◆トピックス◆

FXase 複合体における第 VIII 因子と活性化第 IX 因子間の相互作用に関する新たな知見

添田 哲弘*, 野上 恵嗣*

添田 哲弘

Interaction between factor VIII and factor IXa in the FXase complex

Tetsuhiro SOEDA*, Keiji NOGAMI*

2002 年 九州大学大学院薬学府修士課程修了
同 年 中外製薬株式会社入社
2006 年 奈良県立医科大学小児科
現在に至る

Key words: factor VIII, factor IXa, hemophilia A

はじめに

内因系血液凝固第 VIII 因子 (FVIII) はリン脂質膜上で活性化第 IX 因子 (FIXa) と FXase 複合体を形成し, 第 X 因子 (FX) 活性化を約 10^6 倍促進する. 従って, FVIII の欠乏/欠損症として知られる血友病 A では FXase 複合体活性が低下し, 安定したフィブリン形成に必要なトロンビン産生が障害されるために重大な出血症状をきたす. FXase 複合体における FVIII 機能を解析することは, FVIII 分子機能ならびに血友病 A の病態解明において極めて重要である. そこで, 本トピックスでは FXase 複合体における FVIII の機能に関して, 最近筆者らが明らかにした FIXa に対する FVIII の結合メカニズムを中心に紹介する.

FVIII の構造

FVIII は 2332 個のアミノ酸からなる一本鎖糖タンパクで, 約 9kb の FVIII cDNA によりコードされている. FVIII はアミノ酸組成の相同性から A, B, C の 3 ドメインからなり, A1-A2-B-A3-C1-C2 の順に配列している. 循環血漿中では, 成熟 FVIII は A1-A2-B ドメインの重鎖 (90-210 kDa) と, A3-C1-C2 ドメインの軽鎖 (80kDa)

が heterodimer として存在している. 最近 Shen らは結晶解析により, A1-A2/A3-C1-C2 ドメイン dimer form の立体構造を明らかにした¹⁾. A ドメインの構造はすでに Pemberton ら²⁾ が報告した A ドメインと相同性のあるセルロプラスミンを鋳型として推定した 3 次元モデルと類似していた. C1 は非常に tight に A3 と, 一方 C2 は極めて loose に A3 および C1 と結合し, FVIII が flexible に動きうることを示した. また, C2 内の底面からのびるスパイク様ループの疎水性残基 (Met²¹⁹⁹/Phe²²⁰⁰, Val²²²³, Leu²²⁵¹/Leu²²⁵²) はリン脂質膜結合部位とされており, さらに 4 つの塩基性残基 (Arg²²¹⁵, Arg²²²⁰, Lys²²²⁷, Lys²²⁴⁹) は負に帯電したリン脂質と静電相互作用により, リン脂質との結合の安定化に寄与している³⁾.

FXase における FIXa と FVIII の相互作用

トロンビンや活性型 FX (FXa) により活性化された FVIII (FVIIIa) は FIXa の補因子として作用し, 重鎖 A2 内の残基 484-493, 558-565 と 708-715, 軽鎖 A3 内の残基 1811-1818 に広がる surface 上で FIXa と結合するとされる⁴⁾. 特に, 558-565 領域は FIXa のプロテアーゼドメイン内 330 ヘリックスに結合し, 一方 1811-1818 領

*奈良県立医科大学小児科 [〒 634-8522 奈良県橿原市四条町 840]

Department of Pediatrics, Nara Medical University [840 Shijo-cho, Kashihara, Nara 634-8522, Japan]

Tel : 0744-29-8881 Fax : 0744-24-9222 e-mail : soeda@naramed-u.ac.jp

域は FIXa 軽鎖 EGF ドメインと結合する。FIXa は FVIII 軽鎖と強い結合親和性 ($K_d \sim 15\text{nM}$) をもって FXase 複合体形成の中心として作用する。一方、親和性の極めて弱い A2 は ($K_d \sim 300\text{nM}$)、FIXa の活性中心構造の変化をもたらし、FXase 複合体の活性発現に重要な役割を果たしている。

FIXa と FVIII 軽鎖 C2 の相互作用

Blostein らは⁵⁾、FVIII 軽鎖が FIXa Gla ドメインと結合することを報告していたが、FVIII 軽鎖内の結合領域は不明であった。そこで我々は、軽鎖 C2 が FIXa Gla ドメインと同様リン脂質結合ドメインであること、また立体構造的に近い位置にあることに着目し、両者の相互作用について検討した⁶⁾。ELISA にて、固相化した rC2 に対し FIXa は直接結合した (図 1A)。また表面プラズモン共鳴法 (BIAcoreTM) により、sensor chip に固相化した FIXa に対する rC2 との K_d は 107nM であった。この結合反応は、キモトリプシンにより Gla ドメインを除去した FIXa では認められず (図 1A)、抗 FIX (a) Gla ドメイン抗体により抑制された (図 1B) ことから、FIXa Gla ドメインに対する FVIII 軽鎖の結合領域は C2 であることがわかった。さらに V8 プロテアーゼ処理後精製した rC2 フラグメントや合成 C2 ペプチドを用いた結合競合実験により、C2 上の FIXa 結合部位は残基 2228-2240 であることも明らかになった。本領域は、C2 内のリン脂質膜との結合に重要な残基と近接していたが、overlap していなかった (図 2)。残基 2228-2240 の合成ペプチドはリン脂質存在下での FIXa/FVIIIa による FX 活性化を濃度依存的に 95% まで抑制したことから (図 3)、本領域が FXase 複合体活性発現に重要な役割を果たしていることが示唆された。

また、最近我々らは⁷⁾、残基 2228-2240 の C2 ペプチドが内因系の関与する propagation phase において強い抑制作用を示したことから、抗血栓薬となりうることを報告した。このように FXase 複合体における FVIII の機能解析は新規抗血栓薬の開発においても役立つものと期待される。

図1 FIXaとFVIII軽鎖C2の結合実験 文献6)より引用、改変
(A) ELISAにて、固相化したrC2に対するEGR-FIXa (○)またはEGR-GDless FIXa (●) (Glu-Gly-Arg-chloromethylketoneにより活性化部位を不活化したFIXaまたはGDless FIXa)の結合量を吸光度にて評価した結果を示す。
(B) rC2とEGR-FIXaの結合に対する抗FIX(a)Glaドメイン抗体(○)とコントロール抗体(●)の阻害効果を評価した結果を示す。

異常FVIIIによるFXase活性低下と血友病Aの病態との関連性

血友病Aにおいて、遺伝子解析により同定された遺伝子異常、またはFVIIIインヒビターによる機能低下のメカニズムを解明する上でも、FXase複体内でのFVIIIの相互作用の情報は非常に重要である。Jenkinsらは⁸⁾、A2 556-565領域内、Ser558Phe, Val559Ala, Asp560Ala,

図2 FIXaに対するFVIII C2内の結合部位 C2内のリン脂質との結合に重要な疎水性残基 Met²¹⁹⁹/Phe²²⁰⁰, Val²²²³, Leu²²⁵¹/Leu²²⁵², 結合の安定化に寄与する塩基性残基 Arg²²¹⁵, Arg²²²⁰, Lys²²²⁷, Lys²²⁴⁹, とFIXaに対するC2内の結合部位残基 Glu²²²⁸-Val²²⁴⁰, それぞれの位置をC2の立体構造 (PDB ID: 1D7P) を基にモデリングした図を示す。

Gln565Argの変異FVIIIは、FIXaに対する親和性は保たれるが、FIXaに対する活性中心構造変化が障害 (k_{cat} が低下) されることにより、その補因子活性を低下させることを報告している。血友病Aの遺伝子異常に関するデータベース (HAMSTeRS) によると、筆者らが同定したC2内FIXa結合領域、残基2228-2240、に変異症例が登録されており、本領域もFXase活性に重要であることが推察される。

おわりに

FXase複合体活性におけるFVIIIの機能に関する研究は着実に成果を出しつつある。これらの知見は、FVIII分子機能及び血友病Aの病態解明のみならず、抗血栓薬開発への応用にも役立つものと期待される。FVIIIの補因子機能については未だ解明されていないことも多く、今後の研究成果が待たれる。

謝 辞

本研究にあたり、多大なる御助言、御指導をいただきました同教室教授 嶋緑倫先生に深謝いたします。

図3 FIXa/FVIIIaによるFX活性化に対する合成C2ペプチドの効果 (文献6) より引用, 改変
FIXaに、残基2228-2240のC2ペプチド0 μM (○), 2.5 μM (●), 5 μM (□), 10 μM (■), 15 μM (△) を添加後、FVIIIaおよびFX添加し、反応を開始後、生成したFXa量をFXa発色基質S-2222にて検出した結果を示す。

Disclosure of Conflict of Interests

The authors indicated no potential conflict of interest.

文 献

- Shen BW, Spiegel PC, Chang CH, Huh JW, Lee JS, Kim J, Kim YH, Stoddard BL : The tertiary structure and domain organization of coagulation factor VIII. *Blood* **111** : 1240-1247, 2008.
- Pemberton S, Lindley P, Zaitsev V, Card G, Tuddenham EG, Kemball-Cook G : A molecular model for the triplicated A domains of human factor VIII based on the crystal structure of human ceruloplasmin. *Blood* **89** : 2413-2421, 1997.
- Pratt KP, Shen BW, Takeshima K, Davie EW, Fujikawa K, Stoddard BL : Structure of the C2 domain of human factor VIII at 1.5 Å resolution. *Nature* **402** : 439-442, 1999.
- Fay PJ : Activation of factor VIII and mechanisms of cofactor action. *Blood Rev* **18** : 1-15, 2004.
- Blostein MD, Furie BC, Rajotte I, Furie B : The Gla Domain of Factor IXa Binds to Factor VIIIa in the Tenase Complex : *J Biol Chem* **278** : 31297-31302, 2003.
- Soeda T, Nogami K, Nishiya K, Takeyama M, Ogiwara K, Sakata Y, Yoshioka A, Shima M : The factor VIIIa C2 domain (residues 2228-2240) interacts with the factor IXa Gla domain in the factor Xase complex : *J Biol Chem* **284** : 3379-3388, 2009.
- 添田哲弘, 野上恵嗣, 嶋緑倫 : 活性型第IX因子と第VIII因子軽鎖C2ドメイン間特異的阻害ペプチドの抗血栓作用. *日本血栓止血学会雑誌* **19** : 652, 2008.
- Jenkins PV, Freas J, Schmidt KM, Zhou Q, Fay PJ : Mutations associated with hemophilia A in the 558-565 loop of the factor VIIIa A2 subunit alter the catalytic activity of the factor Xase complex. *Blood* **100** : 501-508, 2002.