ヘパリンコファクターⅡの構造と機能

山 岸 良 一** 桜 川 信 男*

Structure and function of heparin cofactor II

Ryoichi YAMAGISHI** and Nobuo SAKURAGAWA*

Key words: heparin cofactor II, serpin family

はじめに

血中には10種類以上ものプロテアーゼインヒビターが存在し、それぞれ重要な生理的役割を担っている¹⁾。アンチトロビンⅢ(ATⅢ)は血液凝固を制御する最も重要なインヒビターであり、トロピンをはじめ活性型第Ⅹ, Ⅸ, Ⅺ, Ⅻ因子などほとんどの凝固因子を阻害する作用をもつ。ATⅢはそれ自体ではプロテアーゼをきわめて緩徐に阻害するだけである。しかしそこにヘパリンを共存させると、その阻害速度は1,000倍以上に加速される点で、ATⅢはきわめてユニークな存在である²⁾。またATⅢのもつこの性質の重要性は、ヘパリン結合能を消失した異常ATⅢ分子をもつ患者では血栓症が多発することで裏付けられる。

このようにヘパリンはATⅢという血中蛋白成分を介して抗凝固作用を発現することが明らかにされて久しいが、1982年、Tollefsen ら³⁾は第2のヘパリン依存性トロピン阻害物質ヘパリンコファクターⅡ(HCⅡ)をヒト血漿から単離し、ヘパリンのもつ抗凝固作用はATⅢのみ

を介するものではないことを示唆した。ところがHCⅡの血中濃度は約0.1 mg/mlと決して少なくないにもかかわらず(ATⅢの約1/3)、その生理的意義は未だ明確ではない。しかしHCⅡの全一次構造はcDNAからRagg⁴⁾によって1986年に決定されており、HCⅡはATⅢやOvalbuminなどのいわゆるserine protease inhibitor family (Serpine family)に属することが明らかになった。

本稿ではHCⅡの構造と機能について述べ、Serpine familyとの関連、生理的意義について最近の成果を紹介しつつまとめてみたい。

I. HCⅡの生化学的性質

1. 物理化学的性質

HCⅡの精製法としては、Tollefsen らの原報³⁾、Wunderwald らの方法⁵⁾、筆者らの方法⁶⁾、Griffithらの方法⁷⁾がある。詳細はそれぞれの文献を参照していただきたいが、ここではHCⅡのヘパリン-アガロースカラムからの溶出挙動について述べる。HCⅡはヘパリンアガロースに結合するものの親和性はきわめて低い。塩濃

* 富山医科薬科大学検査部〔〒930-01 富山市杉谷 2630〕, Department of Clinical Laboratory, Toyama Medical and Pharmaceutical University, Toyama, Japan.

** キッセイ薬品工業株式会社

図 1: ヘパリン-アガロースカラムからの HCII の溶出⁶⁾.

ヘパリン-アガロースカラム (20 mM Tris HCl, pH 7.4, 0.1 M NaCl) に HCII を含む画分を添加, 洗浄後, 塩濃度を上げて溶出した. HCII は 0.12 ~ 0.18 M NaCl で溶出される.

度を上げて溶出すると 0.12~0.18 M NaCl で溶出される. ATIII は同一条件で 1 M 以上の濃度で溶出されることを考えると, この親和性の低さは HCII の一つの大きな特徴である (図 1).

表 1 は HCII の物理化学的性質を示す³⁾. 分子量は沈降平衡法と SDS-PAGE で若干異なっているが, 筆者らはモル濃度の計算などには前者の値を用いている. SDS-PAGE での移動度は還元してもしなくても変わらない. 沈降係数と分子量から本物質は球状蛋白と推定される.

2. 抗トロンビン作用機序と阻害スペクトラム

HCII はトロンビンの活性部位と 1:1 の複合体を形成してこれを阻害する³⁾⁷⁾. この複合体は SDS や尿素などの蛋白変性剤で処理しても解離しないが, pH 10 以上で解離することから⁷⁾, アシル型酵素複合体を形成していると推定される. この際 HCII の限定分解が伴うが, これは ATIII その他のインヒビターと共通の現象である. トロンビンとの結合部位は Leu-Ser で, ATIII (Arg-Ser) とは異なる. このことが HCII はトロンビン以外の凝固線溶因子を阻害しない⁹⁾理由と考えられる.

HCII は細胞内プロテアーゼのカテプシン G⁹⁾

表 1 HCII の物理化学的性質³⁾

分子量	65,600 (沈降平衡法)
	72,000 (SDS-PAGE)
pI	4.95~5.15
S 20 w	4.31 S
E 1 % 280	11.7
ストークス半径	34 Å

と消化酵素であるキモトリプシン¹⁰⁾を阻害する. 後者の場合, 反応速度はトロンビンの場合よりも高いが, ヘパリンの添加効果はない.

II. HCII の一次構造と Serpin family

1. HCII の一次構造上の特徴

Tollefsen らは HCII を精製した時点で HCII と ATIII との amino 酸組成の類似性を認めている³⁾. HCII の一次構造は cDNA から Ragg⁴⁾により決定された (図 2). それによると HCII は 480 個の amino 酸からなり, トロンビンとの結合部位は N 末端から 444 番目の Leu である. 後に詳しく述べるが ATIII との homology は 25 ~ 28% と高い.

ヘパリンとの結合には ATIII 同様, Lys¹¹⁾ や Arg¹²⁾ 残基が関与するようであるがその局部位は不明である. ATIII と異なるのは Trp 残基の寄与がない¹²⁾ことで, 前述のようにヘパリン親和性の低さの原因かも知れない.

最近, Tollefsen らは 60 と 73 番目の Tyr 残基が硫酸化されていることを見出した¹³⁾. このように硫酸化された蛋白質は最近相次いで報告されているが, その意味は必ずしも明確ではない. HCII の硫酸化について Tollefsen らは次のように推定している. 硫酸化された 2 つの Tyr 残基の周辺のアミノ酸配列はほとんど同一であり, しかも酸性に富んでいることから, これらの領域は普段はヘパリン結合部位 (塩基性に富んだ部位) と結合している. ここにヘパリンが存在すると, ヘパリンはヘパリン結合部位に結合し, 代りにこの硫酸化された部位が離れ, その結果 HCII のコンホメーションが変化するというものである. これが事実ならばきわめて興味深い知見であるが, HCII のヘパリン結合部位がまだ決まらない現在ではその証明は

```

1      5      10      20      30      40
G S K G P L D Q L E K G G E T A Q S A D P Q W E Q L N N K N L S M P L L P A D F
      50      60      70      80
H K E N T V T N D W I P E G E E D D D Y L D L E K I F S E D D D Y I D I V D S L
      90      100      110      120
S V S P T D S D V S A G N I L Q L F H G K S R I Q R L N I L N A K E A F N L Y R
      130      140      150      160
V L K D Q V N T F D N I F I A P V G I S T A M G M I S L G L K G E T H E Q V H S
      170      180      190      200
I L H F K D F V N A S S K Y E I T T I H N L F R K L T H R L F R R N F G Y T L R
      210      220      230      240
S V N D L Y I Q K Q F P I L L D F K T K V R E Y Y F A E A Q I A D F S D P A F I
      250      260      270      280
S K T N N H I M K L T K G L I K D A L E N I D P A T Q M M I L N C I Y F K G S W
      290      300      310      320
V N K F P V E M T H N H N F R L N E R E V V K V S M M Q T K G N F L A A N D Q E
      330      340      350      360
L D C D I L Q L E Y V G G I S M L I V V P H K M S G M K T L E A Q L T P R V V E
      370      380      390      400
R W Q K S M T N R T R E V L L P K F K L E K N Y N L V E S L K L M G I R M L F D
      410      420      430      440
K N G N M A G I S D Q R I A I D L F K H Q G T I T V N E E G T Q A T T V T T V G
      450      460      470      480
F M P L S T Q V R F T V D R P F L F L I Y E H R T S C L L F M G R V A N P S R S

```

図 2: HCII の全一次構造⁴⁾。

—をつけたアミノ酸は ATIII と一致していることを示す。↓はトロンビンによる切断箇所である。

難しく、推定の域を出ない。

2. Serpin family とは

HCII は Serpin family と呼ばれる一群の蛋白と深く関連しているのので、Serpin family について以下に述べる。

1980年、Hunt と Dayhoff¹⁴⁾は、ATIII, α_1 -アンチトリプシンおよびオプアルブミンの一次構造に高い相同性があることを見出し、これらの蛋白が同一 family に属することを示唆した。以後、cDNA を用いての一次構造決定法の確立とコンピューター解析の進歩を背景として、種々の蛋白がこの family に属することが次々と確かめられている。それは、アンギオテンシノーゲン¹⁵⁾, α_1 -アンチキモトリプシン¹⁶⁾, α_2 -プラスミンインヒビター¹⁷⁾であり、ごく最近も C₁-インヒビター¹⁸⁾とプロテインインヒビター¹⁹⁾もそうであることが報告されている。これらのうち、ほとんどが serine protease inhibitor であることからその頭文字をとって Serpin と命名されたのである。それぞれ25~30%という高い相同性を有しており、共通の祖先から進化したものと考えられる。この中で異色の存在はオプアルブミンとアンギオテンシノーゲンで

図 3: 各種硫酸化多糖類による HCII および ATIII の活心化⁹⁾。

ヘパリン (●), コンドロイチンポリ硫酸-1(□), -5(■), デキストラン硫酸(○), デルマタン硫酸(▲) 存在下で HCII (上段 A) または ATIII (下段 B) の抗トロンビン活性を測定した。

表 2 各種硫酸化多糖類存在下での HCII-トロンビン
反応の k_2 値

Sulfated- polysaccharide	k_2 ($M^{-1} min^{-1}$)	
	HC II	AT III
None	1.2×10^5	5.0×10^6
Heparin	3.2×10^8	7.0×10^8
Dermatan sulfate	3.8×10^8	—
Pentosan polysulfate	1.7×10^8	—
Dextran sulfate	2.7×10^8	1.7×10^7

ある。これらのものは進化の途中でその機能を消失したものと推定される。

さて HCII はその機能から Serpin の一員であることは容易に想像できる。まず Griffith ら⁷⁾ は HCII の C 末端側、すなわち反応部位の構造が ATIII ときわめて類似していることを示した。全一次構造が決定されると⁴⁾、HCII もやはり Serpin の一員であることが認められたのである。

III. 各種硫酸化多糖類による HCII の活性化

1. HCII と硫酸化多糖類

HCII はヘパリン以外にも、コンドロイチンポリ硫酸⁶⁾、デキストラン硫酸⁶⁾、デルマタン硫酸²⁰⁾などによっても活性化される。特にデルマタン硫酸は HCII を特異的に活性化する点で他と異なる(図 3)。このような作用を定量的に把握するためには、反応速度定数の測定が必要である。HCII とトロンビンの反応は次のように進行すると考えると、

k_2 は HCII をトロンビンに対して大過剰に添加して擬一次反応として求められる。表 2 に各種硫酸化多糖類存在下で筆者らが測定した k_2 値を示した²¹⁾。表 2 に示した多糖類は全て HCII-トロンビン反応を 1,000 倍以上に加速する。ATIII-トロンビン反応の場合、デルマタン硫酸の影響は全くなく、デキストラン硫酸も充分ではない。この意味で、HCII は ATIII に比較して、硫酸化多糖に対する特異性は低いといえる。

ところで、ATIII と同様、HCII との結合にも硫酸化多糖中の特定の sequence を必要とするのであろうか。これは、少なくとも HCII の活性化能とヘパリンの ATIII 親和性とは無関係である²²⁾ということが判明している以外、現時点では詳細は不明である。この問題を解決するための 2, 3 の例を紹介する。

まず筆者らは、多糖中の分子量と硫酸含量に着目して、合成品であるデキストラン硫酸を用いたモデル実験を行なった²¹⁾。HCII 活性はデキストラン硫酸の分子量と硫酸含量に密接に依存していることが判明し、しかも、分子量 10,000 以上、S 含量 18% のデキストラン硫酸はヘパリンに匹敵する活性化能を示した(表 2)。以上の結果は、HCII の活性化には、特定の sequence を必要とせず、むしろ硫酸基の数に依存していることを示唆している。

一方、Tollefsen らのグループは、デルマタン硫酸を部分分解し、HCII 親和性の高いオリゴ糖を分離してその性質を調べた²³⁾。それによると、HCII との結合には 8 糖以上の長さのフラグメントが必要であるが、HCII の活性化には 12 糖以上が必要とされる。また、その 8 糖親和性の高い画分と低い画分に分離して調べると、前者はより negative charge が大きいという。おそらくこれは硫酸基に由来するものであり、この意味で筆者らの実験と一致している。彼らは、HCII はデルマタン硫酸のある specific な部位へ結合すると推定しているが、この 8 糖の構造がわかればさらにはっきりすると思われる。

Griffith らのグループも、デルマタン硫酸とヘパリンには HCII に高い親和性を有する画分

が存在することを示している²⁴⁾。

2. HCII の生理的意義

これまで述べてきたことは、全て単離した HCII を用いての *in vitro* での成績である。HCII が生体内でどのような役割を担っているかは不明の点が多い。HCII 欠損によると思われる血栓症の報告もあるが²⁵⁾²⁶⁾、例数がまだ少なすぎるため、症例の検討がさらに必要と思われる。

Tollefsen らのグループはごく最近、HCII が fibroblasts や vascular smooth muscle cell で活性化されることを見出した²⁷⁾。この活性化はこれらの細胞表面に存在するデルマトン硫酸によるものと考えられる。ただし、加速の程度は 2~10 倍と、*in vitro* よりもかなり低い。また、同じ条件で、血管内皮細胞では活性化されない (ATIII は活性化される)。以上の結果は、HCII は、血管が破綻して血液がこれらの細胞に触れたとき活性化されることを示しており、HCII の血栓形成阻害機構上、興味深い知見である。

おわりに

HCII に関する知見を、構造と機能を中心としてまとめてみた。最近の生化学的、分子生物学的手法の発展は目覚ましく、HCII についても詳細な分析が可能となった。その成果が HCII の硫酸化であり、また serpin family との関係である。しかし、HCII が生体内で「実際に」どのように働いているかはほとんどわからないのである。今後の発展に期待したい。

なお、本稿では HCII の臨床面に関してはほとんど割愛した。また、serpin family の遺伝子構造についても深入りは避けたので、総説²⁸⁾を参照していただきたい。

文 献

- 1) Travis, J. and Salvesen, G.S.: Human plasma proteinase inhibitors. *Ann. Rev. Biochem.*, **52**; 655~709, 1983.
- 2) Koide, T.: Structure and function of antithrombin III. *Acta Hematol.*, **48**; 1875~1884, 1985.
- 3) Tollefsen, D.M., Majerus, D.W. and Blank, M.K.: Heparin cofactor II; purification and properties of a heparin-dependent inhibitor of thrombin in human plasma. *J. Biol. Chem.*, **257**; 2162~2169, 1982.
- 4) Ragg, H.: A new member of the plasma protease inhibitor gene family. *Nucleic Acids Res.*, **14**; 1073~1088, 1986.
- 5) Wunderwald, P., Schrenk, W.G. and Port, H.: Antithrombin BM from human plasma; an antithrombin binding modulatory to heparin. *Thromb. Res.*, **25**; 177~191, 1981.
- 6) Yamagishi, R., Niwa, M., Kondo, S., Sakuragawa, N. and Koide, T.: Purification and biological property of heparin cofactor II; activation of heparin cofactor II and antithrombin III by dextran sulfate and various glycosaminoglycans. *Thromb. Res.*, **36**; 633~642, 1984.
- 7) Griffith, M.J., Noyes, C.M. and Church, F.C.: Reactive site peptide structural similarity between heparin cofactor II and antithrombin III. *J. Biol. Chem.*, **260**; 2218~2225, 1985.
- 8) Griffith, M.J., Noyes, C.M., Thyndal, J.A. and Church, F.C.: Structural evidence for leucine at the reactive site of heparin cofactor II. *Biochemistry*, **24**; 6777~6782, 1985.
- 9) Parker, K.A. and Tollefsen, D.M.: The protease specificity of heparin cofactor II; inhibition of thrombin generated during coagulation. *J. Biol. Chem.*, **260**; 3501~3505, 1985.
- 10) Church, F.C., Noyes, C.M. and Griffith, M.J.: Inhibition of chymotrypsin by heparin cofactor II. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **82**; 6431~6434, 1985.
- 11) Church, F.C. and Griffith, M.J.: Evidence for essential lysines in heparin cofactor II. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **124**; 745~751, 1984.
- 12) Church, F.C., Villanueva, G.B. and Griffith, M.J.: Structure-function relationships in cofactor II; chemical modification of arginine and tryptophan and demonstration of two-domain structure. *Arch. Biochem. Biophys.*, **246**; 175~184, 1986.
- 13) Hortin, G., Tollefsen, D.M. and Strauss, A.

- W.: Identification of two sites of sulfation of human heparin cofactor II. *J. Biol. Chem.*, **261**; 15827~15830, 1986.
- 14) Hunt, L.D. and Dayhoff, M.O.: A surprising new protein superfamily containing ovalbumin, antithrombin III and α_1 -proteinase inhibitor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **95**; 864~871, 1980.
- 15) Doolittle, R.F.: Angiotensinogen is related to the antitrypsin-antithrombin-ovalbumin family. *Science*, **222**; 417~419, 1983.
- 16) Chandra, T., Stackhouse, R., Kidd, V.J., Robson, J.H. and Woo, S.L.C.: Sequence homology between human α_1 -antichymotrypsin, α_1 -antitrypsin and antithrombin III. *Biochemistry*, **22**; 5055~5061, 1983.
- 17) Lijnen, H.R., Wiman, B. and Collen, D.: Partial primary structure of human α_2 -antiplasmin; homology with other plasma protease inhibitors. *Thromb. Haemost.*, **48**; 311~314, 1982.
- 18) Bock, S.C., Skriver, K., Nielsen, E., Thøgersen, H.-C., Wiman, B., Donaldson, V.H., Eddy, R.L., Marrinan, J., Radziejewska E., Huber, R., Shows, T.B. and Magnusson, S.: Human C1 inhibitor; primary structure, cDNA cloning, and chromosomal localization. *Biochemistry*, **25**; 4292~4301, 1986.
- 19) Suzuki, K., Deyashiki, Y., Nishioka, J., Kurachi, K., Akira, M., Yamamoto, S. and Hashimoto, S.: Characterization of a cDNA for human protein C inhibitor; A new member of the plasma protease inhibitor superfamily. *J. Biol. Chem.*, **262**; 611~616, 1987.
- 20) Tollefsen, D.M., Pestka, C.A. and Monafó, W.J.: Activation of heparin cofactor II. *J. Biol. Chem.*, **258**; 6713~6716, 1983.
- 21) Yamagishi, R., Niwa, M. and Sakuragawa, N.: Thrombin inhibitory activity of heparin cofactor II depends on the molecular weight and sulfate amount of dextran sulfate. *Thromb. Res.*, **44**; 347~354, 1986.
- 22) Hurst, R.E., Poon, M.-C. and Griffith, M.J.: Structure-activity relationships of heparin; independence of heparin charge density and antithrombin-binding domains in thrombin inhibition by antithrombin and heparin cofactor II. *J. Clin. Invest.*, **72**; 1042~1045, 1984.
- 23) Tollefsen, D.M., Peacock, M.E. and Monafó, W.J.: Molecular size of dermatan sulfate oligosaccharides required to bind and activate heparin cofactor II. *J. Biol. Chem.*, **261**; 8854~8858, 1986.
- 24) Griffith, M.J. and Marbet, G.A.: Dermatan sulfate and heparin can be fractionated by affinity for heparin cofactor II. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **112**; 663~670, 1983.
- 25) Tran, T.H., Marbet, G.A. and Duckert, F.: Association of hereditary heparin cofactor II deficiency with thrombosis. *Lancet*, **ii**; 413~414, 1985.
- 26) Sie, P., Dupouy, D., Pichon, J. and Boneu, B.: Constitutional heparin cofactor II deficiency associated with recurrent thrombosis. *Lancet*, **ii**; 414~416, 1985.
- 27) McGuire, E.A. and Tollefsen, D.M.: Activation of heparin cofactor II by fibroblasts and vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.*, **262**; 169~175, 1987.
- 28) 倉地幸徳: 血液凝固反応系に関与するタンパク質の遺伝子構造. *細胞工学*, **5**(3); 250~263, 1986.