糖鎖などの修飾 アミノ酸残基番号	(N-グリコシド型)	145, 322
	(O-グリコシド型)	52, 60
	(γ -カルボキシ グルタミン酸残基)	6, 7, 14, 16, 19, 20, 25, 26, 29, 35
ドメイン構造	① Gla domain (1~39) ② EGF-1 domain (50~81) ③ EGF-2 domain (91~127) ④ Protease domain (153~406)	① Extracellular domain (1~219) ② Membrane domain (220~242) ③ Cytoplasmic domain (242~263) 細胞内ドメインに存在する Cys-SH は palmitoyl 化および stearyl 化され ている。細胞内ドメインに存在する Ser253 残基は部分的にリン酸化され ている。
主な生成の場所	肝細胞	血液と接触しないほとんどの細胞*1
血中濃度	400~500 ng/ml 8~10 nM	100~200 pg/ml*2 2.7~5.4 pM
生理機能	外因系凝固の開始	外因系凝固の開始, 脈管形成*3
レセプター・結合蛋白**	Tissue factor	Factor VII
欠乏症の病態	出血	致死*3

*1: 単球・血管内皮細胞は刺激時のみ発現

*2: Soluble tissue factor

*3: ノックアウトマウスからの知見

** : Tissue factor と factor VII との間の Kd は 82 pM~21 nM

VIIa になると考えられている。したがって生理的な VIIa の凝固活性発現には TF が必須である。

TF がどのような仕組みで, VIIa の触媒活性を増強しているか, その詳細は未だ明らかでないが, 最近, 報告された VIIa-TF 分子複合体の結晶構造からの情報はそれを考える上で, きわめて注目される。本トピックスでは, sTF (TF の細胞外ドメインのみを発現させたもの) 単量体および VIIa-sTF 複合体の X 線結晶構造を解説しつつ, それらのデータをもとに TF 共存下での VIIa の触媒活性増強について述べる。

2. sTF 単量体および VIIa-sTF 複合体の立体構造

I. VIIa-sTF 複合体

1996 年, Banner らが報告した VIIa-sTF 複合体の結晶構造¹⁾を図 2 に示す。この分子構造から, 細胞膜上 (図中下側) に sTF のカルボキシル末端 (C 末), VIIa のアミノ末端 (N 末) が配向し, プロテアーゼドメインは細胞表面から離れたところに位置し, その活性部位は細胞膜から高さ約 80 Å のところにあることが見積られる。複合体の高さはおよそ 115 Å, 幅が 40~50 Å であり, 複合体中の VIIa 分子は Gla ドメインや EGF-1 ドメイン, EGF-2 ドメイン, プロ

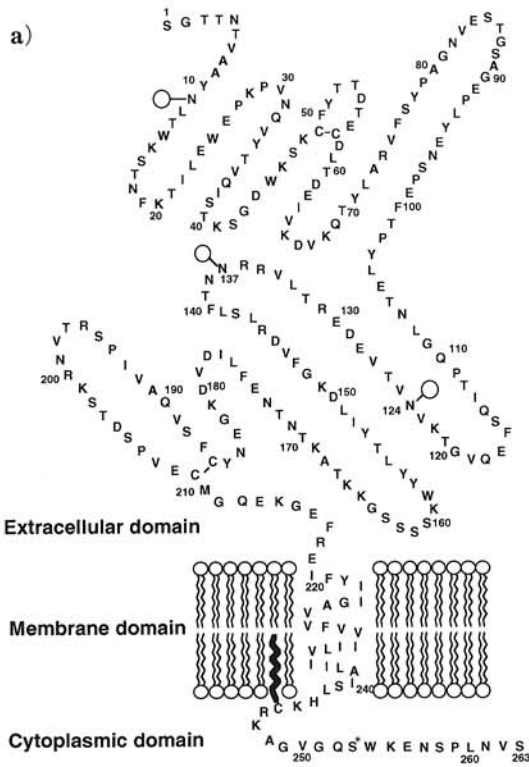
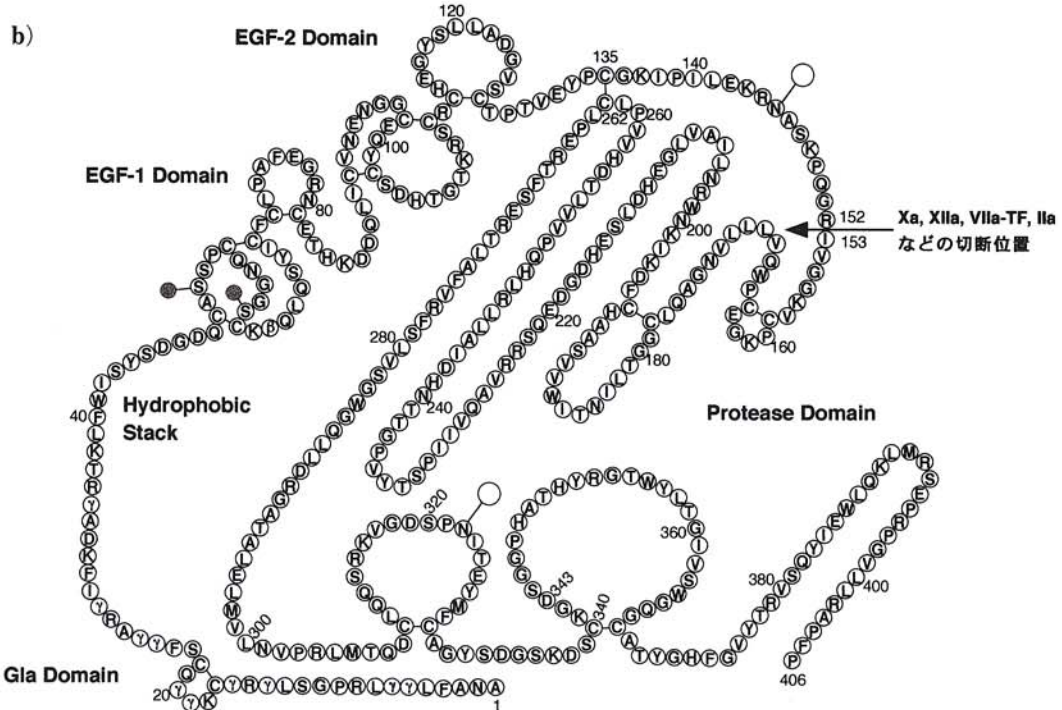


図1 組織因子 (TF) および血液凝固 VII 因子 (VII) の一次構造

a) ヒト組織因子のアミノ酸配列。○は N-グリコシド型糖鎖付加サイト、◊はパルミチン酸あるいはステアリン酸のチオエステル結合を示す。*Ser253 は、部分的にリン酸化されている。

b) ヒト血液凝固 VII 因子のアミノ酸配列。○は N-グリコシド型糖鎖付加サイト、●は O-グリコシド型糖鎖付加サイト (Ser52 には 3 糖の Xyl-Xyl-Glc が、Ser60 には Fuc が結合)、γ は γ-カルボキシグルタミン酸残基を表し、活性化の際、切断されるペプチド結合は矢印で示した。



テアーゼドメインが縦に繋がった構造をしている。sTF は分子全体を使って, VIIa 分子全体に対して, 巻き付くように広範囲で接触しており, VIIa と sTF の接触面積は $1,800 \text{ \AA}^2$ に及ぶ。VIIa と TF の解離定数 (Kd 値) が数 nM オーダーと低いのは, この広範囲にわたる相互作用が寄与しているものと推察される。生体内での VIIa cofactor としての TF の機能を考えた場合, TF は細胞膜にアンカリングしているので, 複合体形成により VIIa の並進, 回転運動の自由度は減少することが容易に推察される。さらに, McCallum らの報告によると²⁾, Fluorescence energy transfer を利用した実験から, TF は VIIa の活性部位の細胞膜からの高さを調節しているらしい。また, X を用いた実験から, TF には X の活性化に重要と考えられるアミノ酸残基 (Lys165, Lys166) が存在することが報告されており³⁾, 図 2 からも推察されるように TF を介して, 酵素 (VIIa) と天然高分子基質 (この場合 X) が効率よく向き合うように複合体形成が起こるのではないかと考えられる。これらは TF の VIIa に対する天然の高分子基質 (IX および X など) の活性化速度を上昇させる理由のひとつと考えられる。

II. sTF

図 1a に示すように, TF はタイプ-I 膜結合型の糖蛋白質であるが, その細胞外ドメイン (sTF) 単量体の結晶構造が, 1994 年, Harlos らにより決定された⁴⁾。その構造は分子全体がほとんど β シート構造からなり, さらにこれらは N 末ドメイン (N-module) と C 末ドメイン (C-module) の 2 つの免疫グロブリン様ドメインに分けられる。また, Banner らが報告した VIIa-sTF 複合体の結晶構造中の sTF と, Harlos らの報告した遊離の sTF の立体構造は酷似しており, このことから TF が VIIa と複合体を形成する際の構造変化は小さいといえる (図 3)。VIIa と sTF の接触領域のアミノ酸残基を 図 4a に示す (見やすくするため, アミノ酸残基は TF 分子内の VIIa 接触領域のみを示してい

る)。これら VIIa との相互作用に関わるアミノ酸残基は, Ruf らが報告した Alanine scanning による変異体の実験⁵⁾⁶⁾ から示唆されたものと良く一致している。また, TF には N-グリコシド型糖鎖付加サイトが細胞外ドメインに 3 か所存在するが (Asn11, Asn124 および Asn137), VIIa との複合体中ではいずれも VIIa 分子とは反対側に位置しており, これらの糖鎖は VII(a) との複合体形成に直接関与しないと考えられる。このことは大腸菌で発現した TF の活性が, 天然型と差の無いことから推察される。

III. VIIa

VIIa の sTF との相互作用領域のアミノ酸残基を 図 4b に示す。図に示した TF との相互作用に関わるアミノ酸残基は, Dickinson らの報告した Alanine scanning による変異体の実験⁷⁾ から示唆された結果と良い一致を示している。また, VII の分子異常の報告⁸⁾ の中でも, TF との相互作用部位に含まれるアミノ酸変異 (図 4b 参照, Arg79 および Arg304) が原因であるものが知られているが, こうした異常症では, VII の抗原量は正常とあまり変わらないものの凝固活性の低下が起きるといふ。

Light chain

VIIa-sTF 複合体中の VIIa の Gla ドメインには, 7 つの Ca^{2+} イオンが結合しているが, うち 6 つはリン脂質膜の平面に直線的に並ぶように配置している (図 2)。この sTF と Gla ドメインの相互作用は, 主に疎水性相互作用からなり, hydrophobic stack region と呼ばれる部位がここに存在する (図 2 および 図 4b)。

EGF-1 ドメインは IX, X 同様に一つの Ca^{2+} イオン結合サイトを持つ。また, この領域の Ser52 と Ser60 には O-グリコシド型の糖鎖が結合しているが, TF との相互作用領域とは反対側に位置している。

EGF-2 ドメインは X のそれと立体的に似た構造を示し, プロテアーゼドメインと密に相互作用しており, 一つの構造ドメインのように一体化している。また, Asn145 には N-グリコシ

図2

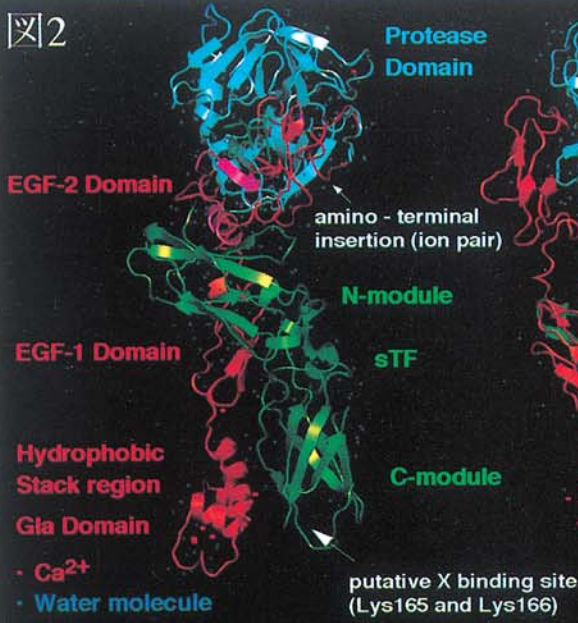


図3



図4a

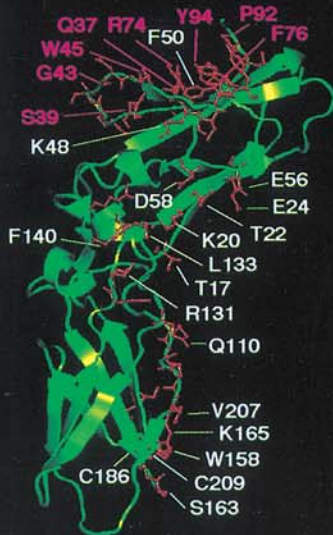
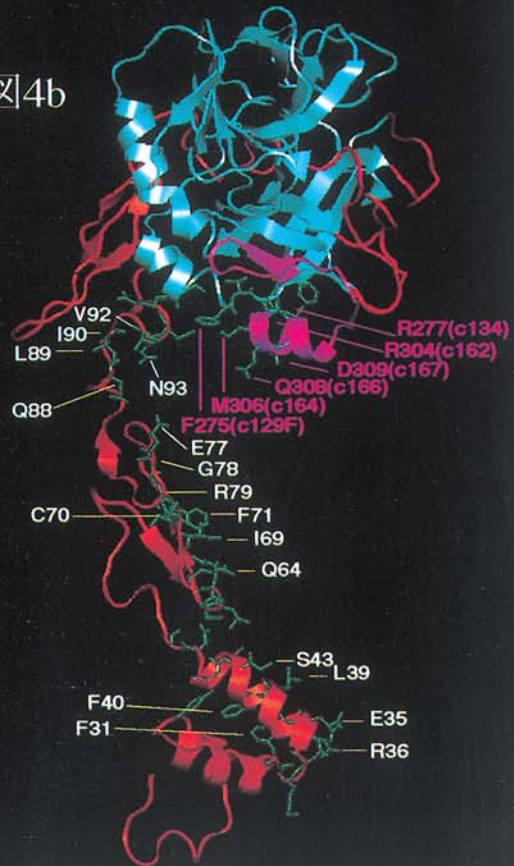


図4b



ド型糖鎖が存在する。一方, Gla ドメインと EGF-1 ドメインのつなぎ目 (hydrophobic stack region), および EGF-1 ドメインと EGF-2 ドメインのつなぎ目は, ほどけたヘリックス構造をとっており, VIIa 単量体では, この部分がヒンジ領域として振る舞うのではないかと推測される。事実, Waxman らの報告によると⁹⁾, Fluorescence anisotropy を利用した実験から, 単量体の VIIa は Light chain にドメイン間の運動が認められ, TF-VIIa 複合体ではこの運動が消失するという。これも TF による VIIa の天然高分子基質に対する水解の際の cofactor 機能の一つであろう。

プロテアーゼドメイン (Heavy chain)

プロテアーゼドメインには, 1 個の高親和性 Ca^{2+} イオン結合サイト (トリプシンのそれとほぼ同じ場所) が存在し, Asn322 には *N*-グリコシド型糖鎖が存在する。

VIIa の TF との複合体形成前後の構造変化については, VII/VIIa 単量体の結晶構造が解明

されていないので詳細な議論はできないが, 一般に他のトリプシン様セリンプロテアーゼ同様, 前駆体から活性型への変換には, Arg152-Ile153 部位の切断, およびそれに伴う構造変化がある。その変化はトリプシノーゲン (前駆体) →トリプシン (活性型) の変換において詳しく解析されており¹⁰⁾, 結晶解析の結果から activation domain と呼ばれる一連の構造変化の大きい領域が 4 カ所存在する。前駆体の活性化に伴い, 新たに出現する *N* 末の α -アミノ基 (キモトリプシノーゲン番号 16 位; c16) と, 活性 Ser 残基 (c195) の一つ前の Asp (c194) の β -カルボキシル基の間にイオンペアーが形成され, 安定な活性型へと変換する。したがって, VII → VIIa の場合も同様に, 活性化に伴い新たに出現する VIIa の Ile 153 (c16) の α -アミノ基が, 活性 Ser344 (c195) の一つ前の Asp343 (c194) の β -カルボキシル基とイオンペアーを形成することが, この活性化に伴う一連の構造変化に必須であると推測される (図 2 の赤色ループ部位:

図 2 VIIa-sTF 複合体の結晶構造¹⁾

Protein Data Bank (PDB) 中の PDB コード「1DAN」をもとに分子設計支援ソフト QUANTA を用いて作図した。

sTF を緑色リボンモデルで, VIIa Light chain (Gla, EGF-1 および EGF-2 ドメイン) を橙色リボンモデルで, VIIa プロテアーゼドメインを水色リボンモデルで示し, さらに, プロテアーゼドメイン内の推定される activation domain を赤色リボンモデルで, また, sTF との相互作用領域を桃色リボンモデルで, 活性部位に存在する阻害剤 D-Phe-L-Phe-Arg-chloromethyl ketone は濃緑色ワイヤーモデルで示す。結晶構造中の Ca^{2+} イオンを赤点で, 水分子を青点で示す。図中左側が活性部位を正面にした図で, 右側が活性部位を右に向けた図。

図 3 sTF 単量体および VIIa-sTF 複合体中の sTF の結晶構造¹³⁾

sTF 単量体を図中桃色リボンモデルで示す。Protein Data Bank (PDB) 中の PDB コード「1BOY」をもとに分子設計支援ソフト QUANTA を用いて作図した。複合体中の sTF を図中緑色リボンモデルで示す。Protein Data Bank (PDB) 中の PDB コード「1DAN」から sTF の座標のみを抽出し, 分子設計支援ソフト QUANTA を用いて作図した。複合体中の sTF には, 結晶化の前処理による主鎖の座標に欠損が存在する (アミノ酸番号 81~90 位および 159~162 位) 事に注意。

図 4 VIIa-sTF 複合体形成時に相互作用するアミノ酸残基

Protein Data Bank (PDB) 中の PDB コード「1DAN」をもとに分子設計支援ソフト QUANTA を用いて作図した。

a) sTF 中の VIIa との相互作用領域のアミノ酸残基を橙色 Ball & Stick モデルで示し, 特に直接相互作用するアミノ酸残基を一文字表記で残基番号と共に白色 (VIIa の Light chain と相互作用するアミノ酸残基) または, 桃色 (VIIa のプロテアーゼドメインと相互作用するアミノ酸残基) で示した。

b) VIIa 中の sTF との相互作用領域のアミノ酸残基を濃緑色 Ball & Stick モデルで示し, 特に直接相互作用するアミノ酸残基を一文字表記で残基番号と共に白色 (VIIa の Light chain 由来のアミノ酸残基) または, 桃色 (VIIa のプロテアーゼドメイン由来のアミノ酸残基) で示した。プロテアーゼドメイン由来アミノ酸残基にはカッコ内にキモトリプシン番号を添字 c を付して記載した。

VIIaにおいて推定される activation domain).

ところが, Higashi らの化学修飾の実験から¹¹⁾¹²⁾, VIIa は他のトリプシン様プロテアーゼと異なり, このイオンペアーが不安定であることが示された. つまり, VIIa は活性化後も前駆体様構造と活性型構造との間で平衡関係にあり, このことが VIIa 単独での酵素活性が低い理由ではないかと考えた. そして, TF は VIIa と複合体を形成する際, このイオンペアーを安定化するか,あるいは活性型になっている VIIa 分子をトラップすることで, 前述した低分子合成基質の TF 依存的な加水分解活性の上昇が生じると推定した. 何故 VIIa が単量体では, 活性化後も前駆体様の構造をとるのかについては, プロテアーゼドメイン内の Cys310-Cys329 ループ (図 2 および図 4b 中の桃色部分) 内に他の凝固因子には見られないアミノ酸配列の挿入が 5 残基あり, これが VIIa 単量体での水解活性の低下に関連するものと考えられる. また, この領域が直接または間接的に Ile153 の α -アミノ基と Asp343 の β -カルボキシル基とのイオンペアーを阻害している可能性, または基質との結合を妨げている可能性も考えられよう. TF は, この VIIa の Cys310-Cys329 ループ領域と直接的あるいは水分子を介して間接的に相互作用しつつ, VIIa の前駆体様構造から活性型への構造変換に寄与していることが, 複合体の結晶構造からも推察される (図 2 および図 4b). しかし, 現時点では VII/VIIa 単量体の立体構造が明らかでないため, VIIa-TF 複合体の高次構造情報のみからこのことを証明するのは困難である.

3. おわりに

以上を要約すると, TF は細胞膜表面リン脂質上に VIIa を局在化させる. その際, VIIa と sTF は分子全体で相互作用し, 堅固な複合体を形成する. TF の cofactor 機能としては, VIIa の並進, 回転運動の自由度を減じ, また VIIa の

Light chain のドメイン間の運動を消失させ, さらに, リン脂質からの VIIa の活性部位の高さを調節するなどして, 天然高分子基質である IX, X の活性化の増進に寄与しているのであろう. 一方, TF は VII (a) のプロテアーゼドメインと相互作用しつつ不活性型から活性型への変換に関与し, VIIa の触媒基形成に直接関わっている可能性が考えられる.

謝辞: TF の一次構造の図を快く提供していただいた宮田敏行先生 (国立循環器病センター研究所・脈管生理部) に深謝いたします.

文 献

- 1) Banner DW, D'Arcy A, Chene C, Winkler FK, Guha A, Konigsberg WH, Nemerson Y, Kirchofer D: The crystal structure of the complex of blood coagulation factor VIIa with soluble tissue factor. *Nature*, **380**: 41-46, 1996.
- 2) McCallum CD, Hapak RC, Neuenschwander PF, Morrissey JH, Johnson AE: The location of the active site of blood coagulation factor VIIa above the membrane surface and its reorientation upon association with tissue factor. A fluorescence energy transfer study. *J Biol Chem*, **271**: 28168-28175, 1996.
- 3) Ruf W, Miles DJ, Rehemtulla A, Edgington TS: Cofactor residues lysine 165 and 166 are critical for protein substrate recognition by the tissue factor-factor VIIa protease complex. *J Biol Chem*, **267**: 6375-6381, 1992.
- 4) Harlos K, Martin DM, O'Brien DP, Jones EY, Stuart DI, Polikarpov I, Miller A, Tuddenham EG, Boys CW: Crystal structure of the extracellular region of human tissue factor. *Nature*, **370**: 662-666, 1994.
- 5) Ruf W, Schullek JR, Stone MJ, Edgington TS: Mutational mapping of functional residues in tissue factor: identification of factor VII recognition determinants in both structural modules of the predicted cytokine receptor homology

- domain. *Biochemistry*, **33**: 1565-1572, 1994.
- 6) Ruf W, Kelly CR, Schullek JR, Martin DM, Polikarpov I, Boys CW, Tuddenham EG, Edgington TS: Energetic contributions and topographical organization of ligand binding residues of tissue factor. *Biochemistry*, **34**: 6310-6315, 1995.
 - 7) Dickinson CD, Kelly CR, Ruf W: Identification of surface residues mediating tissue factor binding and catalytic function of the serine protease factor VIIa. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**: 14379-14384, 1996.
 - 8) Tuddenham EG, Pemberton S, Cooper DN: Inherited factor VII deficiency: genetics and molecular pathology. *Thromb Haemost*, **74**: 313-321, 1995.
 - 9) Waxman E, Laws WR, Laue TM, Nemerson Y, Ross JB: Human factor VIIa and its complex with soluble tissue factor: evaluation of asymmetry and conformational dynamics by ultracentrifugation and fluorescence anisotropy decay methods. *Biochemistry*, **32**: 3005-3012, 1993.
 - 10) Huber R, Bode W: Structural basis of the activation and action of trypsin. *Accounts Chem Res*, **11**: 114-122, 1978.
 - 11) Higashi S, Nishimura H, Aita K, Iwanaga S: Identification of regions of bovine factor VII essential for binding to tissue factor. *J Biol Chem*, **269**: 18891-18898, 1994.
 - 12) Higashi S, Matsumoto N, Iwanaga S: Molecular mechanism of tissue factor-mediated acceleration of factor VIIa activity. *J Biol Chem*, **271**: 26569-26574, 1996.
-