

ストレプトキナーゼ-ミニプラスミン複合体の立体構造

宮田 敏行*, 峯 昇平*

Three Dimensional Structure of Streptokinase-miniplasmin Complex

Toshiyuki MIYATA*, Shouhei MINE*

Key words : X-ray crystallography, streptokinase, staphylokinase, plasminogen, three dimensional structure

1. はじめに

プラスミノゲン (Pg) は線溶酵素プラスミン (Pn) の前駆体である。Pn はフィブリンを溶解するのみならず、凝固第 V 因子や凝固第 VIII 因子、フィブリノゲンを分解し、プロコラゲナーゼやメタロプロテアーゼの活性化も行なう。ストレプトキナーゼ (SK) は Pg 活性化能をもつ溶血性連鎖球菌, Streptococci の菌体外蛋白質である。それ自体は酵素活性を示さないものの、Pg (もしくは Pn) に結合し、複合体を形成して Pg 活性化能を発揮する。最近、SK-Pn 複合体および SK の β ドメインの立体構造が、X 線結晶構造解析の手法で明らかにされた¹⁾²⁾。残念ながら、結晶構造解析された複合体は、SK-Pn であり SK-Pg ではなかったため、SK がどのような機構で前駆体 Pg にプロテアーゼ活性を賦与するかについて明確な結論は得られなかった。しかし、結晶構造は、SK-Pn 複合体の基質特異性の変換機構や α 2-プラスミンインヒビターに対する不感受性など、多くの重要な情報を与えた。本稿では、結晶構造が報告された 2 つの論文を中心に SK-Pn 複合体の立体構造を解説したい。また、ほぼ同時期にスタフィロ

キナーゼ (SAK) -Pn 複合体の X 線結晶構造解析も発表されたので³⁾、SK-Pn 複合体の立体構造を SAK-Pn 複合体の立体構造と比較しながらその違いを述べることにより、SK-Pn 複合体のユニークな点も解説したい。SK-Pn 複合体と SAK-Pn 複合体の差異を立体構造から論じた総説も併せて参照されたい⁴⁾。

2. プラスミノゲン (Pg)

Pg の諸性質を表 1 に示す。Pg は 1 本鎖糖蛋白質であり、N 末端から preactivation ドメイン (分子量約 8,000)、5 つのクリングルドメイン (K1 から K5 と略)、セリンプロテアーゼドメインから成る。Pg は Pg 活性化因子 (tPA, uPA など) で活性化される。この際、Pg 分子内の Arg 561-Val 562 結合が限定分解をうけ、活性型 Pn となる。Pn は Pg 活性化能をもたないものの、Pg (もしくは Pn) 分子から preactivation ドメインを遊離させる活性をもつ。血中に循環している Pg の N 末端残基は Glu なのでこれを Glu-Pg とよび、preactivation ドメインが遊離した Pg を Lys-Pg とよぶ。Lys-Pg は、Glu-Pg より活性化されやすい。したがって、Pg

* 国立循環器病センター研究所 [〒 565-8565 大阪府吹田市藤白台 5-7-1]
National Cardiovascular Center Research Institute [5-7-1 Fujishirodai, Suita 565-8565, Japan.]
Tel. 06-6833-5012, Fax. 06-6872-8091, e-mail: miyata@ri.ncvc.go.jp

表 1 プラスミノゲンメモ

生理機能	フィブリンの分解, プロコラゲナーゼの活性化
分子量	92,000 (SDS-PAGE), 88,430 (cDNA から推定), 糖含量約 2%
総アミノ酸残基数	791残基, プラスミンで N 末端側の preactivation ドメインが限定分解されたものを Lys-プラスミノゲンとよぶ。これは N 末端が Met69 もしくは Lys78, Val79 となったプラスミノゲンである。Arg561-Ser562 結合が切断され活性型プラスミンとなる。
ドメイン構造	N 末端より, preactivation ドメイン (N 末端領域ペプチドともよばれる), 5 つのクリングルドメイン, セリンプロテアーゼドメイン
糖鎖などの修飾アミノ酸	Lys を固定化したカラムを用いて ϵ アミノカブロン酸の濃度勾配により 1 型と 2 型に分離できる。1 型は Asn289 と Thr346 に糖鎖が結合, 2 型は Thr346 にのみ糖鎖が結合。
ヒト染色体部位	6q26
遺伝子構造	約 52.5 kb, 19 エクソン
血漿濃度	100~170 mg/l, 1.2~2.0 μ M
欠乏症	日本人の約 3.6% に Ala601 が Thr に変異したプラスミノゲン異常症が見られる。
血中半減期	2.2 時間
主な生合成の場所	肝
主な局在場所	血中
レセプター, 結合蛋白質	血管内皮細胞上のアネキシン II, フィブリン (フィブリンへの結合は plasma carboxypeptidase B の作用でリジンが遊離すると低下する)
血中インヒビター	α 2-プラスミンインヒビター, α 2-マクログロブリン
活性化因子	tPA, uPA, SK-Pn 複合体, SK-Pg 複合体, SAK-Pn 複合体
活性中心残基	His603, Asp646, Ser741

の活性化は, まず Glu-Pg が Glu-Pn へと活性化され, 生成した Glu-Pn が Glu-Pg を Lys-Pg へ変換し, こうして生成した Lys-Pg が Pg 活性化因子により効率よく Lys-Pn へと活性化される経路をとる。

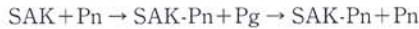
Glu-Pg と Lys-Pg の高次構造は大きく異なる。多くの研究から総合すると, Glu-Pg はコンパクトなまとまった形をしているのに対し, Lys-Pg は各ドメインが伸びた形をとっているらしい。この高次構造の違いにより, Lys-Pg の方が Glu-Pg より活性化されやすいと説明されている。一方, Glu-Pg はリジンや ϵ -アミノカ

ブロン酸の存在下では, Lys-Pg と同程度の活性化速度を示す。

Pg は, その 5 つのクリングルドメインのうち K1 から K4 にペプチドの C 末端リジンに特異的に結合する“リジン結合部位” (LBS) を持つ。また, K5 にはフィブリンの側鎖リジンに結合するといわれるアミノヘキシル部位が存在する。これらを介して Pg はフィブリンに特異的に結合する。tPA もフィブリンに対する親和性を持つ構造を有するが, uPA には存在しない。Pg およびその活性化因子である tPA がフィブリンに吸着し, 見かけ上の K_m が低下し活性化

Table 2 ストレプトキナーゼメモ

菌株	<i>Streptococcus equisimilis</i> H46A 株
分子量	45,000 (SDS-PAGE), 47,286 (cDNA から推定)
総アミノ酸残基数	414 残基
ドメイン構造	α (残基番号 1~146), β (残基番号 147~290), γ (残基番号 291~414)
生理機能	プラスミノゲンの活性化



Pg* はそれ自体の分子内で Pn に変換する能力をもつ活性化前駆体を示す。

図 1 SK と SAK による Pg 活性化機構の違い

が促進されることは血栓溶解にとってきわめて効率が良く合目的である。

3. ストレプトキナーゼ (SK)

SK の諸性質を表 2 に示す。SK は *Streptococci* の菌体外蛋白質である。GenBank のデータベース中には数種の SK の塩基配列が登録されており、それらのアミノ酸配列は高い相同性を示すものの同一ではない。X 線解析に用いられた標品は、*Streptococcus equisimilis* 由来の 414 残基の SK である。SK は Pg や Pn に 1:1 のモル比で結合し複合体を形成する。Pg (Pn) 自体はそもそも Pg 活性化能をもたないが、SK-Pg 複合体や SK-Pn 複合体は Pg 活性化能を示す (図 1)。このように、SK は前駆体酵素 Pg と複合体を形成し、Pn が本来もたない Pg 活性化能を与えるコファクター蛋白質である。Pn に結合しその基質特異性を交換する蛋白質として *Staphylococci* 由来の SAK が知られる。SK と SAK のもっとも大きな違いは、SK は前述のように限定分解を伴うことなく Pg を活性化型へと変換できるが、SAK はこの活性を持たない点である。SAK は Pn に結合し、Pn の基質特異性をフィブリンから Pg へと変換するが、SAK-Pg 複合体は Pg 活性化能を示さない (図 1)。

4. SK-マイクロ Pn (μ Pn) 複合体の特長

結晶解析に用いられた SK は大腸菌で発現させた組み換え体であり、ヒト Pn は主にセリンプロテアーゼ領域から成るいわゆるマイクロ Pg (μ Pg, 残基番号 542~791) の組み換え体であった。マイクロ Pg の活性中心 Ser 741 は、Ala に変異され活性を示さない。2 つの組み換え体は発現後、両者を混ぜてリフォールディングを行ない複合体を得ている¹⁾。このようにして作成した複合体は SK- μ Pg のはずであるが、結晶化中に μ Pg は μ Pn に活性化されていた (すなわち、Arg 561-Val 562 結合が水解されていた)。さらに SK の Lys 59-Ser 60 結合と Lys 257-Ser 258 結合も限定分解をうけていた。この原因として、きわめて低い頻度でおこるリボソームでの翻訳の誤りが考えられている。

SK- μ Pn 複合体のプロテアーゼドメインは $40 \times 45 \times 50 \text{ \AA}$ の大きさで、ほかのトリプシンファミリーに酷似した立体構造であった (図 2)。複合体中のプロテアーゼドメインの N 末端アミノ酸 Val 562 (16: 必要に応じてキモトリプシン番号をカッコ内に示す) の α -アミノ基は、Asp 740 (194) の側鎖カルボキシル基と塩結合していた。日本人の 3~4% にみられる異常 Pg Tochigi は、プロテアーゼドメイン中の Ala 601 (55) の Thr への変異 (図 2 の白の CPK

モデルで示す)を持つ⁵⁾。この Ala 601 が Thr へ変異すると、活性中心残基 His 603 (57) と Asp 646 (102) の間に生じる活性発現に必須の水素結合が破壊され、その結果活性を消失すると説明された。SK は、ほぼ同じ大きさの3つのドメインから成っていた(図 2)。これらを N 末端から順に α , β , γ とよぶ。これら3つのドメインは β -grasp フォールディングとよばれる共通の構造をとっていた。 μ Pn と SK の各ドメインの相互作用は、 α , γ , β の順に小さくなっていった。

SK- μ Pn 複合体は、SK の3つのドメインが μ Pn を取り囲んで凹状の構造を形成していた(図 3)。凹面の底には Pn の活性中心が位置していた。この SK- μ Pn 複合体の立体構造(図 2)を SAK- μ Pn 複合体(図 4)と比べてみよう。SAK の立体構造は、SK の3つのドメインと同じ β -grasp フォールディングをとっていた³⁾。通常の方法では両者のアミノ酸配列に相同性をみいだせないが、フォールディング構造を考慮してみると低いながら SAK と SK の α と β ドメイン間に相同性を見出すことができる。両複合体を同じ方向から眺めてみると、SAK は分子量が小さいので、 μ Pn の1つの面でしか接触していないことがわかる(図 4)。また、SAK は SK の α ドメインと同じ方向から μ Pn に結合していることも判明した。

SK の β ドメインは、 β ドメイン中の合成ペプチド(残基番号 254~273)が複合体による Pg 活性化を強く阻害したり、 β ドメイン単独でも Pg に強く結合できることから、SK-Pn 複合体が基質である Pg を認識してそれに結合するのに重要な役割を果たしている可能性がこれまで指摘されていた。複合体の結晶構造では、 β ドメインは μ Pn 分子との接触がもっとも少なく、ドメイン内の Lys 257-Ser 258 結合は切断されており、その周辺の立体構造は決定されなかった。この領域の構造は、 β ドメイン単独の X 線結晶構造解析で初めて決定された(図 5)²⁾。それによると、250 ループとよばれる領域(251~264 残

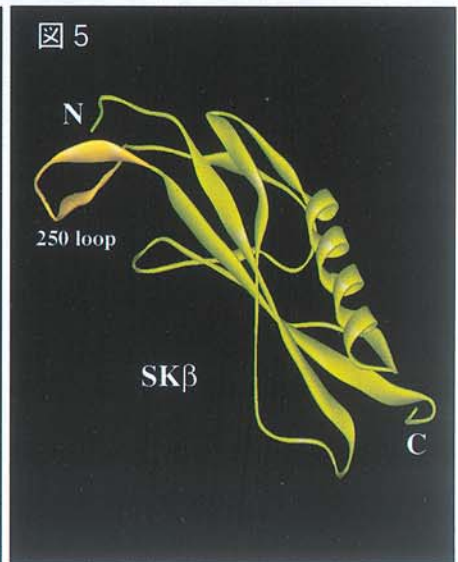
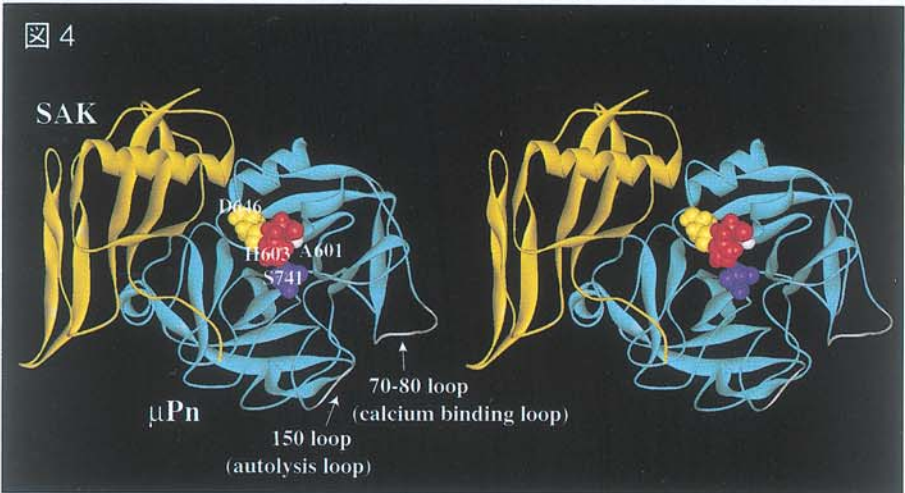
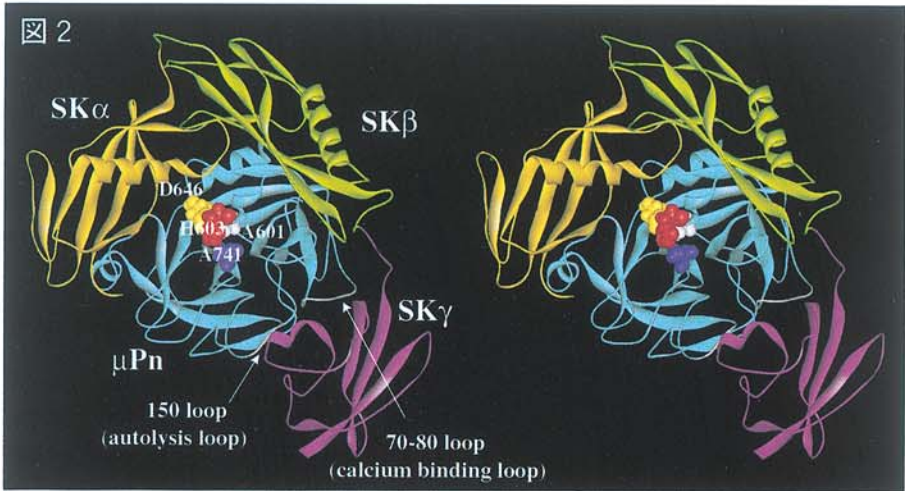
基)は動きやすい領域であり、モデリングではこのループと Pg の K 5 の相互作用が指摘された。 β ドメインは、この K 5 との相互作用を通して Pg の活性化に寄与していると推定される。

SK の γ ドメインは、SK-Pg 複合体が Pg 活性化能を発揮する上でもっとも重要であると考えられる(図 2)。 γ ドメインは、Pn の Ca^{2+} 結合ループ(残基番号 622~628:キモトリプシン番号では 70~80 ループ)と自己消化ループ(残基番号 692~695:キモトリプシン番号では 150 ループ)に結合していた。 Ca^{2+} 結合ループは幾つかの凝固プロテアーゼに存在し、プロテアーゼ活性と前駆体の活性化を調節すると考えられている。一方、自己消化ループに切断が入ると、例えば α -トロンピンが β -や γ -トロンピンに変換されるように、基質特異性が変化し凝固能が低下する。このように、プロテアーゼ活性と特異性の発現に重要である2つのループに SK の γ ドメインが直接結合していることから、SK-Pg 複合体が Pg 活性化能を獲得する際に、 γ ドメインがきわめて重要な役割を果たすと考えられる。

5. SK- μ Pn 複合体の基質特異性変換機構

SK の結合により Pn の基質特異性は、フィブリンから Pg へと変換する。前述のように、SK- μ Pn 複合体の活性中心は三方を SK の3つのドメインで囲まれた凹面の底に位置する(図 3)。この複合体の活性部位に、活性化の際に切断される基質 Pg の Arg 561-Val 562 結合をフィットさせてみると、基質 Pg と複合体中の SK の3つのドメイン、特に α ドメインとの間に広い接触がみられる。この広い相互作用が、Pg 活性化能という新しい基質特異性の獲得に重要であると指摘されている。

結晶構造解析は SK- μ Pn 複合体で行われ、残念ながら SK- μ Pg 複合体ではなかった。したがって、どのようにして SK が前駆体 Pg に Pg 活



性化能を発揮させるかは明確でないが, いくつかの説明がなされている。まず, SAK にはみられない SK γ ドメインと Pn の相互作用である。前述のように, γ ドメインはプロテアーゼ活性と前駆体の活性化を調節することで知られている Ca²⁺ 結合ループに結合する。もっとも単純な説明は, この結合により Pg 中に活性化ポケット (P1 ポケット) が形成される, というものである。どのようにして活性化ポケットが形成されるか, という点に関しては, 限定分解なしで酵素活性を示す 1 本鎖 tPA が参考になる。tPA の場合, Lys 429 (156) が Asp 740 (194) (前述のように活性型セリンプロテアーゼの N 末端アミノ酸のアミノ基と塩結合をつくる残基, この塩結合の形成により活性化ポケットの形成などの立体構造の変化が生じて活性型となる) と塩結合を形成しており, 古典的な前駆体の活性化の際にみられる立体構造の変化を起こしている。tPA の 429 (156) 位にあたる Pg の残基は, tPA と同様に Lys である。このことから, SK の γ ドメインが Pg に結合すると, この Lys 残基の ϵ アミノ基が Asp 740 (194) と結合して立体構造の変化をひきだすという説明も可能である。しかし, Lys 156 を介した上記の活性化機構が, 1 本鎖前駆体の示すプロテアーゼ活性発現のすべてにあてはまるものではない。Staphylococci 由来のスタフィロコアグラゼは, プロトロンビンに結合することにより限定

分解なしで活性を発現させるが, プロトロンビンは Lys 156 をもたない⁶⁾。SK による前駆体 Pg の活性化機構を明らかにするためには, SK-Pg 複合体の立体構造の解明が待たれる。

SK-Pn 複合体は α 2-プラスミンインヒビターで阻害されない。一方, SAK-Pn 複合体は阻害される。この違いは, Pn のまわりを SK がとり囲んでいるので, α 2-プラスミンインヒビターが活性中心に接近できないことで説明された。一方, SAK は Pn の 1 つの面にしか結合しないので, α 2-プラスミンインヒビターが結合できると考えられる。

6. おわりに

SK- μ Pn 複合体の立体構造を解説した。最近, 細菌感染時の Pg の役割が Pg 遺伝子破壊マウスを用いて明らかにされた。ホストの Pg 系はペスト菌などの感染に必須であると報告されている⁷⁾。Pn はフィブリンの溶解作用に加えて, コラゲナーゼやメタロプロテアーゼを活性化する。これが, 細菌の感染を助けている。このことは, 細菌による Pg の活性化, すなわち細菌由来の Pg 活性化因子と Pg の複合体形成を選択的に阻害することにより, 細菌の増殖を阻害できる可能性を示唆している⁴⁾。SK-Pn 複合体の結晶構造解析は, ドラッグデザインの点からも有益な情報を提供している。

図 2 SK- μ Pn 複合体の立体構造 (ステレオ図)。 μ Pn は水色, SK の α , β , γ ドメインはおのおの黄, 緑, 紫で示す。 μ Pn 分子の表面ループである Ca²⁺ 結合ループ (70~80 ループ) と自己消化ループ (150 ループ) は白で示す。 μ Pn の活性中心残基 Asp 646, His 603, Ala 741 (Ser を Ala に置換している) はおのおの黄, 赤, 青で, 異常 Pg Tochigi の変異部位である Ala 601 は白の CPK モデルで示す。Protein Data Bank (PDB): 1 BML。なお, 図 2~5 は, ソフトウェア WebLab™ ViewerLite を用いて作図した。

図 3 SK- μ Pn 複合体を横から見る。SK の α ドメインが手前になるように図 1 を回転させたもの。SK- μ Pn 複合体には凹状のへこみがみられ, そのへこみの底中央に μ Pn の活性中心がある。SK と μ Pn の色付けは図 2 と同じ。

図 4 SAK- μ Pn 複合体の立体構造 (ステレオ図)。 μ Pn は水色, SAK は黄で示す。 μ Pn の活性中心残基の Ser 741 (青の CPK モデル) 以外は, 図 2 と同じ色付け。SAK は SK の α ドメインとよく似た様式で μ Pn に結合していることが分かる。SAK- μ Pn 複合体の PDB: 1 BUI。

図 5 SK の β ドメインの立体構造。 β ドメインは β -grasp フォールディングをとる。フレキシブルな 250 ループ (黄) も示す。SK- μ Pn 複合体では 250 ループ中のペプチド結合が水解され, 構造が決定されなかった。PDB: 1 C4 P。

謝 辞: 本稿をご校閲下さいました自治医科大学坂田洋一先生に深謝いたします。

文 献

- 1) Wang X, Lin X, Loy JA, Tang J, and Zhang XC: Crystal structure of the catalytic domain of human plasmin complexed with streptokinase. *Science* **281**: 1662-1665, 1998.
- 2) Wang X, Tang J, Hunter B, and Zhang XC: Crystal structure of streptokinase β -domain. *FEBS Lett* **459**: 85-89, 1999.
- 3) Parry MAA, Fernandez-Catalan C, Bergner A, Huber R, Hopfner KP, Schlott B, Guhrs KH, and Bode W: The ternary microplasmin-staphylokinase-microplasmin complex is a proteinase-cofactor-substrate complex in action. *Nature Struct Biol* **5**: 917-923, 1998.
- 4) Esmon CT and Mather T: Switching serine protease specificity. *Nature Struct Biol* **5**: 933-937, 1998.
- 5) Miyata T, Iwanaga S, Sakata Y, and Aoki N: Plasminogen Tochigi: Inactive plasmin resulting from replacement of alanine-600 by threonine in the active site. *Proc Natl Acad Sci USA*. **79**: 6132-6136, 1982.
- 6) Kawabata S, Morita T, Miyata T, Iwanaga S, and Igarashi H: Isolation and characterization of staphylocoagulase chymotryptic fragment: Localization of the procoagulant- and prothrombin-binding domain of this protein. *J Biol Chem* **261**: 1427-1433, 1986.
- 7) Degen JL: Hemostatic factors and inflammatory disease. *Thromb Haemost* **82**: 858-864, 1999.