

スタフィロキナーゼの立体構造と機能発現

岡田 清孝*, 松尾 理*

The Structure and Function of Staphylokinase

Kiyotaka OKADA*, Osamu MATSUO*

Key words : staphylokinase, plasminogen, plasminogen activator, three dimensional structure

はじめに

スタフィロキナーゼ (staphylokinase ; SAK) は、黄色ぶどう球菌が産生するプラスミノゲン活性化因子 (plasminogen activator ; PA) である。SAK はプラスミンと 1:1 の複合体を形成し、その複合体が PA となり基質であるプラスミノゲンをプラスミンへ活性化させる¹⁾。SAK はプラスミノゲンとも結合するが、その複合体は PA 活性を発現しない²⁾。その複合体のプラスミノゲンは、周囲の PA によりプラスミンに変換され、プラスミン-SAK 複合体として PA 活性を発現する。この PA 活性は SAK 単独で発現せず、複合体中のプラスミン活性部位が結合した SAK により修飾されて発現する。したがって、SAK は大変古い時代にキナーゼと命名されたが、PA 活性を発現するコファクターであるとも言える。SAK の PA 活性はプラスミンの阻害因子である α_2 -プラスミンインヒビター (α_2 -PI または α_2 -アンチプラスミン ; α_2 -AP) により阻害される。この α_2 -PI による阻害はフィブリン存在下で起こさない。このことより、SAK の線溶活性化は血栓上で特異的に発現する。また、連鎖球菌が産生するストレプト

キナーゼ (streptokinase ; SK) は同様にプラスミノゲンと複合体を形成し PA 活性を発現するが、血栓特異性を示さない。この SAK は約 50 年程前に発見されながら³⁾、SK の陰に隠れたかたちで、注目されていなかった。SAK の研究は佐古ら⁴⁾によりその遺伝子がクローニングされた後、われわれがそのユニークな血栓特異性を報告⁵⁾したのを期に、飛躍的に進んだ。この SAK の血栓溶解機序についてはすでに本雑誌に詳しく述べたので、それを参照されたい⁶⁾。この SAK は現在ヨーロッパで血栓溶解剤として臨床治験が進められている¹⁾。また、SAK については作用機序解析と抗原性減弱を目的とした変異体の作製や、X 線解析による立体構造の解明が行われている。ここでは SAK の立体構造と機能発現について紹介する。

1. SAK の構造

SAK は 163 個のアミノ酸をコードしている SAK 遺伝子から作られ、そのうち 27 個のシグナルペプチドが切断されて、N 末端アミノ酸が Ser で始まる 136 個のアミノ酸残基から構成される (表 1)。SAK の分子量は約 15,500 で糖鎖

*近畿大学医学部第二生理学 [〒 589-8511 大阪府大阪狭山市大野東 377-2]

Department of Physiology, Kinki University School of Medicine [377-2 Ohnohigashi, Osakasayama-city, Osaka 589-8511, Japan.]

Tel. 0723-66-0221 Fax. 0723-66-2853 e-mail: kiyokada@med.kindai.ac.jp

表1 スタフィロキナーゼ・メモ

別称	細菌由来プラスミノゲン活性化補助因子
cDNA	異なるクローンから3種のcDNAの塩基配列が決定されている
アミノ酸残基	163アミノ酸残基(27残基のシグナルペプチドと136残基の成熟蛋白) 糖鎖付加および修飾アミノ酸残基はない Cys残基は無く、ジスルフィド結合を持たない
分子量	15,500
生理機能	プラスミンと1:1の複合体を形成し、その複合体がプラスミノゲン活性化因子(PA)として働く
産生菌	黄色ぶどう球菌(<i>Staphylococcus aureus</i>)

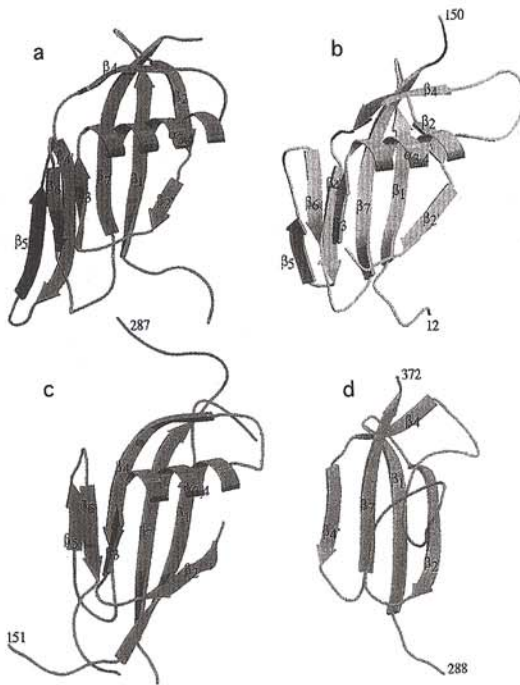


図2 SAKとSKの立体構造(文献8)

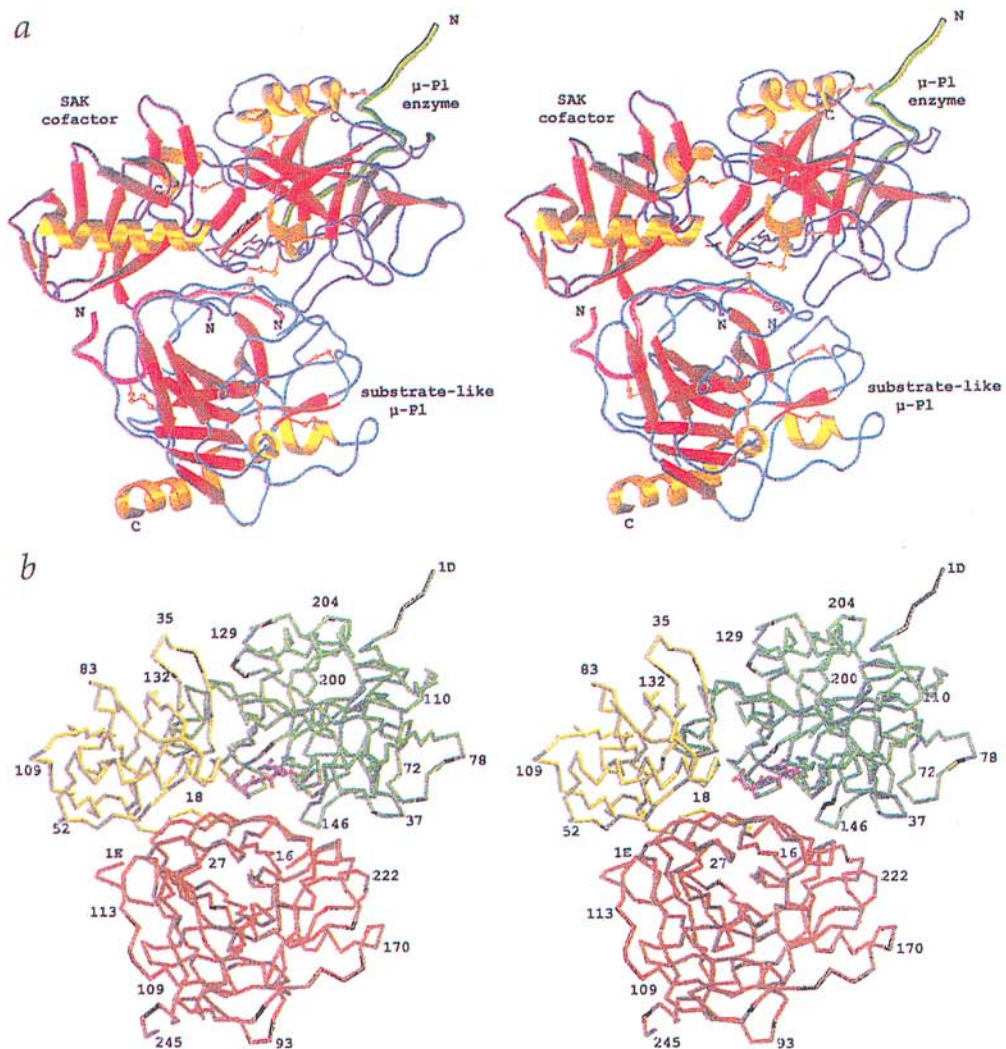
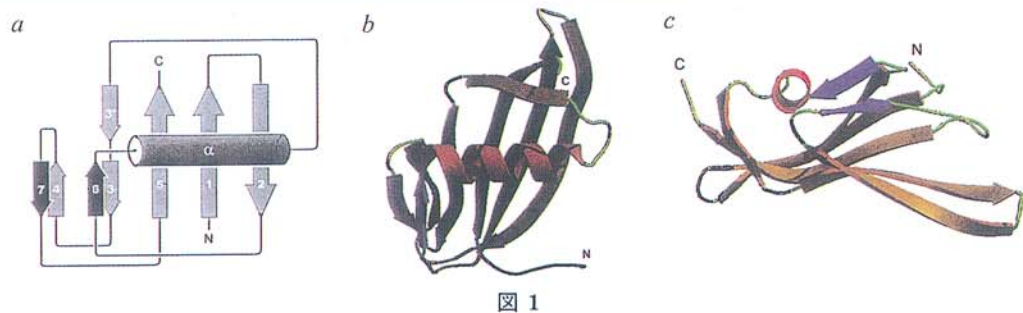
(a) SAKの立体構造;5本の β -構造からなるシートと1個の α -helixおよび2本の β -構造からなるシートを示す。(b) SKの α 領域(12-150)の立体構造;5本の β -構造からなるシートと1個の α -helixおよび2本の β -構造からなるシートを示す。(c) SKの β 領域(151-287)の立体構造;5本の β -構造からなるシートと1個の α -helixおよび2本の β -構造からなるシートを示す。(d) SKの γ 領域(288-372)の立体構造;4本の β -構造からなるシートを示す。

図1 SAKの立体構造(文献7)

(a) SAKの立体構造の概略図。5本の β -構造からなるシート(1-5; gray)と1個の α -helix(α ; black)および2本の β -構造からなるシート(6と7; black)を示す。(b) 垂直方向での5本の β -構造からなるシート(black)と1個の α -helix(α ; brown)および2本の β -構造からなるシート(purple)を示す。(c) 側面方向での5本の β -構造からなるシート(bitter orange)と1個の α -helix(red)および2本の β -構造からなるシートを示す。

図3 μ -plasmin-SAK- μ -plasmin 三量体の立体構造(文献10)

(a) 三量体はSAKコファクター(dark blue)と μ -plasmin酵素(media blue)の1:1の複合体に基質様 μ -plasmin(light blue)が結合している。(b) μ -plasmin-SAK- μ -plasmin三量体の $C\alpha$ プロット。三量体はSAKコファクター(light green)と μ -plasmin酵素(green)および基質様 μ -plasmin(brown)を示す。



を持たない一本鎖蛋白質である。SAKの分子内にはジスルフィド結合も存在しない。SAKの遺伝子は細菌性ファージ (*sacφC*) と *sak42D*) と黄色ぶどう球菌 (*sakSTAR*) のそれぞれのクローンから得られている。SAK蛋白質にはアミノ酸配列が一部異なる3種類の天然変異体が存在する。最初に報告された *sacφC* 遺伝子からのSAK蛋白質のアミノ酸配列は Gly 34, Gly 36, His 43 である。これに対しほかのSAKのアミノ酸配列は *sak42D* のSAKが Arg 36 と Arg 43 を有し、*sakSTAR* のSAKでは Ser 34 とそれぞれ異なる。

SAKの立体構造についてはCD解析、NMR解析やX線結晶解析⁷⁾ などにより解明されている。SAKは図1に示すように、五本のβ-構造からなるシートに一個のα-helixと二本のβ-構造からなるシートがパッキングされ、β-grasp fold familyと類似の構造を示す。また、SKはSAKとまったく異なるアミノ酸配列および分子サイズを示す蛋白である。このSKは図2に示すように、α、βおよびγの3個のドメインからなる⁸⁾。このうちαとβドメインは五本のβ-構造からなるシートと一個のα-helixから構成されている。特にSKのαドメインの立体構造はSAKの立体構造と非常に類似している。なお、SKの立体構造については宮田ら⁹⁾により前号に掲載されているのでそちらを参照されたい。また、μ-plasmin-SAK-μ-plasmin三量体の立体構造が2.6Å分解能のX線結晶解析で解明されている¹⁰⁾。この構造解析された三量体は蛋白分解酵素—コファクター—基質で構成されていた(図3)。このμ-plasminは2個のジスルフィド結合でplasminのA鎖20アミノ酸残基とB鎖229アミノ酸残基(酵素ドメイン)が結合した蛋白である。μ-plasminの構造には8個の露出loopsが存在する。これらのloopsは活性部位の上流に4個(94-shunt, 174-multiple-turn structure, 60-loopおよび37-loop)と下流に4個[214-220 loop, 192-193 segment, 'calcium' loop (70/80-loop) および

'autolysis loop' (150-loop)] 存在する。これらの部位はほかの蛋白との相互作用に関与しやすい場所であるとされている。なお、μ-plasminのアミノ酸残基の番号はキモトリプシノーゲンのアミノ酸配列に相当する番号で示した。

2. SAKの構造と機能発現

SAKの構造と機能の関係についてプラスミンとの結合性とPA活性発現機序の解析および抗原性発現の解析から検討されている。

SAKはプラスミンによってN末端側10残基(Lys 10-Lys 11間)が切断される。このLys 11-SAKのPA活性はSer 1-SAK (native form) とほぼ同等である。また、SAKのN末端側のアミノ酸残基の重要性についてはSAKの変異体で検討されている。その検討結果から、SAKのプラスミンとの結合能とPA活性発現にはN末端11番目から20番までのアミノ酸残基が必要で、特に11-16番目のアミノ酸残基が重要であることが示唆された。

また、SAKの抗原性はSKに比べて非常に弱いながら発現する。このSAKの抗原性とPA活性発現についてSAKのモノクローナル抗体を用いた検討およびSAK分子表面上にあると推測される荷電アミノ酸の置換により検討された。その結果、まずSAKのPA活性発現にはGlu 46, Lys 50, Glu 65 および Asp 69の荷電アミノ酸が重要であることが示唆された。それらのアミノ酸はβ2-sheetの後半とα-helix上に存在するアミノ酸であった(図4)。次に、SAKの抗原性についてはモノクローナル抗体の種類からSAKの分子上に3カ所のエピトープが存在することがわかった¹¹⁾。それぞれのエピトープを構成するアミノ酸残基はエピトープ1がLys 74, Glu 75 および Arg 77で、エピトープ3がLys 35, Glu 38, Glu 80 および Asp 82であった。それらのアミノ酸はエピトープ1がβ4-sheetの前部、エピトープ3がβ1-sheetとβ2-sheetの間およびβ4-sheet上に存在していた

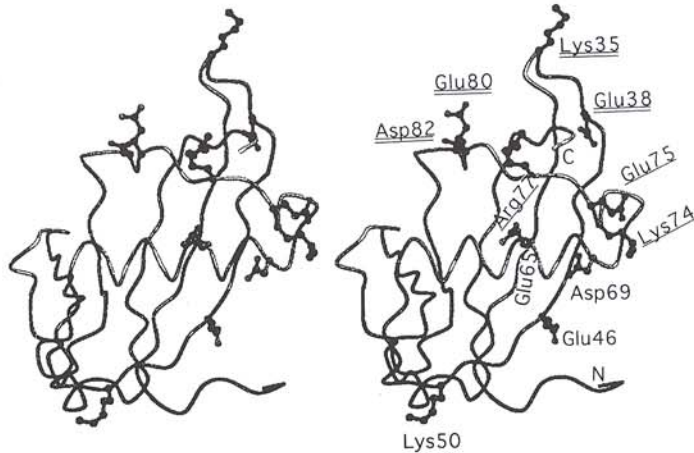


図 4 SAK の立体構造中の重要なアミノ酸残基 (文献 7 改変)
 SAK の PA 活性発現に関与するアミノ酸残基 (Glu 46, Lys 50, Glu 65 および Asp 69) を示す。SAK の抗原決定部位のエピトープ 1 (Lys 74, Glu 75 および Arg 77) とエピトープ 3 (Lys 35, Glu 38, Glu 80 および Asp 82) のアミノ酸残基を示す。

(図 4)。そこで PA 活性を保持し抗原性を消失させた SAK 変異体の開発はこれらのアミノ酸残基をターゲットとして検討された。そのうち SakSTAR.M 38 (Lys 35, Glu 38, Lys 74, Glu 75 および Arg 77 を Ala に置換) と SakSTAR.M 89 (Lys 74, Glu 75, Arg 77, Glu 80 および Asp 82 を Ala に置換) は PA 活性を保持し抗原性が非常に低下した変異体であった。この抗原性低下 SakSTAR は血栓溶解剤としての臨床応用が期待される。なお、エピトープ 2 については解析されていない。

また、SAK の機能発現に重要なほかのアミノ酸残基についてアミノ酸置換 SAK 変異体と μ -plasmin を用いて検討された¹²⁾。その結果、SAK の μ -plasmin との結合性には 3 個の β -sheet 上にある Tyr 24, Met 26, Tyr 44 および Ile 128 残基が重要であった。また、 μ -plasmin-SAK 複合体による PA 活性発現には β 2-sheet 後半と α -helix の C 末端側にある Val 45, Phe 47, Tyr 62, Tyr 63, Trp 66 および Ala 70 残基が activation epitope を形成しその重要性が示唆された。このことと前述の荷電アミノ酸の結果から、SAK の PA 活性発現はその立体構

造上、 β 2-sheet と α -helix 上のアミノ酸残基が重要であることが示唆された。一方、SAK の 3 種天然変異体の PA 活性はほぼ同等であった。このことから SAK の β 2-sheet 上の前半の部分は PA 活性発現に関わらないと思われる。

また、SAK に対する μ -plasmin 側のアミノ酸残基は Arg 175 と Arg 221 残基がもっとも重要で、さらに、Asn 169, Tyr 171, Asn 173, Glu 180, Leu 217 および Lys 224 残基も関与する¹²⁾。また、phage display の検討では SAK の Glu 75 と Glu 88 : Ile 128 が μ -plasmin の Arg 94 と Gly 174 とそれぞれ salt bridge を形成し、局部的に両者間の結合に関わっていることが示唆された。

また、SAK の PA 活性の発現性にはプラスミンの動物種差が認められている。すなわち、SAK はヒト、ウサギ、イヌなどのプラスミンと複合体を形成し、PA 活性を発現する。しかし、SAK はマウス、ウシ、ラットなどのプラスミンと PA 活性を発現しない。マウスのプラスミンは SAK と複合体を形成しない¹³⁾。これは前述した SAK との反応に関わるヒト μ -plasmin の重要なアミノ酸配列がマウスでは一部異なって

いることが一因となっていると考えられる。

また、SAKは糖鎖を持たないが、*Pichia pastoris*で発現させることにより、Asn 28残基に高マンノースタイプの糖鎖が付加された。この糖鎖付加SAKはヒトプラスミンと結合したが、PA活性を発現しなかった。このことからSAKのAsn 28残基の糖鎖付加はPA活性発現を阻害することが示唆された。

3. おわりに

このようにSAKの立体構造はコンパクトでプラスミンと結合しても活性部位の修飾のみで、プラスミンのLys親和性部位(LBS)に大きな影響を与えないことが推測される。これに対して、SKは3個のドメインがプラスミノゲンとの結合に関わり⁸⁾、活性部位の修飾のみならずLBSに影響を与えると考えられる。この点がSAKとSKの線溶活性化における血栓特異性の違いの原因であると思われる。

文 献

- Collen D: Staphylokinase: a potent, uniquely fibrin-selective thrombolytic agent. *Nature Med* **4**: 279-284, 1998.
- Sakharov DV, Lijnen HR, Rijken DC: Interactions between staphylokinase, plasmin(ogen), and fibrin. *J Biol Chem* **271**: 27912-27918, 1996.
- Lack CH: Staphylokinase: an activator of plasma protease. *Nature* **161**: 559-560, 1948.
- Sako T, Sawaki S, Sakurai T, Ito S, Yoshizawa Y, Kondo I: Cloning and expression of the staphylokinase gene of *Staphylococcus aureus* in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* **190**: 271-277, 1983.
- Matsuo O, Okada K, Fukao H, Tomioka Y, Ueshima S, Watanuki M, Sakai M: Thrombolytic properties of staphylokinase. *Blood* **76**: 925-929, 1990.
- 岡田清孝: 新しい血栓溶解剤スタフィロキナーゼ. *血栓止血誌* **3**: 136-140, 1992.
- Rabijns A, Bondt HL De, Ranter C De: Three-dimensional structure of staphylokinase, a plasminogen activator with therapeutic potential. *Nature Struct Biol* **4**: 357-360, 1997.
- Parry MAA, Zhang XC, Bode W: Molecular mechanisms of plasminogen activation: bacterial cofactors provide clues. *Trends Biochem Sci* **25**: 53-59, 2000.
- 宮田敏行, 峯 昇平: ストレプトキナーゼ-ミニプラスミン複合体の立体構造. *血栓止血誌* **11**: 276-282, 2000.
- Parry MAA, Fernandez-Catalan C, Bergner A, Huber R, Hopfner K-P, Schlott B, Guhrs K-H, Bode W: The ternary microplasmin-staphylokinase-microplasmin complex is a proteinase-cofactor-substrate complex in action. *Nature Struct Biol* **5**: 917-923, 1998.
- Collen D, Bernaerts R, Declerck P, De Cock F, Demarsin E, Jenne S, Laroche Y, Lijnen HR, Silence K, Verstreken M: Recombinant staphylokinase variants with altered immunoreactivity. I: Construction and characterization. *Circulation* **94**: 197-206, 1996.
- Jaspers L, Vanwetswinkel S, Lijnen HR, Van Herzele N, Van Hoef B, Demarsin E, Collen D, De Maeyer M: Structural and functional basis of plasminogen activation by staphylokinase. *Thromb Haemost* **81**: 479-485, 1999.
- Okada K, Ueshima S, Tanaka M, Fukao H, Matsuo O: Analysis of plasminogen activation by plasmin-staphylokinase complex in plasma of α_2 -antiplasmin deficient mice. *Blood Coag Fibrinol* 2000 (in press).