

## Gla ドメインの立体構造と機能

森田 隆 司\*<sup>1</sup>, 水野 洋\*<sup>2</sup>

Structure and Function of Gla-domain

Takashi MORITA\*<sup>1</sup>, Hiroshi MIZUNO\*<sup>2</sup>

**Key words** :  $\gamma$ -carboxyglutamic acid, Gla domain, Vitamin K-dependent coagulation factor, prothrombin, factor VII

### 1. はじめに

Gla ドメインの立体構造はまずウシプロトロンビン・フラグメント 1 の X 線結晶解析により明らかにされ、次いでヒト VIIa 因子・ヒト Tissue factor 複合体の X 線解析により凝固 VIIa 因子の Gla ドメインの立体構造が明らかにされた<sup>1)2)</sup>。意外ではあるが、今日でもそれ以外の血液凝固因子の Gla ドメインの立体構造は報告されていない。それらの Gla ドメインの構造決定が今日まで困難だったのは、Gla ドメインが結晶中で disorder していたか、あるいは結晶化の過程でプロテアーゼにより Gla ドメインが切断され、母体タンパク質から除去されたためと思われる。例えば、凝固 IXa 因子の X 線解析の結果、Gla ドメインに相当する電子密度は見られず、わずかに EGF-1 につながる Gla ドメインの C 末端ヘリックス部分が認められるのみであった<sup>3)</sup>。

このトピックスでは、現在明らかにされているプロトロンビンと凝固 VIIa 因子の Gla ドメインの立体構造の知見を述べた後、おわりの「ま

とめ」で、著者のグループが行なった X 因子の Gla ドメインの立体構造についてもふれてみたい。

### 2. ビタミン K 依存性凝固因子の Gla ドメインの構造

それぞれの凝固因子 Gla ドメインの一次構造は図 1 に示したように高い相同性がある。Gla ドメインには合計 9~13 残基の Gla 残基を含み、それぞれの Gla 残基の位置はよく保存されている(図 1)。また、Gla ドメインの C 末側に位置するおよそ 5 アミノ酸残基からなる領域は aromatic amino acid stack domain (残基 40~45) と呼ばれる。この領域は  $\alpha$ -キモトリプシンなどのプロテアーゼに対し、非常に感受性が高く hinge region とも呼ばれている。この領域をコードする遺伝子部分は大変小さいエクソン III に対応する。プロトロンビンの Gla ドメインはこの hinge region を橋渡しとして Kringle ドメインにつながっている。プロトロンビン以外の因子である X 因子、IX 因子、VII 因

\*<sup>1</sup>明治薬科大学・生体分子学教室 (〒204-8588 東京都清瀬市野塩 2-522-1)

Department of Biochemistry, Meiji Pharmaceutical University (2-522-1, Noshio, Kiyose, Tokyo 204-8588)

Tel. 0424-95-8479 FAX. 0424-95-8479 e-mail: tmorita@my-pharm.ac.jp

\*<sup>2</sup>農業生物資源研究所・生物工学部・蛋白質工学研究室 (〒305-8602 茨城県つくば市観音台 2-1-2)

National Institute of Agrobiological Resources [Kannondai 2-1-2, Tsukuba, Ibaraki 305-8602]

Tel. 0298-38-7014 FAX. 0298-38-7492 e-mail: mizuno@abr.affrc.go.jp

	1	5	10	15	20	25	30	35	40	45															
<b>h PT</b>	ANT-FL	Y Y	VRKGNL	Y R Y	CV	Y Y	TCSY	Y Y	AF	Y	AL	Y	S	S	T	A	T	D	V	F	W	A	K	Y	T
<b>b PT</b>	ANKGFL	Y Y	VRKGNL	Y R Y	CL	Y Y	PCSR	Y Y	AF	Y	AL	Y	S	L	S	A	T	D	A	F	W	A	K	Y	T
<b>h VII</b>	ANA-FL	Y Y	LRPGSL	Y R Y	CK	Y Y	QCSF	Y Y	AR	Y	IF	K	D	A	Y	R	T	K	L	F	W	I	S	Y	S
<b>b VII</b>	ANG-FL	Y Y	LLPGSL	Y R Y	CR	Y Y	LCSF	Y Y	AH	Y	I	F	R	N	Y	R	T	R	Q	F	W	V	S	Y	N
<b>h X</b>	ANS-FL	Y Y	MKKGHL	Y R Y	CM	Y Y	TCSY	Y Y	AR	Y	V	F	Y	D	S	D	K	T	N	Y	F	W	N	K	Y
<b>b X</b>	ANS-FL	Y Y	VKQGNL	Y R Y	CL	Y Y	ACSL	Y Y	AR	Y	V	F	Y	D	A	Y	Q	T	D	Y	F	W	S	K	Y
<b>h IX</b>	YNSGKL	Y Y	FVQGNL	Y R Y	CM	Y Y	KCSF	Y Y	AR	Y	V	F	Y	N	T	Y	R	T	T	Y	F	W	K	Q	Y
<b>b IX</b>	YNSGKL	Y Y	FKRGNL	Y R Y	CK	Y Y	KCSF	Y Y	AR	Y	V	F	Y	N	T	Y	K	T	T	Y	F	W	K	Q	Y
<b>h PC</b>	ANS-FL	Y Y	LRHSSL	Y R Y	C I	Y Y	I C D F	Y Y	A K	Y	I	F	Q	N	V	D	D	T	L	A	F	W	S	K	H
<b>b PC</b>	ANS-FL	Y Y	LRPGNV	Y R Y	C S	Y Y	V C Y F	Y Y	A R	Y	I	F	Q	N	T	Y	D	T	M	A	F	W	S	K	Y
<b>h PS</b>	ANS-LL	Y Y	TKQGNL	Y R Y	C I	Y Y	L C N K	Y Y	A R	Y	V	F	Y	N	D	P	Y	T	D	Y	F	Y	P	K	Y
<b>b PS</b>	ANT-LL	Y Y	TKKGNL	Y R Y	C I	Y Y	L C N K	Y Y	A R	Y	I	F	Y	N	N	P	Y	T	E	Y	F	Y	P	K	Y
<b>h PZ</b>	AGSYLL	Y Y	LFEGNL	Y K Y	C Y	Y Y	I C V Y	Y Y	A R	Y	V	F	Y	N	Y	V	T	D	Y	F	W	R	R	Y	K
<b>b PZ</b>	AGSYLL	Y Y	L F Y	G H L	Y K Y	C W	Y Y	I C V Y	Y Y	A R	Y	V	F	Y	D	D	Y	T	T	D	Y	F	W	R	T
	1	5	10	15	20	25	30	35	40	45															

図1 ビタミンK 依存性凝固因子 Gla ドメインのアミノ酸配列の比較。  
 h と b はそれぞれヒトとウシを意味する。  
 PT:プロトロンビン, VII:VII 因子, X:X 因子, IX:IX 因子, PC:プロテイン C, PS:  
 プロテイン S, PZ:プロテイン Z.  $\gamma$  は Gla 残基を示す。

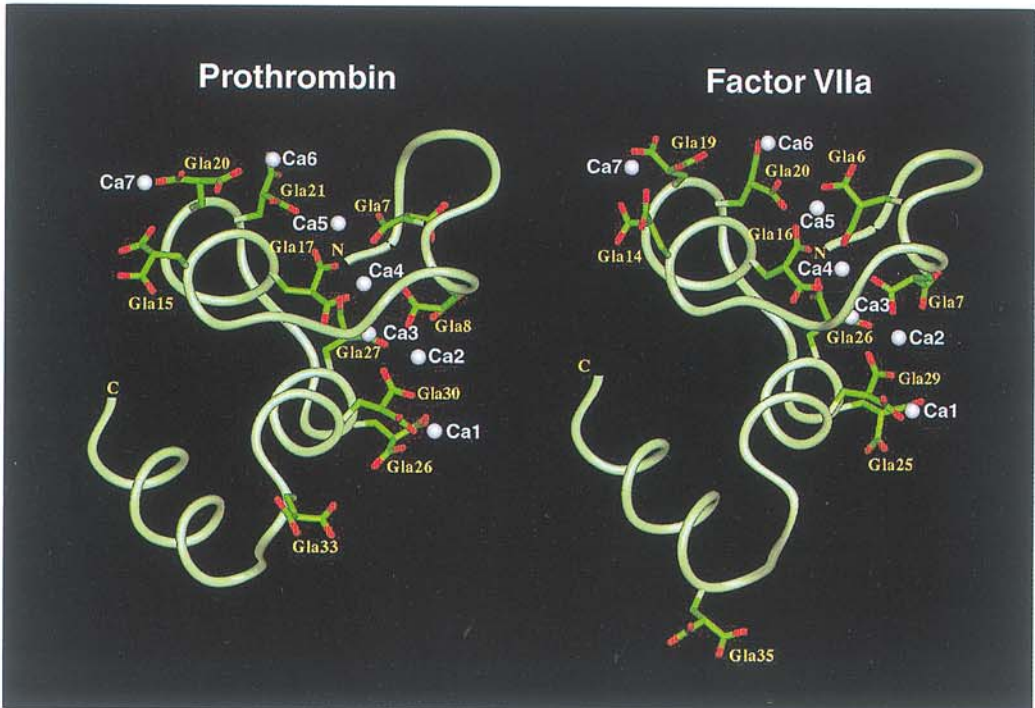


図2 ウシプロトロンビンとヒト VIIa 因子の Gla ドメインの構造。

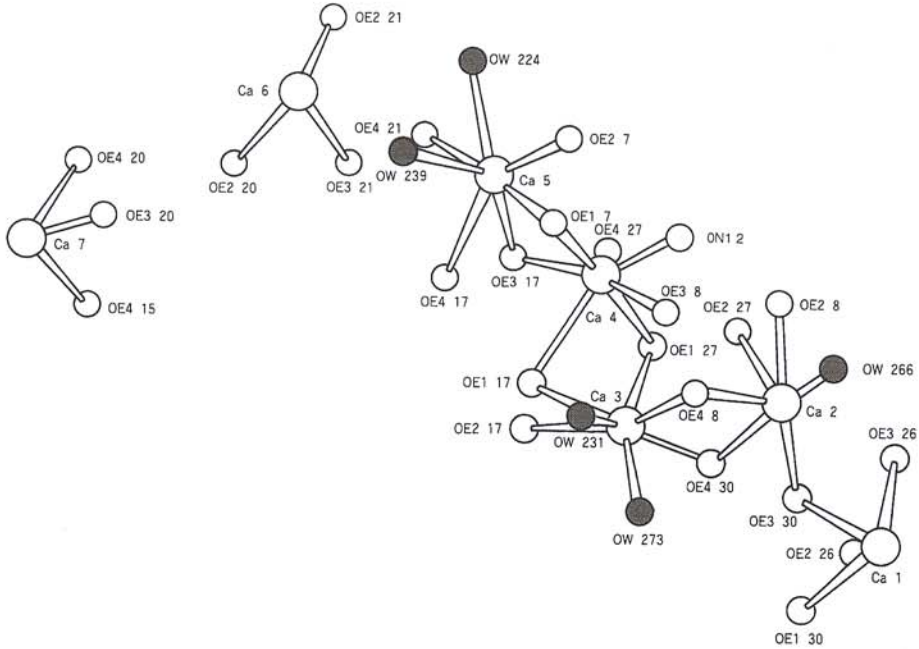


図 3  $\text{Ca}^{2+}$  イオンが結合したプロトロンビン Gla ドメイン中の各  $\text{Ca}^{2+}$  イオンと酸素原子の配位状態 (文献 1 と 7 より引用)。

Gla 残基は側鎖の二つのカルボキシル基にそれぞれ二つずつの酸素原子をもち、それぞれに 1~4 の番号をつけた。たとえば OE 2 17 は Gla 17 のカルボキシル基の酸素原子 2 を示す。OW は水分子の酸素原子 (シャドウ部分) を示す。

子, およびプロテイン C の場合は hinge region に続き, EFG ドメインにつながっている。

プロトロンビンと VIIa 因子の Gla ドメインには, 図 2 に示したように合計 7 個の  $\text{Ca}^{2+}$  イオンが結合していることが X 線構造解析から明らかにされている。これらの  $\text{Ca}^{2+}$  イオンには Gla 残基の二つの  $\gamma$ -カルボキシル基の酸素原子, Asp 残基の  $\beta$ -カルボキシル基の酸素原子, さらに水分子の酸素原子がいろいろな組み合わせで, それぞれの  $\text{Ca}^{2+}$  イオンに配位する形で結合している (図 3)。これらの  $\text{Ca}^{2+}$  イオンはすべて同一の結合様式で Gla 残基に結合しているわけではなく, 個々の  $\text{Ca}^{2+}$  イオンによってその結合様式は異なっており, 配位数は 6~7 配位である。例えば, Ca-2 を例にとると, Gla 27 のカルボキシル基から一つの酸素原子 (unidentate), Gla 30 の一つのカルボキシル基から二つの酸素原子 (bidentate), Gla 8 の二つ

のカルボキシル基から 1 個ずつの酸素原子 (malonate) が配位し, さらに水分子の酸素原子が配位することにより  $\text{Ca}^{2+}$  イオンの結合部位を形成している (図 3)。従って, Ca-2 の場合は 6 配位結合である。このうち, Gla 30 の一つの酸素原子は Ca-1 にも結合し, Gla 30 のもう一方の酸素原子と Gla 8 の酸素原子は Ca-3 にも結合している。従って, Gla 残基のカルボキシル基の酸素原子は  $\text{Ca}^{2+}$  イオン間を橋渡し構造によって, Ca-1, Ca-2, Ca-3, Ca-4, Ca-5 は互いに連結され,  $\text{Ca}^{2+}$  クラスターを形成している。 $\text{Ca}^{2+}$  イオンの露出表面積 (accessible area) の割合から, Ca-1 を除くこれらの  $\text{Ca}^{2+}$  イオンは分子内部に埋没しており, 酸性 Gla 残基を中和するのみでなく, Gla ドメインの立体構造の維持に大きく寄与している。

$\text{Ca}^{2+}$  イオン結合型 VIIa 因子の Gla ドメインの場合も, プロトロンビンの場合と比べてほ



ンピンの  $\text{Ca}^{2+}$  イオン結合型の構造を比較すると,  $\text{Ca}^{2+}$  イオンが存在していない場合の方がかなりの Gla 残基が分子表面に露出していることがわかる<sup>4)5)</sup>。特に重要な点は, N 末端領域の疎水性アミノ酸残基 (Phe 4, Leu 5, Val 8) は分子内部に折り畳まれている構造が,  $\text{Ca}^{2+}$  結合によって大きな構造変化をもたらすことである。すなわち,  $\text{Ca}^{2+}$  イオンが結合した後では, Gla 残基は内部に折り畳まれ  $\text{Ca}^{2+}$  イオンと結合し, 逆に N 末端側の疎水性アミノ酸残基は表面に突出する。図 2 のプロトロンピンと VIIa 因子の Gla ドメインの立体構造図の右上側の疎水性アミノ酸ループがそれにあたる。プロトロンピンの方がループが大きいのは, プロトロンピンにはこの領域に一残基 (Gly 残基) アミノ酸が余分に含まれているからである (図 1)。

Gla ドメインは  $\text{Ca}^{2+}$  イオンと結合して立体構造変化を起こし, リン脂質との結合が可能となる。すなわち, この疎水性のループとリン脂質の疎水性部分が相互作用し結合すると解釈されている。この構造変化は  $\text{Ca}^{2+}$  イオン以外の金属イオン ( $\text{Mg}^{2+}$ ) でも生じるが, その場合, リン脂質膜との結合は起こらない。また, Gla ドメインには数種の金属イオンが結合できるが,  $\text{Ca}^{2+}$  イオンが結合する場合にのみ, 正の協調性を誘引することが知られている。このため, 膜結合にはこの正の協調性をもつ  $\text{Ca}^{2+}$  イオン結合が必要であることがわかる。

Gla ドメインは正電荷の  $\text{Ca}^{2+}$  イオンを介して負の電荷をもつフォスファチジルセリンなどの酸性リン脂質と結合する。しかし, その結合の分子レベルでの機構は明らかではない。Gla ドメインに結合する  $\text{Ca}^{2+}$  イオンの中で, お互いに近接する位置にある Ca-2・Ca-3・Ca-4・Ca-5 が形成するクラスターは電荷的に中性である。おそらくこれらは正の協調性を有する  $\text{Ca}^{2+}$  結合に関わっているのであろう。また, その構造維持には Gla ドメインの N 末端領域の構造も深く関与している。一方, Ca-1 および Ca-6・Ca-7 で形成するクラスターは弱く正に荷電してい

るもののリン脂質との結合については明らかではない。このため, Gla ドメインとリン脂質の橋渡しをするために, さらに  $\text{Ca}^{2+}$  イオンが結合することで負に荷電したリン脂質と結合することも考えられる。しかしながら, 分子内部の  $\text{Ca}^{2+}$  イオン結合に関与していないフリーの Gla 残基のうち, 分子表面に局在するものは少なく, これらの残基が膜結合に関わる  $\text{Ca}^{2+}$  イオンと結合できるのか疑問である。むしろ Gla ドメイン自体が強く負に荷電していることから, 非特異的に  $\text{Ca}^{2+}$  イオンと結合することで負に荷電したリン脂質と結合するのかもしれない。おそらく, 正の協調性を有する  $\text{Ca}^{2+}$  イオン結合と, これにより惹起される N 末端領域の構造変化が, 膜との結合に必要な Gla ドメインの立体構造をもたらすのであろう。いずれにせよ,  $\text{Ca}^{2+}$  イオン-Gla ドメインへのリン脂質結合の詳細なメカニズムについては, 今後の研究にまたねばならない。

#### 4. おわりに

筆者のグループは最近, X 因子の Gla ドメイン (残基 1~44) とその結合タンパク質の複合体の結晶構造解析に成功した<sup>6)</sup>。その結果の詳細は未発表なので割愛せざるを得ないが, この研究結果により X 因子の Gla ドメインの立体構造が明らかとなった。その構造解析により, X 因子の Gla ドメインの立体構造においても, その立体構造の基本骨格はプロトロンピンや VIIa 因子の Gla ドメインとほぼ同じ立体構造を有していることが明らかとなった。興味深いことに, X 因子の Gla ドメイン中には, プロトロンピンと VIIa 因子の Gla ドメインにはみられない“8 番目”の  $\text{Ca}^{2+}$  イオンが結合していることが明らかとなった。その  $\text{Ca}^{2+}$  イオン結合部位はいわゆる hinge region 附近に存在し, Gla 35 と Gla 39 の 4 個のカルボキシル基が  $\text{Ca}^{2+}$  イオンと配位していた。われわれは X 因子と IX 因子の Gla ドメイン間でのアミノ酸配列の相同性から, この 8 番目の  $\text{Ca}^{2+}$  イオン結

合は“IX因子のGlaドメイン”にも存在すると推定している。8番目のCa<sup>2+</sup>イオン結合部位は第一EGFにつながる領域の要になること、Xa因子とIXa因子の共通点はそれぞれ補助因子のVa因子とVIIIa因子が結合し、活性発現する点を考え合わせると、この8番目のCa<sup>2+</sup>イオンはXa因子・Va因子あるいはIXa因子・VIIIa因子の複合体形成に関与しているかも知れない。今後、この点を検討する必要がある。一方、Glaドメインとリン脂質の相互作用の本質は依然不明な点が多いので、この点も今後の研究の焦点になろう。

#### 文 献

- 1) Soriano GM, Padmanabhan K, De Vos AM, Tulinsky A: The Ca<sup>2+</sup> ion and membrane binding structure of the Gla domain of Ca-prothrombin fragment 1. *Biochemistry* **31**: 2554-2566, 1992.
- 2) Banner DW, D'Arcy A, Chene C, Winkler FK, Guha A, Konigsberg WH, Nemerson Y, Kirchofer D: The crystal structure of the complex of blood coagulation factor VIIa with soluble tissue factor. *Nature* **380**: 41-46, 1996.
- 3) Brandstetter H, Bauer M, Huber R, Lollar P, Bode W: X-ray structure of clotting factor IXa: Active site and module structure related to Xase activity and hemophilia B. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 9796-9800, 1995.
- 4) Sunnerhagen M, Forsen S, Hoffren AM, Drakenberg T, Teleman O, Stenflo J: Structure of the Ca<sup>2+</sup>-free Gla domain sheds light on membrane binding of blood coagulation proteins. *Nature Struct Biol* **2**: 504-509, 1995.
- 5) Sunnerhagen M, Olah GA, Stenflo J, Forsen S, Drakenberg T, Trehella J: The relative orientation of Gla and EGF domains in coagulation factor X is altered by Ca<sup>2+</sup> binding to the first EGF domain. A combined NMR-small angle X-ray scattering study. *Biochemistry* **35**: 11547-11559, 1996.
- 6) Mizuno H, Fujimoto Z, Atoda H, Morita T: Crystal structure of coagulation factor X-binding protein complexed with the Gla domain. *Thrombosis and Haemostasis Supplement*: 35, 1999.
- 7) 井上敬介, 森田隆司: 第II因子(プロトロンビン), 松田道生・鈴木宏治編集, 止血・血栓・線溶, 東京, 中外医学社, 164-173, 1994.