◆トピックス◆

TAFI 活性化とトロンボモジュリンのドメイン構造

小 亀 浩 市*

TAFI Activation and Thrombomodulin Structure

Koichi KOKAME*

Key words: TAFI, thrombomodulin, protein C, fibrinolysis, coagulation

はじめに

TAFI (Thrombin-activatable Fibrinolysis Inhibitor) は、血漿中に存在するカルボキシペプチダーゼ B の前駆体である。トロンビンにより活性化された TAFI すなわち TAFIa は、線溶抑制因子として働くことにより血液凝固線溶系の一役を担っている。本稿では、TAFI の機能に関するこれまでの知見を概説するとともに、TAFI 活性化のコファクターであるトロンボモジュリンの構造要求性について解析した筆者らの成果を紹介させていただく。

析の結果、既に報告されていた血漿プロカルボキシペプチダーゼ B⁴⁾ あるいはカルボキシペプチダーゼ U⁵⁾ と同一であることがわかった。カルボキシペプチダーゼ B と呼ばれていることからわかるように、TAFIa は蛋白質・ペプチドの C 末端 Arg/Lys 残基を遊離する活性をもつ。したがって、TAFIa の活性測定には hippuryl-Arg の水解反応を利用することが多い。TAFIa の熱安定性は非常に低く(活性半減期は 37°C で 10 分⁶⁾)、カルボキシペプチダーゼ U の U は unstable に由来する。血中濃度は、約 73 nM と報告されている⁷⁾。

TAFI の発見

1995 年 Bajzar らによって、線溶抑制因子として TAFI が初めて報告された¹⁾。活性化プロテイン C (APC) が抗凝固能だけでなく線溶促進能も併せもつという現象²⁾³⁾ を説明するために、新たな因子を探索した結果である(後述)。TAFI は、プラスミノゲンセファロースによる親和性カラムクロマトグラフィーを利用して、ヒト血漿より精製された¹⁾。SDS-PAGE で約 60 kDa を示し、トロンビンによる限定分解で 35 kDa と 25 kDa に断片化する。アミノ酸配列解

TAFI による線溶抑制のメカニズム

TAFI による線溶抑制のしくみを述べる前に、TAFI の精製が何を指標に進められたかを述べる。それは、再構成系におけるフィブリン塊溶解反応を抑制する能力を観察しながら行われた¹⁾。まず、プラスミノゲン・ α_2 -アンチプラスミン・PC/PS・第 V 因子・プロトロンビン・アンチトロンビン III を含むフィブリンノゲン溶液に、トロンビン・Ca²⁺・組織型プラスミノゲンアクチベーターを添加してフィブリン塊を生成させる。この溶液の濁度を経時的に追跡すると、

* 国立循環器病センター研究所 [〒 565-8565 大阪府吹田市藤白台 5-7-1]

National Cardiovascular Center Research Institute, [Fujishirodai 5-7-1, Suita, Osaka 565-8565, Japan.]

プラスミンによるフィブリン塊の溶解が濁度減少として観察される。ここに TAFIa を共存させると、用量依存的に濁度減少速度が低下するのである。この線溶抑制に TAFIa のカルボキシペプチダーゼ B 活性が関与していることは、カルボキシペプチダーゼ B 活性阻害剤が線溶速度遅延を相殺することで確認された¹⁾。さらに実際、フィブリン塊の溶解反応の際に TAFIa を加えておくと、Arg と Lys が遊離してくる⁸⁾。TAFIa による線溶抑制は、正常ヒト血漿を用いた実験でも観察された。血漿へのトロンビン添加で生成したフィブリン塊の溶解速度は、TAFIa の生成とともに遅延するが、TAFI 活性化を阻害する抗 TAFI 抗体共存下ではその遅延効果が消失した⁹⁾。

では TAFIa は、何の C 末端をターゲットにして線溶抑制能を発揮するのだろうか。現在のところ、TAFIa がもっとも効果を発揮する基質として、フィブリン分解産物 FDP が考えられている¹¹⁾¹⁰⁾。その理由は以下の通りである。線溶反応初期において、K5 ドメインを介してフィブリンに結合したプラスミノゲンは、同じくフィブリンに結合したプラスミノゲンアクチベーターによって活性化される。生じたプラスミンはフィブリンを分解し始めるが、このとき FDP に由来する C 末端 Lys が数多く露出する。これにプラスミノゲンが K1-3 ドメインを介して効率良く結合し、プラスミノゲンアクチベーターによる活性化効率が著しく増強する¹¹⁾。この最後の過程が TAFIa によって抑制されるのである。すなわち、TAFIa が FDP の C 末端 Lys を遊離させることで、プラスミノゲンの FDP への結合を抑えてしまう、言い換えると、FDP のコファクター活性を減衰させる、というストーリーである。これは、プラスミノゲンアクチベーターによるプラスミノゲンの活性化反応において、Glu プラスミノゲンの代わりに、FDP の C 末端 Lys 要求性の低い Lys プラスミノゲンを使うと、TAFIa による抑制効果が見られないという結果¹⁾と一致する。なお、TAFIa の不

活性化には、自身の熱不安定性⁵⁾⁶⁾¹⁰⁾、トロンビン¹⁴⁾あるいはプラスミン⁴⁾⁸⁾による分解が関与することが示唆されている。

TAFI 活性化とトロンボモジュリン

TAFI がトロンビンによる限定分解でカルボキシペプチダーゼ B 活性を獲得することは前述したが、この TAFI 活性化にはきわめて高濃度 (500 nM) のトロンビンを要する¹⁾。そこで、生理的な条件下で TAFI は本当に活性化されるのか、トロンビン以外のより強い活性化酵素が存在するのではないか、という疑問が生じていた。しかしながら、この疑問は 1996 年 Bajzar らによって解決された¹⁰⁾。彼らは、トロンビンによる TAFI 活性化反応の系に可溶性トロンボモジュリンを加えた。その結果、TAFIa の生成効率が 1000 倍以上高くなったのである。その後、可溶性トロンボモジュリンだけでなく、内皮細胞表面に発現しているトロンボモジュリンも TAFI 活性化のコファクターになることが確認された⁹⁾。

次に生じる疑問は、トロンボモジュリンのどの部位が TAFI 活性化に関与しているのか、という点である。トロンボモジュリンは、N 末端レクチン様ドメイン、6 個の連続する上皮増殖因子 (EGF) 様ドメイン、O 型糖鎖結合領域、細胞膜貫通領域、細胞質領域から成る¹²⁾¹³⁾ (図 1)。トロンビンによるプロテイン C 活性化において、トロンボモジュリンの完全なコファクター活性発現には、第 4~6 EGF 様ドメインが必要かつ十分である¹⁴⁾。トロンビンは第 5, 6 EGF 様ドメインに結合し、第 4 EGF 様ドメインはプロテイン C 活性化に必要とされる。さて前述のように、Bajzar らはトロンボモジュリンの細胞外ドメイン (可溶性トロンボモジュリン) に TAFI 活性化のコファクター活性を見出した¹⁰⁾。したがって、細胞膜への結合は必須でないと考えられる。第 1~6 EGF 様ドメインのみでコファクター活性が発現すること、第 4~6

図 1 トロンボモジュリンの構造

トロンボモジュリンは、N 末端側から、レクチン様ドメイン (226 残基)、6 個の EGF 様ドメイン (計 236 残基)、O 型糖鎖結合 (Ser/Thr に富む) 領域 (34 残基)、細胞膜貫通領域 (23 残基)、細胞質領域 (38 残基) から成る。第 5, 6 EGF 様ドメインにトロンピンが結合することにより、トロンボモジュリンのコファクター活性が機能する。プロテイン C 活性化においては第 4 EGF 様ドメインが¹⁴⁾、TAFI 活性化においては第 3 EGF 様ドメインが不可欠である¹⁵⁾。

EGF 様ドメインのみでは完全に不活性になることから、第 1~3 EGF 様ドメインの関与が示唆された⁸⁾。さらに、第 5 EGF 様ドメイン (トロンピン結合部位) に対する抗体がコファクター活性をブロックするのにに対し、第 2 EGF 様ドメインに対する抗体は無効であること⁸⁾ から、第 1 あるいは第 3 EGF 様ドメインの関与が予想された。

昨年筆者は、米国セントルイス市ワシントン大学の Sadler 研究室において、トロンボモジュリンの変異体を用いた実験を行った¹⁵⁾。その結果、N 末端から第 2 EGF 様ドメインまでを欠失した変異体 (図 2b~d) は、全長トロンボモジ

ュリン (図 2a) と同等の TAFI 活性化コファクター活性をもつのにに対し、第 3 EGF 様ドメインまでを欠失すると活性が完全に失われた (図 2e)。したがって、TAFI 活性化コファクター活性発現には、第 3 EGF 様ドメインが不可欠であると結論できた。さらに、第 3, 5, 6 EGF 様ドメインから成る変異体 (図 2g) には、コファクター活性がないという結果は、第 4 EGF 様ドメインも必須であることを示している。ただし、そのアミノ酸配列が重要なのか、あるいは第 3 EGF 様ドメインと第 5 EGF 様ドメインとの距離が重要なのかは未だ明らかではない。

さて、トロンボモジュリンのプロテイン C 活性化コファクター活性に第 4 EGF 様ドメインが必須であることは前述したが、ここにプロテイン C が結合することは厳密には確かめられていない。では、TAFI と第 3 EGF 様ドメインの結合はどうか。筆者らは、これを確かめるべく、トロンボモジュリン変異体のプロテイン C 活性化コファクター活性が TAFI 存在下で影響を受けるか否かを調べた。全長トロンボモジュリン (図 2a) および第 2 EGF 様ドメインまでを欠失した変異体 (図 2d) のプロテイン C 活性化コファクター活性は、TAFI の共存により抑制された。一方、第 3 EGF 様ドメインまでを欠失した変異体 (図 2e) では、TAFI による阻害効果がまったく観察されなかった¹⁵⁾。つまり、第 3 EGF 様ドメインがなければ、プロテイン C 活性化に対して TAFI は影響を及ぼさないのである。これらの結果は、TAFI が第 3 EGF 様ドメインに結合すること、第 4 EGF 様ドメインには結合しないことを示唆する。なお、トロンボモジュリンのプロテイン C 活性化コファクター活性に対する TAFI の阻害様式は拮抗的であり、また逆に、プロテイン C も TAFI 活性化を同程度の強さで拮抗阻害することも明らかになった¹⁵⁾。ただし、この TAFI とプロテイン C によるトロンピン-トロンボモジュリン複合体の奪い合いが生理的に重要であるか否かは不明である。

		コファクター活性	
		TAFI	PC
a		○	○
b		○	○
c		○	○
d		○	○
e		×	○
f		×	○
g		×	×

図2 トロンボモジュリン変異体のコファクター活性

CV-1細胞株表面に発現させた全長トロンボモジュリン(a), N末端からドメイン構造を順次除去した変異体(b~e), 第4, 5, 6 EGF様ドメインから成る可溶性変異体(f), 第3, 5, 6 EGF様ドメインから成る可溶性変異体(g)それぞれの, トロンビンによるプロテインCおよびTAFI活性化におけるコファクター活性を示す¹⁵⁾. ○は全長トロンボモジュリンと同等の活性をもつことを, ×は全く活性がないことを表している.

図3 トロンボモジュリンを中心とした凝固・線溶系

トロンビン-トロンボモジュリン複合体は, プロテインCを活性化して抗凝固作用を, TAFIを活性化して抗線溶作用を発揮する. Tm; トロンボモジュリン, PC; プロテインC, APC; 活性化プロテインC, II; プロトロンビン, IIa; トロンビン, Va; 活性化第V因子, VIIIa; 活性化第VIII因子, TAFI; thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor, TAFIa; 活性化TAFI, Pg; プラスミノゲン, Pn; プラスミン, Fbg; フィブリノゲン, Fibrin; フィブリン, FDP; フィブリン分解産物.

凝固系と線溶系のつながり

トロンビン-トロンボモジュリン複合体により活性化されたプロテインCすなわちAPCが、活性化第V, VIII因子を失活させることによって抗凝固能を発揮することはよく知られている。一方、APCが線溶促進作用をもつという現象も古くから見出されている²³⁾。これは、APCがプラスミノゲンアクチベーターインヒビターIを中和するため、あるいはAPCの抗凝固能に伴うトロンビン生成の減少が内皮細胞のプラスミノゲンアクチベーターインヒビターI分泌を抑制するため、と説明されてきた。しかし、これだけではすべてを説明できず、Bajzarら²⁾やde Fouwら³⁾は何らかの因子の存在を予想していた。そしてTAFIの出現で、APCの線溶促進作用に新たな機構が考えられるようになった。図3を参照していただきたい。APC活性によってプロトロンビンの活性化が抑制されると、トロンビン量が減少する。すると、トロンビン-トロンボモジュリン複合体の基質TAFIの活性化が抑制される。その結果、活性半減期の短いTAFIaは、その抗線溶効果(つまりプラスミノゲンの活性化効率の減少)を発揮できなくなり、相対的に線溶が亢進する。

これまで、トロンビン-トロンボモジュリン複合体の生理的基質としてプロテインCのみが知られていた。したがって、トロンボモジュリンは、抗凝固機能をもつコファクターとしての役割のみ注目されてきた。TAFIという第2の基質が発見されたことで、トロンボモジュリンは線溶系にも顔を出すこととなった。凝固系と線溶系は、トロンボモジュリンという共通の分子を中心に、我々の想像以上に緊密な関係があるのかもしれない。

おわりに

TAFIとプロテインCの血中濃度は、それぞれ73 nM⁷⁾、65 nM¹⁶⁾とよく似ている。また、ト

ロンビン-トロンボモジュリン複合体に対する両者のKm値は、それぞれ0.5~2.1 μ M⁶⁾¹⁰⁾¹⁵⁾、1.4~2.4 μ M¹⁵⁾¹⁷⁾と大差ない。したがって、まだ世に名を馳せていないTAFIも、プロテインCと同等の重要性をもっているであろう。凝固亢進状態を招くプロテインCの欠損症・異常症は、多く知られている¹⁸⁾。TAFIの欠損症・異常症(出血傾向?)も近い将来同定されるかもしれない。

第2の基質が見つかった今も、トロンボモジュリンのレクチン様ドメイン、第1, 第2 EGF様ドメインの生理的役割ははっきりしていない。明らかになる日が楽しみである。

文 献

- 1) Bajzar L, Manuel R, Nesheim ME: Purification and characterization of TAFI, a thrombin-activable fibrinolysis inhibitor. *J Biol Chem* **270**: 14477-14484, 1995.
- 2) Bajzar L, Fredenburgh JC, Nesheim M: The activated protein C-mediated enhancement of tissue-type plasminogen activator-induced fibrinolysis in a cell-free system. *J Biol Chem* **265**: 16948-16954, 1990.
- 3) de Fouw NJ, Haverkate F, Bertina RM: Protein C and fibrinolysis: a link between coagulation and fibrinolysis. *Adv Exp Med Biol* **281**: 235-243, 1990.
- 4) Eaton DL, Malloy BE, Tsai SP, Henzel W, Drayna D: Isolation, molecular cloning, and partial characterization of a novel carboxypeptidase B from human plasma. *J Biol Chem* **266**: 21833-21838, 1991.
- 5) Wang W, Hendriks DF, Scharpe SS: Carboxypeptidase U, a plasma carboxypeptidase with high affinity for plasminogen. *J Biol Chem* **269**: 15937-15944, 1994.
- 6) Boffa MB, Wang W, Bajzar L, Nesheim ME: Plasma and recombinant thrombin-activable fibrinolysis inhibitor (TAFI) and activated TAFI compared with respect to glycosylation, throm-

- bin/thrombomodulin-dependent activation, thermal stability, and enzymatic properties. *J Biol Chem* **273**: 2127-2135, 1998.
- 7) Bajzar L, Nesheim ME, Tracy PB: The profibrinolytic effect of activated protein C in clots formed from plasma is TAFI-dependent. *Blood* **88**: 2093-2100, 1996.
- 8) Nesheim M, Wang W, Boffa M, Nagashima M, Morser J, Bajzar L: Thrombin, thrombomodulin and TAFI in the molecular link between coagulation and fibrinolysis. *Thromb Haemost* **78**: 386-391, 1997.
- 9) Bajzar L, Nesheim M, Morser J, Tracy PB: Both cellular and soluble forms of thrombomodulin inhibit fibrinolysis by potentiating the activation of thrombin-activable fibrinolysis inhibitor. *J Biol Chem* **273**: 2792-2798, 1998.
- 10) Bajzar L, Morser J, Nesheim M: TAFI, or plasma procarboxypeptidase B, couples the coagulation and fibrinolytic cascades through the thrombin-thrombomodulin complex. *J Biol Chem* **271**: 16603-16608, 1996.
- 11) 坂田洋一: プラスミノゲン, 松田道生, 鈴木宏治, 編集, 止血・血栓・線溶. 東京, 中外医学社, 1994, 275-281.
- 12) Suzuki K, Kusumoto H, Deyashiki Y, Nishioka J, Maruyama I, Zushi M, Kawahara S, Honda G, Yamamoto S, Horiguchi S: Structure and expression of human thrombomodulin, a thrombin receptor on endothelium acting as a cofactor for protein C activation. *EMBO J* **6**: 1891-1897, 1987.
- 13) Wen D, Dittman WA, Ye RD, Deaven LL, Majerus PW, Sadler JE: Human thrombomodulin: complete cDNA sequence and chromosome localization of the gene. *Biochemistry* **26**: 4350-4357, 1987.
- 14) Zushi M, Gomi K, Yamamoto S, Maruyama I, Hayashi T, Suzuki K: The last three consecutive epidermal growth factor-like structures of human thrombomodulin comprise the minimum functional domain for protein C-activating cofactor activity and anticoagulant activity. *J Biol Chem* **264**: 10351-10353, 1989.
- 15) Kokame K, Zheng X, Sadler JE: Activation of thrombin-activable fibrinolysis inhibitor requires epidermal growth factor-like domain 3 of thrombomodulin and is inhibited competitively by protein C. *J Biol Chem* **273**: 12135-12139, 1998.
- 16) Bauer KA: Inherited and acquired hypercoagulable states, in Loscalzo J, Schafer AI (eds): *Thrombosis and hemorrhage*, Williams & Wilkins, Baltimore, 863-900, 1998.
- 17) Parkinson JF, Grinnell BW, Moore RE, Hoskins J, Vlahos CJ, Bang NU: Stable expression of a secretable deletion mutant of recombinant human thrombomodulin in mammalian cells. *J Biol Chem* **265**: 12602-12610, 1990.
- 18) Reitsma PH, Bernardi F, Doig RG, Gandrille S, Greengard JS, Ireland H, Krawczak M, Lind B, Long GL, Poort SR, Saito H, Sala N, Witt I, Cooper DN: Protein C deficiency: a database of mutations, 1995 update. On behalf of the Subcommittee on Plasma Coagulation Inhibitors of the Scientific and Standardization Committee of the ISTH. *Thromb Haemost* **73**: 876-889, 1995.