

LPS 感受性プロテアーゼ前駆体の 自己触媒的活性化における遷移状態を捕捉する

川畑俊一郎, 柴田 俊生

九州大学大学院理学研究院生物科学部門

Capturing the active transition state of an LPS-sensitive protease zymogen in autocatalytic activation

Shun-ichiro Kawabata, Toshio Shibata

Department of Biology, Faculty of Science, Kyushu University

Abstract

Hemolymph coagulation in horseshoe crabs is triggered by the autocatalytic activation of a lipopolysaccharide (LPS)-sensitive serine protease zymogen factor C through its transition state (factor C*). However, the existence of factor C* is only speculative, and it remains unknown whether the autocatalytic cleavage of the Phe⁷³⁷-Ile⁷³⁸ bond (the F737 site) of factor C* required for the conversion to an active form α -factor C occurs intramolecularly or intermolecularly. We show that the F737 site of a catalytic Ser⁹⁴¹-deficient mutant of factor C is cleaved by an F737 site-uncleavable mutant in the presence of LPS. These data clearly indicate the existence of factor C* without cleavage of the F737 site. We also found the following facts : (1) the autocatalytic cleavage at the F737 site of factor C* occurs intermolecularly on the LPS surface ; (2) factor C* does not exhibit intrinsic chymotryptic activity against the F737 site during the autocatalytic activation, and (3) LPS is required not only to complete the substrate-binding site and oxyanion hole of factor C* but also to allow the F737 site to be cleaved.

Endotoxin and Innate Immunity 22 : 58~62, 2019

Key words : horseshoe crab, lipopolysaccharide (LPS), serine protease zymogen, autocatalytic activation, transition state

はじめに

カブトガニは、古生代に繁栄した三葉虫亜門の系譜にはなく、クモ・サソリ・ダニなどを含む鋏角亜門 (Chelicerata) に属している。節足動物の化石群からなる北米のバージェス頁岩動物群 (約 5 億 500 万年前) には、三葉虫類とともにサンクタカリス (*Sanctacaris uncata*) やハベリア (*Habelia optata*) といった鋏角類がすでに出現している。現存種としては、日本に *Tachypleus tridentatus*、北アメリカ東岸に *Limulus polyphemus*、アジア東南海域沿岸には、*T. tridentatus* に加えて *T. gigas* と *Carcinoscorpius rotundicauda* が生息している。

カブトガニの免疫系における特徴は、グラム陰性菌の細胞壁成分であるリポ多糖 (Lipopolysaccharide : LPS) に対する高い感受性と、それに惹起される体液凝固反応にある。カブトガニ体液の顆粒細胞は、LPS に鋭敏に反

応して顆粒に貯蔵されている凝固因子を放出する¹⁾。凝固因子は、4つのセリンプロテアーゼ前駆体 (C 因子, G 因子, B 因子, 凝固酵素前駆体) と凝固タンパク質前駆体のコアギュロゲンから成り、限定分解による活性化の連鎖反応 (カスケード反応) を引き起こす (図 1)。C 因子は、N-末側ドメインのトリプレット配列 (-Arg³⁶-Trp³⁷-Arg³⁸-) を介して LPS に結合し²⁾、自己触媒的な限定分解により α -C 因子となり、 α -C 因子は B 因子を活性化型に変換する。活性化型 B 因子は、凝固酵素前駆体を凝固酵素に活性化し、コアギュロゲンは、凝固酵素によりコアギュリンに変換されてゲル化する。

また、C 因子は顆粒細胞の細胞膜に局在する LPS 受容体としても機能し、プロテアーゼ依存性の G タンパク質共役受容体を活性化すると推定される³⁾。一方、G 因子は、真菌や海藻の細胞壁成分である β -1,3-D-グルカン (BDG) と相互作用して自己触媒的に活性化し、B 因子

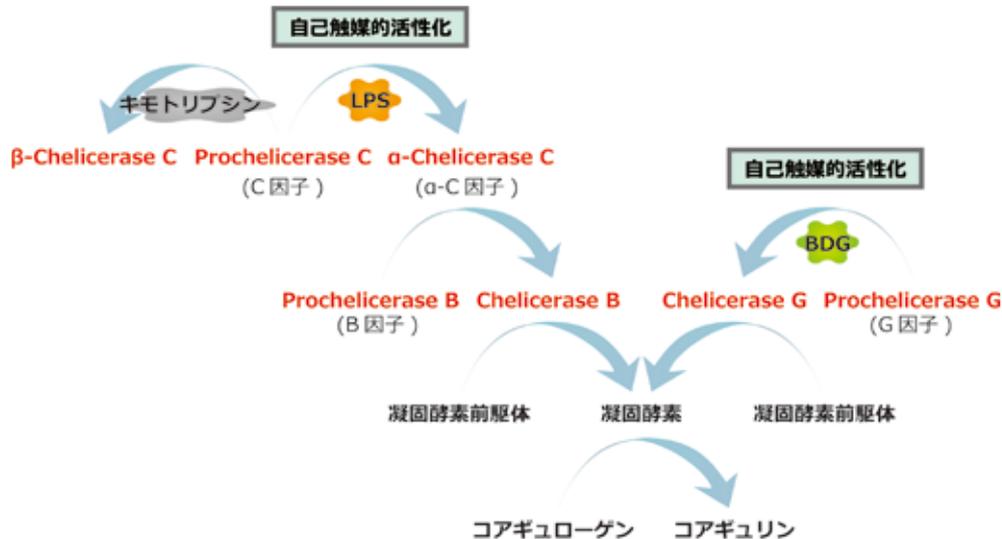


図 1 カプトガニ体液凝固のカスケード反応
新しい凝固因子の呼名を赤字で示した。

を介することなく凝固酵素前駆体を活性化する(図1)。なお、BDG やペプチドグリカンは、顆粒細胞を刺激して凝固因子を放出させることはない³⁾。

われわれは、1998年より大腸菌や酵母の系を用いて、組換え体C因子の調製法を模索したが、実用には至らなかった。Wangらは、ショウジョウバエS2細胞系を用いて、N-結合型糖鎖がC因子のフォールディングに不可欠であることを明らかにした⁴⁾。その後、われわれは、哺乳類細胞(HEK293S変異株)を用いて、一定サイズのN-結合型糖鎖(Man₅GlcNAc₂)を付加した組換えC因子を調製した。ところが、得られた組換えC因子は、天然のC因子と同等のLPS結合活性を示すものの、自己触媒的に活性化しなかった。アミノ酸配列分析の結果、N-末端Arg¹残基にベクター由来の3つのアミノ酸残基が付加していたため、Arg¹のアミノ末端側に本来のC因子のプロペプチドを挿入したところ、培養細胞中でプロペプチドが正常にプロセシングされ、天然C因子に匹敵する野生型C因子の調製に成功した⁵⁾。さらに、Arg¹が自己触媒的活性化に必須であること、Arg¹とLPS結合配列との距離が自己触媒的活性化に重要であることも判明した。

われわれは、C因子のLPS依存的な自己触媒的活性化機構を説明するために、『限定分解を受けていないが、活性型コンフォメーションを有する遷移状態(C*因子)]を仮定している。配列相同性から判断すると、 α -C因子は、基質の切断位置(P1部位)にArgやLys残基を好むトリプシン族に属し、事実、P1部位にArgを有する合成ペプチド基質を特異的に切断する。しかし、自己触媒的活性化を介したC因子から α -C因子への変換には、F737部位の限定分解が生じるため(図2)⁶⁾、『C*因子はF737部位を切断する内在的キモトリプシン様活性を有

する』という都合のよい仮定も必要であった。さらに、『C*因子のF737部位が分子内で切断されるのか、あるいはC*因子の分子間で切断されるのか』についても未解決の問題であった。これらの懸念を解決すべく、C因子の変異体を用いて詳細に検討した⁷⁾。

1. 限定分解を介したセリンプロテアーゼ前駆体の活性化機構

セリンプロテアーゼ前駆体の活性化機構は、トリプシンによるキモトリプシノーゲンの限定分解を介した活性化モデルにより説明される。すなわち、ウシキモトリプシノーゲンの-Arg¹⁵-Ile¹⁶-のペプチド結合がトリプシンにより限定分解されると、新たに生じたIle¹⁶-Val¹⁷-Asn¹⁸-Gly¹⁹-のペプチド配列が折れ曲がって、キモトリプシノーゲンの活性化ポケット(activation pocket)と呼ばれる疎水的な穴に潜り込み、Ile¹⁶の α -アミノ基と分子内部にあるAsp¹⁹⁴側鎖の β -カルボキシル基とがsalt bridge(塩橋)を形成する。そのことが触媒部位(His⁵⁷, Asp¹⁰², Ser¹⁹⁵のトライアド)周辺のコンフォメーション変化を誘導し、基質結合部位(ArgやLysの側鎖に対する結合部位)とオキシアニオンホール(基質・酵素複合体の四面体中間体を一時的に安定化する部位)を完成させる。つまり、セリンプロテアーゼ前駆体活性化の本質は、-Arg¹⁵-Ile¹⁶-の限定分解ではなく、分子内の塩橋形成が誘導するコンフォメーション変化である。したがって、限定分解されなくとも塩橋形成と同じ作用をするものがあれば、前駆体は活性型に変換されるはずである。

C因子はH鎖とL鎖から成る2本鎖からなる前駆体であり、L鎖にプロテアーゼドメインが含まれる(図2)。キモトリプシノーゲン活性化モデルに準じて、C因子の自己触媒的活性化を推定すると、LPSとの相互作用によ

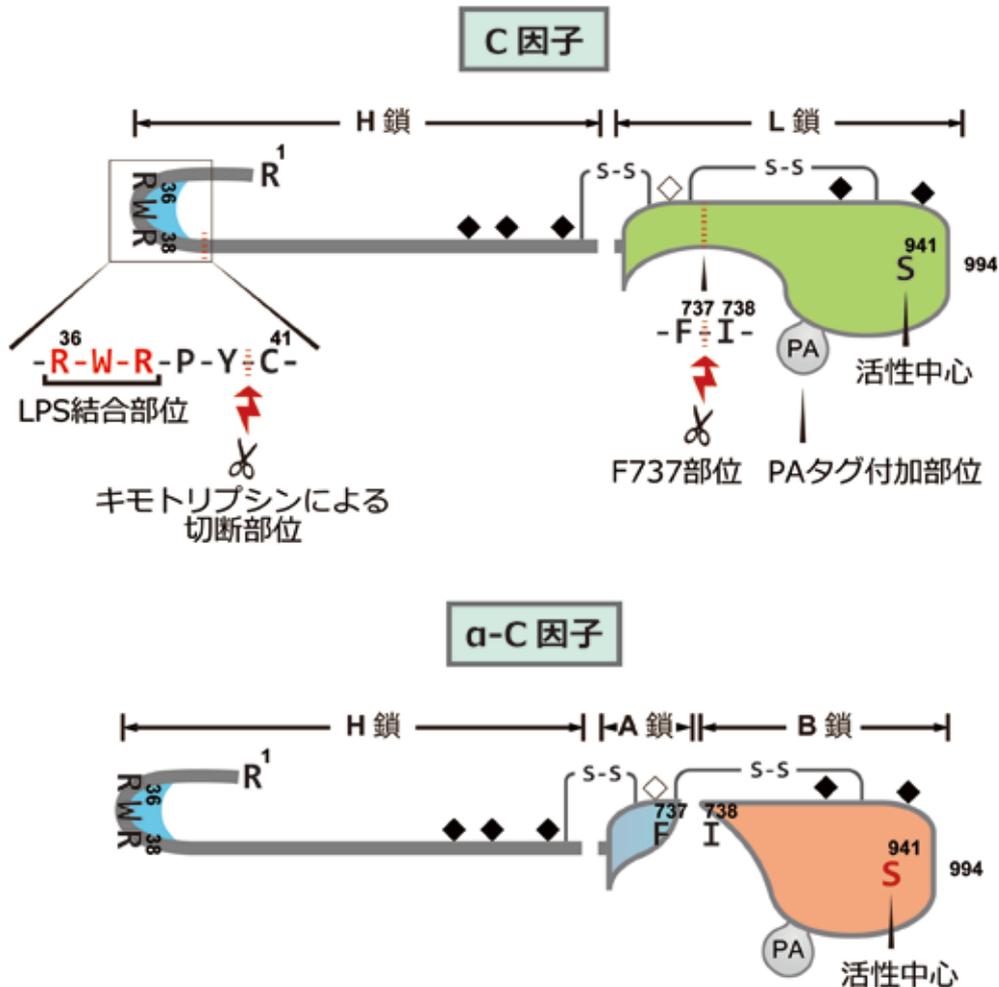


図 2 C 因子と α -C 因子のモデル図

C 因子は、N 末端側に局在するトリプレット配列 (-R³⁶-W³⁷-R³⁸-) を介して LPS に結合し、自己触媒的活性化反応により、-F⁷³⁷-I⁷³⁸- (F737 部位) が限定分解を受けて、活性型の α -C 因子に変換される⁵⁾。その際、L 鎖が切断されて A 鎖と B 鎖が生じる。なお、C 因子の F737 部位は、キモトリプシンでも切断されて、ペプチド基質に対してアミダーゼ活性を有する β -C 因子となる。しかし、 β -C 因子は、二次的に -Y⁴⁰-C⁴¹- の間もキモトリプシンにより切断されているため、B 因子を活性化することができない⁸⁾。

り遷移状態となった C* 因子は、分子内あるいは分子間で、-Arg¹⁵-Ile¹⁶- に相当する -Phe⁷³⁷-Ile⁷³⁸- (F737 部位) を自己触媒的に限定分解する。その結果、Ile⁷³⁸-Trp⁷³⁹-Asn⁷⁴⁰-Gly⁷⁴¹- のペプチド配列は折れ曲がって活性化ポケットに潜り込み、Ile⁷³⁸ の α -アミノ基が Asp¹⁹⁴ に相当する Asp⁹⁴⁰ の側鎖 β -カルボキシル基と塩橋を形成して、 α -C 因子へと変換される。実験的には、C 因子から α -C 因子への変換は、(1) F737 部位の切断に伴って L 鎖から B 鎖が遊離することを、B 鎖の抗体を用いてウェスタンブロットする、さらに (2) 合成ペプチド基質に対するアミダーゼ活性を測定することで確認している。

2. C* 因子の内在的キモトリプシン様活性を仮定する必要はない

セリンプロテアーゼの触媒残基 Ser¹⁹⁵ に相当する C 因

子の Ser⁹⁴¹ 残基を Ala に置換した S941A 変異体は、LPS 依存的な自己触媒的活性化を誘導しないことから、C* 因子においても Ser⁹⁴¹ が触媒部位として機能していることは明らかである。そこで、C* 因子の「内在性のキモトリプシン様活性」を確認する目的で、F737 部位の Phe⁷³⁷ を Ala (F737A 変異体)、あるいは Glu (F737E 変異体) に置換すると、予想に反して、F737A および F737E 変異体は、野生型と同様に LPS 依存的な自己触媒的活性化を引き起こした。つまり、C* 因子による F737 部位の限定分解の際には、P1 部位の Phe⁷³⁷ は基質認識に重要でないことを示している。

一方、Phe⁷³⁷ を Pro 残基に置換した F737P 変異体には、LPS 依存的な限定分解はみられなかった。Pro 残基は、 α -ヘリックスや β -シートといった二次構造を壊すアミノ酸であり、F737 部位周辺のコンフォメーション変化

による立体構造が、C*因子による限定分解に必須なのかもしれない。これらの実験結果から、自己触媒的なF737部位の限定分解には、C*因子の内在的キモトリプシン様活性を仮定する必要がないことが判明した。

3. C*因子の捕捉と分子間でのF737部位の限定分解

S941A変異体は触媒残基Ser⁹⁴¹を失っているが、F737部位は正常である。一方、F737P変異体のSer⁹⁴¹は正常であるが、F737部位は限定分解されない。2つの変異体をLPS存在下で混合した場合、F737P変異体が遷移状態(F737P*)をとり、分子間で限定分解が起こるとすれば、S941A変異体のF737部位が限定分解されるはずである。LPS存在下で、S941A:F737Pのモル比を50:1, 50:2, 50:5で混合して一定時間インキュベーションすると、F737Pの量に比例してS941A変異体のF737部位が切断され、遷移状態F737P*(C*因子)の存在を実証する結果となった。

C*因子による分子間での限定分解をさらに確認するために、C因子に標識タグをつける必要があった。しかし、C因子のN末端やC末端にHis-タグを導入すると、LPS親和性には影響を与えないが、自己触媒的活性化が阻害された。ところが、PA-タグ(ポドプラミンに由来する10残基のペプチド)をC因子のB鎖内部に導入したPA-C因子(図2)は、LPS存在下で活性化した。PA-タグは、そのリング状構造から、導入したタンパク質に対して機能障害を与えにくいとされる。そこで、S941A変異体のB鎖にPA-タグを導入したPA-S941A変異体を作成した。LPS存在下でPA-S941A変異体とF737P変異体を1:1で混合すると、F737P*によりPA-S941A変異体のF737部位が限定分解され、B鎖の遊離がPA-タグ抗体で確認された。以上の結果から、C*因子は、分子間でF737部位を限定分解できることが証明された。なお、F737P*は本来F737部位が切断されない変異体であり、C*因子が「分子内でF737部位を切断しない」という直接的な証明にはなっていない。

4. C*因子同士の分子間反応にはLPSという足場が必要である

C因子のLPS結合モチーフ(-Arg³⁶-Trp³⁷-Arg³⁸-)の2つのArg残基をGlu残基に置換したRE-C因子は、LPS結合活性を失い、LPS依存的な自己触媒的活性化を誘導しない³⁾。そこで、LPS結合活性を欠失させたRE-S941A変異体を作成した。LPS存在下で、RE-S941A変異体とF737P変異体を1:1で混合したが、RE-S941A変異体のF737部位は限定分解されなかった。このことは、C*因子で分子間のF737部位を限定分解するには、基質側のC因子もLPSに結合しておく必要があることを示唆している。基質側のC因子がLPSと結合することで、

F737部位が限定分解を受けやすいコンフォメーションへと変換されるのであろう。

5. カプトガニ凝固因子の改名

最近、B因子もLPS結合タンパク質であることが判明した⁸⁾。一方、カプトガニ血漿中には、補体C3因子、補体B因子、補体系レクチンが存在している^{9,10)}。興味深いことに、C因子は補体C3因子と複合体を形成し、補体活性化の初期過程で重要な働きをしている¹¹⁾。さらに、ダニのC因子ホモログが発見され、補体系に関与している¹²⁾。このように、カプトガニ凝固因子と補体系因子の名前と機能に重複がみられるため、カプトガニ凝固因子を改名した⁷⁾。銚角重門の分類名にちなんで、C、B、G因子は、それぞれProchelicrase C、Prochelicrase B、Prochelicrase Gとし、活性型はProを除いたものとした(図1)。また、Prochelicrase Cに対しては、自己触媒的に活性化したものは α -chelicrase C、キモトリプシンにより活性化されたものは β -chelicrase Cとした。なお、 β -chelicrase Cは、合成ペプチド基質に対しては α -chelicrase Cと同等のアミダーゼ活性を示すが、LPS結合モチーフ近辺の-Tyr⁴⁰-Cys⁴¹-のペプチド結合がキモトリプシンにより切断されてLPS結合性を失っており、B因子(Prochelicrase B)を活性化しない(図2)⁸⁾。

おわりに

C因子変異体を用いた研究により、遷移状態のC*因子の存在を示せたことは大きな成果であった(図3)。加えて、以下のC*因子の特徴が解明された。(1)自己触媒的なF737部位の限定分解は、C*因子同士の分子間反応である。(2)F737部位の限定分解に対して、C*因子の内在的キモトリプシン様活性を仮定する必要はない。(3)LPSの結合は、C*因子の基質結合部位やオキシアニオンホールを完成させるだけでなく、F737部位周辺のコンフォメーション変化を誘導する。今後は、すべての凝固因子の組換えタンパク質を調製して、凝固カスケードの分子機構を詳細に解析していく必要がある。

文献

- 1) Kawabata S, Muta T : Sadaaki Iwanaga : Discovery of the lipopolysaccharide- and β -1,3-D-glucan-mediated proteolytic cascade and unique proteins in invertebrate immunity. J Biochem 147 : 611-618, 2010
- 2) Koshiba T, Hashii T, Kawabata S : A structural perspective on the interaction between lipopolysaccharide and Factor C, a receptor involved in recognition of Gram-negative bacteria. J Biol Chem 282 : 3962-3967, 2007
- 3) Ariki S, Koori K, Osaki T, et al. : A serine protease

