

◆トピックス◆

プラスミノゲンアクチベーターインヒビター 1 (PAI-1) の 立体構造と機能相関

小出 武比古*, 城谷 裕子*

Structure-Function Relationship of Plasminogen Activator Inhibitor 1

Takehiko KOIDE*, Hiroko SHIROTANI*

Key words : plasminogen activator inhibitor 1, serpin, tissue plasminogen activator, latent form, heparin, vitronectin

はじめに

プラスミノゲンアクチベーターインヒビター 1 (PAI-1) は線溶系の主要な制御因子として機能する血中セルピン (serpin, serine-proteinase inhibitor) で、その主な特徴を表 1 に示した。PAI-1 の反応中心 (反応部位ともいう) (P1-P1') は Arg 346-Met 347 であり、主として組織型プラスミノゲンアクチベーター (tPA)、ウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーター (uPA) を阻害する¹⁾。さらにトロンビン、活性化プロテイン C、プラスミン、XIIa 因子、XIa 因子、カリクレインに対する阻害活性も認められ、ヘパリン存在下ではトロンビンの阻害速度が 90 倍促進される²⁾。

PAI-1 は立体構造上、ほかのセルピンとは大きく異なる特徴を有する。すなわち、一般的に、セルピンは生理的条件下では活性型 (active form または intact form) (図 1-a) として存在するが、これは準安定な状態であるため、標

的プロテアーゼと相互作用をして、反応中心のペプチド結合 (P1-P1'間) が切断されると、反応中心ループ (反応ループ、反応部位ループともいう) の N 末端側の 16 アミノ酸残基の領域が、 β シート A 中のストランド 3 A (s3 A) とストランド 5 A (s5 A) 間に入り込んで、新たな β ストランド (s4 A) を形成して、より安定な開裂型 (cleaved form) (図 1-c) になる (詳細はアンチトロンビンを例に述べた本誌先号のトピックス³⁾ を参照いただきたい)。しかし、PAI-1 の活性型は安定性がさらに悪く、生理的条件下で、反応中心のペプチド結合が切断されることなく、自発的に潜在型 (latent form) (図 1-b) になるという特徴があり、活性型から潜在型への移行の半減期 $T_{1/2}$ は 37°C でわずか 2 時間である。そのため、最初に解析された PAI-1 の結晶構造も潜在型であったが⁴⁾、最近、活性型 PAI-1 の立体構造を明らかにするため、天然のものよりもはるかに安定性の良い PAI-1 変異体が作製され⁵⁾、ごく最近、Sharp らがその結晶

*姫路工業大学理学部生命科学科・生体物質化学 II 講座 [〒 678-1297 兵庫県赤穂郡上郡町光都 3-2-1]

Department of Life Science, Faculty of Science, Himeji Institute of Technology (3-2-1 Kouto, Kamigori-cho, Ako-gun, Hyogo 678-1297, JAPAN.)

図 1-a

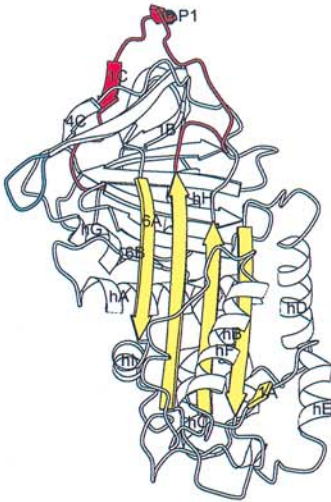


図 1-b

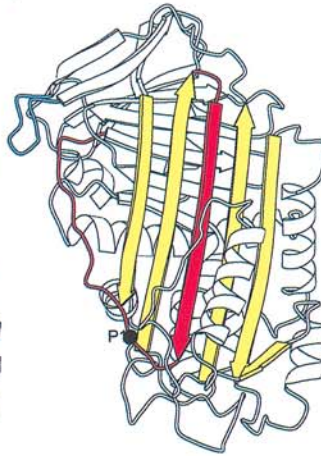


図 1-c

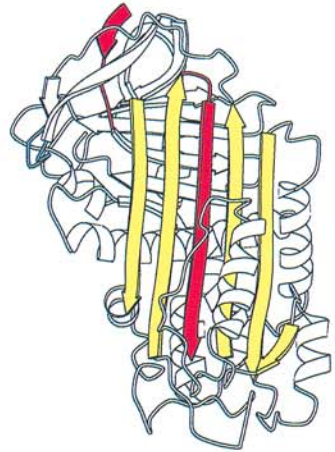


図 2-a

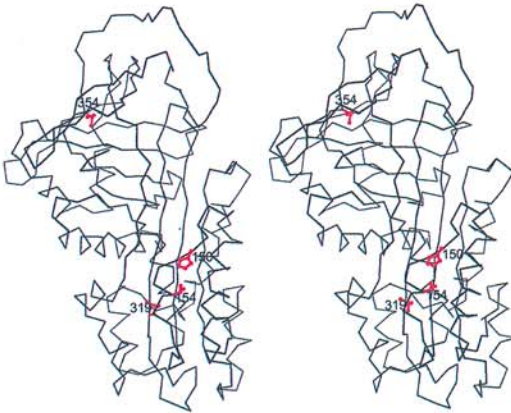


図 2-b

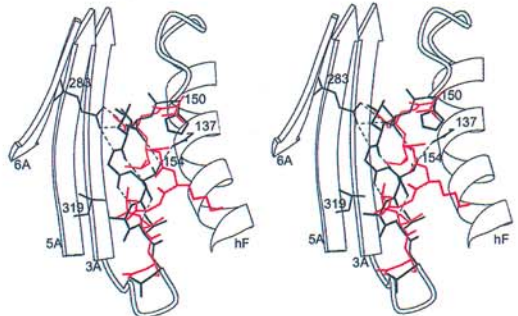
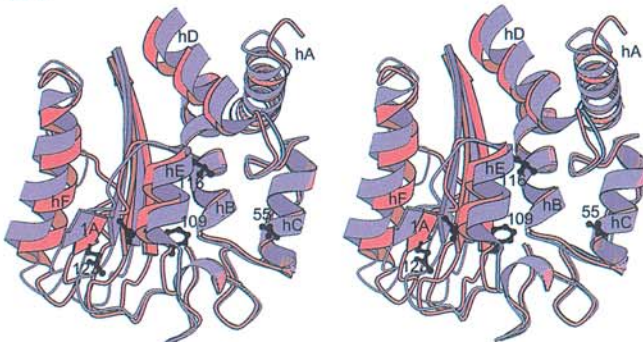


図 3



化に成功した⁶⁾。その結晶構造解析から, PAI-1 が活性型から潜在型へ移行する構造的な要因が明らかになりつつある。本稿では PAI-1 の立体構造上の特徴である潜在型形成機構を中心に解説する。

1. PAI-1 はなぜ潜在型をとりやすいのか — 活性型四重変異体からの知見

セルピンの潜在型は, アンチトロンビンや α_1 -アンチトリプシンでも知られているが, それらは 0.9 M グアニジンで処理したり, 60°C 以上の温度ストレスを与えた場合に限られている。しかし, PAI-1 は生理的条件下でも潜在型になり易い。1992 年, Mottonen ら⁴⁾ は PAI-1

表 1 プラスミノゲンアクチベーターインヒビター 1・メモ

略号	PAI-1
生理機能	プラスミノゲンアクチベーター (組織型プラスミノゲンアクチベーター (tPA) とウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーター (uPA) を阻害することにより線溶を制御。
分子量	52,000
総アミノ酸残基数	379
ドメイン構造	分子内にドメイン構造はないが, 分子全体としてほかの多くのタンパク質と共通構造を有し, セルピン・スーパーファミリーに属する。
糖鎖などの修飾アミノ酸	3カ所の Asn (209, 265, 329) に N 型糖鎖が結合。S-S 結合がない。
ヒト染色体部位	7q21.3~22
遺伝子構造	12.2 kb, 9 エクソン, 8 イントロン
血漿濃度	20 $\mu\text{g/l}$, 0.4 nM (日内変動があり, 早朝がもっとも高く, 以後減少する)
欠乏症	出血傾向
高値疾患	冠状動脈性心疾患, アテローム性動脈硬化症
血漿中の半減期	約 30 分
生合成の場所	血管内皮細胞, 血管平滑筋細胞, 肝細胞, 繊維芽細胞
主な局在場所	血中 (ほとんどは血小板中)
レセプターおよび結合タンパク質	LRP (LDL レセプター関連タンパク質) ビトロネクチン

図 1 PAI-1 立体構造の 3 型 (Sharp AM et al., Structure 7: 111-118, 1999. より引用)。

β シート A を黄色, 反応中心ループを赤色, ゲート領域を水色で示した。

a) 活性型 (intact form) (正常型より安定性の高い四重変異体; Asn 150 \rightarrow His, Lys 154 \rightarrow Thr, Gln 319 \rightarrow Leu, Met 354 \rightarrow Ile の 4 カ所に変異を導入したもの)

b) 潜在型 (latent form). 黒丸 (●) は P1 位の位置を示す。

c) 開裂型 (cleaved form)

潜在型と開裂型では, 反応中心ループの N 末端領域が β シート A 中に挿入され, ストランド 4 A (赤色) を形成している。

図 2-a PAI-1 変異体 (図 1-a) の変異箇所 (Sharp AM et al., Structure 7: 111-118, 1999. より引用)。変異箇所の側鎖を赤色で示した。

図 2-b 3_{10} ヘリックスを形成する構造変化に関係する 3 カ所の変異アミノ酸残基 (Asn 150 \rightarrow His, Lys 154 \rightarrow Thr, Gln 319 \rightarrow Leu) の拡大ステレオ図 (Sharp AM et al., Structure 7: 111-118, 1999. より引用)。

128~150 番目のアミノ酸残基 (ヘリックス F 領域) と 158~162 番目のアミノ酸残基を活性型と潜在型で重ね合わせ, その間の 150~158 番目のアミノ酸残基を活性型は黒色, 潜在型は赤色で示した。

図 3 活性型 (ピンク色) から潜在型 (紫色) への移行により引き起こされるビトロネクチン結合領域の構造変化 (Sharp AM et al., Structure 7: 111-118, 1999. より引用)。

阻害活性に影響を及ぼさず, ビトロネクチンの結合に影響を及ぼすアミノ酸残基 (Gln 55, Phe 109, Met 110, Leu 116, Gln 123) の側鎖をボールアンドスティックモデルで示した。

の潜在型の X 線結晶構造 (2.6 Å 分解能) を報告した(図 1-b)。この潜在型 PAI-1 は、反応中心のペプチド結合が切断されていないにも拘わらず、反応中心ループの N 末端側領域 (P 16-P 4 位にあたる Ser 343~Val 355) が、ほかのセルピンの開裂型と同様に、完全に β シート A 中に入り込んで、新たな s 4 A を形成している。このため反応中心と標的プロテアーゼとの相互作用が起りにくく、潜在型 PAI-1 は阻害活性を示さないが、尿素やグアニジンなどの変性剤下で、再び活性型に戻ることから、「潜在型」と呼ばれる。潜在型における s 4 A は s 3 A や s 5 A との間に多くの水素結合や疎水結合を形成して安定化している⁴⁾。最近、Sharp らは 4 ヲ所にアミノ酸置換 (すなわち Asn 150 \rightarrow His, Lys 154 \rightarrow Thr, Gln 319 \rightarrow Leu, Met 354 \rightarrow Ile) を施すことにより、天然 PAI-1 よりも 72 倍安定化し、潜在型への移行の半減期が 145 時間の PAI-1 四重変異体の結晶化に成功した (図 1-a)⁶⁾。この四重変異体のアミノ酸置換部位はすべて、PAI-1 が活性型から潜在型へ移行する際に動く場所に位置している (図 2-a)。また、個々の置換体の活性型の半減期はいずれも 6.6 時間以内と短く、145 時間という長時間の安定化のためには 4 ヲ所のアミノ酸置換によるそれぞれの寄与が必要である。4 ヲ所の置換部位のうち、Met 354 だけは遠位ヒンジを形成する β ストランド 1C (s 1C) 内にあるが、C 1-インヒビターの同部位の変異体 (Val 366 \rightarrow Met) ではポリマー化が起り、反応中心ループが β シート A 中に入り込み潜在型様構造をとることが明らかにされている。PAI-1 はこの部位が元々 Met であるため、構造が不安定となり、潜在型をとり易いものと考えられる。一方、Asn 150, Lys 154, Gln 319 は β シート A が開いて反応中心ループが入り込む領域の周りに存在している (図 2-b)。この PAI-1 四重変異体で見られる活性型では、ヘリックス F (hF) と s 3 A とをつなぐループ (His 150 と Thr 154 が含まれる) が 1 回転の 3_{10} ヘリックスを形成して

おり、Thr 154 の側鎖が周辺と水素結合を形成することによって、この 3_{10} ヘリックスが安定化しており、さらにこの部分が s 6 A 中の Glu 283 の側鎖との間で水素結合を形成することにより、潜在型の形成を妨げていると考えられる。

2. 反応中心ループとプロテアーゼ阻害の特異性

一般に、セルピンは標的プロテアーゼを阻害する際、まず反応中心の P 1 位のカルボニル炭素とプロテアーゼの活性中心 Ser の水酸基との間にアシル結合を形成し、その後、切断された反応中心ループの N 末端側領域が s 4 A として β シート A 中に挿入されることで安定化する。セルピンによるプロテアーゼ阻害の特異性を決定する上でもっとも重要なのは反応中心の P 1 位のアミノ酸残基であり、PAI-1 では Arg である。この結果、PAI-1 は塩基性アミノ酸残基を基質特異性にもつプロテアーゼを特異的に阻害する。しかし、PAI-1 は tPA や uPA など線溶系プロテアーゼに対しては迅速な阻害活性を示すが、トロンビンに対しては非常に遅い。この原因は、tPA は活性中心以外にも立体構造的に活性中心近くに存在し、分子表面に出たループ (Lys 296-His-Arg-Arg-Ser-Pro-Gly 302) が PAI-1 と相互作用するためである。つまり、同ループ中の陽電荷アミノ酸残基が PAI-1 の反応中心ループ C 末端側の P 4'~P 9' 位 (Glu 350-Glu-Ile-Ile-Met-Asp 355) の陰電荷アミノ酸残基 (Glu 350, Glu 31 および Asp 355) と相互作用するため、PAI-1 は tPA に対し反応性が高いと考えられている⁷⁾。逆に、PAI-1 の反応中心ループ中の陰電荷アミノ酸残基は、トロンビンの Glu 25 (キモトリプシン番号では 39), Glu 202 (同 192) と反発することが明らかにされ、トロンビンに対する低反応性が解明され始めた⁸⁾。

3. 基質型 PAI-1 と反応中心ループ

標的プロテアーゼによるセルピンの反応中心ペプチド結合の切断後の反応中心ループの β シート A への挿入による新たな s4 A の形成はセルピンによるプロテアーゼ阻害機構の大きな特徴と考えられてきた。その根拠として、エラスターゼの基質として知られる非インヒビターセルピンのオポアルブミンでは、エラスターゼによって反応中心に相当するペプチド結合が切断されても、その後の β シート A への挿入がないことが挙げられていた。PAI-1 についても、反応中心ループ内 P 14 位 Thr 333 が Arg へ置換した PAI-1 変異体は基質型となり、プロテアーゼによって分解されてしまうことが示され、変異体は反応中心ループが β シート A へ挿入できないために、阻害活性を失い、基質型になってしまうと考えられた⁹⁾。しかし、Aertgeerts ら¹⁰⁾ は基質型 PAI-1 変異体 (P 12 位 A 335 P) の 2.7 Å 分解能の X 線結晶構造解析に成功し、この変異体が開裂型 (図 1-c) であることを明らかにし、セルピンの反応中心ペプチド結合の切断に伴う反応中心ループの β シート A への挿入は必ずしもセルピンのインヒビター機能に必須のものではないことを示した。

4. ヘパリン結合領域

ヘパリン存在下で PAI-1 はトロンビンに対する阻害活性のみ促進されることが知られている。アンチトロンビンやヘパリンコファクター II のヘパリン結合領域は hD 上とその周辺の塩基性アミノ酸残基のクラスターであるが³⁾、PAI-1 でも hD 上の Lys 65, Lys 69, Arg 76, Lys 80, Lys 88 がヘパリン結合部位であり、特に、Arg 76, Lys 80, Lys 88 の重要性が明らかにされている¹¹⁾。また、PAI-1 が uPA などの標的プロテアーゼと複合体を形成した際に露呈され、そのクリアランスに関与する LRP (low

density lipoprotein receptor-related protein, LDL レセプター関連タンパク質) との結合部位もこのヘパリン結合領域と重複して存在することが示唆されている¹²⁾。

5. ビトロネクチン結合領域

ビトロネクチンは分子量 78,000 の血漿糖タンパク質で、分子内に Arg-Gly-Asp 配列をもつ細胞接着タンパク質の 1 つであるが、一方で、ビトロネクチンは活性型 PAI-1 に結合してその構造を安定化し、PAI-1 のトロンビン阻害速度を 200 倍増加させる。各種 PAI-1 変異体を用いた研究より、PAI-1 のビトロネクチン結合領域は Gln 55 (hC 上), Phe 109, Met 110, Leu 116 (いずれも hE 上) および Gln 123 (s1 A 上) にまたがる平面の領域であることが明らかにされている¹³⁾。また、モノクローナル抗体を用いた研究からもアミノ酸残基番号 110~145 の領域 (hE, s1 A および hF の領域) がビトロネクチンとの結合に重要であると提唱されている¹⁴⁾。PAI-1 とビトロネクチンの結合は、活性型 PAI-1 に特異的であり、潜在型や開裂型、プロテアーゼとの複合体形成 PAI-1 とビトロネクチンとの結合は活性型の 1/100 以下に弱くなるが、この理由は活性型と潜在型 PAI-1 の立体構造の違いから推察できる。上述のビトロネクチン結合領域 (hE, s1 A および hF の領域) は活性型から潜在型への移行によってかなり大きく変化しており (図 3)、この構造変化のために潜在型をはじめとする反応中心ループ挿入型にはビトロネクチンが結合しなくなると考えられる。逆に、活性型 PAI-1 にビトロネクチンが結合することによって、PAI-1 の反応中心ループの β シート A への挿入が妨げられ、活性型が安定化されるものと推察される。

おわりに

PAI-1 は線溶系の制御だけでなく、細胞接着

や組織再生にも重要な役割を果たすなど多岐にわたる機能を有するセルピンである。安定性の高い活性型 PAI-1 変異体の結晶構造が明らかになったことで、立体構造に基づいた有用なドラッグデザインの可能性も開かれたといえる。

文 献

- 1) Ny T, Sawdey M, Lawrence D, Millan JL, Loskutoff DJ: Cloning and sequence of a cDNA coding for the human β -migrating endothelial-cell-type plasminogen activator inhibitor. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**: 6776-6780, 1986.
- 2) Keijer J, Linders M, Wegman JJ, Ehrlich HJ, Mertens K, Pannekoek H: On the target specificity of plasminogen activator inhibitor 1: The role of heparin, vitronectin, and the reactive site. *Blood* **78**: 1254-1261, 1991.
- 3) 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作用機構-立体構造で見る動的構造変化 *血栓止血誌* **10**: 93-99, 1999.
- 4) Mottonen J, Strand A, Symersky J, Sweet RM, Danley DE, Geoghegan KF, Gerard RD, Goldsmith EJ: Structural basis of latency in plasminogen activator inhibitor-1. *Nature* **370**: 270-273, 1992.
- 5) Berkenpas MB, Lawrence DA, Ginsburg D: Molecular evolution of plasminogen activator inhibitor-1 functional stability. *EMBO J* **14**: 2969-2977, 1995.
- 6) Sharp AM, Stein PE, Pannu NS, Carrell RW, Berkenpas MB, Ginsburg D, Lawrence DA, Read RJ: The active conformation of plasminogen activator inhibitor 1, a target for drugs to control fibrinolysis and cell adhesion. *Structure* **7**: 111-118, 1999.
- 7) Madison EL, Goldsmith EJ, Gerard RD, Gething M-JH, Sambrook JF, Bassel-Duby RS: Amino acid residues that affect interaction of tissue-type plasminogen activator with plasminogen activator inhibitor 1. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 3530-3533, 1990.
- 8) Rezaie AR: Elucidation of the structural basis for the slow reactivity of thrombin with plasminogen activator inhibitor-1. *Biochemistry* **37**: 13138-13142, 1998.
- 9) Lawrence DA, Olson ST, Palaniappan S, Ginsburg D: Serpin reactive center loop mobility is required for inhibitor function but not for enzyme recognition. *J Biol Chem* **269**: 27657-27662, 1994.
- 10) Aertgeerts K, De Bondt HL, De Ranter CJ, Declerck PJ: Mechanisms contributing to the conformational and functional flexibility of plasminogen activator inhibitor-1. *Nature Struct Biol* **2**: 891-897, 1995.
- 11) Ehrlich HJ, Gebbink RK, Keijer J, Pannekoek H: Elucidation of structural requirements on plasminogen activator inhibitor 1 for binding to heparin. *J Biol Chem* **267**: 11606-11611, 1992.
- 12) Stefansson S, Muhammad S, Cheng X-F, Battey FD, Strickland DK, Lawrence DA: Plasminogen activator inhibitor-1 contains a cryptic high affinity binding site for the low density lipoprotein receptor-related protein. *J Biol Chem* **273**: 6358-6366, 1998.
- 13) Lawrence DA, Berkenpas MB, Palaniappan S, Ginsburg D: Localization of vitronectin binding domain in plasminogen activator inhibitor-1. *J Biol Chem* **269**: 15223-15228, 1994.
- 14) van Meijer M, Gebbink RK, Preissner KT, Pannekoek H: Determination of the vitronectin binding site on plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1). *FEBS Lett* **352**: 342-346, 1994.