Staphylocoagulase とプレトロンビン-2 複合体のX線結晶構造 解析から明らかになったセリンプロテアーゼ前駆体の 活性化メカニズムの原型と共通原理 — Streptokinase との相違点と共通性—

山崎 泰男*, 森田 隆司*

X-ray crystal structure of staphylocoagulase and prethrombin-2 complex reveals a prototype mechanism and a common principle of zymogen activation of serine proteases

Yasuo YAMAZAKI, Takashi MORITA

Key words: staphylocoagulase, prethrombin-2, X-ray crystal structure, serine protease, zymogen activation mechanism

はじめに

ある種のバクテリアはペプチド結合の開裂を伴わない非酵素的な手段で血液凝固・線溶系を活性化する興味深いタンパク質を分泌することが知られている。黄色ブドウ球菌 *Staphylococcus aureus* は敗血症、心内膜炎に関与する病原菌で、それらが分泌するスタフィロコアグララーゼ staphylocoagulase (分子量 64,000, SC と略)¹⁾⁻¹¹⁾ はユニークな方法でプロトロンビンを活性化する。通常血液中では、プロトロンビンはプロトロンビナーゼによる限定分解を受け、活性型トロンビンへと変換されるが、SC はプロトロンビンと 1 対 1 の複合体を形成することで、ペプチド結合を切断せずにプロトロンビンを活性化状態にする^{5), 10)}。SC・プロトロンビン複合体 (staphylothrombin) はトロンビンの生理的な基質であるフィブリノーゲンやトロ

ンビンの人工基質を限定分解しうる^{5), 10), 11)}。このユニークなプロテアーゼ活性化メカニズムは、同じくバクテリア由来のプラスミノーゲンアクチベータ streptokinase (SK と略) にも見られ、酵素化学的な研究から N 末端のアミノ酸配列が大きく関与していることが明らかにされている。SC の N 末端にも SK と同様にトリプシンおよびキモトリプシンの N 末端アミノ酸配列 (Ile-Val-) を mimic した配列が存在することから、この N 末端ペプチドがプロトロンビンおよびプラスミノーゲンの活性化ポケットに挿入されることで活性化されるモデルが考えられた。このモデルは Bode らが提唱したトリプシノーゲン-トリプシン活性化モデル (molecular sexuality hypothesis)¹²⁾ とよく合致する。

最近、米国 Vanderbilt 大 Bock らのグループとドイツ Max Planck 研究所の Bode らグルー

* 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, Japan]

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

プは、共同研究で SC とトロンビン複合体の X 線結晶構造解析を成功させ、この仮説を立証する結果を得ている¹³⁾。単なる結晶構造解析にとどまらず、周到に観点を変えて行った興味深い研究内容も含まれているので、その要点を紹介したい。

SC は SK と類似の活性化機構を示す反面、構造面では SC は α ヘリックスのみからなり (図 1a), 主に β シートから形成される SK とは全く異なっている (図 1b)。さらに、リガンドとの結合部位も大きく異なっていることが明らかにされた (図 1a, b, c)。SK・プラスミンの場合は、活性型であるプラスミンとの複合体のみの構造解析を行ったので¹⁴⁾、Bode らの仮説は明らかにされなかった。今回、トロンビン・SC と前駆体であるプレトロンビン-2 (Pre-2 と略)・SC の両複合体を解析することで、仮説を直接証明し得た。蛇足だが、セリンプロテアーゼ前駆体は、ペプチド鎖の切断により新たに生成した N 末端のアミノ基と、活性中心の Ser195 の隣接残基である Asp194 の β カルボキシル基が salt bridge をつくることにより、活性化ポケットが形成され活性化状態に移移することであることを付け加えたい。

Staphylocoagulase・トロンビンおよびプレトロンビン-2 の複合体の構造解析

SC は N 末端側の D1, D2 領域と C 末端側の 8 個の繰り返し領域から構成されており、プロトロンビン活性化領域は D1 と D2 領域に存在する (図 2)。彼らは *E. coli* で発現した組換え SC (N 末端に Met が付加, Met-SC(1-325)) とバクテリア由来の native SC(1-325) を、それぞれトロンビンと Pre-2 との複合体を調製し、その立体構造を解析した。2 つの複合体は共に類似した構造を示し、Pre-2 のプロテアーゼドメインは活性型であるトロンビンと類似した構造を形成している。図 3 に示した様に、SC (赤色とピンク色) は 2 つの棒状のヘリックス部分

図 2 Staphylocoagulase とプロトロンビンの模式構造
原著の Fig. 1a を引用した。Staphylocoagulase (SC) 分子中の R は、SC の C 末端領域の 8 個の繰り返し構造を示している^{8), 9), 11)}。

が黄色・ゴールド色のトロンビンと約 110 度で接合した構造を有しており、N 末端側のヘリックス部分 (D1) が向き合うように 2 量体を形成している (図 3a)。SC は β シート構造を全く含まず、D1 および D2 領域はそれぞれ 3 本の α ヘリックスから構成されている。彼らは沈降平衡法でトロンビン・SC(1-325) の複合体は 155 ± 10 kDa であることを算出し、溶液中でも二量体構造を形成していることを明らかにしている。トロンビンおよび Pre-2 はいずれも SC の D1 と C 末端側ヘリックス部分 (D2) の連結した肘部分に抱かれるように結合している (図 3a と b)。活性中心は 2 分子の間にできた空間部へと向いており、おのおのの活性中心 (Ser195) は約 75Å 離れている。二量体形成には図 3b の上部の SC と下部の SC の接触部分、すなわち D1 領域の $\alpha 2$ ヘリックスと、 $\alpha 2$ ヘリックスと $\alpha 3$ ヘリックスを連結するループ領域が重要であり、これらによって形成された指状構造が、複合体のもう一方の SC の N 末端側

図.1

図.3

図.5

$\alpha 1$ ヘリックスをつまむように二量体を形成している (図 3b).

SC はトロンビンの 148 ループ (トロンビン・ループ 2) と exosite-1 の 2 カ所を介して結合している. 148 ループは SC の D1 の $\alpha 1$ と $\alpha 2$ ヘリックスの間, および D1 の $\alpha 2$ - $\alpha 3$ ヘリックス連結部の疎水性表面に結合しており, トロンビンの Trp148 の側鎖がその結合に大きく寄与している (原論文では Fig. 3a, 割愛). exosite-1 における結合では, 基質・補因子の認識に重要なトロンビン Tyr76 の側鎖が, SC の周辺側鎖によって形成される疎水性の溝に配置され, かつトロンビンの 3 つの塩基性残基が SC の 3 つの酸性残基と結合している (具体的な残基は原論文 Fig. 3b を参照).

トロンビン分子表面での exosite-1 形成は, プロトロンビンからトロンビンへの活性化過程でフィブリノーゲンとの相互作用に必須である. 彼らはまず蛍光標識したヒルジンの exosite-1 結合部位のペプチド Hir (残基 54-65) を作成した. それを用いて SC によるプロトロンビンの活性化に伴う exosite-1 形成を蛍光変化を指標に測定した. プロトロンビンおよびトロンビンと Hir (残基 54-65) との結合に対し, SC は競合阻害的に作用する (原論文では Fig.

3c, d, 割愛). その stoichiometry はプロトロンビンに対し 0.8 ± 0.1 , トロンビンに対し 0.94 ± 0.03 であることから, SC・プロトロンビン複合体では“限定分解を受けなく”とも機能的な exosite-1 が形成されていることを示している.

さらに彼らはいくつかの SC 変異体を作成し, SC の各ドメインおよび N 末端ペプチドの機能について調べている. D2 の C 末端約 50 残基を欠如した変異体 (SC1-234) は SC1-325 に比べ, プロトロンビン活性化能が約 1/5 に低下し, さらに D2 を完全に欠如した変異体 (SC1-146) は約 1/3,000 にまで活性が低下する (図 4b). 一方, SC の C 末端部分 (SC147-234) には全く活性化能が見られない (図 4b). これらのデータは 1980 年代に九大・岩永研で行った著者らのデータと完全に一致する^{2),7)}. 多分, Bock らは我々の研究結果を参考にし, 図 4a の実験を検討したと推測できる. この論文の価値を高めたのは図 4b の興味深い結果であるので紹介したい. N 末端が 1 残基長い Met-SC1-325 は SC1-325 に比べてプロトロンビンに対し約 1/60 の親和性しか有しておらず, 1 残基短い SC2-325 では約 1/6 程度の親和性しかない (図 4a). さらに N 末端を 2 残基欠失した SC (SC3-325) は SC1-325 の 2% 以下のプロト

図 1 Staphylocoagulase (SC) とプレトロンビン-2 (Pre-2) 複合体および streptokinase (SK) と μ -プラスミン複合体の比較

- SC (赤色) と Pre-2 (青色) 複合体. 波線部は Pre-2 との複合体でのみ決定できた SC の N 末端ペプチドと活性化ポケットの結合部を示している. 図 1a は図 1c から作成した. 図 1a の中には理解し易くするために SC の N 末端ペプチドと Pre-2 の結合部位にドットの丸を加えた.
- SK (黄色) と μ -プラスミン (青色) 複合体. 図 1b は図 1c から作成した.
- a と b をプロテアーゼ領域を中心に重ね合わせたもの. 図 1c は原著の supplementary information より引用した.

図 3 Staphylocoagulase とトロンビンの複合体の立体構造

SC (赤・ピンク色) とトロンビン (黄色・ゴールド色) 複合体は SC の長軸側で向き合うように二量体を形成している. 図 3a は原著の Fig. 2 を引用し, 理解し易くするために D1, D2 の記号を加えた. 図 3b は原著の supplementary information を引用した. 原図では $\alpha 2^{D1}$ が 2 カ所あるが, 右側は間違いであるので本稿 (図 3b) では $\alpha 1^{D1}$ に修正した.

図 5 プレトロンビン-2 (Pre-2) の活性化ポケットへの Staphylocoagulase (SC) の N 末端ペプチドの結合

- Pre-2 の活性化ポケットと SC の N 末端ペプチドの結合. SC は黄色で, $^{SC}I1$ は SC の N 末端の Ile の位置を示す. Pre-2 は表面電荷モデルで示している.
- SC の N 末端ペプチド (青色) と Pre-2 (灰色) 複合体の結合部位の電子密度図. 青色で示された SC の N 末端の Ile (図 5b では $^{SC}I1$ と示されている) は, 左上のトロンビンの Asp194 (図では D194 と示されている) と salt bridge を形成している. 図 5a, b は原著の Fig. 4c, d に対応する.

図4 Zymogen 活性化における staphylocoagulase の N 末端ペプチドの重要性

- a. SC 部分欠失変異体のプロトロンビン活性化. プロトロンビン活性化はプロトロンビンの合成基質の加水分解活性で評価している. ●: SC (1-325), △: SC (1-234), ◆: SC (1-146), ▲: SC (147-325).
- b. SC の N 末端ペプチドのプロトロンビン活性化における役割. ●: SC (1-325), ○: SC (2-325), □: Met-SC (1-325), ■: SC (3-325). 図 4a, b は原著の Fig 4b, a に対応する. 原著では図が逆転して掲載されているので, 本稿では修正した.

ロンビン活性化能しか有しておらず, 事実上活性が消失している (図 4b). これらの結果から, D1, 特に N 末端 2 残基はプロトロンビンの活性化に不可欠であり, D2 は exosite-1 を介したプロトロンビンへの高親和性の結合に重要な働きをしていると結論している.

SC・Pre-2 複合体の構造解析から得られた結果は, これらの kinetics によって得られた知見を裏付けている. SC と前駆体 Pre-2 複合体では, 活性型のプロトロンビンとの複合体では完全には同定できなかった N 末端 6 残基の電子

密度が決定できた. SC の N 末端 4 残基のペプチドはプロトロンビンのプロテアーゼドメインの N 末端に相当する Ile16 から Gly19 とほぼ同じ場所に位置しており, SC Ile 1 のイオン化した α アミノ基は, プロトロンビンの Asp194 (活性中心 Ser195 の隣接残基) のカルボキシル基と Pre-2 の周辺残基のカルボニル基で形成される陰性荷電したポケットに挿入され salt bridge を形成している (図 5). この N 末端 “活性化ペプチド” は SC Val 2 とプロトロンビン Asp189 の主鎖間の水素結合, およびいくつかのファンデルワールス相互作用によって安定化されている (図 5b). これら結果は, SC の N 末のペプチドを 1 残基長くしたり短くした場合でもどうにか Ile16 ポケットに結合できるが, 2 残基欠失した組換え体になると短かすぎて活性化ポケットに接近できなくなり, 酵素前駆体を活性化状態にすべき構造変化は不可能になることを明確に示している (図 5b).

まとめ

以上をまとめると, ① zymogen の活性化には SC の N 末端の SC Ile および 2 残基目の SC Val が重要である. ② SC はプロトロンビン -2 と 148 ループおよび exosite-1 を介して結合し, N 末端ペプチドを活性化ポケット (Ile16 ポケット) に挿入することで zymogen を活性化状態にする. ③ SC は 3 本の α ヘリックスのみからなる 2 つのドメインから構成される, 今まで見いだされなかった新規な構造をしている.

今回の報告は, SC をはじめとするバクテリア由来タンパク質による非限定分解性のプロテアーゼ活性化機構の原型を示し, さらにはトリプシンやキモトリプシン様のセリンプロテアーゼ前駆体の活性化機構とその基本原理すなわち, salt bridge 形成 (molecular sexuality hypothesis) による活性触媒残基 Ser195 の活性化メカニズムを直接証明しうる大変興味深いものである. Friedrich らの論文はタンパク質・

リガンド複合体の X 線結晶構造解析にとどまらず, タンパク質の活性化の原型を明らかにした点が高く評価されたに違いない. また, 我々にとって外来の毒性因子であるトキシンを用いた今回の研究から, 哺乳動物の機能の共通原理に肉迫する研究例であり, 秀でた研究といえよう.

文 献

- 1) Igarashi H, Morita T, Iwanaga S. A new method for purification of staphylocoagulase by a bovine prothrombin-Sepharose column. *J Biochem (Tokyo)* **86** : 1615-1618, 1979.
- 2) Morita T, Igarashi H, Iwanaga S. Staphylocoagulase. *Methods Enzymol* **80** : 311-319, 1981.
- 3) Kawabata S, Morita T, Iwanaga S, Igarashi H. Staphylocoagulase-binding region in human prothrombin. *J Biochem (Tokyo)* **97** : 325-331, 1985.
- 4) Kawabata S, Morita T, Iwanaga S, Igarashi H. Difference in enzymatic properties between alpha-thrombin-staphylocoagulase complex and free alpha-thrombin. *J Biochem (Tokyo)* **97** : 1073-1078, 1985.
- 5) Kawabata S, Morita T, Iwanaga S, Igarashi H. Enzymatic properties of staphylothrombin, an active molecular complex formed between staphylocoagulase and human prothrombin. *J Biochem (Tokyo)* **98** : 1603-1614, 1985.
- 6) Kawabata S, Miyata T, Morita T, Iwanaga S, Igarashi H. The amino acid sequence of the procoagulant- and prothrombin-binding domain isolated from staphylocoagulase. *J Biol Chem* **261** : 527-531, 1986.
- 7) Kawabata S, Morita T, Miyata T, Iwanaga S, 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.
- 8) Kaida S, Miyata T, Yoshizawa Y, Kawabata S, Morita T, Igarashi H, Iwanaga S. Nucleotide sequence of the staphylocoagulase gene: its unique COOH-terminal 8 tandem repeats. *J Biochem (Tokyo)* **102** : 1177-1186, 1987.
- 9) Kaida S, Miyata T, Yoshizawa Y, Igarashi H, Iwanaga S. Nucleotide and deduced amino acid sequences of staphylocoagulase gene from *Staphylococcus aureus* strain 213. *Nucleic Acids Res* **17** : 8871, 1989.
- 10) Kawabata S, Morita T, Miyata T, Kaida S, Iwanaga S, Igarashi H. Structure and function relationship of staphylocoagulase. *J Protein Chem* **6** : 17-32, 1987.
- 11) 森田 隆司: コアグララーゼ, 櫻井 純, 本田 武司, 小熊 恵二, 編集, 細菌毒素ハンドブック, 東京, サイエンスフォーラム, 2002, 260-266.
- 12) Bode W, Huber R: Induction of the bovine trypsinogen-trypsin transition by peptides sequentially similar to the N-terminus of trypsin. *FEBS Lett* **68** : 231-236, 1976.
- 13) Friedrich R, Panizzi P, Fuentes-Prior P, Richter K, Verhamme I, Anderson PJ, Kawabata S, Huber R, Bode W, Bock PE: Staphylocoagulase is a prototype for the mechanism of cofactor-induced zymogen activation. *Nature* **425** : 535-539, 2003.
- 14) Wang X, Lin X, Loy JA, Tang J, Zhang XC: Crystal structure of the catalytic domain of human plasmin complexed with streptokinase. *Science* **281** : 1662-1665, 1998.