◆総説◆

先天性 protein S 欠損症の分子生物学的解析

山 崎 鶴 夫*

Molecular Biological Analysis of Hereditary Protein S Deficiency

Tomio YAMAZAKI*

Key words: protein S, hereditary protein S deficiency, genetic characterization, mutation

1. はじめに

先天性 protein S 欠損症と血拴傾向との関連が注目され始めたのは 1980 年代半ばのことである¹⁾²⁾。その後 protein S の生理的機能の解析とともに, protein S 欠損症の病態生理についてもさまざまな研究が進められてきた。最近では血友病 B や先天性 protein C 欠損症の場合と同様に, 先天性 protein S 欠損症の病態解析においても遺伝子解析がその中心となっている。ここでは既報の遺伝子解析の結果をまとめるとともに, protein S 欠損症に至る分子生物学的メカニズムについて考察する。

2. protein S の抗凝固作用

protein S は複数の凝固因子と相互作用し, それぞれ異なったメカニズムで血液の凝固反応を制御している。protein S は activated protein C が factor Va および factor VIIIa を蛋白分解により不活性化する (PC pathway) 際に不可欠な cofactor として機能する³⁾。また, protein S は単独で factor Va および factor Xa と相互作用して prothrombinase complex の機能を阻害し, thrombin の産生を抑制する⁴⁾⁵⁾。さらに, protein S は factor VIII と結合することによ

り, factor IXa による factor X の活性化を阻害する作用をもつ⁶⁾。

protein S は血漿中で補体系蛋白である C4b binding protein (C4BP) の β chain と結合し 1:1 の複合体を形成する。両者の結合親和性は非常に高く ($K_d=10^{-10}$ M)³⁾⁷⁾、血漿中に存在する C4BP の β chain のほとんどすべてが protein S で常に飽和された状態にある⁸⁾。C4BP と複合体を形成する protein S の割合は、血漿中の protein S と C4BP の量的バランスによって決定され⁹⁾、正常人の血漿中では protein S の約 60% が C4BP の β chain に吸着され、残りの約 40% が遊離蛋白として存在する³⁾。protein C pathway においては、遊離型 protein S のみが activated protein C に対する cofactor 活性をもち、複合体型は activated protein C と相互作用できない⁹⁾。よって遊離型 protein S をある一定値以上に維持することが生体にとって重要となる。例えば炎症などにおいて補体系が活性化されると C4BP が増加するが、このとき反応性に合成される C4BP は β chain を持たず, protein S と結合しないため free protein S はほぼ一定に保たれる¹⁰⁾。

* 名古屋大学医学部第一内科 [〒466 名古屋市昭和区鶴舞町 65, (現在) 山形大学医学部分子病理学 〒990-23 山形市飯田西 2-2-2]: First Department of Internal Medicine, Nagoya University School of Medicine 65 Tsurumai-cho, Showa-ku, Nagoya, 466, Japan

表 1 先天性 protein S (PS) 欠損症の分類

	総 PS 抗原	複合体型 PS 抗原	遊離型 PS 抗原	cofactor 活性
I 型	低下	正常～低下	低下	低下
II 型	正常	正常	正常	低下
III 型	正常	正常～増加	低下	低下

図 1 protein S の二次元電気泳動
 正常者 (A) では複合体型 protein S と遊離型 protein S のふたつのピークを認める。先天性 I 型 protein S 欠損症のヘテロ接合体の患者 (B) では、血漿中に残存する protein S (正常の約 50% に低下) のほとんどが C4BP に吸着されてしまうため、遊離型 protein S のピークが著明に減少している。

3. 先天性 protein S 欠損症の遺伝子解析の現状

血友病 B および先天性 protein C 欠損症の遺伝子解析は数年前より盛んに行われており、現在までに数百例の mutation が報告されている¹¹⁾¹²⁾。これに対し、先天性 protein S 欠損症の遺伝子解析に関する報告は比較的少なく、現在までに約 60 例の mutation が報告されているに過ぎない^{13~27)}。先天性 protein S 欠損症の患者は先天性 protein C 欠損症の患者とほぼ同じ頻度で存在するにもかかわらず、その遺伝子解

析があまり進まなかった理由は、protein S 遺伝子の解析にはより多くの労力を必要とするからである。protein C 遺伝子および factor IX 遺伝子がそれぞれ 9 および 8 個の exon からなるのに対し、protein S 遺伝子は 15 個の exon をもち、遺伝子全体のサイズもはるかに大きい²⁸⁾。さらに、protein S 遺伝子 (protein S α 遺伝子) には非常に相同性の高い pseudogene (protein S β 遺伝子) が存在するため²⁸⁾、遺伝子解析では protein S β 遺伝子を避け、protein S α 遺伝子のみを選択的に解析する必要がある。これらふたつの障害のため先天性 protein S 欠損症の遺伝子解析は敬遠されがちであったが、最近になり少しずつ報告が増える傾向にあり、現在フランスのグループを中心に mutation の database の編集が進められている。

4. 先天性 protein S 欠損症の分類

国際血栓止血学会 (ISTH) の標準化委員会 (SSC) は、先天性 protein S 欠損症を 3 つの型に分類することを提唱している (表 1)。先天性 protein S 欠損症の患者の大多数が属する I 型は量的 (古典的) 欠損症であり、血漿中の総 protein S 抗原、遊離型 protein S 抗原および cofactor 活性のすべてが低下する。I 型欠損症の患者では C4BP 抗原は正常に保たれているため、C4BP の β chain が吸着し得る protein S の絶対量は変化しない。よって、総 protein S 抗原の減少は遊離型 protein S 抗原の選択的な減少となって現れる (図 1)。ISTH の SSC では、先天性凝固因子欠損症において抗原と活性が平行して低下するものを一般に I 型欠損症と定義しているが、I 型 protein S 欠損症では総 protein S 抗原の減少に比べて cofactor 活性 (=遊離型 protein S 抗原) の低下が著しく、抗原と活性の低下は平行しない。

II 型は protein S 分子の質的異常により生じ

る機能異常症であり、血漿中の総 protein S 抗原および遊離型 protein S 抗原は正常であるが、cofactor 活性のみが低値を示す。

III 型では血漿中の総 protein S 抗原は正常であるにもかかわらず、cofactor 活性をもつ遊離型 protein S 抗原のみが減少する。これは先天性 protein S 欠損症に特徴的な型であり、そのメカニズムについて2つの異なる仮説が提唱されており、III 型欠損症の病態は heterogeneous であると考えられている(後述)。近い将来 III 型欠損症の診断基準の見直しまたは細分類が行われる可能性がある。

5. I 型 protein S 欠損症のメカニズム

1989 年にオランダのグループが、遺伝子の large deletion が原因と考えられる I 型 protein S 欠損症の患者を初めて報告した¹³⁾。その後、筆者らおよびヨーロッパのグループを中心に I 型 protein S 欠損症の遺伝子解析が行われ、missense mutation, nonsense mutation, frameshift mutation および splice site mutation がそれぞれ複数発見されている^{15)17)~27)}。これらの

mutation は非常に heterogeneity が強く、protein S 遺伝子全体に普遍的に存在し、ある特定の領域に集中する傾向は見られない。これは血友病 B や先天性 protein C 欠損症の I 型にも共通する特徴である¹¹⁾¹²⁾。

nonsense mutation および frameshift mutation は premature termination を生じ、mutant mRNA の発現を減少させる²⁹⁾。また splice site mutation も mRNA の正常な splicing を障害し、alternative splicing を誘導するとともに mutant mRNA の発現を減少させる³⁰⁾。これらの mutation では mRNA の段階において量的欠損を生じるため、結果として蛋白合成の量的低下をきたし、患者は I 型欠損症を生じると考えられる。

これに対し missense mutation が I 型欠損症を生じるメカニズムは、蛋白合成以降の過程における障害によるものと考えられる。現在まで I 型 protein S 欠損症の患者において発見された missense mutation のほとんどは、哺乳類の protein S またはそれらに類似した蛋白群においてよく保存されたアミノ酸の置換によるもの

Human PS	460	S S A E G W H V N V T L N I R P S T G T G V M L A L V S G N	489
Bovine PS	460	S N P E A W Q I N V S L N I R P S A G T G V M L A L V S D N	489
Mouse PS	460	T N A E G W Q M N V T L N I R P S T G T G V M L A L V S G G	489
Rabbit PS	460	S Y V E D W Q V N V T L N I R P S T G T G V M L T L V S G N	489
Porcine PS	460	S S A G A W Q V N V S L N I R P S A G T G V M L A L V S G N	489
Monkey PS	460	S N A E G W H I N V T L N I R P S T G T G V M L A L V S S N	489
Human SHBG	414	P H A E P W A F S L D L G L K Q A A G S G H L L A L G T - -	241
Rat ABP	444	P H T D P W T F S L E L G F K L V D G A G R L L T L G T - -	271
Human Gas6	501	G T E S T W E V E V V A H I R P A A D T G V L F A L W A P D	530
Mouse Gas6	498	G T E T T W E V K V V A R I R P A T D T G V L L A L - V G D	526
Human Laminin	512	G Y K V Q S D V N I T L E F R T S S Q N G V L L G I S T A K	541
Human Merosin	975	G F K V G L D L L V E F E F R T T T T G V L L G I S S Q K	1004

図 2 哺乳類の protein S およびその関連蛋白におけるアミノ酸配列の比較

哺乳類の protein S の 474 位およびそれに対応するアミノ酸残基(網かけで示す)においては、Arg または Lys の形で塩基性アミノ酸が保存されている。またその前後の領域も非常に高い相同性を示し、これらの蛋白の構造上重要な役割を果たしている可能性が示唆された。(文献 25 より引用)

図3 expression vector の構築

recombinant PCR 法を用いて codon 474 に mutation を導入し, Arg 474 (CGT) を Cys (TGT), Ala (GCT), Glu (GAA) および Lys (AAA) に置換した variant protein S に対する expression vector を構築した。

Protein S in the culture media

図4 COS-1 細胞を用いた recombinant protein S の transient expression
wild-type protein S および variant protein S に対する expression vector を COS-1 細胞に導入し, 培養上清中に分泌された protein S 抗原量を ELISA にて測定した。wild-type protein S の分泌量を 100% とした値 ±SD を示す。(文献 25 より改変)

であり, それらのアミノ酸は protein S の構造上重要な役割を果たしていると推察される。

筆者らは先天性 I 型 protein S 欠損症の患者において遺伝子解析を行い, exon 13 に Arg474 (CGT) → Cys (TGT) の missense mutation を発見した²⁾²⁵⁾。この 474 位のアミノ酸は, 哺乳類の protein S およびそれらに類似した蛋白群において, Arg または Lys の形で正電荷をもつ塩基性アミノ酸が保存されており (図 2)^{31~40)}, 474 位における塩基性アミノ酸は protein S の構造上重要な役割を果たしている可能性が示唆された。この仮説を確かめるため, 474 位の Arg を患者において発見された Cys の他に, 中性アミノ酸である Ala, 酸性アミノ酸である Glu および塩基性アミノ酸である Lys に置換した recombinant protein S を用いて expression study を行った (図 3)。COS-1 細胞を用いた transient expression では, Lys-type は wild-type (Arg-type) とほぼ同等の分泌量を示したが, Cys-type, Ala-type および Glu-type の分泌量は著しく低下していた (図 4)。この結果より, 474 位におけるアミノ酸の置換は protein S の分泌に大きな影響を与え, かつ 474 位の塩基性アミノ酸の消失は protein S の分泌量を著しく

低下させることが示された。よって, Arg474 (CGT)→Cys (TGT) の missense mutation がこの患者における先天性 I 型 protein S 欠損症の原因であると結論された。

6. II 型 protein S 欠損症のメカニズム

現在までに II 型 protein S 欠損症の患者において報告された mutation はすべて missense mutation である¹⁶⁾¹⁹⁾²²⁾。これらは protein S の機能上重要な領域におけるアミノ酸の置換であり, 他の凝固因子やリン脂質との相互作用を障害するものと考えられる。

林らは先天性 II 型 protein S 欠損症 Protein S Tokushima の家系において遺伝子解析を行い, protein S の機能上重要とされる第 2 EGF 領域に Lys155 (AAG)→Glu (GAG) の missense mutation を発見した¹⁶⁾。林らは recombinant Protein S Tokushima を用いて詳細な機能解析を行い, recombinant Protein S Tokushima は activated protein C, factor Va および factor Xa との相互作用に障害があるために抗凝固機能が低下していることを報告している⁴¹⁾。

筆者らは Protein S Tokushima とは別の protein S 欠損症の家系において遺伝子解析を行い, Protein S Tokushima と同じ Lys155 (AAG)→Glu (GAG) の missense mutation を発見した⁴²⁾。健康な日本人 182 人より得た DNA sample を用いて, この missense mutation の有無を調べたところ 182 人中 3 人がこの mutation に対して heterozygote であり, 日本人の遺伝子の 0.82% (3 alleles/364 alleles) に存在する稀な polymorphism であることを見出し, point mutation の塩基番号をもとに PS732 と命名した。

Lys155→Glu のアミノ酸置換が protein S の抗凝固機能を障害し, かつ日本人の約 60 人にひとりが heterozygote であることを考えると, 日本人における先天性血拴傾向のうちのかなりの数が Protein S Tokushima or PS732 によるものと推察され, 今後も詳細な解析が必要と思われる。

7. III 型 protein S 欠損症のメカニズム

III 型 protein S 欠損症は総 protein S 抗原が正常範囲内であるにもかかわらず遊離型 protein S 抗原が低値を示す型と定義されている。現在 III 型 protein S 欠損症を生じるメカニズムに関して以下の 2 つの仮説が提唱されており, III 型 protein S 欠損症は heterogeneous な病態であると考えられる。

1991 年オランダのグループによって報告された Protein S Heerlen は⁴³⁾, Ser460 (TCC)→Pro (CCC) の missense mutation のために糖鎖結合部位のひとつを失った variant protein S であるが, 正常な cofactor 活性をもち, オランダ人の 0.52% に存在する稀な polymorphism であると考えられていた。ところが, 1995 年フランスのグループが 85 人の protein S 欠損症の患者において遺伝子解析を行ったところ, III 型欠損症と診断された 16 人 (18.8%) に Protein S Heerlen の存在を見出した⁴⁴⁾。患者の血漿より抽出した Protein S Heerlen は, 正常 protein S と比較して C4BP に対する結合能が増加しており, 血漿中で C4BP と複合体を形成する protein S が増加するため相対的に遊離型 protein S が減少し, 結果として患者は III 型 protein S 欠損症を生じると説明している。

これに対しスウェーデンのグループは, ある先天性 protein S 欠損症の家系内において I 型欠損症を呈する者と III 型欠損症を呈する者が混在する症例を示し, I 型と III 型は単なる表現型上の差に過ぎず, 同一の mutation から生じ得るものと考えた⁴⁵⁾。つまり量的 (I 型) protein S 欠損症の heterozygote の患者では, 時に総 protein S 抗原が正常範囲下限を示すことがあり, この場合 ISTH の SSC の基準では III 型欠損症と診断されてしまう。現在までに III 型 protein S 欠損症と診断されたほとんどの症例において総 protein S 抗原は正常範囲下限を示し, protein S の量的な減少が III 型 protein S 欠損症の大多数を占めることを示唆している。

8. mRNA 解析の重要性

factor IX や protein C は肝細胞以外の臓器

ではほとんど産生されておらず、mRNAを抽出して解析することは基本的に困難である。これに対し protein S は肝細胞以外にも骨髓巨核球で高い発現が認められ、末梢血血小板から

mRNA を安定して抽出することができる。これは先天性 protein S 欠損症の解析において最大の武器であると言っても過言ではない⁴⁶⁾。protein S β 遺伝子は mRNA へ転写されないため、mRNA を用いた解析では protein S α 遺伝子を選択的に解析することが可能である。また、DNA レベルで発見された mutation が mRNA レベルでどのような影響を与えるのかを解析することは、protein S 欠損症を生じるメカニズムを考える上で非常に重要なポイントとなる^{15)21)~23)25)~27)}。

筆者らは先天性 I 型 protein S 欠損症の患者において遺伝子解析を行い、DNA レベルで exon 4 に Ser62 (TCA)→Stop (TGA) の nonsense mutation を発見した²⁶⁾。この mutation を mRNA レベルで解析したところ、mutant mRNA では exon 4 が skipping しており、かつその発現量は normal mRNA に比べて激減していた (図 5)。exon 4 の skipping は 87 塩基の in-frame deletion を生じ、29 個のアミノ酸が deletion すると考えられた (図 6)。DNA レベルの解析のみでは、nonsense mutation によって truncated mutant protein S が作られることが I 型 protein S 欠損症の原因であると考えがちである。ところが、実際には nonsense mutation が mutant mRNA におい

図 5 protein S mRNA の解析
protein S mRNA の exon 1 から exon 6 を含む領域を RT-PCR 法を用いて増幅した。正常者では予想されたサイズのパンドのみが得られたが、患者 (exon 4 における nonsense mutation に対して heterozygote) では予想されたサイズのパンドに加えて、サイズの小さいパンドがわずかに認められた。(文献 26 より引用)

図 6 mutant mRNA における exon skipping
予想されたサイズの PCR 産物はすべて正常な sequence を示したが、サイズの小さい PCR 産物では exon 4 全体が skipping していた。exon 4 の skipping により 87 塩基の in-frame deletion を生じ、27 個のアミノ酸を deletion した mutant protein S が産生されると考えられた。(文献 26 より引用)

て exon skipping を誘導し⁴⁷⁾, alternative splicing のため mRNA の発現量が低下すること, さらに 29 個のアミノ酸が deletion した mutant protein S が合成されることの 2 点が, この患者における I 型 protein S 欠損症の原因であると考えられた。これは遺伝子解析において mRNA の解析がいかに重要であることを示唆する症例であると思われる。

9. 今後の展望

先天性 protein S 欠損症の遺伝子解析において, exon 1 から exon 15 まですべての領域を解析したにもかかわらず, protein S 欠損症の原因となる mutation が発見できない症例がしばしば経験され, そのほとんどは I 型または III 型欠損症である。これは先天性 protein S 欠損症に特有な現象ではなく, 先天性 protein C 欠損症の遺伝子解析においても見られる普遍的なものである。しかし, オランダのグループは, 先天性 protein C 欠損症では症例の 90% 以上で mutation が発見されたが, 先天性 protein S 欠損症では症例の 60% 強にしか mutation が発見されなかったと報告している¹⁵⁾。protein S 遺伝子の promotor を含む上流領域の構造は未だ明らかになっておらず, 未知の exon が存在するのではないかとされている。これらの領域に生じた mutation は現在のところ解析が困難であり, 見逃されている可能性が高い。また, protein S α 遺伝子と protein S β 遺伝子との間で gene conversion が生じているのではないかという説もあり, protein S α 遺伝子のみを選択的に解析することに疑問を投げかけている。

protein S と C4BP の相互作用 (前述) は血液凝固系反応と免疫系反応を直接つなぐユニークな特徴として注目されているが, その生理的意義に関しては未だ明らかでない点も多い。さらに最近, 細胞の分化増殖に関与するビタミン K 依存性蛋白 gas6 と protein S は互いに高い相同性を示すことが判明し³⁷⁾, protein S が細胞の分化増殖に何らかの役割を果たしている可能性が示唆された⁴⁸⁾。この仮説を裏付ける有力な証拠は未だ得られていないが, 今後は protein S は凝固系蛋白としてのみならず, 免疫系および

細胞の分化増殖に関する多機能蛋白として, より一層研究が進められるものと期待される。

文 献

- 1) Comp PC, Esmon CT: Recurrent venous thromboembolism in patients with a partial deficiency of protein S. *N Engl J Med* **311**: 1525-1528, 1984.
- 2) Kamiya T, Sugihara T, Ogata K, Saito H, Suzuki K, Nishioka J, Hashimoto S, Yamagata K: Inherited deficiency of protein S in a Japanese family with recurrent venous thrombosis: a study of three generations. *Blood* **67**: 406-410, 1986.
- 3) Dahlbäck B: Protein S and C4b-binding protein: components involved in the regulation of the protein C anticoagulant system. *Thromb Haemost* **66**: 49-61, 1991.
- 4) Heeb MJ, Mesters RM, Tans G, Rosing J, Griffin JH: Binding of protein S to factor Va associated with inhibition of prothrombinase that is independent of activated protein C. *J Biol Chem* **268**: 2872-2877, 1993.
- 5) Heeb MJ, Rosing J, Bakker HM, Fernández JA, Tans G, Griffin JH: Protein S binds to and inhibits factor Xa. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 2728-2732, 1994.
- 6) Koppelman SJ, Hackeng TM, Sixma JJ, Bouma BN: Inhibition of the intrinsic factor X activating complex by protein S: evidence for a specific binding of protein S to factor VIII. *Blood* **86**: 1062-1071, 1995.
- 7) Dahlbäck B, Frohm B, Nelsetuen G: High affinity interaction between C4b-binding protein and vitamin K-dependent protein S in the presence of calcium. *J Biol Chem* **265**: 16082-16087, 1990.
- 8) Griffin JH, Gruber A, Fernández JA: Reevaluation of total, free and bound protein S and C4b-binding protein levels in plasma anticoagulated with citrate or hirudin. *Blood* **79**: 3203-3211, 1992.
- 9) Nishioka J, Suzuki K: Inhibition of cofactor activity of protein S by a complex of protein S and C4b-binding protein. *J Biol Chem* **265**: 9072-9076, 1990.
- 10) García de Frutos P, Alim RI, Hardig Y, Zöller B,

- Dahlbäck B: Differential regulation of α and β chains of C4b-binding protein during acute-phase response resulting in stable plasma levels of free anticoagulant protein S. *Blood* **84**: 815-822, 1994.
- 11) Giannelli F, Green PM, Sommer SS, Poon MC, Ludwig M, Schwaab R, Reitsma PH, Goossens M, Yoshioka A, Brownlee GG: Haemophilia B (sixth edition): a database of point mutations and short additions and deletions. **24**: 103-118, 1996.
 - 12) 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. *Thromb. Haemost* **73**: 876-889, 1995.
 - 13) Ploos van Amstel HK, Huisman MV, Reitsma PH, Ten Cate JW, Bertina RM: Partial protein S gene deletion in a family with hereditary thrombophilia. *Blood* **73**: 479-483, 1989.
 - 14) Schmidel DK, Nelson RM, Broxson EH, Comp PC, Marlar RA, Long GL: A 5.3-kb deletion including exon XIII of the protein S α gene occurs in two protein S-deficient families. *Blood* **77**: 551-559, 1991.
 - 15) Reitsma PH, Ploos van Amstel HK, Bertina RM: Three novel mutations in five unrelated subjects with hereditary protein S deficiency type I. *J Clin Invest* **93**: 486-492, 1994.
 - 16) Hayashi T, Nishioka J, Shigekiyo T, Saito S, Suzuki K: Protein S Tokushima: Abnormal molecule with a substitution of Glu for Lys-155 in the second epidermal growth factor-like domain of protein S. *Blood* **83**: 683-690, 1994.
 - 17) Borgel D, Gandrille S, Gouault-Heilmann M, Aiach M: First frameshift mutation in the active protein S gene associated with a quantitative hereditary deficiency. *Blood Coagul Fibrinolysis* **5**: 593-600, 1994.
 - 18) Gómez E, Ledford MR, Pegelow CH, Reitsma PH, Bertina RM. Homozygous protein S deficiency due to a one base pair deletion that leads to a stop codon in Exon III of the protein S gene. *Thromb Haemost* **71**: 723-726, 1994.
 - 19) Gandrille S, Borgel D, Eschwege-Gufflet V, Ailaud Mf, Dreyfus M, Matheron C, Gaussem P, Abgrall JF, Jude B, Sie P, Toulon P, Aiach M: Identification of 15 different candidate causal point mutations and three polymorphisms in 19 patients with protein S deficiency using a scanning method for the analysis of the protein S active gene. *Blood* **85**: 130-138, 1995.
 - 20) Gómez E, Poort SR, Bertina RM, Reitsma PH: Identification of eight point mutations in protein S deficiency type I-analysis of 15 pedigrees. *Thromb Haemost* **73**: 750-755, 1995.
 - 21) Yamazaki T, Hamaguchi M, Katsumi A, Kagami K, Kojima T, Takamatsu J, Saito H: A quantitative protein S deficiency associated with a novel nonsense mutation and markedly reduced levels of mutated mRNA. *Thromb Haemost* **74**: 590-595, 1995.
 - 22) Formstone CJ, Wacey AI, Berg LP, Rahman S, Bevan D, Rowley M, Voke J, Bernardi F, Legnani C, Simioni P, Girolami A, Tuddenham EGD, Kakkar VV, Cooper DN: Detection and characterization of seven novel protein S (PROS) gene lesions: evaluation of reverse transcript-polymerase chain reaction as a mutation screening strategy. *Blood* **86**: 2632-2641, 1995.
 - 23) Mustafa S, Pabinger I, Mannhalter C: Protein S deficiency type I: identification of point mutations in 9 of 10 families. *Blood* **86**: 3444-3451, 1995.
 - 24) Duchemin J, Borg JY, Borgel D, Vasse M, Lévêque H, Aiach M, Gandrille S: Five novel mutations of the protein S active gene (PROS1) in 8 Norman families. *Thromb Haemost* **75**: 437-444, 1996.
 - 25) Yamazaki T, Katsumi A, Kagami K, Okamoto Y, Sugiura I, Hamaguchi M, Kojima T, Takamatsu J, Saito H: Molecular basis of a hereditary type I protein S deficiency caused by a substitution of Cys for Arg474. *Blood* **87**: 4643-4650, 1996.
 - 26) Okamoto Y, Yamazaki T, Katsumi A, Kojima T, Takamatsu J, Nishida M, Saito H: A novel nonsense mutation associated with an exon skipping in a patient with hereditary protein S defi-

- ciency type I. *Thromb Haemost* **75**:877-882, 1996.
- 27) Andersen BD, Lind B, Philips M, Hansen AB, Ingerslev J, Thorsen S: Two mutations in exon XII of the protein S α gene in four thrombophilic families resulting in premature stop codons and depressed levels of mutated mRNA. *Thromb Haemost* **76**:143-150, 1996.
- 28) Schmidel DK, Tatro AV, Phelps LG, Tomczak JA, Long GL: Organization of the human protein S genes. *Biochemistry* **29**:7845-7852, 1990.
- 29) Cooper DN: Human gene mutations affecting RNA processing and translation. *Ann Med* **25**:11-17, 1993.
- 30) Krawczak M, Reiss J, Cooper DN: The mutational spectrum of single base-pair substitutions in mRNA splice junctions of human genes: causes and consequences. *Hum Genet* **90**:41-51, 1992.
- 31) Hoskins J, Norman DK, Beckmann RJ, Long GL: Cloning and characterization of human liver cDNA encoding a protein S precursor. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**:349-353, 1987.
- 32) Dahlbäck B, Lundwall, Stenflo J: Primary structure of bovine vitamin K-dependent protein S. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**:4199-4203, 1986.
- 33) Greengard JS, Fernández JA, Radtke KP, Griffin JH: Identification of candidate residues for interaction of protein S with C4b binding protein and activated protein C. *Biochem J* **305**:397-403, 1995.
- 34) He X, Dahlbäck B: Molecular cloning, expression and functional characterization of rabbit anticoagulant vitamin-K-dependent protein S. *Eur J Biochem* **217**:857-865, 1993.
- 35) Chu MD, Sun J, Bird: Cloning and sequencing of a cDNA encoding the murine vitamin K-dependent protein S. *Biochem Biophys Acta* **1217**:325-328, 1994.
- 36) Yasuda F, Hayashi T, Tanitame K, Nishioka J, Suzuki K: Molecular cloning and functional characterization of rat plasma protein S. *J Biochem* **117**:374-383, 1995.
- 37) Manfioletti G, Brancolini C, Avanzi G, Schneider C: The protein encoded by a growth arrest-specific gene (gas6) is a new member of the vitamin K-dependent proteins related to protein S, a negative coregulator in the blood coagulation cascade. *Mol Cell Biol* **13**:4976-4985, 1993.
- 38) Gershagen S, Fernlund P, Lundwall A: A cDNA coding for human sex hormone binding globulin; Homology to vitamin K-dependent protein S. *FEBS Lett* **220**:129-135, 1987.
- 39) Joseph DR, Hall SH, French FS: Rat androgen-binding protein: Evidence for identical subunits and amino acid sequence homology with human sex hormone binding globulin. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**:339-343, 1987.
- 40) Joseph DR, Baker ME: Sex hormone-binding globulin, androgen-binding protein, and vitamin K-dependent protein S are homologous to laminin A, merosin, and *Drosophila* crumbs protein. *FASEB J* **6**:2477-2481, 1992.
- 41) Hayashi T, Nishioka J, Suzuki K: Molecular mechanism of the dysfunction of protein S (Tokushima) (Lys155 $\rightarrow$ Glu) for the regulation of the blood coagulation system. *Biochim Biophys Acta* **1272**:159-167, 1995.
- 42) Yamazaki T, Sugiura I, Matsushita T, Kojima T, Kagami K, Takamatsu J, Saito H: A phenotypically neutral dimorphism of protein S: the substitution of Lys155 by Glu in the second EGF domain predicted by an A to G base exchange in the gene. *Thromb Res* **70**:395-403, 1993.
- 43) Bertina RM, Ploos van Amstel HK, Van Wijnngaarden A, Coenen J, Leemhuis MP, Deutz-Terlouw PP, Van der Linden IK, Reitsma PH: Heerlen polymorphism of protein S, an immunologic polymorphism due to dimorphism of residue 460. *Blood* **76**:538-548, 1990.
- 44) Duchemin J, Gandrille S, Borgel D, Feurgard P, Alhenc-Gelas M, Matheron C, Dreyfus M, Dupuy E, Juhan-Vague I, Aiach M: The Ser 460 to Pro substitution of the protein S α (PROS1) gene is a frequent mutation associated with free protein S (type IIa) deficiency. *Blood* **86**:3436-3443, 1995.
- 45) Zöller B, García de Frutos P, Dahlbäck B: Evaluation of the relationship between protein S and

- C4b-binding protein isoforms in hereditary protein S deficiency demonstrating type I and type III deficiencies to be phenotypic variants of the same genetic disease. *Blood* **85**: 3524-3531, 1995.
- 46) Yamazaki T, Hamaguchi M, Takamatsu J, Okamoto Y, Katsumi A, Kagami K, Sugiura I, Kojima T, Saito H: Analysis for heterozygosity of protein S mRNA: application to genetic screening and family studies in hereditary protein S deficiency. *Int J Hematol* **64**: 119-125, 1996.
- 47) Dietz HC, Valle D, Francomano CA, Kendzior RJ Jr, Pyeritz RE, Cutting GR: The skipping of constitutive exons in vivo induced by nonsense mutations. *Science* **259**: 680-683, 1993.
- 48) Stitt TN, Conn G, Gore M, Lai C, Bruno J, Radziejewski C, Mattsson K, Fisher J, Gies DR, Jones PF, Masiakowski P, Ryan TE, Tobkes NJ, Chen DH, DiStefano PS, Long GL, Basilico C, Goldfarb MP, Lemke G, Glass DJ, Yancopoulos GD: The anticoagulation factor protein S and its relative, Gas6 are ligands for the Tyro 3/Axl family of receptor tyrosine kinases. *Cell* **80**: 661-670, 1995.
-