

凝固 XIII 因子の立体構造

一 瀬 白 帝*

3D-Structure of Coagulation Factor XIII

Akitada ICHINOSE

Key words : トランスグルタミナーゼ, 架橋結合反応, A サブユニット, 欠損症

1. はじめに

凝固 XIII 因子はトランスグルタミナーゼ (Transglutaminase, TGase) の一つであり, 主にフィブリン単量体同士を架橋結合させて強固な安定化フィブリンに変える。また, α_2 -プラスミンインヒビターを基質として同じくフィブリンに架橋結合させ, フィブリンネットワークのプラスミンによる早期溶解を防ぐという役割を果たしている。さらに, フィブロネクチンをフィブリンやコラーゲンに架橋結合させて細胞外マトリックスの要素を連結し, 創傷治癒過程を促進する。

従って, 先天性 XIII 因子欠損症は, 後出血, 創傷治癒不全, 女性では自然流産などの症状を伴う。

2. XIII 因子の一次構造

XIII 因子は, 血漿中では二つの A サブユニット (85 kD) と二つの B サブユニット (75 kD) からなる 320 kD の異種 4 量体である。TGase 酵素部分である A サブユニットは 731 アミノ酸残基よりなり, アミノ末端側から順に,

トロンピンにより切断される活性化ペプチド, 活性中心 Cys 314 を含む活性部位, カルシウム結合領域, トロンピンによる第二の切断部位などの機能部位がある¹⁾。

現在までに 8 種類存在することが知られている TGase ファミリーには相同性 (25~45% のアミノ酸が同一) があり, 活性部位を含む分子の中央部分はアミノ酸配列の同一性が高い (33~54% が同一)。特に活性中心 Cys 残基周辺のアミノ酸配列は, 全ての TGase で共通である。また, 赤血球膜の安定化に関与しているバンド 4.2 タンパク質とも相同性があるが, 後者では活性部位の Cys が Ala 残基で置換されているので酵素活性はない。分子のアミノ末端やカルボキシル末端はアミノ酸配列の同一性が低く, ケラチノサイト TGase のように XIII 因子よりさらに約 80~90 残基ほど N 末側に伸長しているものもあり, これらの部分が活性化や基質特異性に関与していると考えられる。

3. XIII 因子の遺伝子構造

XIII 因子 A サブユニットの遺伝子は染色体 6 p 24-25 に局在し, そのサイズは 160 kb 以上

* 山形大学医学部分子病態学 [〒 990-9585 山形市飯田西 2-2-2]

Department of Molecular Patho-Biochemistry and Patho-Biology, Yamagata University School of Medicine
2-2-2 Iida-Nishi, Yamagata, 990-9585 Japan

Tel. 023-628-5276, Fax. 023-628-5280, e-mail: aichinos@med.id.yamagata-u.ac.jp

表1 凝固 XIII 因子 A サブユニット・メモ

名称	血漿トランスグルタミナーゼ, フィブリン安定化因子 FXIIIa, FSF
分子量	75,000 (SDS-PAGE) 80,488 (cDNA)
ドメイン構造	活性化ペプチド部分, β サンドウィッチドメイン, 活性部位を含むコアドメイン, 二つの β パレルドメイン
糖鎖	六つの Asn 型糖鎖付着可能なアミノ酸配列はあるが実際には糖鎖は付いていない
染色体部位	6p24-25
遺伝子構造	200 kb 以上, 15 エクソン
血中濃度	11 mg/l
欠乏症状	後出血, 創傷治癒不全, 女性では自然流産
血中半減期	約 10 日
生成部位	骨髓系細胞 (ただし, 放出機構は不明)
主な局在部位	血中, 巨核球/血小板, 単球/マクロファージ
結合タンパク	レセプターは不明, B サブユニットと異種 4 量体を形成

で 15 のエクソンと 14 のイントロンからなっている。5'-ノンコーディング領域の中にイントロンが一つあり, 活性化ペプチドは一つのエクソン, 活性部位, カルシウム結合領域, 第二のトロンピン切断部位もそれぞれ別のエクソンでコードされている。ほかの TGase ファミリーのメンバーの遺伝子構造を比較すると, ケラチノサイト TGase やバンド 4.2 遺伝子のエクソンの数とイントロンの挿入位置は, A サブユニットのそれとほとんど同じである。したがって, TGase ファミリーは同一の祖先遺伝子の重複によって派生したと考えられる。

XIII 因子以外の TGase ファミリーの遺伝子は, 組織 TGase と表皮 TGase は 20q11 に, ケラチノサイト TGase は 14q11.2 に, バンド 4.2 は 15q15-21 に, 前立腺 TGase は 3p21.33-22 に局在しているので, 相同性はあるが cluster を作ってはいない。また, これらの遺伝子の 5'-発現調節領域の塩基配列も似ておらず, 転写因子の結合するモチーフも遺伝子によって種類がまったく異なる。このことが, それぞれの TGase が特異的に発現し, それぞれの細胞や組織に限局して存在する理由である。

4. XIII 因子の立体構造

酵母で発現されたりコンビナント XIII 因子

(A サブユニット)が, 別々の二つのグループによって結晶化された。しかし, その X 線結晶解析に最初に成功したのはシアトルのグループであった²⁾。

A サブユニットは長さ 100 Å, 幅 60 Å, 奥行き 50 Å の三角形の楔型で, N 末から順に, 活性化ペプチド部分, β サンドウィッチドメイン, 活性部位を含むコアドメイン, 二つの β パレル (樽状) ドメインからなっている (図 1)。

1) 活性化ペプチド

トロンピンによって切断されるこの部分は N 末端の 37 アミノ酸残基からなるが, 通常の二次構造を持たない。後半部分は次の β サンドウィッチドメインに密着して水素結合で保持されているが, 前半部分はもう一方の A サブユニットのコアドメインに伸びており, その活性部位 (Cys 314 残基) のポケット上に掩い被さっている (図 2)。

2) β サンドウィッチドメイン

このドメインは Glu 43 から Phe 184 までの 140 残基からなり, それぞれ 4 本のストランドからなる 2 組の逆平行 β シートが約 50° の角度をなしている。最初の β ストランドの後に 2 回転のヘリックスがあり, ドメイン全体は縦, 横, 高さともに 40 Å のサイズである。

組換え A サブユニット蛋白質の熱変性実験により, この領域は次のコアドメインと同様比

較的不安定であることが示されている³⁾。

3) コアドメイン

分子の中心にある最大のドメインであり、Asn 185 から Arg 515 までの約 330 残基からなる。10 個の α ヘリックス領域があり、 β サンドウィッチドメイン近傍の 2 回転のヘリックス以外は、中央の β シートによって 5 個と 4 個の α ヘリックスグループに分けられる。N 末側に前者があり、 β サンドウィッチドメインに接している。この領域には第二の β バレルドメインとの間に位置する 2 本の逆並行 β ストランドがあり、6 本の逆平行 β ストランドからなる振じれた β シートのあるドメイン中心に続いている。この β シートは、C 末側の 4 個の α ヘリックス領域に沿って曲がっている。コアドメインのもっとも C 末側には 3 本のストランドからなる β シートがあり、第一の β バレルドメインの側面に位置している。第一 β バレルドメインへ続く 509 から 515 残基のループ部分はきわめてフレキシブルで、Lys 513 が第二のトロピン切断部位にあたる。この残基は Glu 453 とイオン結合しており、蛋白質本体に保持されているが、Ca イオンや基質が分子に結合するとコアドメインと第一 β バレルドメインを結ぶループの構造が変化し、第一 β バレルドメインがコアドメインから離れて Lys 513 が外部からアクセスできるようになる。

前述した熱変性実験により、コアドメインは 332 番目のアミノ酸残基を境に二つのサブドメインに分けられると推定されている³⁾。これらのサブドメインの接触面の大きさは、二つのサブユニット間のその約 2 倍であり、一つの A サブユニット分子の安定に寄与している。

TGase ファミリーの中で同一のアミノ酸配列はほとんどコアドメインにあり、この領域の構造自体もよく保存されていると考えられる。

4) β バレルドメイン

第一の β バレルは Ser 516 から Thr 628 までの約 100 残基からなり、7 本のストランドをなしている。第二の β バレルは Ile 629 から

Arg 727 までの約 100 残基で、同じく 7 本のストランドをなしており、どちらも長さ 50 Å、幅 25 Å である。また、二つの β バレルドメインはアミノ酸配列自体は相同でないにもかかわらず、何れも 3+4 型の 7 本のストランドをなしており、4+3 型であるフィブロネクチンの III 型リピートとは異なっている。第一の β バレルは第二の β バレルよりアミノ酸残基数が多く、 β ストランドを繋いでいる 2 カ所がバレル本体から外へ突出している。特に、第 3 と第 4 ストランドの間のループには Tyr 560 があり、活性部位の構造形成に関与している。

二つの β バレルドメインは、きわめて熱に安定であり、各種の蛋白質分解酵素での処理に対しても抵抗性を示す³⁾。従って、この領域はきわめてコンパクトな構造になっていると考えられる。

5) 2 量体の構造

ほかの TGase は単量体であるが、A サブユニットと前立腺 TGase は 2 量体として存在する。二つの A サブユニットは、縦軸に沿って合わさって 2 量体を作るので、正面から見ると六角形になる(図 2 左)。それぞれの分子の β サンドウィッチドメインとコアドメインが 2 回回転対称の関係で相対して、広い接触面を作る。これは、熱不安定性のある β サンドウィッチドメインとコアドメインの相互作用が 2 量体形成に重要であるという知見とよく一致する。

前述したように、活性化ペプチドは二つの A サブユニットの間隙を越えて、もう一方の分子の活性部位への入り口の上まで伸びている。5 個の水素結合が、活性化ペプチドをもう一方の A サブユニット分子に保持する力になっている。また、Asp 343 も相手方の Arg 11 とイオン結合している。

側面(直角方向)から見ると、2 量体は扁平ではなく、二つの A サブユニットがほぼ 90° の角度をなしている(図 2 右)。活性化ペプチドは、この両 A サブユニットの間の大きな凹みを越えてもう一方の分子と繋がっているのである。

25°CでpH 2.9以下では、Aサブユニット2量体は不可逆的に単量体に解離し、pH 7.6に戻しても酵素活性は回復しない。ところが、同様の操作をpH 3.3で行うと2量体を再形成し、活性も回復するという。これは、2量体構造が活性発現に必要である可能性を示唆する点で興味深い。

6) 活性部位の構造

X線結晶解析の結果、二つのアミノ酸残基(His 373とAsp 396)が空間的に活性部位のCys 314に近い位置にあり、酵素活性部位の微細構造形成に関与していることが分かった。すなわち、もっとも長い α ヘリックス(17残基)のN末端に活性アミノ酸残基Cys 314があり、コアドメインの中心にある傾いた β シートと接している。Cys 314のSH基の硫黄原子は β シートの真ん中のストランドにあるHis 373の窒素原子と水素結合しており、さらにこのHis環のほかの窒素原子は、隣接した β ストランドにあるAsp 396の酸素原子と水素結合し

ている(図3)。His 373の人工的改変によりXIII因子活性が失われるので、活性部位の構造に重要であることが示唆される⁴⁾。このCys-His-Asp残基の配置はTGaseファミリーに共通であるのみならず、Cysteine酵素ファミリーの触媒活性部位のCys-His-Asn構造と酷似しており、とりわけCys残基周辺は9アミノ酸中7残基が両群で保存されている。Cysteine酵素ファミリーの限定分解反応とTGaseファミリーの架橋結合反応は、反応が鏡像的で反対方向に進むことが提唱されている。

Aサブユニットの活性部位3アミノ酸は、コアドメインと第一の β バレルドメインに囲まれた空洞の底にあり、前述したTyr 560の水酸基がCys 314の硫黄原子と水素結合している。シアトルのグループは、フィブリンなどの巨大分子は二つの β バレルドメインの方向から接近し、第一 β バレルドメインにあるTyr 560を押しつけて基質であるGlu残基がCys 314に結合するものと推察している。

図1 XIII因子Aサブユニットの3次元構造(PDBコード, 1F13)

活性化ペプチド部分、 β サンドウィッチドメイン(黄)、活性部位を含むコアドメイン(赤)、二つの β バレル(樽状)ドメイン(緑と青)からなり、コアドメインに活性部位Cys 314が存在する。*印はcisペプチド結合の位置を、括弧は2量体の2回回転対称軸を示す。2量体を二つのAサブユニット分子X, Yで示した。(著者の許可を得て文献6より転載)

図2 Aサブユニット2量体の3次元構造の正面および側面図(PDBコード, 1GGT)

図1とは分解能が異なる(1F13は2.1Å, 1GGTは2.65Å)一方のAサブユニットの活性化ペプチドは、2量体間の大きな凹みを越えて相手の分子(灰色)に密着している。コアドメインに活性部位Cys 314(*印)が存在する。(著者の許可を得て文献2より転載)

図3 活性部位の構造(立体図)

活性化ペプチド(灰色)、コアドメイン(ピンク)、第一 β バレルドメイン(緑)の主鎖はコイルで、二次構造はヘリックスと矢印で示す。活性部位の3アミノ酸残基と水素結合する残基、二つ目の分子のArg 11'の側鎖の原子は球と棒で示す(灰色、炭素;青、窒素;赤、酸素;黄、硫黄)。(著者の許可を得て文献2より転載)

図4 cisペプチド結合の構造

Arg 310-Tyr 311とGln 425-Phe 426領域の主鎖の相互作用を示す。二つ目の分子の原子には'を付した。距離の単位はÅ(著者の許可を得て文献6より転載)

図5 Ca結合部位

Ca(赤)、Sr(黄)、Yb(青)と結合したそれぞれの構造を重ね合わせて示す。(著者の許可を得て文献8より転載)

図6 Gly 562-Arg変異体の構造予測

野生型(左)と変異型(右)Aサブユニット分子の562番残基周辺の拡大図である。小さなGly残基が大きくて荷電したArg残基によって置換されると、隣接したアミノ酸とエネルギー的に不利な接触を起すため立体障害を惹き起こす。(文献10より引用)

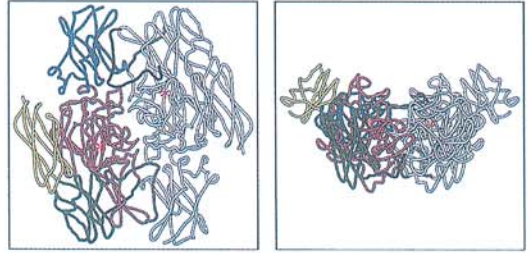
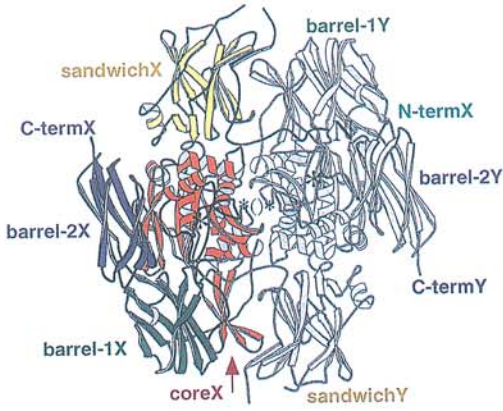


図 2

図 1

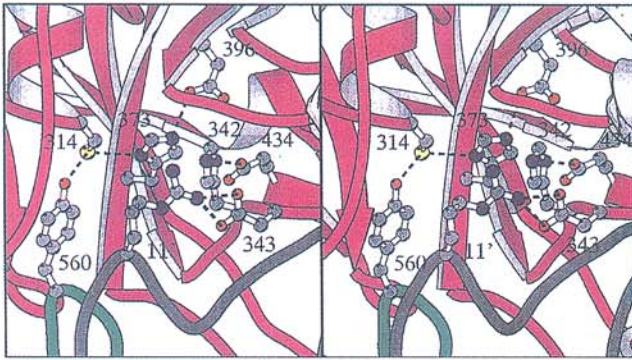


図 3

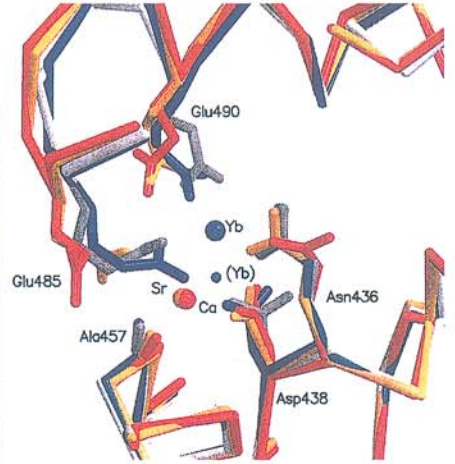


図 5

Arg310-Tyr311



Gln425-Phe426

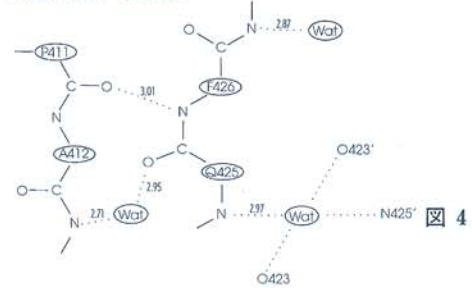
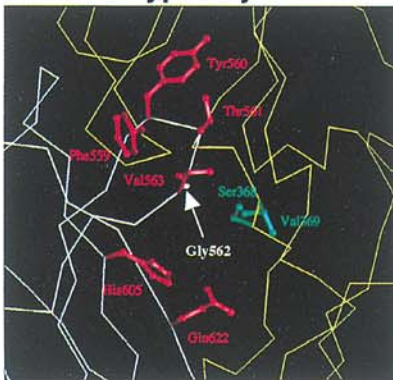


図 4

Wild type Gly562



Mutant Arg562

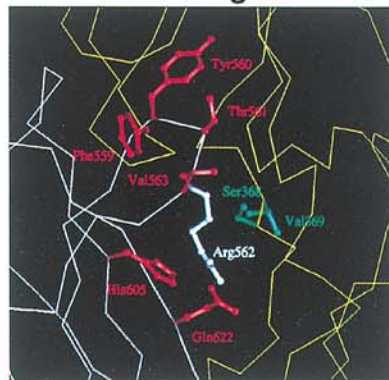


図 6

7) 活性型 A サブユニットの構造

Ca イオンの存在下でトロンビンによって活性化された A サブユニットが X 線結晶解析されたところ、その立体構造は活性化前の分子とほとんど同じで、活性化ペプチドの位置、構造ともに変化がないことが判明した⁵⁾。これまで、活性化ペプチドが遊離することによってマスクされた活性部位が露出すると考えられてきたので、この報告はこの分野の研究者の大きな驚きをもって迎えられたが、高 Ca 濃度や高塩濃度ではトロンビンによる切断無しでも酵素活性が認められることと矛盾しない。

後に、より高解像度で X 線結晶解析したドイツのグループは、活性化ペプチド C 末側の 5 アミノ酸残基が β ストランドをなして β サンドウィッチドメインの C 末側の β ストランドと逆平行に接することのみならず多数の水素結合とイオン結合によって、 -14 kcal/mol の強い安定化エネルギーで活性化ペプチドが 2 量体に保持されていると計算している⁶⁾。

5. cis ペプチド結合と活性化機序

ドイツのグループは、構造解析の過程で二つの cis ペプチド結合の存在を明らかにした。一つは Arg 310-Tyr 311 で、二番目は Gln 425-Phe 426 である (図 4)。一般的にはエネルギー上不利であるこれらの cis 配位構造は、水素結合と疎水的相互作用によって安定化されている。前者では、Tyr 311 の窒素および Arg 310 の酸素が Val 287 と、隣接した Val 309 と Gly 312 が Val 276 と水素結合を作り、Arg 310 の側鎖の疎水的部分が Tyr 311 の芳香環と疎水的に密着する (図 4 左)。後者でも、Gln 425 の酸素が水分子を介して Ser 413 の窒素と、Phe 426 の窒素が Pro 411 の酸素と水素結合する。Gln 425 の窒素は水和されていて、この水分子が 2 量体の 2 回回転対称軸上にあり、両分子の Gln 425 を結び付けている (図 4 右)。また、Gln 残基の側鎖の疎水的部分が Phe 426 の芳香環に

密着している。

前述したように、A サブユニットはトロンビンによる切断後も大きな構造変化が認められないので、その活性部位は基質に対して閉じていると考えられるが、Arg 310-Tyr 311 は活性部位の近傍に、Gln 425-Phe 426 は 2 量体の隣接面の中心に存在するので、これらのペプチド結合の cis/trans 異性体化が活性型構造への変換に関わっているのではないかとドイツのグループは推定している。何れにせよ、Arg 310 や Tyr 311 の Ala 残基での置換により酵素活性が激減することは、これらの残基の重要性を示唆している⁷⁾。

6. A サブユニットの Ca 結合部位

A サブユニットの活性部位が基質に暴露されるためには Ca の結合が必要なので、Ca 存在下で作製した結晶が X 線解析されたところ⁸⁾、主な Ca 結合部位は、Ala 457 の主鎖の酸素が主たる蛋白質リガンドで、Asn 436, Asp 438, Glu 485, Glu 490 の陰性荷電した側鎖からなるポケットであることが判明した (図 5)。このポケットは、活性部位を外部からブロックしている Tyr 560 を含む第一 β パレルドメインからわずか 10 Å しか離れていないし、もう一方の A サブユニットとも隣接しているので、Ca の結合が活性化に伴う分子内の大きな構造変化や相手方の分子との相互作用を惹き起こす可能性がある。

さて、上記の予想に反して、Ca の結合した分子全体の構造は、またしても酵素前駆体のそれと酷似していたので、活性型構造を安定化するには基質や阻害因子の存在が必要であると考えられるようになった。

7. 遺伝的変異と欠損症

XIII 因子欠損症には、両サブユニットが欠乏する I 型と A サブユニットのみが欠乏する II

型があり、前者は B サブユニットの、後者は A サブユニットの欠損が原因である。A サブユニットの遺伝子異常は、これまでに 30 種類以上が同定されている。

X 線結晶解析により A サブユニットの立体構造が理解されるようになったため、欠損症の症例の遺伝子解析で同定された塩基変異に基づくアミノ酸置換が構造に与える影響も推定可能になり、コンピュータグラフィックによって図示されるようになった。また、北里大学のグループは、構造エネルギーの計算により A サブユニット変異体の安定性を予測することも可能にしている⁹⁾。

例えば、ある A サブユニット欠損症の症例では Gly 562 が Arg で置換されていた。分子モデリングの結果、Arg 562 は Gly に比べて側鎖が大きいため周囲の残基と立体障害を惹き起こし(図 6)、この構造変化のため分子のミスフォールディング/不安定化が起こると推定された。また、分子力学的解析により、+73.4 kcal/mole のエネルギーが増加することも計算され、変異体分子の不安定化を支持する。この Gly 562-Arg 変異体を実際に哺乳類細胞に発現させると、野生型と同じように生合成されるが急速に変性/分解されることが分かったので、分子モデリングや計算による予測の正しさが証明された¹⁰⁾。

別の A サブユニット欠損症症例で見つかった Arg 260-Cys 変異も分子モデリングと分子力学的解析の結果、分子がミスフォールディング/不安定化すると計算された⁹⁾。特に、この変異では分子間の Arg 260-Asp 404 イオン結合が破壊されるとともに、分子間接触面が変形するため 2 量体化が阻害されるものと予想された。この変異体を酵母で実際に発現させたところ、単量体として存在することが確認された(Maeda & Ichinose, 未発表データ)。

以上のように、A サブユニットの立体構造のデータは、遺伝子異常の解析にも大変有用である。

8. おわりに

最近、XIII 因子 A サブユニットの活性化ペプチドの中にある Val/Leu 34 多型性が XIII 因子活性を左右し、心筋梗塞、脳梗塞や静脈血栓症と関連しているという報告がされており、動脈硬化・血栓症に果たす役割が注目されている。このような遺伝的多型性が、活性化ペプチドの構造をどう変化させるのか、トロンピンによる活性化ペプチドの切断反応、A サブユニットの酵素活性、トロンピンによる第二の切断反応に与える影響はどうかなどが今後の課題となるが、それらの機構の解明に立体構造の理解が貢献するものと期待される。

文 献

- 1) Ichinose A, Hendrickson LE, Fujikawa K, Davie EW: Amino acid sequence of the a subunit of human factor XIII. *Biochem* **25**: 6900-6906, 1986.
- 2) Yee VC, Pedersen LC, Le Trong I, Bishop PD, Stenkamp RE, Teller DC: Three-dimensional structure of a transglutaminase: human blood coagulation factor XIII. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 7296-7300, 1994.
- 3) Kurochkin IV, Procyk R, Bishop PD, Yee VC, Teller DC, Ingham KC, Medved LV: Domain structure, stability and domain-domain interactions in recombinant factor XIII. *J Mol Biol* **248**: 414-430, 1995.
- 4) Micanovic R, Procyk R, Lin W, Matsueda GR: Role of histidine 373 in the catalytic activity of coagulation factor XIII. *J Biol Chem* **269**: 9190-9194, 1994.
- 5) Yee VC, Pedersen LC, Bishop PD, Stenkamp RE, Teller DC: Structural evidence that the activation peptide is not released upon thrombin cleavage of factor XIII. *Thromb Res* **78**: 389-397, 1995.
- 6) Weiss MS, Metzner HJ, Hilgenfeld R: Two non-proline cispeptide bonds may be important for factor XIII function. *FEBS Lett* **423**: 291-296,

- 1998.
- 7) Hettasch JM, Greenberg CS: Analysis of the catalytic activity of human factor XIIIa by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* **269**: 28309-28313, 1994.
- 8) Fox BA, Yee VC, Pedersen LC, Le Trong I, Bishop PD, Stenkamp RE, Teller DC: Identification of the calcium binding site and a novel ytterbium site in blood coagulation factor XIII by x-ray crystallography. *J Biol Chem* **274**: 4917-4923, 1999.
- 9) Ichinose A, Tsukamoto H, Izumi T, Yamazaki T, Togashi M, Takamatsu J, Saito H, Umeyama H: Arg260-Cys mutation in severe factor XIII deficiency: conformational change of the A subunit is predicted by molecular modelling and mechanics. *Brit J Haematol* **101**: 264-272, 1998.
- 10) Takahashi N, Tsukamoto H, Umeyama H, Castaman G, Rodeghiero F, Ichinose A: Molecular mechanisms of type II factor XIII deficiency: novel Gly562-Arg mutation and C-terminal truncation of the A subunit cause factor XIII deficiency as characterized in a mammalian expression system. *Blood* **91**: 2830-2838, 1998.