

活性化プロテイン C の立体構造

宮田 敏行*¹, 竹田-志鷹真由子*², 梅山 秀明*²

Three Dimensional Structure of Activated Protein C

Toshiyuki MIYATA*¹, Mayuko TAKEDA-SHITAKA*² and Hideaki UMEYAMA*²

Key words : X-ray crystallography, protein C, serine protease, thrombophilia, three dimensional structure

1. はじめに

血管内皮細胞は血液の流動性を保つため、その表面に抗凝固機能を保持している。本項で解説するプロテイン C (PC) は、血管内皮細胞上できわめて重要な抗血栓性を担っている。PC は、血管内皮細胞上の内皮細胞 PC レセプター (Endothelial cell PC receptor: EPCR) に結合し、トロンピン-トロンボモジュリン複合体により活性化される。その結果生じた活性化 PC (APC) は、プロテイン S の存在下で活性化型凝固第 V 因子 (Va) および活性化型凝固第 VIII 因子 (VIIIa) を水解し、不活化する。PC の先天性欠乏症は静脈血栓症の遺伝的素因であることから明らかなように、PC 抗凝固機構は生理的に重要である。

PC は N 末端から Gla ドメイン, EGF 1 ドメイン, EGF 2 ドメイン, プロテアーゼドメインから成る。このドメイン構造は, X, IX, VII の各ビタミン K 依存性凝固因子と同じなので、進化的にはこれらの因子と起源を 1 つにすると考えられる。しかし、PC はこれらの因子とは異なる

り、凝固を制御する役割をもつ。このため、アンチトロンピンでは阻害されないこと、血中半減期が短いこと、活性化や抗凝固機能の発揮に補助蛋白質を要求することなど、ほかの因子には見られない際立った特徴を示す。1996 年に、Phe-Pro-Arg クロロメチルケトン (PPACK) で活性を不活化した Gla ドメイン欠如ヒト APC の立体構造が、X 線結晶解析の手法で決定された¹⁾。本項ではこの論文を中心に APC の立体構造を解説したい。PC の諸性質は表 1 に示す。

2. APC の全体構造

結晶構造が解析されたのは、Gla ドメイン欠如ヒト APC である (図 1)。EGF 1 ドメインは約 30×25×20 Å, EGF 2 ドメインは約 30×20×20 Å, プロテアーゼドメインは約 45×50×50 Å の大きさであった。PC の EGF 1 ドメインのアミノ酸配列をほかの EGF 様ドメインと比較すると、1 つの SS 結合を含む 7 アミノ酸残基の挿入がみられる。この挿入により、EGF 1 ドメインは少しふくらんだ形をしている。X 線

*¹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.]

*²北里大学薬学部生物分子設計学教室 [〒108-8641 東京都港区白金 5-9-1]

School of Pharmaceutical Sciences, Kitasato University [5-9-1 Shirokane, Minato-ku, Tokyo 108-8641, Japan.]

表1 プロテインC・メモ

生理機能	血液凝固の制御, 特に第 Va 因子と第 VIIIa 因子を限定分解により不活化する。
分子量	62,000 (SDS-PAGE), 血中の約 15% は 1 本鎖分子であり, 85% は S-S 結合で連結された 2 本鎖 (L 鎖および H 鎖) として存在。47,456 (cDNA からの推定) + 23% 糖鎖
総アミノ酸残基数	1 本鎖は 419 残基, 2 本鎖は L 鎖 155 残基, H 鎖 262 残基。両鎖の生成時に Lys-Arg が切り離される。H 鎖のアミノ末端から 12 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。
糖鎖などの修飾アミノ酸	γ -カルボキシグルタミン酸 (9 残基, 6 位, 7 位, 14 位, 16 位, 19 位, 20 位, 25 位, 26 位, 29 位), エリスロ β ヒドロキシアスパラギン酸 (71 位), Asn 結合型糖鎖は 4 カ所 (Asn 97, Asn 248, Asn 313, Asn 329)。約 30% のプロテイン C は Asn 329 に糖鎖を持たない低分子量 β 型。
ヒト染色体部位	2q14~21
遺伝子構造	約 11.2 kb 9 エクソン
血漿濃度	3~5 mg/l 65 nM
欠乏症	静脈血栓症
血中半減期	6~8 時間, 活性化プロテイン C は 15~20 分。
主な生合成の場所	肝細胞
主な局在場所	血中
レセプターおよび結合蛋白質	レセプターは血管内皮細胞上の EPCR (endothelial cell protein C receptor)。血中のプロテイン S は結合蛋白質。
血中インヒビター	protein C inhibitor (ヘパリンで促進される), α_1 -antitrypsin, α_2 -macroglobulin
活性化因子	トロンピン-トロンボモジュリン複合体
活性中心残基	His 211, Asp 257, Ser 360

右ページの図の説明

図 1 Gla ドメイン欠如ヒト APC と阻害剤 PPACK 複合体の結晶構造 (ステレオ図)

主鎖は白線, EGF 1 ドメインの β シートは黄, EGF 2 ドメインの β シートはマゼンタ, プロテアーゼドメインの β シートは水色, α ヘリックスは赤で示す。Gla ドメインは結晶化のために切除されている。阻害剤 PPACK はオレンジの CPK モデル, SS 結合は黄色で示す。プロテアーゼドメインの 60 ループ (緑) と 148 ループ (ピンク) も示した。Protein Data Bank (PDB) : 1AUT。なお, 図 1-4 は, ソフトウェア WebLab Viewer (MOLECULAR SIMULATIONS INC.) を用いて作成した。

図 2 APC プロテアーゼドメインの塩基性領域

図 1 を左側面から眺め, 活性中心を中心に据えた図。CPK モデル。塩基性アミノ酸 11 残基を色付けして示した。8 残基 (Arg 222, Arg 229, Arg 230, Lys 233, Arg 314, Lys 308, Lys 311, Arg 314) は緑で, また, トロンピン-トロンボモジュリン複合体による活性化に重要である 3 残基 (Lys 191, Lys 192, Lys 193) はピンクで示す。阻害剤 PPACK はオレンジ, 活性中心残基は水色で示す。

図 3 APC の活性中心の拡大図

Glu 357 (c192) (赤色) と 60 ループ (水色) が APC のプロテアーゼの活性中心にどのようにかかわっているかを示す。活性中心 3 残基は黄色。PPACK の Phe-Pro はオレンジ, Arg は緑の CPK モデルで示す (ステレオ図)。

図 4 APC の Va 結合部位

Va 結合部位であると報告された 4 つの領域 (Arg81-Phe95, Gly142-Leu155, Lys311-Val317, Lys395-His404) を図 1 に緑で加筆した。阻害剤 PPACK はオレンジ, 活性中心 3 残基は水色, SS 結合は黄色で示す。

図 1

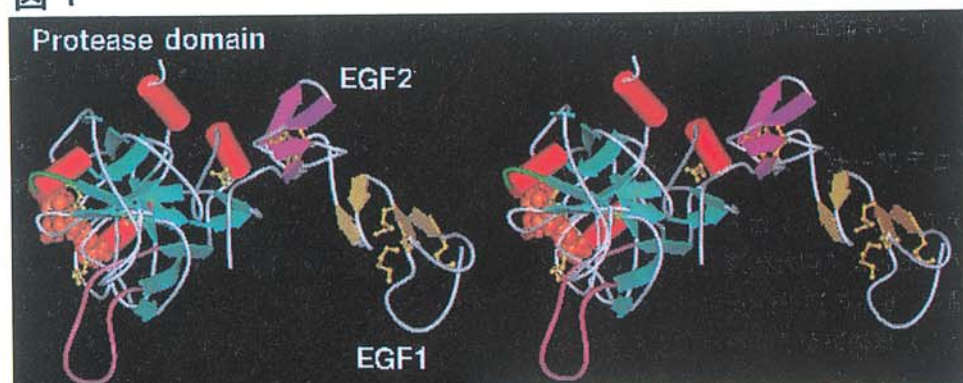


図 2

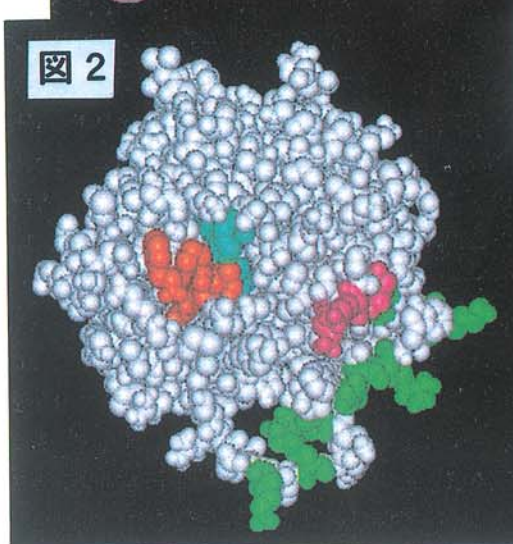


図 4

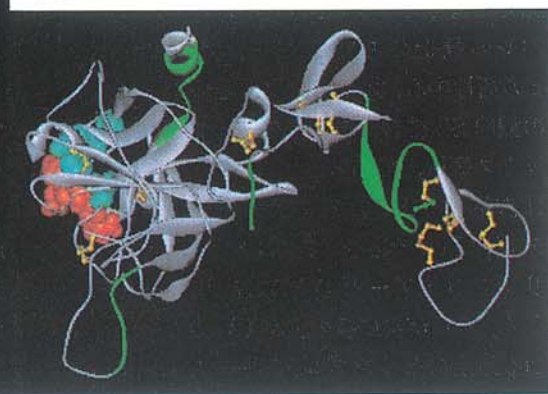
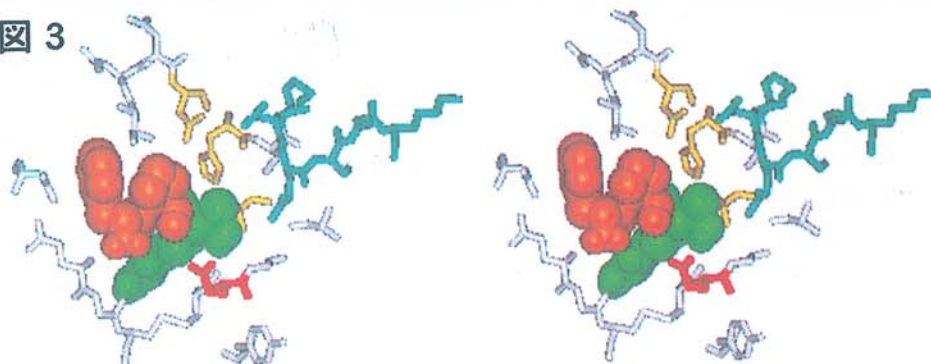


図 3



解析の電子密度は Gln49 以降しか得られず、Gla ドメインと EGF 1 ドメインの間にあると考えられる α ヘリックスの立体構造が決定できなかったため、Gla ドメインをモデリングにより継ぎ足して予想することはできていない。

EGF 1 と EGF 2 のドメイン間をつなぐペプチドは IXa の場合より 3 残基長く、またより曲っていた。したがって、両 EGF ドメインはかなりフレキシブルであると考えられた。EGF 2 ドメイン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った。プロテアーゼドメインは活性中心に PPACK が結合していた。

3. プロテアーゼドメインの構造上の特徴

プロテアーゼドメインはトリプシン型セリンプロテアーゼとよく似た構造をとっている。全体の構造は、6本の逆平行 β シートがつくるバレル(たる)様構造が2つ集ってできている。トリプシンファミリーに共通してみられる構造の特徴は、APCにもみられる。すなわち、①アミノ末端と Asp359 (c194: キモトリプシン番号、今後必要に応じてキモトリプシン番号をcを加えた番号で示す)とのイオンペア、②2つのバレル構造のあいだに位置する Asp-His-Ser の活性中心、③カルシウム結合ループ、④3つの鎖内 SS 結合、⑤2つの分子表面上の α ヘリックス領域、である。

N末端: APCのプロテアーゼドメインのN末端はLeuであり、これはきわめて珍しい。セリンプロテアーゼのN末端はIleがもっとも多く、Valが次に多い。EMBLデータベースの200以上のセリンプロテアーゼ中に、Leuを持つものはPC以外には見当たらない。IXaやXa、トリプシンのN末端残基であるIleはLeu(c158)とペアをつくって側鎖がパックされるが、APCではこの2つのアミノ酸が逆になっている。

カルシウム結合部位: トリプシン様セリンプロテアーゼには1カ所のカルシウム結合部位が存在し、APCにも同様の部位にカルシウムが結合すると考えられる。Glu225からGlu237のループ内には5つの酸性残基(Glu225, Asp227, Glu232, Glu235, Glu237)があり、このなかのGlu225とGlu235がカルシウム結合部位と考えられる。この部位がカルシウム結合部位であると断定できないのは、結晶作成に用いたバッファ中のクエン酸により、カルシウムイオンがAPCからはずれたためである。PCのGlu235

Lys変異体はPC活性化のカルシウムイオン要求性がなくなるという実験などから、Glu225とGlu235がカルシウム結合部位であることは間違いない。

分子表面上の塩基性領域: APCの分子表面上には塩基性アミノ酸が集中した領域が存在する(図2)。この塩基性領域はトロンビン上の塩基性領域(Anion-binding exosite 1とAnion-binding exosite 2: 本シリーズの鈴木, 上村のトピックスを参照²⁾)と比べると理解しやすい。トロンビンのexosite 1はヒルジン結合部位ともよばれ、基質や阻害剤、細胞上の受容体の結合に関与している。一方、トロンビンのexosite 2は、別名ヘパリン結合部位ともよばれる。APC上の塩基性アミノ酸が集中する領域は、トロンビンのexosite 1に相当する表面にある。APCのこの表面は8つの塩基性アミノ酸、Lys191, Lys192, Lys193, Arg222, Arg229, Arg230, Lys233, Arg314から構成されている。これは、トロンビンのexosite 1を構成している7つの塩基性アミノ酸より多い。また、APCの分子表面ループ上のLys308, Lys311, Arg314もこの領域に近い(このループの原子座標は決っていないので側鎖の向きが明らかでない)。また、APCに対して阻害活性をもつRNAが単離されており(アダマーとよぶ)、このRNAアダマーはAPCに対して非拮抗阻害様式であったことから、基質結合部位や触媒部位以外の部位に結合し活性を阻害する³⁾。トロンビンのアダマーはexosite 1に結合することが判明している。APCのRNAアダマーはAPCの塩基性領域に結合し活性を阻害するのかもしれない。

分子表面上のAPC特有のループ: APCは活性中心の下に大きな148ループがある(図1, ピンク)。APCの148ループは4残基の挿入があり、これがAPCの大きな特徴となっている。残念ながら、このループの立体構造はゆらぎのため決定されていないが、このループ内のアミノ酸に変異を示す先天性異常分子は酵素活性を

表2 APCのVaおよびVIIIaの切断部位周辺配列

	P4	P3	P2	P1	P1'	P2'	P3'	P4'
Va	K	K	T	R306	N	L	K	K
Va	L	D	R	R506	G	I	Q	R
Va	M	A	T	R679	K	M	H	D
V	R	L	K	R994	S	Q	F	L
VIIIa	P	Q	L	R336	M	K	N	N
VIIIa	V	D	Q	R562	G	N	Q	I

P1やP2は切断部位のN末端側アミノ酸をさす。P1'やP2'は切断部位のC末端側アミノ酸をさす。S1やS2は、基質のP1残基やP2残基が入り込む酵素側のポケットをさす。

示さないものがあり、天然基質の結合部位を考える上で興味深い。

活性中心近傍: X線解析されたGlaドメイン欠如APCは活性中心にPPACKが結合している。これにより、APCのS1, S2, およびS4の各サブサイトが観察される。APCの基質結合部位は開いていて、大きな基質や阻害剤が近づける構造をしている。基質や阻害剤の結合を妨害すると思われる唯一の構造要素は60ループ(Met213-Lys218)である(図1, 3)。

S2ポケットはトロンピンやXaにみられるものより広くかつ極性をもっている。このS2ポケットのちがいは、ポケットにAPCではThr254, トロンピンではLeu, XaではTyrが存在することで説明される。Thrが存在することにより、APCのP2は大きな残基を好み、また広い基質特異性(Arg, Thr, Gln, 表2)を説明できる。

RGD配列: インテグリンに結合するRGD配列がAPCのArg178-Gly179-Asp180に存在する。Arg178は分子表面に存在するものの、Asp180の側鎖は内部にあるので、このRGD配列は接着に関与すると考えられない。

4. APCの機能

Glu357 (c192) (図3, 赤色): 活性中心近傍にあり、基質と阻害剤の結合に主要な役割を果たしている。このGlu残基をGlnに変異させたGlu192Gln変異体は、Vaの不活化速度が2-3

倍速い。しかし、本変異体は $\alpha 1$ アンチトリプシンで280倍速く阻害された。また、本来阻害されないインヒビター(アンチトロンピン, ウシ膀胱トリプシンインヒビター, TFPI)で阻害されるようになった。このことは、Glu357はAPCの活性を抑制しているものの、プロテアーゼインヒビターによる阻害からも逃れる構造要素であることを示している。

Lys191-Lys192-Lys193(図2, ピンク): この連続した3つの塩基性アミノ酸は、前述の塩基性アミノ酸の集中した領域に存在する。この3残基を全て酸性残基に変異したもの、およびGlyに変異した変異体が作成された。これら2種の変異体のトロンピン単独での活性化速度は天然体と同じであった。一方、トロンピン-トロンボモジュリン複合体による活性化では、天然体は2,000倍活性化速度が上昇するが、酸性変異体ではまったく活性化が見られず、Gly変異体ではわずか30倍の活性化速度の上昇しか観察されなかった。このことから、この3残基のLysは、トロンピン-トロンボモジュリン複合体による活性化に重要な働きをしていると考えられる。

アンチトロンピンで失活されないこと: APCはアンチトロンピンで不活化されない。これは、トロンピンのヘパリン結合部位であるexosite 2が、APCにはないことで説明されよう。exosite 2に対応するAPCの分子表面には塩基性アミノ酸のクラスターが認められないので、ヘパリンはトロンピンとアンチトロンピンのような橋渡しをできない。APCはプロテインCインヒビターというセルピンで失活をうけ、ヘパリンはこの阻害を促進するが、この時のAPC上のヘパリン結合部位は、トロンピンのexosite 1に相当する領域(前述のAPCの塩基性領域, 図2)と考えられる。もうひとつの要素は、APCのS2とS4がアンチトロンピンのP2とP4にうまくはまらないことがあげられる。アンチトロンピンのP2のGlyは、APCの大きく広いS2ポケットに適していない。また、

P4のIleはAPCの親水性のS4ポケットにうまく相互作用しないと考えられる。

Vaの結合部位(図4, 緑) : APCとVaの相互作用部位は合成ペプチドを用いて明らかとなっている。APCの軽鎖中の1カ所(Gly142-Leu155)と重鎖中の2カ所(Lys311-Val317およびLys395-His404)がVaの結合部位として報告されている。軽鎖のArg81-Phe95も弱いながらAPCとVaの相互作用を妨害する。これらを図示すると、Vaの結合領域はAPCの全体構造のへこんだところにあるようにみえる。

プロテインS (PS) との相互作用 : PSの役割は、APCによるVaおよびVIIIaの分解失活化を促進するコファクター機能である。その作用機序はPSが血小板や内皮細胞膜上に結合し、APCを膜上にアンカーすることにある。詳しく述べると、APCはVaのArg506-Gly507の結合を速く切断するが、Vaの失活化に必須のArg306-Asn307結合の切断はおそい。PSはAPCによるArg306-Asn307の切断を20倍促進することによりVaの失活化を加速する。APC単独時、その活性中心は膜上の94 Åに位置するが、PS存在下ではこれが84 Åに低くなる。APCの活性中心のPSによる高さの調節が、Vaの分解不活化に重要であると考えられる。

EPCR との結合 : EPCRはPCのGlaドメインに結合し、PCを血管内皮細胞上に濃縮させる。今回決定されたAPCはGlaドメイン欠如体なので、EPCRが結合するGlaドメインの立体構造は不明である。EPCRはPCを特異的に結合するが、ほかのビタミンK依存性凝固因子を結合しない。したがって、PCのGlaドメインは、ほかのビタミンK依存性凝固因子のGla

ドメインにはない構造の特徴があるものと推測される。

5. おわりに

APCの立体構造を紹介した。現在PC活性化能を残したままで凝固活性をなくした機能修飾トロンビンの作成を目指す研究が行われている。目的はPCの活性化物質の作成にあるので、対象はトロンビンでなくてもよいはずである。PCに働きかけて活性化に導く低分子化合物の探索は、APCの立体構造およびその諸性質が明らかになった現在、研究対象の範疇に入ってきたように思われる。

文 献

- 1) Mather T, Oganessyan V, Hof P, Huber R, Foundling S, Esmon C, and Bode W: The 2.8 Å crystal structure of Gla-domainless activated protein C. *EMBO. J.* 15: 6822-6831, 1996.
- 2) 鈴木宏治, 上村みどり: トロンビン. *血栓止血誌* 10: 195-203, 1999.
- 3) 西川 諭: 活性化プロテインC阻害活性をもつRNA(アプタマー). *血栓止血誌* 9: 440-444, 1998.
- 4) Rezaie AR and Esmon CT: Conversion of glutamic acid 192 to glutamine in activated protein C changes the substrate specificity and increases reactivity toward macromolecular inhibitors. *J. Biol. Chem.*, 268: 19943-19948, 1993.
- 5) Mesters RM, Heeb MJ and Griffin JH: A novel exosite in the light chain of human activated protein C essential for interaction with blood coagulation factor Va. *Biochemistry* 32: 12656-12663, 1993.