

## ◆トピックス◆

# 立体構造からみた TFPI (Tissue Factor Pathway Inhibitor) の作用機構

加藤 久雄\*1 亀井加恵子\*2

Mechanism of Inhibition by TFPI (Tissue Factor Pathway Inhibitor)  
based on the Tertiary Structure

Hisao KATO, Kaeko KAMEI

**Key words:** TFPI, Kunitz type, tissue factor, factor Xa, protease inhibitor

## はじめに

TFPI (Tissue Factor Pathway Inhibitor) は表 1 にまとめて示した諸性質をもつプロテアーゼインヒビターで、外因系凝固の開始反応を阻害する作用をもつ。TFPI には Kunitz 型阻害領域が 3 つ (K1, K2, K3) 存在し、そのうち、K1 が組織因子・VIIa 複合体と、K2 が Xa と結合することにより阻害作用を示す。Kunitz 型阻害領域をもつタンパク質は数多く知られているが、それらのアミノ酸配列から分子進化の過程を調べた報告では、K1 と K2 が近接して分化し、K3 はそれらとは独立に進化したことが示されている。K3 にはプロテアーゼインヒビター活性がないことを考えると、K3 が別の機能を持つ領域として進化したと考えられる。TFPI の立体構造については、今までに、全体構造についての報告はなく、NMR および X 線解析による K2 の立体構造と K1 類似体の立体構造、およびモデリングによる K1 および K2 の立体構造が報告されているのみである。そこで

本稿ではこれらの立体構造を紹介するとともに、C 末端側領域の立体構造についてもふれ、TFPI の機能との関係について考察したい。

## 1. TFPI の全体構造

TFPI は図 1 に示すように比較的酸性アミノ酸に富むアミノ末端側領域 (TFPI-N) と塩基性アミノ酸残基に富むカルボキシル末端側領域 (TFPI-C) の間に存在する 3 つの Kunitz 型阻害領域 (TFPI-K1, TFPI-K2, TFPI-K3) からなっている。K1, K2, K3 ともに全て阻害部位である P1 サイトに Lys あるいは Arg が存在するが、インヒビター活性をもつのは K1 と K2 のみである。表 2 に示すように、これらの 2 つの領域は TF/VIIa と Xa に、それぞれ特異的に結合し、阻害作用を示す。一方、K3 と C 末端側領域はヘパリンなどの多糖硫酸と結合する作用をもっており、内皮細胞表面のヘパラン硫酸などのプロテオグリカンとの結合に重要な役割を果たしている。さらに、これらの領域は内皮細胞や平滑筋細胞などと結合し、細胞の増殖阻害作用を示すことが明らかにされつつある。

\*1 国立循環器病センター研究所 (〒 565-8565 吹田市藤白台 5-7-1)

National Cardiovascular Center Research Institute (Fujishirodai Suita 565-8565, Japan.)

\*2 京都工芸繊維大学繊維学部 (〒 606-0962 京都市左京区松ヶ崎御所海道町)

Kyoto Institute of Technology, Dept of Applied Biology (Matsugasaki, Sakyo-ku, Kyoto 606-0962, Japan)

表1 ヒトTFPIの性質

- 1) ヒト染色体部位: 2p31-32.1  
 遺伝子構造: 約85 kb 8つのエクソン。mRNAは4 kbと1.4 kbの2種類である。  
 遺伝子多型: PstI処理による6.4 kbと6.9 kb, Hind III処理による15 kbと3.7 kb, プロモーター領域のC-399 T変異, C-33 T変異 P 151 L, V 263 M  
 プロモーター領域の塩基配列は明らかになっているが, TFPI mRNAの発現を促進する機構は明らかになっていない。LysoPCはTFPI産生を低下させる。
- 2) 分子量  
 血漿由来TFPI: 遊離型 40-46 kDa リボタンパク質結合型 60-67 kDa 分解型 (truncated from) 33~37 kDa (トロンビン, Xa, プラスミンにより分解を受ける)。  
 大腸菌由来組み換え体 32 kDa  
 哺乳動物由来組み換え体 41 kDa
- 3) 総アミノ酸残基数 276
- 4) 糖鎖などの修飾アミノ酸  
 糖鎖: 3つのN型糖鎖結合位置 (Asn 117, 167, 228) が存在するが, CHO細胞由来の組換え体についての研究ではN型糖鎖は2つ (Asn 117, 167) で, O型糖鎖も2つ (Thr 175, Ser 174) 存在することが明らかになった。ほかの細胞由来の組換え体TFPIの糖鎖には硫酸基が結合しているものがある。  
 リン酸基: HepG2やfibroblastの産生するTFPIには2番目のセリン残基の1部に存在
- 5) ドメイン構造  
 アミノ末端側に酸性領域, カルボキシル末端側に塩基性領域が存在し, その間に3つのKunitz型阻害領域 (K1, K2, K3) がタンデムに並んでいる。
- 6) 主な生合成の部位  
 主に主管内皮細胞で合成されるが, そのほかに血小板 (巨核球), 単球, 繊維芽細胞, 平滑筋細胞でも産生される。一般に肝臓では殆ど合成されないが, サルの場合のみ肝臓で効率よく産生される。
- 7) 健康人の血漿濃度  
 研究グループにより大きく異なるのでわれわれの測定した健康人 (229人, 40~81歳) の抗原量を示す。  
 遊離型TFPI 14.2±7.1 ng/ml (0.35 nM)  
 リボタンパク質結合型TFPI 60.1±16.4 ng/ml (1.5 nM)  
 内皮細胞結合型TFPI 119.8±49.1 ng/ml (3 nM) (ヘパリン投与により上昇した量)  
 心筋梗塞患者やDIC患者, 高脂血症患者では遊離型TFPI値が上昇する。
- 8) 生理機能  
 TF/VIIaおよびXa因子と結合することにより外因系血液凝固の開始反応を阻害する作用をもつほか, 内皮細胞や平滑筋細胞と結合して, それらの増殖を阻害する作用をもつ。
- 9) レセプターおよび結合タンパク質  
 TFPIは細胞表面に存在するヘパラン硫酸プロテオグリカン, 特にsyndecan 4 (Ryudocan)やGlypican 3と結合することが明らかになっているが, それ以外のタンパク質様レセプターについては明らかになっていない。
- 10) 欠乏症の病態  
 TFPIの欠損症の報告はないので, 血栓症などの病態との関係は今後の問題である。TFPIのノックアウトマウスはembryoにおける出血のため, ホモはうまれていない。

TFPI-N	D S E E D E E H T I I T D T E L P P L K L																																																									
TFPI-C	F I Q R I S K G G L I K T K R K R K K Q R V K I A Y E E I F V K N M																																																									
	1	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55																																														
BPTI	R	P	D	F	C	L	E	P	P	Y	T	G	P	C	K	A	R	I	I	R	Y	F	Y	N	A	K	A	G	L	C	Q	T	F	V	Y	G	G	C	R	A	K	R	N	N	F	K	S	A	E	D	C	M	R	T	C	G	G	A
5L15	A	P	D	F	C	L	E	P	P	Y	D	G	P	C	R	A	L	H	L	R	Y	F	Y	N	A	K	A	G	L	C	Q	T	F	Y	Y	G	G	L	A	K	R	N	N	F	E	S	A	E	D	C	M	R	T	C	G	G	A	
TFPI-K1	M	H	S	F	C	A	F	K	A	D	D	G	P	C	K	A	I	M	K	R	F	F	F	N	I	F	T	R	Q	C	E	E	F	I	Y	G	G	C	E	G	N	R	F	E	S	L	E	E	C	K	M	C	T	R	D			
TFPI-K2	K	P	D	F	C	F	L	E	E	D	P	G	I	C	R	G	Y	I	T	R	Y	F	Y	N	N	Q	T	K	Q	C	E	R	F	K	Y	G	G	C	L	G	N	M	N	F	E	T	L	E	E	C	K	N	I	C	E	D	G	
TFPI-K3	G	P	S	W	C	L	T	P	A	D	R	G	L	C	R	A	N	E	N	R	F	Y	N	S	V	T	G	K	C	R	P	F	K	Y	S	G	C	G	G	N	E	N	N	F	T	S	K	Q	E	C	L	R	A	C	K	K	G	
	P5 P4 P3 P2 P1 P1' P2' P3' P4' P5'																																																									
TFPI	N			K1				K2			K3			C																																												

図1 TFPIのアミノ酸配列とKunitz型インヒビターとの比較

表 2 TFPI の K1 と K2 および BPTI とその変異体 (5L15) とプロテアーゼとの結合の解離定数 (nM)

	TF/VIIa	Xa	トリプシン
K1	120-530		
K2	>90	90	
BPTI	9,800	>9,800	0.05
5L15*	0.4	52	0.01

\* 図 1 参照  
文献 3) より引用

## 2. TFPI の立体構造

図 1 に示すように, TFPI の Kunitz 型阻害領域, K1, K2, K3 は代表的な Kunitz 型インヒビターである塩基性膵臓トリプシンインヒビター, BPTI と相同性があり, BPTI の立体構造はもっともよく研究されている。BPTI の Thr11-Ile19 の領域がプロテアーゼとの結合部位で, プロテアーゼの活性部位のポケットに頭を突っ込んだ形となって活性を阻害する。その他の領域はこれらの結合領域を支持するために必要な構造をとっていると考えられる。

### K2 の立体構造

Burgering らが *E. coli* を用いて K2 組換え体を発現し, その立体構造を H1 NMR により解析した結果<sup>1)</sup> を図 2 に示す。BPTI の場合と同様に, 図の上の部分 (Pro11-Thr19) がプロテアーゼとの結合部位である。立体的にみると 1 から始まるアミノ末端側が上側に C 末端側部分が下側にくるように見える。K2 と Xa との複合体は結晶化しなかったが, K2 とトリプシンとの複合体は結晶化したので, その X 線解析を行った。その立体構造は BPTI-トリプシン複合体とほぼ同様で, とくに主鎖のコンフォメーションにはほとんど差がなかった。K2 の中央部分に 3 つの逆平行ベータシートが存在し, C 末端側にヘリックスが存在する。この立体構造をもとにモデリングにより K2-Xa 複合体の立体構造を推定し, 図 3 に示した。緑で示された Xa の活性部位領域を上から見下ろした形になっており, K2 は結合領域を頭に活性部位に突っ込んだ形になっている。K2 と Xa の結合に関与するそれぞれのアミノ酸残基を表 3 (A) に

表 3 (A) K2 と Xa の結合に関与するアミノ酸残基 (文献 1) より引用

K2	Xa	相互反応のタイプ
Arg 15	Asp 189	Salt bridge
	Gly 281	Hydrogen bond
Tyr 17	Arg 143	Hydrogen bond
Arg 20	Ala 61	Hydrogen bond
Arg 32	Glu 37, Glu 39	Salt bridge
Lys 34	Glu 39	Salt bridge
Cys 38	Lys 96	Hydrogen bond
Glu 46	Lys 62	Salt bridge

(B) 5L15 と VIIa の結合に関与するアミノ酸残基 (文献 3) より引用

5L15	VIIa	相互反応のタイプ
Asp 11	Arg 290	Salt bridge
Asp 11	Lys 341	Salt bridge
Arg 15	Asp 338	Salt bridge
Arg 15	Ser 344	Transition state
Arg 15	Gly 342	Oxyanion hole
Arg 15	Ser 344	Oxyanion hole
Arg 20	Asp 196	Salt bridge
Glu 46	Lys 199	Salt bridge

示した。P1 の Arg15 のカルボニル基は Xa のオキシアニオンホールに存在し, またグアニジル基は特異性を決定するポケットに延びて Asp189 のカルボキシル基と塩結合している。Yoneda らがモデリングにより Xa と K1 および K2 との反応を解析した結果<sup>2)</sup> では, Xa が K1 よりも K2 と強く結合する理由は, Xa の基質特異性と, 効果的な疎水的結合によると報告されている。この疎水結合は Xa の Tyr99, Phe174, Trp215 が K2 の Ile13 や Leu39 と結合することによるとされる。

### K1 の立体構造

5L15 は図 1 に示すように BPTI の 8 つのアミノ酸残基を置換した変異体であるが, 表 2 に示すように TF/VIIa と強く結合する。5L15 の構造は K1 の構造とは異なるが, ここでは, Zhang らの報告による TF/VIIa/K1 複合体の立体構造のモデルとして TF・VIIa・5L15complex の X 線解析の結果<sup>3)</sup> を紹介する (図 4)。5L15 の Asp 11-Leu19 の領域が逆平行ベータシートにより VIIa の活性領域と直接に

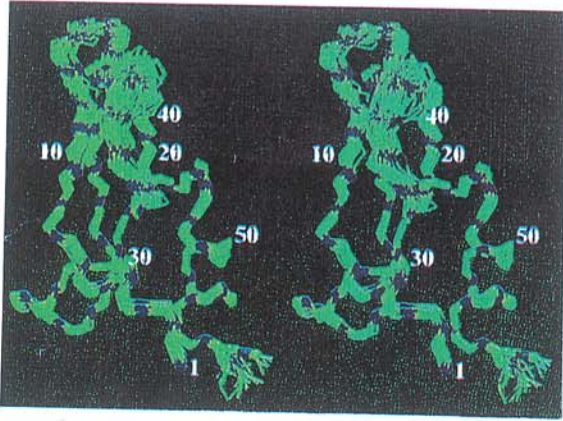


図2 NMRにより決定されたK2の立体構造のステレオ図(文献1より引用)  
 緑:炭素原子, 青:窒素原子

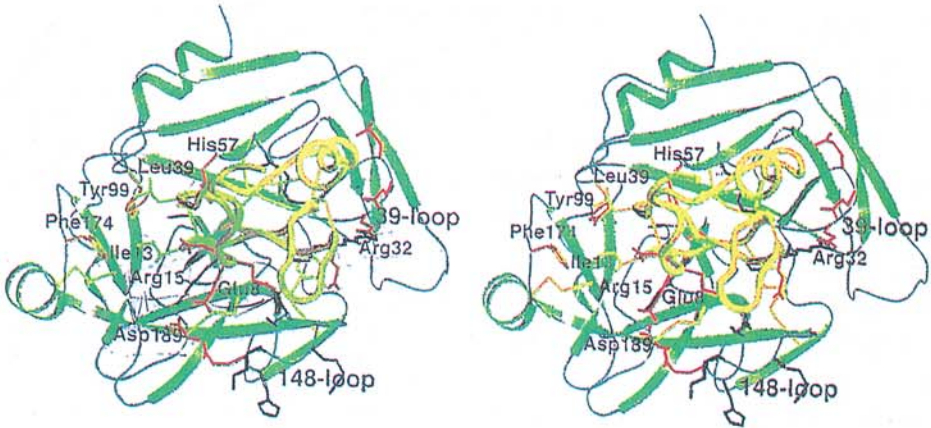


図3 K2とXa複合体の立体構造のステレオ図  
 Xaの活性部位を上から見下ろした形となっており, 活性部位の西側には疎水結合が形成され, TFPIの塩基性アミノ酸残基は東側の39ループに延びている。(文献1より引用)

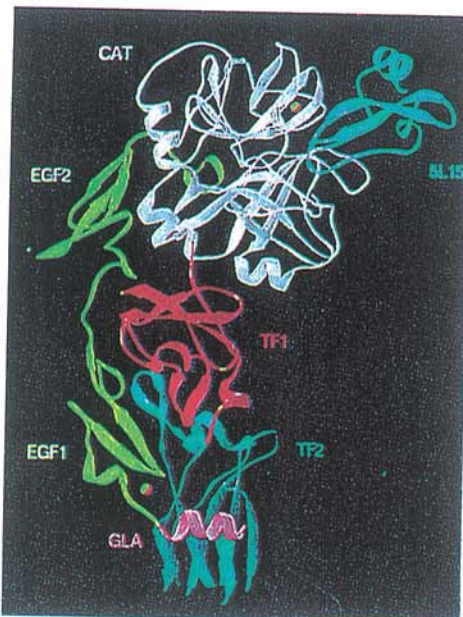


図4 TF/VIIaと5L15複合体の立体構造のリボンモデル(文献3より引用)

結合している。P5からP1'までの領域では5L15とK1の違いはP1のArgとLysの違いだけである。これらの領域およびほかの残基との反応を表3(B)にまとめてしめした。5L15はBPTIのLys46がGluに置換されているが、この残基はVIIaのLys199と水素結合しており、TFPIのK1とK2の場合もこの部分がGluになっている。

### C末端側領域の立体構造

K3についてはプロテアーゼの作用を阻害する作用はなく、立体構造についての報告はないが、この領域がヘパリンと結合する機能をもっていることから、立体構造の形成により、塩基性アミノ酸残基が表面に並ぶようになるのではないかと推測されている<sup>4)</sup>。このようなヘパリンとの結合様式はアンチトロンビンについて詳しく記されている<sup>5)</sup>。K3のP1がArgであるにもかかわらず、プロテアーゼに対する阻害作用を持たない理由は、その立体構造の解明を待つ必要があるが、K1やK2に比べて、P5が塩基性アミノ酸に、P3'が酸性アミノ酸に置換されていることが原因のひとつである可能性がある。

先に記したように、TFPIのC末端側には塩基性アミノ酸残基が集中した部位がある。ヘパリンと結合するタンパク質に共通したヘパリン結合領域の配列として、XBBXBとXBBBX-XBXの2つ保存配列がCardinとWeintraub<sup>6)</sup>により提唱された(Bは塩基性アミノ酸を示す)。ヘパリンはグルコサミンとイズロン酸の2糖繰り返し構造を基本構造とし、水酸基およびアミノ基が高度に硫酸化されている。ヘパリン中の硫酸基やカルボキシル基と結合タンパク質の塩基性アミノ酸とのイオニックな相互作用により、両者が結合し、さまざまな生物活性を示すものと考えられている。その後の種々のヘパリン結合タンパク質の一次構造の比較から、(1)いずれのBも必ずしも塩基性アミノ酸である必要はなく、またXは塩基性アミノ酸でも構わない、(2)塩基性アミノ酸はリシンとアルギニンが多く、ヒスチジンはまれである、(3)酸性

アミノ酸は存在しないことが新たに追加されている<sup>7)</sup>。TFPIのC末端領域のLys254からLys265までの配列がLys-Thr-Lys-Arg-Lys-Arg-Lys-Lys-Gln-Arg-Val-Lysであり、ヘパリン結合タンパク質に共通した配列に一致することから、この領域がヘパリン結合領域であることが容易に推察される。これは、C末端欠失TFPIがヘパリンとの結合が弱くなることや、合成C末端ペプチドがヘパリンに結合するという実験結果とも一致する<sup>8)</sup>。ヘパリン結合領域の二次構造は、アンチトロンビンのように $\alpha$ ヘリックスをとっている場合もあるが、繊維芽細胞増殖因子(FGF)のように $\beta$ 構造であることもある。TFPIにおいて $\alpha$ ヘリックス、 $\beta$ 構造のいずれをとっているかは今後の研究を待たなければならない。アンチトロンビンの場合は、結合するのに必要なヘパリンの最小構造は5糖からなることが明らかになっているが、TFPIの場合は、少なくとも16糖程度の鎖長が相互作用に必要であり(未発表)、ヘパリン中のグルコサミン残基の6位、N位およびイズロン酸残基の2位のすべての硫酸基が必要であることが分かっている<sup>8)</sup>。TFPIはヘパリンによって活性が増強されるが、そのメカニズムは解明されていない。おそらく、K3とC末端側塩基性領域の両方と結合するとともに、Xaとも結合することにより、プロテアーゼとの相互作用を増強していると考えられる。今後、この領域の立体構造が明かにされ、TFPIとヘパリンの相互作用について解明されることが待たれる。

## 2. おわりに

ここで記したように、TFPIの立体構造については、その全体の立体構造や、C末端側部分のK3領域やC末端側塩基性領域の立体構造が明らかになっていない。特にこれらの領域はTFPIのもつもう1つの機能である細胞増殖の制御機能に重要な役割を果たしていると考えられ、これらの領域のヘパリンとの結合や細胞の

リセプターとの結合様式が立体構造の解明により解明されることが期待される。また、TFPIとリン脂質およびリポタンパク質との結合は、その機能を明らかにするために重要な問題であるが、それらの結合様式については明らかでない点が多く、ここではふれなかった。なお、ここではTFPIについてのみ記したが、構造が非常によく似ているが作用の異なるTFPI-2についての研究も最近多くなってきている<sup>9)</sup>。また、マウスにはTFPIとはC末端側構造の大きく異なるTFPI $\beta$ の存在も報告されている<sup>10)</sup>。これらのTFPI関連物質の進歩と相まって、TFPIの構造と機能のより詳細な解明が期待される。なお、TFPIについての総説については文献<sup>11)~13)</sup>を参照してほしい。

#### 文 献

- Burgering MJM, Orbons LPM, van der Doelen A, Mulders J, Theunissen HJM, Grootenhuis PDJ, Bode W, Huber R, Stubbs MT: The second Kunitz domain of human TFPI: Cloning, structure determination and interaction with factor Xa. *J Mol Biol* **269**: 395-407, 1997.
- Yoneda T, Komooka H, Umeyama H: Computer modeling study of the interaction between TFPI and blood coagulation factor Xa. *J Protein Chem* **16**: 597-605, 1997.
- Zhang E, Charles RS, Tulinsky A: Structure of extracellular tissue factor complexed with factor VIIa inhibited with a BPTI mutant. *J Mol Biol* **285**: 2089-2104, 1999.
- Enyoji K, Miyata T, Kamikubo Y, Kato H: Effect of heparin on the inhibition of factor Xa by tissue factor pathway inhibitor: A segment, Gly212-Phe243, of the third Kunitz domain is a heparin-binding site. *Biochemistry* **34**: 5725-5735, 1995.
- 城谷裕子, 小出武比古: 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-立体構造でみる動的構造変化 血栓止血誌 **10**: 93-99, 1999.
- Cardin AD, Weintraub, HJ.R: Molecular modeling of protein-glycosaminoglycan interactions. *Atherosclerosis* **9**: 21-32, 1989.
- Conrad HE: Heparinoid/protein interactions. In "Heparin-binding proteins" pp.183-202, Academic Press, San Diego, USA, 1998.
- Ye Z, Takano R, Hayashi K, Ta T-V, Kato H, Kamikubo Y, Nakahara Y, Kumeda K, Hara S: Structural requirements of human tissue factor pathway inhibitor (TFPI) and heparin for TFPI-heparin interaction. *Thromb Res* **89**: 263-270, 1998.
- Shinoda E, Yui Y, Hattori R, Tanaka M, Inoue R, Aoyama T, Takimoto Y, Mitsui Y, Miyahara K, Shizuta Y, Sasayama S: TFPI-2 is a novel mitogen for vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* **274**: 5379-5384, 1999.
- Chang J-Y, Monroe DM, Oliver JA, Roberts HR: TFPI  $\beta$ : mouse lung cDNA library possesses neither a third Kunitz domain nor the basic C-terminal, but instead has a completely different C-terminal sequence. *Thromb Haemostas* **81**: 45-49, 1999.
- 加藤久雄, 円城寺慶一: Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI). 動脈硬化 **23**: 511-517, 1996.
- 加藤久雄, 和田英夫, 久米田幸介: 内皮細胞結合型外因型凝固インヒビター (TFPI). 動脈硬化 **24**: 461-467, 1997.
- 神窪勇一: 血管の発生とその形成に果たす Tissue Factor および Tissue Factor Pathway Inhibitor の役割について. 血栓止血誌 **10**: 56-71, 1999.